

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Annelisa Farah Silva Paes Leme**

**REVESTIMENTO ANTIBIOFILME PARA SUPERFÍCIES DE  
DISPOSITIVOS MÉDICO-HOSPITALARES**

Juiz de Fora  
2014

**ANNELISA FARAH SILVA PAES LEME**

**REVESTIMENTO ANTIBIOFILME PARA SUPERFÍCIES DE  
DISPOSITIVOS MÉDICO-HOSPITALARES**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nádia Rezende Barbosa Raposo**  
**Co-orientador: Prof. Dr. Murilo Gomes Oliveira**

Juiz de Fora  
2014

**ANNELISA FARAH SILVA PAES LEME**

**REVESTIMENTO ANTIBIOFILME PARA SUPERFÍCIES DE  
DISPOSITIVOS MÉDICO-HOSPITALARES**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Aprovada em 14 de fevereiro de 2014.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nádia Rezende Barbosa Raposo (Orientadora)  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Frederico Pittella Silva  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Padula Alves Vieira  
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Rafael Cypriano Dutra  
Universidade Federal de Santa Catarina

*“A persistência é o menor caminho do êxito”.*

*(Charles Chaplin)*

*“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”.*

*(John F. Kennedy)*

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

*(Marthin Luther King)*

*“Comece fazendo o necessário, depois o possível, e de repente  
você estará fazendo o impossível”.*

*(São Francisco de Assis)*

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, base da minha vida.

Aos meus pais, Artur e Cristina, que sempre acreditaram em mim, me apoiando e aconselhando sempre que preciso. Orgulho-me da criação recebida, essencial para que eu me formasse, pessoal e profissionalmente. Sou eternamente grata pelo amor incondicional, pelos exemplos e pelos ensinamentos concedidos.

À minha querida irmã Cecília, que está sempre ao meu lado, aprendendo e crescendo junto comigo. Que me apoia no que eu preciso, com muito carinho e prontidão.

Ao meu marido, Tide, meu companheiro de todas as horas, meu ponto de equilíbrio. Sua paciência, compreensão e sua forma positivista de enfrentar as dificuldades encontradas foram determinantes para que eu chegasse até aqui.

À toda a minha família, em especial, à minha avó Ninita e ao meu avô Abdo e e avó Ernesta (presentes para sempre em meu coração), grandes exemplos de vida, de luta e de perseverança. Vocês são a base de tudo e a inspiração para que possamos seguir em frente.

## AGRADECIMENTOS

"A gratidão é a lembrança do coração". Ao longo da nossa trajetória sempre existem aquelas pessoas que são verdadeiros "anjos da guarda", que nos ajudam, incentivam, torcem pelo nosso sucesso, e sem as quais grande parte dos nossos objetivos dificilmente seriam alcançados. Surge, então, este trabalho – fruto não só de um esforço individual, mas também de significativas contribuições (fundamentais a essa construção) que conquistei ao longo de minha trajetória acadêmica.

Ciente da impossibilidade de listar todos que de uma forma ou de outra contribuíram para que eu chegasse até aqui, destaco aqueles que acrescentaram conhecimentos e experiências em minha vida e que serão para sempre por mim lembrados:

À CAPES e a UFJF pela bolsa concedida durante parte do doutorado.

Agradeço à minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nádia Raposo, por todos estes anos de convivência e aprendizado. Pela oportunidade de desenvolver este e vários outros trabalhos, pelos ensinamentos passados e pela confiança depositada. Obrigada pelas inúmeras e produtivas conversas que tanto contribuíram para meu amadurecimento científico e pessoal.

Ao Prof. Dr. Murilo Oliveira, meu co-orientador, à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita Padula, à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Braga, à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Chicourel e aos professores da PGC BIO pela amizade, pelo apoio e pelos conhecimentos transmitidos. Em especial, à Beth, tão importante neste período, por permitir que eu crescesse academicamente e por me incentivar na luta diária. Obrigada pela sua amizade!

Agradeço também, à Prof<sup>a</sup>. Francine, pelas aulas de inglês e assessoria nas correções de artigos. Ao Prof. Dr. Rogério Faria pela ajuda nas análises histológicas. À Noêmia Rodrigues, do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer (UFRJ) e à Amanda Garcez, do Centro de Microscopia Eletrônica de Varredura (Museu Nacional - UFRJ) pelo auxílio nas análises microscópicas e pelo carinho e atenção com que sempre me receberam. Ao Prof. Dr. Murilo Oliveira e à Bruna Azevedo, residente do Laboratório de Análises Clínicas Maurílio Baldi do Hospital Universitário (UFJF), pelo auxílio nas análises microbiológicas e pela doação das cepas clínicas. À Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello pela doação das cepas ATCC utilizadas neste estudo.

Meu agradecimento, ainda, à todos os amigos do NIQUA (FF/UFJF) que muito me ajudaram nos ensaios de MIC, nos ensaios *in vivo* e nos projetos paralelos: à Aline, Karla, Raquel, Thamires, Rebeca, Romário, Paula, Dirceu, Camila, Virgínia, Kauana e Hudson. Em especial à Fatinha, Natália, Edilene, Érika, Pedro, Dani e Fernanda, grandes amigos que eu conquistei neste período e que fizeram parte, sem dúvida alguma, dos melhores momentos desta jornada. O apoio e a ajuda direta de vocês, foram impensáveis para a conclusão do doutorado. Obrigada pelas conversas, pelos nossos encontros, pela disponibilidade em me ajudar. Levarei vocês sempre no meu coração! Agradeço também aos meus amigos, não diretamente relacionados à área acadêmica, pela amizade, torcida e por entenderem minhas ausências.

À toda minha família, em especial, meus pais Artur e Cristina, minha irmã Cecília e meu marido Tide, pelo amor, pela compreensão, pelo equilíbrio e por me incentivarem em todos os momentos.

E, finalmente, agradeço a Deus, pela Sua presença e Sua proteção. Por ter conduzido e abençoado toda minha trajetória acadêmica, abrindo os caminhos, iluminando minhas decisões e propiciando grandes oportunidades em minha vida.

## RESUMO

Biofilmes associados a dispositivos médicos são responsáveis por 85% das infecções de corrente sanguínea relacionadas a catéteres (ICSRC). O objetivo deste trabalho foi testar duas formulações, como revestimento para catéteres venosos centrais (CVC), as quais tiveram a eficácia antimicrobiana e antiaderente avaliadas *in vitro* e a eficácia e biocompatibilidade, *in vivo*. A atividade antimicrobiana foi determinada por método turbidimétrico e a concentração inibitória mínima (CIM) foi estabelecida. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) avaliou a propriedade antiaderente dos CVC revestidos com a formulação 1 (CVC-R1) e formulação 2 (CVC-R2), comparados aos não revestidos (CVC-NR). Implantes subcutâneos foram inseridos na área dorsal de ratos. O primeiro ensaio compreendeu análises hematológicas e microbiológicas (hemocultura e colonização das superfícies de CVC), a fim de avaliar a eficácia dos revestimentos. A biocompatibilidade foi avaliada no segundo ensaio pela observação das reações inflamatórias após 7 e 21 dias. Ambas formulações apresentaram atividade antimicrobiana frente a todas as cepas testadas. A desagregação do biofilme, com redução significativa da aderência microbiana, foi observada em ambos CVC revestidos. *In vivo*, foi observada maior eficácia antibiofilme de CVC-R2, com redução da colonização por *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. As reações teciduais provocadas por CVC-R1 e CVC-R2 foram mais pronunciadas inicialmente, contudo, ao longo do experimento, se tornaram estatisticamente semelhantes às do CVC-NR. Ambas as formulações foram biocompatíveis, com maior velocidade de reparo tecidual no grupo CVC-R2. O uso de CVC- R1 e, especialmente de CVC-R2, pode diminuir a incidência de ICSRC. Acredita-se que CVC-R2 apresenta potencial para ser testado clinicamente.

Palavras-chave: Aderência bacteriana. Biofilmes. Catéteres. Infecções relacionadas a catéter. Prevenção & controle.

## ABSTRACT

Device-associated biofilms are responsible for 85% of catheter-related bloodstream infections (CRBSI). The aim of this study was investigate two formulations, as central venous catheters (CVC) coating, which were submitted to *in vitro* evaluation of antimicrobial and anti-adherent efficacy and *in vivo* evaluation of efficacy and biocompatibility. The antimicrobial activity was assessed by turbidimetric method and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. The scanning electron microscopy (SEM) was used to assess the anti-adherent property of CVC coated with formulation 1 (CVC-R1) and formulation 2 (CVC-R2), in comparison to uncoated CVC fragments (CVC-NR). Subcutaneous implants were inserted into the dorsal area of rats. The first assay consisted in hematological and microbiological analysis (hemoculture and CVC surfaces colonization) in order to evaluate the coatings effectiveness. The second assay evaluated the biocompatibility by the observation of inflammatory reactions after 7 and 21 days. Both formulations showed antimicrobial activity against all tested strains. The biofilm disaggregation, with reduction in microbial adherence, was noted in coated catheters. *In vivo* results showed greater antibiofilm efficacy of CVC-R2 since a reduction of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 colonization was observed. The tissue reactions of CVC-R1 and CVC-R2 groups were initially more pronounced, however, throughout the experiment, the histological parameters have become statistically similar those found in CVC-NR group. Both formulations were biocompatible and a higher speed of tissue repair in CVC-R2 group was noted. The use of CVC- R1, and especially of CVC-R2, may reduce the development of CRBSI, and thereby, CVC-R2 have potential to be clinically tested.

Keywords: Bacterial adhesion. Biofilms. Catheters. Catheter-related infections. Prevention & control.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais dispositivos médicos utilizados no corpo humano.....	23
Figura 2	Ilustração esquemática de um catéter venoso central.....	25
Figura 3	Classificação de catéteres de acesso venoso central de acordo com: A) finalidade de uso, B) quantidade de lúmens.....	26
Figura 4	Biofilme em desenvolvimento em torno de um catéter de látex revestido por prata.....	28
Figura 5	Superfície externa de catéter venoso central fotografada por microscopia eletrônica de varredura.....	29
Figura 6	Etapas de formação do biofilme bacteriano.....	31
Figura 7	Esquema das vias de colonização de um catéter.....	36
Figura 8	Estratégias para evitar a formação de biofilme microbiano em dispositivos médicos implantáveis.....	44
Figura 9	Estrutura molecular do xilitol (1,2,3,4,5-penta-hidroxipentano)....	46
Figura 10	Estrutura molecular do triclosan (éter 2,4,4'-triclora-2'-hidroxi-difenílico).....	50
Figura 11	Estrutura molecular da polihexametileno biguanida (PHMB) ( $C_8H_{18}N_5$ ) <sub>n</sub> .....	51
Figura 12	Imagens ilustrativas dos fragmentos de catéter venoso central (CVC) antes e após ao revestimento com as formulações-teste. A) CVC não revestido (CVC-NR), B) CVC revestido com a formulação 1 (CVC-R1) e C) CVC revestido com a formulação 2 (CVC-R2).....	55

Figura 13	Fluxograma ilustrativo da metodologia de estudo.....	56
Figura 14	Imagem representativa da incisão (1 cm) e da inserção do fragmento de catéter venoso central (CVC) (2,5cm) na loja cirúrgica no dorso do animal.....	61
Figura 15	Eletromicrografias da superfície externa de fragmentos de CVC-NR, CVC-R1 e CVC-R2 após contato com <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	66
Figura 16	Eletromicrografias da superfície externa de fragmentos de CVC-NR, CVC-R1 e CVC-R2 após contato com <i>Escherichia coli</i> clínica.....	67
Figura 17	Eletromicrografias da superfície externa de fragmentos de CVC-NR, CVC-R1 e CVC-R2 após contato com <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	67
Figura 18	Fotografias dos tecidos ao redor do implante do fragmento de catéter venoso central (CVC).....	69
Figura 19	Fotografias das placas de ágar sangue utilizadas para avaliação da contaminação da face externa dos fragmentos de catéter venoso central (CVC).....	73
Figura 20	Fotografias dos tubos de tioglicolato utilizados para avaliação da contaminação da face interna dos fragmentos de catéter venoso central (CVC).....	73
Figura 21	Imagens representativas da análise microscópica realizada no tecido ao redor dos implantes de catéter venoso central.....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Interferência do xilitol na expressão de diferentes genes.....	49
Tabela 2	Concentração inibitória mínima (CIM) e tipo de atividade antimicrobiana demonstrada pelas formulações e pelos fármacos de referência, frente alguns micro-organismos frequentemente envolvidos em infecções de corrente sanguínea relacionadas à catéter (ICSRC).....	65
Tabela 3	Ganho de peso e consumo de ração dos animais durante a avaliação da eficácia antimicrobiana/antibiofilme.....	69
Tabela 4	Parâmetros hematológicos dos animais durante a avaliação da eficácia antimicrobiana/antibiofilme.....	70
Tabela 5	Resultados da análise microbiológica das superfícies externa e interna de fragmentos de catéter venoso central (CVC) implantados nos animais durante o ensaio de avaliação da eficácia antimicrobiana/antiaderente: detecção e identificação de micro-organismos colonizadores.....	72
Tabela 6	Ganho de peso e consumo de ração dos animais durante o ensaio de biocompatibilidade tecidual.....	75
Tabela 7	Parâmetros hematológicos dos animais no ensaio de biocompatibilidade tecidual.....	77
Tabela 8	Parâmetros histopatológicos obtidos após avaliação microscópica do tecido ao redor dos fragmentos de catéter venoso central implantados nos animais durante o ensaio de biocompatibilidade tecidual.....	79

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Diferentes materiais e seus empregos em dispositivos médicos..	21
Quadro 2	Classificação das infecções de corrente sanguínea ocorridas em 2006 nos Estados Unidos da América, quanto ao tipo de acesso.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	<i>Antibiotic lock therapy</i> (Terapia de bloqueio com antibiótico)
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APIC	<i>Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAP	<i>Biofilm-associated proteins</i> (Proteína associada a produção de biofilme)
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Caldo de infusão de cérebro e coração)
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
CH-SS	Clorexidina e sulfadizina de prata
CIM	Concentração inibitória mínima
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CVC	Catéter venoso central
CVC-R1	Catéter venoso central revestido com a formulação 1
CVC-R2	Catéter venoso central revestido com a formulação 2
CVC-NR	Catéter venoso central não revestido
CVP	Catéter venoso periférico
DATASUS	Banco de dados do Sistema Único de Saúde
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELT	<i>Ethanol lock therapy</i> (Terapia de bloqueio com etanol)
EPS	<i>Extracellular polymeric substances</i> (Polissacarídeos extracelulares)
ERV	<i>Enterococcus</i> spp resistentes à vancomicina
FF	Faculdade de Farmácia
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICSRC	Infecções de corrente sanguínea relacionadas a catéter
IH	Infecção hospitalar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MHB	<i>Mueller Hinton Broth</i> (Caldo <i>Mueller Hinton</i> )
MRSA/SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina
MSSA/SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensíveis à meticilina

NaCl	Cloreto de sódio
NIQUA	Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica
NNIS	<i>National Nosocomial Infections Surveillance</i>
PHMB	<i>Polyhexamethylene biguanide</i> (Biguanida de polihexametileno)
PVC	Policloreto de vinil
SDA	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (Ágar dextrose Sabouraud)
SDB	<i>Sabouraud Dextrose Broth</i> (Caldo dextrose Sabouraud)
SPSS	<i>Statistical Software Package for the Social Sciences</i>
TSA	<i>Tryptone Soy Agar</i> (Ágar triptona de soja)
TSB	<i>Tryptone Soy Broth</i> (Caldo triptona de soja)
UFCs	Unidades formadoras de colônias
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UTI	Unidade de tratamento intensivo

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
2.1 BIOMATERIAIS.....	19
<b>2.1.1 Dispositivos implantáveis na área médica</b> .....	22
2.1.1.1 Catéter venoso central .....	24
<b>2.1.2 Biofilmes em biomateriais</b> .....	27
2.1.2.1 Etapas da formação de biofilme .....	30
2.2 INFECÇÕES HOSPITALARES.....	33
<b>2.2.1 Infecção de corrente sanguínea relacionada a catéter</b> .....	35
2.2.1.1 Espécies microbianas frequentemente envolvidas em ICSRC.....	37
2.2.1.2 Estratégias para Prevenção de ICSRC.....	38
2.2.1.2.1 <i>Catéteres revestidos disponíveis no mercado</i> .....	41
2.3 REVESTIMENTO ANTIBIOFILME INOVADOR.....	42
<b>2.3.1 Agentes com ação antiaderente</b> .....	45
<b>2.3.2 Agentes com ação antimicrobiana</b> .....	49
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	53
3.1 GERAL.....	53
3.2 ESPECÍFICOS.....	53
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	54
4.1 BIOMATERIAL.....	54
4.2 MICRO-ORGANISMOS.....	54
4.3 FORMULAÇÕES.....	55
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	56
<b>4.4.1 Ensaios <i>in vitro</i></b> .....	57
4.4.1.1 Atividade antimicrobiana.....	57
4.4.1.2 Atividade antiaderente.....	58
<b>4.4.2 Ensaios <i>in vivo</i></b> .....	59
4.4.2.1 Avaliação da eficácia antimicrobiana/antibiofilme.....	59
4.4.2.2 Avaliação da biocompatibilidade tecidual .....	62
4.4.2.3 Análise estatística .....	63
<b>5 RESULTADOS</b> .....	64

5.1 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> .....	64
5.1.1 Atividade antimicrobiana.....	64
5.1.2 Atividade antiaderente.....	66
5.2 ENSAIOS <i>IN VIVO</i> .....	68
5.2.1 Avaliação da eficácia antimicrobiana/antibiofilme .....	68
5.2.2 Avaliação da biocompatibilidade tecidual .....	74
6 DISCUSSÃO.....	81
7 CONCLUSÃO.....	95
8 PERSPECTIVAS.....	96
REFERÊNCIAS .....	97
ANEXO A.....	117
ANEXO B.....	118
ANEXO C.....	119
ANEXO D.....	120
ANEXO E.....	121
ANEXO F.....	122
ANEXO G.....	123
ANEXO H.....	124
ANEXO I.....	125
ANEXO J.....	126
ANEXO L.....	127
ANEXO M.....	128
ANEXO N.....	151

# 1 INTRODUÇÃO

O aparecimento cada vez mais constante de bactérias resistentes a múltiplas drogas desperta grande preocupação na comunidade científica, uma vez que muitos dos tratamentos disponíveis têm se tornado inefetivos (CHIFIRIUC et al., 2012). O prognóstico desse quadro torna-se ainda pior quando são consideradas espécies bacterianas capazes de se organizarem em agregados denominados biofilmes (BURMOLE et al., 2010).

Bactérias formadoras de biofilmes têm alta tolerância aos agentes antimicrobianos e, portanto, são responsáveis por infecções notoriamente mais difíceis de serem erradicadas. Isso ocorre devido à inacessibilidade ou à baixa penetração com que as moléculas dos fármacos e as células do sistema imune atingem as estruturas do biofilme (CARSON, GORMAN e GILMORE, 2010). *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Staphylococcus coagulase-negativa* são exemplos de micro-organismos formadores de biofilme e frequentemente envolvidos em casos graves de infecção (DWYER, 2008).

Estima-se que cerca de 60% a 85% de todas as infecções bacterianas envolvam a formação de biofilmes em tecidos – pele, mucosas, epitélio endotelial e dentes – ou em produtos designados como dispositivos médicos implantáveis (CHIFIRIUC et al., 2012). O termo “dispositivos médicos” abrange uma vasta gama de instrumentos de saúde utilizados direta ou indiretamente em Medicina, Odontologia, Fisioterapia e em práticas de laboratório para o diagnóstico, reabilitação, terapia e acompanhamento (MACHADO et al., 2011). Dentre os diferentes tipos de dispositivos médicos implantáveis, o catéter venoso central (CVC) merece destaque pela alta frequência com que é usado, podendo ser considerado como essencial para pacientes que recebem hemodiálise, quimioterapia e/ou nutrição parenteral (NEVES JÚNIOR et al., 2010).

Assim, biofilmes associados a esses dispositivos são considerados causa primária de infecções hospitalares, representando uma ameaça tanto ao hospedeiro, quanto à equipe de saúde. Dentre elas, merecem destaque as infecções sanguíneas relacionadas a catéter (ICSRC) (WANG et al., 2011; CHAUHAN et al., 2012;

COBRADO et al., 2013).

A eliminação destes biofilmes consiste em outra complicação. O único método eficaz e disponível até o momento envolve a remoção traumática do dispositivo contaminado. A realização deste procedimento invasivo implica em terapia farmacológica adicional e no aumento do tempo de internação, resultando em um maior risco de morbimortalidade para o paciente e no aumento do custo total do tratamento (BADDOUR et al., 2010).

Diante deste quadro e dos prejuízos socioeconômicos relacionados às infecções causadas por bactérias formadoras de biofilme, torna-se necessária a elaboração de estratégias profiláticas eficientes que possam impedir a colonização dos dispositivos médico-hospitalares e, conseqüentemente, o surgimento de infecções de tratamento dificultoso (CHAUHAN et al., 2012).

Inúmeros revestimentos antisépticos ou antibióticos para catéteres têm sido pesquisados na tentativa de reduzir a frequência de ICSRC (DWYER, 2008; FRANCOLINI e DONELLI, 2010; COENYE e NELIS, 2010; SIMÕES, 2011; COBRADO et al., 2013). No entanto, muitas das novas propostas não têm demonstrado eficácia clínica suficiente para serem utilizadas como substitutas para os catéteres tradicionais (DONELLI, 2006). Outras alternativas são o desenvolvimento de biomateriais com material anti-adesivo ou a incorporação de revestimentos que reduzam a aderência bacteriana (CHIFIRIUC et al., 2012).

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar duas formulações inovadoras, uma composta por xilitol, triclosan e PHMB (formulação 1) e outra por xilitol e triclosan (formulação 2) como possíveis opções para revestimento de biomateriais. A realização do mesmo justifica-se pela busca de uma alternativa inédita e eficaz contra a formação de biofilmes em dispositivos médico-hospitalares.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 BIOMATERIAIS

Chim e Gossaim (2009) definem biomaterial como qualquer material, natural ou artificial, que compreende o todo, ou uma parte de uma estrutura viva, ou um dispositivo biomédico com a finalidade de executar, acrescentar ou substituir uma função natural.

Outro conceito para biomaterial corrobora a assertiva anterior: "uma substância que tenha sido projetada para assumir uma forma que, por si só ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar, pelo controle das interações com componentes vitais, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico" (WILLIAMS, 2009). Por este motivo, os biomateriais têm um enorme impacto sobre o tratamento de lesões e doenças (KHUN, 2005). Portanto, a escolha de um biomaterial é de grande importância no momento de elaboração de um dispositivo médico, pois deve incorporar aspectos físicos, químicos e biológicos para ser empregado com sucesso. Em geral, estes constituintes devem provocar pouca ou nenhuma resposta imune do hospedeiro, sendo, portanto, biocompatíveis (VEPARI e KAPLAN, 2007).

A biocompatibilidade, conceitualmente, é definida como a capacidade de um biomaterial, presente em próteses ou quaisquer outros dispositivos médicos, induzir uma resposta apropriada no hospedeiro após sua aplicação. É estabelecida com base na avaliação das respostas biológicas do indivíduo ao dispositivo implantado e permite determinar se o mesmo não apresenta nenhum risco significativo ao usuário. Assim, antes de ser utilizado, um biomaterial necessita ser submetido a testes de biocompatibilidade, avaliando as condições que simulam seu uso clínico (ANDERSON, 2012).

Deste modo, as reações imunológicas desencadeadas por biomateriais também são um ponto de consideração importante (FRANZ et al., 2011). Sobre este aspecto, Junge e colaboradores (2012) citaram que modificações do polímero utilizado, no peso do material e na sua estrutura podem ser realizadas e têm efeitos

substanciais na biocompatibilidade *in vivo*.

O implante de um biomaterial é sempre acompanhado por lesão do tecido ou órgão, a partir da qual inicia-se uma resposta inflamatória ao biomaterial implantado, com a formação, inicialmente, de uma matriz provisória. Além disso, há o surgimento de uma reação imunológica adaptativa. Quando os dispositivos aplicados são degradáveis, a resposta imune também pode ser afetada pelos seus produtos de degradação (FRANZ et al., 2011). Isto se deve porque não existe um material adequado para todas as aplicações, conforme demonstrado no Quadro 1.

A cada ano, milhões de vidas são salvas e a qualidade de vida dos indivíduos é melhorada devido ao uso dos biomateriais. Esses representam, portanto, um campo de contínuo crescimento, sendo uma área promissora para a pesquisa e inovação. Há ainda muitas dúvidas a cerca da resposta biológica dos biomateriais, as quais continuam a motivar a investigação neste sentido, bem como o desenvolvimento de novos produtos (KUHN, 2005). Dessa forma, tornam-se necessários novos estudos em torno das aplicações de biomateriais que acompanhem os avanços atuais da Medicina.

**Quadro 1.** Diferentes materiais e seus empregos em dispositivos médicos.

<b>Dispositivos médicos</b>	
<b>Metal</b>	
Áço inoxidável	Próteses, fixação de fratura óssea, válvulas cardíacas e eletrodos
Titânio e ligas de titânio	Próteses, pontes e implantes dentários, stents coronários
Ligas de cromo-cobalto	Próteses, fixação de fratura óssea
Ouro	Obturações dentárias e coroas, eletrodos
Prata	Fios de marcapasso, materiais de sutura, amálgamas dentárias
Platina	Eletrodos, dispositivos de estimulação neural
<b>Cerâmicas</b>	
Óxido de alumínio	Implantes de quadril, implantes dentários, substituição coclear
Zirconia	Implantes de quadril
Fosfato de cálcio	Enxertos ósseos, revestimento das superfícies das articulações
Sulfato de cálcio	Substitutos ósseos
Carbono	Revestimento de válvulas cardíacas, implantes ortopédicos
Vidro	Substitutos ósseos, fios de materiais odontológicos
<b>Polímeros</b>	
Nylon	Suturas cirúrgicas, segmentos gastrintestinais, tubos traqueais
Silicone	Articulações de dedos, pele artificial, implantes mamários, lentes intra-oculares, catéteres
Poliéster	Suturas absorvíveis, fixação da fratura, revestimentos para feridas, dispositivos de liberação de drogas
Polietileno	Implantes artificiais de quadril e joelho, tendões e ligamentos, enxertos sintéticos vasculares, próteses e implantes faciais
Polimetilmetacrilato	Cimento ósseo, as lentes intra-oculares
Policloreto de vinil (PVC)	Próteses faciais e tubos
<b>Materiais Naturais</b>	
Colágeno e gelatina	Cirurgia estética, curativos, engenharia de tecidos
Celulose	Dispositivo de liberação de drogas
Quitina	Curativos, dispositivos de liberação de drogas
Cerâmicas ou cerâmicas desmineralizadas	Substitutos de enxerto ósseo
Alginate	Encapsulação celular, dispositivo de liberação de drogas
Ácido hialurônico	Prevenção de aderências pós-operatória, lubrificante oftálmico e ortopédico, dispositivo de liberação de medicamentos

Fonte: Adaptado de KUHN (2005).

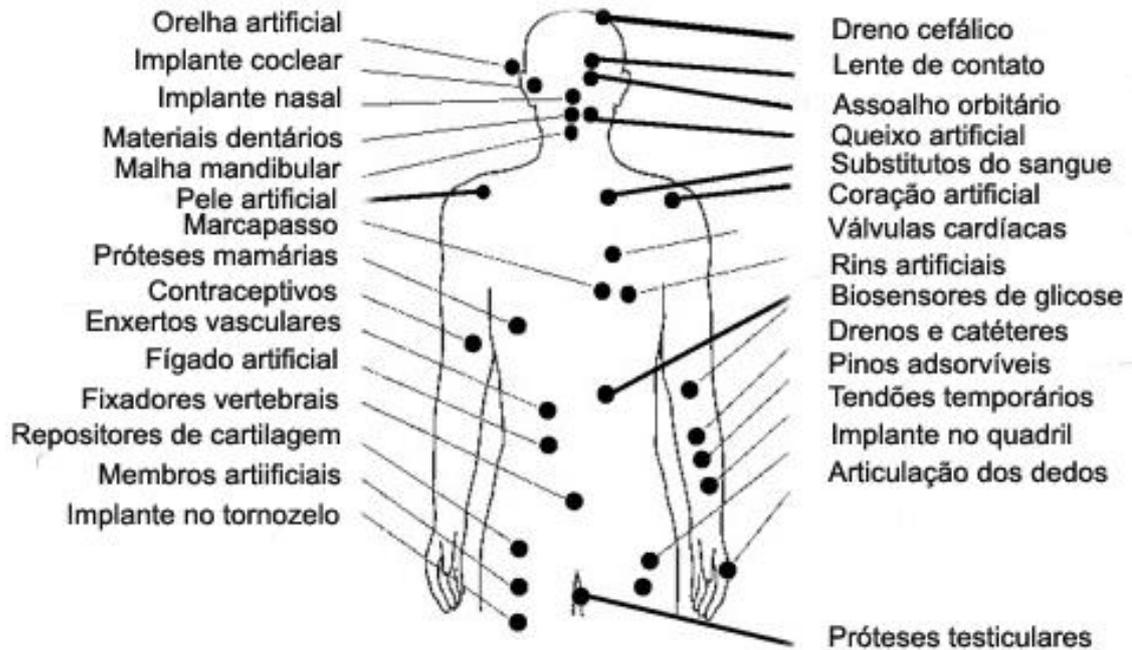
Para Bath e Kumar (2013), o progresso atual na área da bioengenharia e na pesquisa de novos biomateriais permitirão a elaboração, no futuro, de diversos tecidos e órgãos para pacientes que se encontram nas filas de espera de transplantes. O objetivo da engenharia de órgãos é a construção de substitutos biológicos que irão restaurar e manter a função normal em tecidos doentes e feridos. Avanços recentes no estudo da biologia de células-tronco, biomateriais, entre outros, já resultaram na geração de bioengenharia de vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fígado, rins, bexigas e vias respiratórias (MURPHY e ATALA; 2012).

No entanto, para Raman e colaboradores (2012), as pesquisas de avaliação dos dispositivos atuais encontram-se desatualizadas em relação às inovações que surgiram neste campo. Em levantamento realizado pelos mesmos autores, identificou-se cinco grupos principais de dispositivos médicos implantáveis como temas de interesse para a avaliação e publicação de revisões sistemáticas, sendo eles: cardiovasculares, vasculares intervencionistas, implantes ortopédicos, enxertos de reposição de pele e neuroestimuladores.

Bath e Kumar (2013) citam um considerável progresso em métodos diagnósticos existentes e em novos métodos desenvolvidos para oferecer resultados mais rápidos e precisos. Com isso, afirmam que o progresso atual em biomateriais permitirá, dentro de poucos anos, cuidados à saúde disponíveis a um preço acessível e com melhor desempenho.

### **2.1.1 Dispositivos implantáveis na área médica**

O avanço na área dos biomateriais permitiu a elaboração de diversos dispositivos de grande utilidade na área médica. Além de serem empregados no tratamento de patologias, traumas e outros, também se tornaram relevantes nas cirurgias (incluindo procedimentos estéticos), no setor farmacêutico, dentre outros (MAIA et al., 2010; MACHADO et al., 2011). Muitas utilidades podem ser descritas com relação aos dispositivos médicos implantáveis disponíveis atualmente (Figura 1) (KHUN, 2005).



**Figura 1.** Principais dispositivos médicos utilizados no corpo humano. Fonte: Adaptado de KUHN (2005).

Quanto à aplicação, Nascimento e colaboradores (2007) classificaram os dispositivos médicos como sendo de contato ou permanentemente implantados no corpo. Este critério trata-se de um dos requisitos para a seleção do material utilizado de acordo com a aplicação específica para a qual o dispositivo foi projetado.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2009), todos os dispositivos médicos são regulados pelo Ministério da Saúde, nos termos do artigo 12 da Lei nº 6360, de 23 de setembro de 1976, publicada em 24 de Setembro de 1976, artigo que regulamenta a fabricação, o uso e a venda de dispositivos médicos no Brasil.

Na indústria farmacêutica, a conjugação de fármacos com biomoléculas desempenha um papel importante na liberação controlada de princípios ativos. Deste modo, obtém-se formulações que resultarão em níveis sustentados da droga no organismo, levando a uma melhor eficácia da mesma (VILLANOVA, ORÉFICE e CUNHA, 2010). Neste mesmo sentido, outros desenvolvimentos são esperados na área, a fim de melhorar as opções disponíveis no mercado e o uso pelo consumidor (BHAT e KUMAR, 2013).

Na Odontologia, a utilização de implantes osseointegráveis beneficia pacientes com perda parcial ou total dos dentes e o sucesso do tratamento é dependente de um íntimo contato do tecido ósseo com o dispositivo implantado, pela osseointegração (FREIRE, QUEIROZ e OKAMOTO, 2010).

Da mesma forma, percebe-se a importância dos mesmos em cirurgias plásticas reparadoras, como para a reconstrução facial em substituição aos materiais autogênicos ou mesmo em procedimentos estéticos, como o uso de próteses mamárias de silicone e preenchimentos faciais (MAIA et al., 2010; LIM et al., 2013). O surgimento de um novo biomaterial (poli-estireno-b-isobutileno-b-estireno), já em estudo, visa oferecer a possibilidade de uma alternativa ainda mais bem sucedida para a reconstrução da mama (LIM et al., 2013).

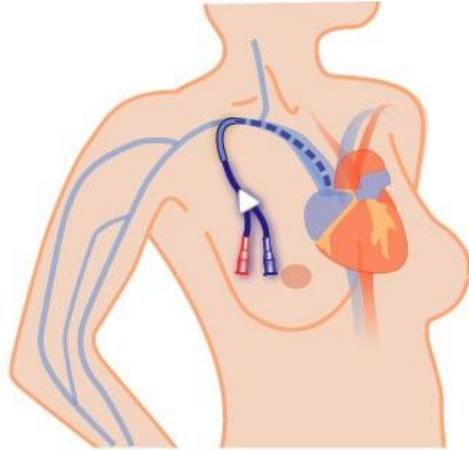
Outra área na qual os dispositivos médicos implantáveis são de grande importância é a Cardiologia. A *American Heart Association* (2012) ressalta três dos mais utilizados dispositivos implantados cirurgicamente, cuja função é normalizar a função cardíaca: marcapassos, dispositivos de assistência ventricular e cardioversor-desfibrilador implantável. Oliveira e Parreira (2010) ressaltam o uso de catéteres. Dentre eles, o recurso de inserção de catéteres venosos periféricos (CVP) é visto como uma prática indispensável no contexto hospitalar, sendo considerado o mais comum procedimento invasivo realizado para administração de fluidos, nutrientes, medicação, sangue e derivados, além do seu papel na monitorização hemodinâmica dos pacientes.

Muitas outras utilidades e tipos de dispositivos médicos implantáveis poderiam ainda ser citadas, tais como peles artificiais, fixação óssea, substitutos de cartilagem, *stents* para o tratamento de aterosclerose, biosensores para glicose e colesterol, novos sistemas de liberação controlada de drogas (ex.: micro-agulhas), dentre outros (BHAT e KUMAR, 2013). Diante da ampla utilização no ambiente hospitalar optou-se, portanto, focar este estudo em CVC.

#### 2.1.1.1 Catéter venoso central

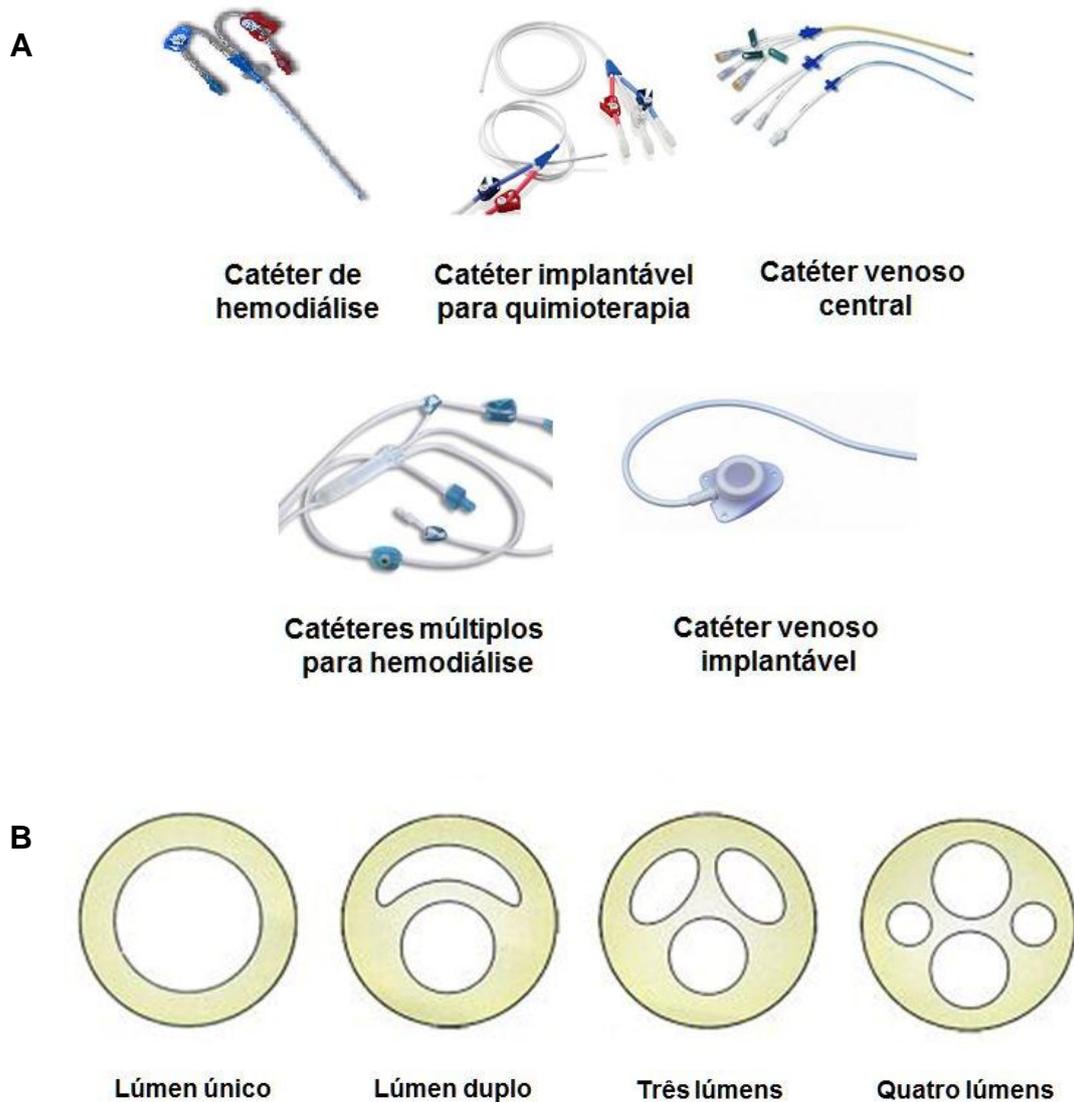
Segundo Bruzi e Mendes (2011), os CVCs (Figura 2) são dispositivos desenvolvidos para permitir o acesso repetido ao sistema vascular com a finalidade

de administrar medicamentos, fluidos intravenosos e solução parenteral, além de permitirem a coleta de amostras de sangue.



**Figura 2.** Ilustração esquemática de um catéter venoso central. Fonte: STEPHAN (2011).

Neves Júnior e colaboradores (2010) descreveram o CVC como um dispositivo médico de grande importância, disponível para uso em diferentes modalidades (Figura 3A), fabricado, geralmente, em silicone ou poliuretano, constituído de lúmen único ou múltiplo (Figura 3B), podendo ser parcial ou totalmente implantável. A escolha do CVC adequado, quanto ao material e a quantidade de lúmens, depende das necessidades do paciente e dos objetivos terapêuticos, devendo-se considerar alguns fatores, dentre os quais, destacam-se a finalidade, o período estimado de uso do catéter e a forma de manutenção do dispositivo.



**Figura 3.** Classificação de catéteres de acesso venoso central de acordo com: A) finalidade de uso, B) quantidade de lúmens.

Baseado nesta informação, convém ressaltar a importância indiscutível da utilidade de CVC para pacientes com neoplasias (adultos e crianças); pacientes com acesso venoso limitado; para aqueles que recebem infusões intravenosas contínuas ou prolongadas; pacientes em uso de quimioterapia múltipla ou agentes de suporte; e, ainda, para indivíduos que necessitam de coletas de sangue repetidas e/ou monitorização clínica (SCHIFFER et al., 2013).

O CVC pode ser classificado de acordo com os seguintes critérios: a via até o vaso sanguíneo (tunelizado, não tunelizado ou implantado); o local de inserção

(veias subclávia, femoral, jugular interna ou inserido perifericamente); e conforme sua composição, comprimento ou outra característica especial (presença ou ausência de uma braçadeira; impregnação com heparina, antibióticos ou anti-sépticos; lúmens simples ou múltiplos) (SCHIFFER et al., 2013).

Assim, apesar de sua utilidade, para Liango e colaboradores (2006), os catéteres apresentam inúmeras complicações relacionadas ao seu implante, manipulação e manutenção, de modo que infecções em catéteres de longa permanência constituem uma grave complicação associada ao aumento de morbimortalidade. Por exemplo, em pacientes imunodeprimidos aumentam-se os riscos e agravos adicionais; em pacientes em hemodiálise, a referida infecção é causa frequente de reinternações e correspondem à segunda causa de morte destes pacientes (FRAM et al., 2009).

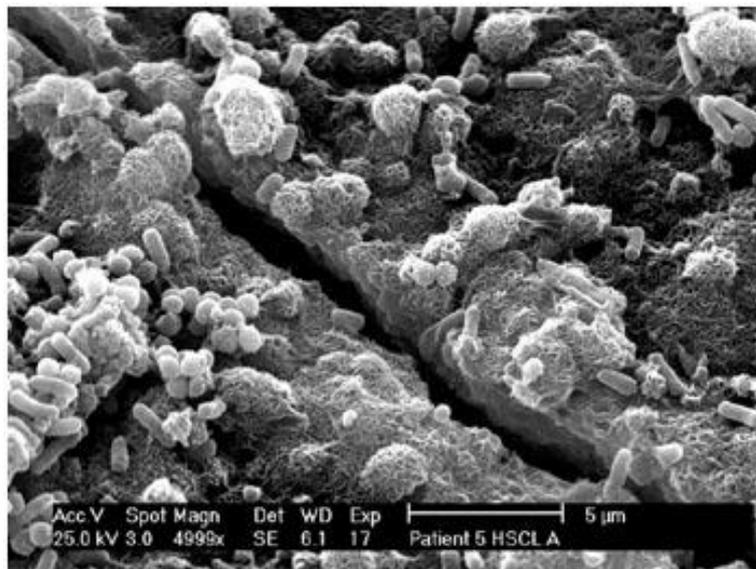
Nos Estados Unidos da América, mais de 5 milhões de CVC são implantados anualmente e um número estimado de 80 mil são infectados e relacionados diretamente a episódios de ICSRC (um novo caso de bacteremia associada a catéter ocorre a cada 257 dias) (MERMEL, 2001; VAN PRAAGH et al., 2011). De 1997 a 2007, dentre os pacientes que desenvolveram este tipo de infecção, mais de 35% evoluíram à óbito e, aqueles que sobreviveram, tiveram cerca de 40 mil dólares adicionados aos custos com internação por aumentarem o tempo de permanência em unidades de tratamento intensivo (UTI) de 8 para 20 dias (VAN PRAAGH et al., 2011).

A relevância médica que estes dispositivos adquiriram, seja para fins terapêuticos ou diagnósticos, é inegável, apesar de representarem um fator de risco para o surgimento de infecções (SIQUEIRA et al., 2011). Tais infecções caracterizam-se por serem causadas, muitas vezes, por patógenos multirresistentes aos tratamentos antimicrobianos, e apresentam, em grande parte dos casos, sintomas inespecíficos e evolução crônica (CHIFIRIUC et al., 2012).

### **2.1.2 Biofilmes em biomateriais**

As bactérias podem alternar entre as formas planctônicas (células individuais) e biofilmes (complexos ecossistemas microbiológicos caracterizados pela adesão a

uma superfície sólida e pela produção de uma matriz de polímeros orgânicos, que envolve as células bacterianas e inclui polissacarídeos extracelulares - EPS, proteínas e DNA) (DWYER, 2008; LANDINI et al., 2010). Arranjados na forma de biofilme, os micro-organismos apresentam maior tolerância aos agentes antimicrobianos e resistem às propriedades antimicrobianas da defesa do hospedeiro (Figura 4), tornando-se difíceis de erradicar (BURMOLE et al., 2010; KHAN e AHMAD, 2012).



**Figura 4.** Biofilme em desenvolvimento em torno de um catéter de látex revestido por prata. Fonte: STICKLER (2008).

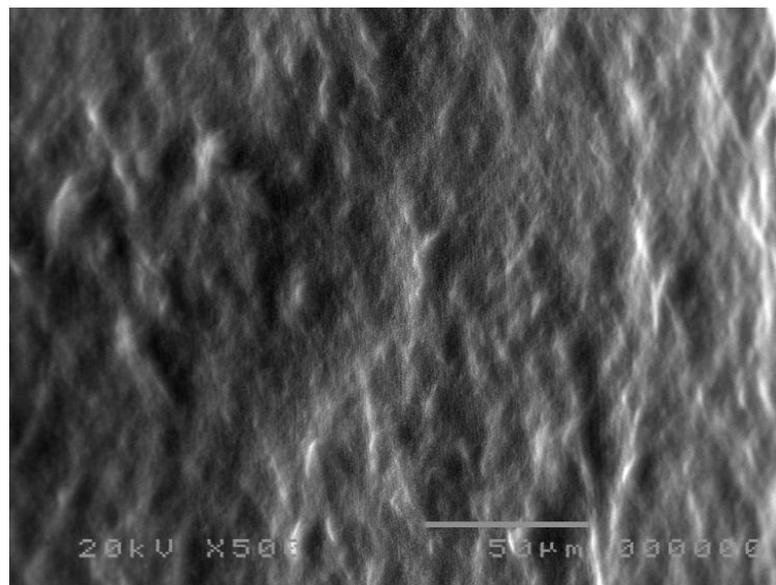
Os biofilmes diferem significativamente em sua fisiologia, padrão de expressão gênica e até mesmo morfologia. A transição de células individuais à biofilme é regulada por uma variedade de estímulos ambientais e fisiológicos, tais como densidade de células bacterianas, disponibilidade de nutrientes e estresse celular (CAVA et al., 2011).

Para Simões e colaboradores (2011), a ubiquidade das bactérias formadoras de biofilmes contribui para que as mesmas sejam uma causa significativa de problemas de saúde pública, na Medicina e também na indústria. No contexto da saúde, mais de 80% das infecções bacterianas em seres humanos envolve a formação de biofilmes.

Carson, Gorman e Gilmore (2010) descreveram que dispositivos médicos, tais

como catéteres urinários ou venosos, tubos endotraqueais, válvulas cardíacas, marcapassos e *stents* sintéticos, são altamente susceptíveis à colonização, com formação de biofilme e conseqüente desenvolvimento de infecções microbianas. Isso ocorre porque estes dispositivos geralmente apresentam superfície hidrofóbica, rugosa ou porosa, com irregularidades e algumas imperfeições, o que oferece uma excelente base para o crescimento do biofilme (MORAES et al., 2013). A Figura 5, obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV), ilustra a superfície externa de um CVC e explicita as porosidades e microfissuras do material.

A infecção ocorre, dentre outras causas, através da adesão de algumas células microbianas, presentes na pele ou membranas mucosas do paciente, durante a inserção do dispositivo. E assim, uma vez ligadas à superfície do biomaterial, a proliferação celular avança e provoca a eventual formação de um biofilme maduro. No entanto, mesmo apresentando esse risco, a Medicina moderna torna-se cada vez mais dependente de dispositivos médicos para viabilizar procedimentos diagnósticos e terapêuticos (SILVA, OLIVEIRA e RAMOS, 2009).



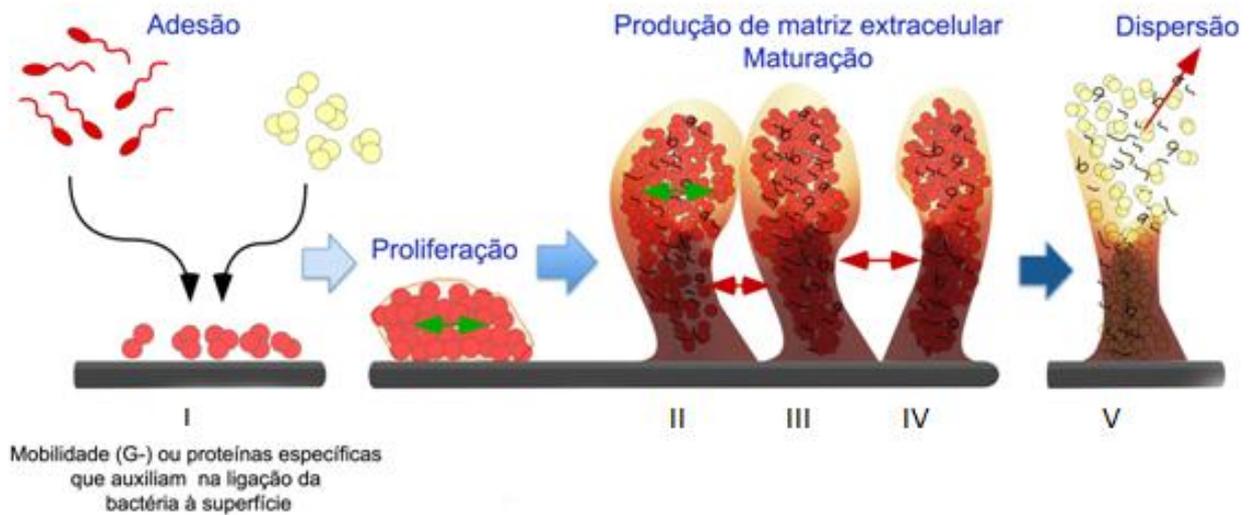
**Figura 5.** Superfície externa de catéter venoso central fotografada por microscopia eletrônica de varredura. Fonte: a autora.

### 2.1.2.1 Etapas da formação de biofilme

A aderência de micro-organismos à superfície de um material médico-hospitalar é um passo essencial na instalação de diferentes infecções no hospedeiro; contudo, a estrutura física destes materiais e as interações moleculares que regem a aderência bacteriana nestas superfícies ainda são pouco conhecidas. Tanto interações específicas e não específicas podem desempenhar um papel importante na capacidade de uma célula bacteriana anexar ou impedir a aderência na superfície do biomaterial (KATSIKOIANNI e MISSIRLIS, 2004).

Para que ocorra a adesão de um micro-organismo a uma determinada superfície, algumas propriedades das interfaces dos suportes (tensão superficial, entalpia superficial por unidade de área, composição da superfície, entre outras) precisam estar em conformidade com as características físico-químicas da superfície da célula, influenciando, de maneira determinante, o processo de adesão. As propriedades microbiológicas e as características do meio circundante, como temperatura, pH, força iônica e disponibilidade de nutrientes, também interferem na adsorção. Desta forma, o processo de formação de um biofilme bacteriano consiste em diferentes etapas, as quais possuem como pré-requisito, a adesão das células microbianas à superfície (ARAÚJO et al., 2010).

Para alguns autores, o desenvolvimento de biofilmes pode ser visto como um processo marcado por cinco etapas: (I) adsorção reversível inicial de células à superfície sólida; (II) produção de uma matriz extracelular composta por substâncias poliméricas, resultando em um anexo irreversível; (III) desenvolvimento precoce da arquitetura do biofilme; (IV) maturação; e (V) dispersão de células individuais do biofilme (Figura 6) (HOUDT; 2004; WOOD, HONG e MA., 2011; KUMAR, CHHIBER e HARJAI, 2013).



**Figura 6.** Etapas de formação do biofilme bacteriano. (I) adsorção inicial da células à superfície sólida; (II) produção de uma matriz extracelular composta por substâncias poliméricas; (III) desenvolvimento da arquitetura do biofilme; (IV) maturação; e (V) dispersão de células individuais do biofilme. Fonte: Adaptado de JOO e OTTO (2012).

Lasa e colaboradores (2005) descreveram a etapa inicial do processo de formação de biofilme como a aderência da bactéria a uma superfície, tanto a própria pele quanto um dispositivo médico, como o CVC. A capacidade de aderência dos micro-organismos tem grande importância na patogênese da infecção relacionada à catéter. Bactérias Gram-negativas utilizam-se de diferentes tipos de adesinas no processo primário de adesão; por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa* e *Vibrio cholerae* possuem fímbrias do tipo IV, *Salmonella enterica* utiliza fímbrias do tipo I (entre outros tipos), enquanto *Escherichia coli* possui ambos os tipos de fímbrias (I e IV). Além disso, a motilidade parece ajudar a bactéria a alcançar a superfície hidrofóbica para posterior aderência. No entanto, de acordo com Abee e colaboradores (2011), a mobilidade não é um fator limitante para a bactéria aderir-se à superfície, apesar de auxiliar durante esta etapa.

Diversas bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., além de *Micobacterium* spp., são capazes de formar biofilmes auxiliadas por proteínas de superfície – *biofilm-associated proteins* (BAP) e *extracellular polymeric substances* (EPS), por exemplo, que participam desta fase inicial de aderência. *Staphylococcus aureus* pode aderir-se a proteínas hospedeiras (fibronectina) comumente presentes nos catéteres. De igual forma, os estafilococos

coagulase-negativos aderem a superfícies de polímeros mais facilmente do que outros patógenos, como *Escherichia coli* ou o próprio *Staphylococcus aureus*. Além disso, certas cepas de estafilococos coagulase-negativos produzem um polissacarídeo extracelular frequentemente chamado de “muco” que, na presença de catéteres, potencializa a patogenicidade destas bactérias, permitindo que as mesmas resistam a mecanismos de defesa do hospedeiro, tornando-os menos suscetíveis a agentes antimicrobianos (através da formação de uma matriz que se junta aos antimicrobianos antes de seu contato com a parede celular do organismo). Certas espécies de *Candida* spp., na presença de fluidos que contenham glicose, podem produzir muco similar àquele bacteriano, o que explica potencialmente a elevada incidência deste patógeno entre pacientes que recebem fluidos de nutrição parenteral (O’GRADY et al., 2002).

Uma vez aderidas à superfície, a próxima etapa de formação do biofilme consiste na divisão de células filhas, as quais se estendem em torno do local de ligação para formação de uma microcolônia produtora de substâncias como polissacarídeos, proteínas, lipídeos e DNA (WOOD, HONG e MA, 2011).

Na fase posterior, as bactérias começam a se agregar e secretar uma matriz exopolissacarídea entre as quais é observada a presença de canais. A composição do exopolissacarídeo é diferente em cada bactéria: para *Pseudomonas aeruginosa*, observa-se a formação de alginato; para *Staphylococcus aureus*, de poli-N-acetilglicosamina (LASA et al., 2005; STICKLER, 2008; ABEE et al., 2011).

Na última etapa, algumas bactérias da matriz do biofilme se desprendem deste complexo com o objetivo de colonizar novas superfícies, encerrando as etapas de formação do biofilme. Cabe ressaltar que este é o processo do qual menos se conhece até o momento (LASA et al., 2005; JOO e OTOO, 2012).

Por fim, as bactérias que se tornam parte de um biofilme se envolvem em *quorum sensing* – um sistema de comunicação coordenado por meio de mediadores químicos (HØIBY et al., 2010) (Figura 7). Harmsem e colaboradores (2010) explicam que, embora os mecanismos por trás do *quorum sensing* não sejam totalmente compreendidos, o processo de comunicação permite que uma bactéria unicelular perceba quantas outras bactérias estão próximas a ela. Se uma bactéria pode perceber que é rodeada por uma densa população de outros agentes patogênicos, tende a se unir e contribuir para a formação de um biofilme.

## 2.2 INFECÇÕES HOSPITALARES

Segundo a Portaria nº 2616/98 do Ministério da Saúde, considera-se infecção hospitalar (IH) toda infecção adquirida após a admissão do paciente, manifestada durante a internação ou após a alta; quando relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares/ambulatoriais; ou quando manifestadas antes de 72 horas da internação, porém associadas a procedimentos diagnósticos e/ou terapêuticos realizados durante este período (BRASIL, 1998).

Atualmente, as IH são consideradas como um dos maiores problemas de saúde pública no Brasil e no mundo, e acometem, sobretudo, indivíduos submetidos a procedimentos invasivos diversos nos serviços assistenciais à saúde (BATISTA e RODRIGUES, 2012). Neste sentido, percebe-se que as infecções nosocomiais desafiam constantemente a qualidade desta assistência como um todo, já que são relacionadas de forma direta ao aumento das taxas de morbi-mortalidade entre os pacientes, ao aumento do sofrimento destes e, inclusive, dos custos hospitalares. Este contexto justifica, portanto, o porquê das IH serem consideradas uma grave complicação em nível mundial (SANTOS, 2004).

Cardoso, Coimbra Junior e Tavares (2010) corroboram tais informações ao afirmarem que estudos de morbidade hospitalar constituem importantes ferramentas na compreensão do perfil epidemiológico de grupos populacionais, tendo em vista que contribuem para a avaliação da gravidade das doenças, para a vigilância e controle de agravos e para o planejamento em saúde.

Nogueira e colaboradores (2009) explicam que isso ocorre pelo fato de o ambiente hospitalar ser um local favorável à propagação de micro-organismos. Vários fatores contribuem neste sentido, como a aglomeração de pessoas com diferentes vulnerabilidades à infecção, intensa realização de procedimentos invasivos e amplo uso de antimicrobianos, os quais aumentam a possibilidade de resistência bacteriana. Os mesmos autores ainda ressaltam que o porte e a finalidade do hospital também influenciam na ocorrência de IH. Em hospitais de ensino, por exemplo, as taxas deste tipo de infecção são mais elevadas, sobretudo nos períodos que coincidem com o ingresso de novos profissionais que ainda não adquiriram habilidade técnica suficiente para realização dos procedimentos cirúrgicos.

Em levantamento entre pacientes internados em um hospital da Suíça, realizado por Gul e colaboradores (2013) no ano de 2011, observou-se que dentre 400 indivíduos foram registradas 610 infecções nosocomiais. Deste grupo, 85 indivíduos (21,3%) que manifestaram algum tipo de IH, foram a óbito. As IH mais frequentes envolviam: infecções do sistema urinário (45,8%), infecções em corrente sanguínea (32,9%), pneumonia (8,6%) e infecções de sítio cirúrgico (7,8%). Um total de 289 micro-organismos foram isolados a partir de 279 tipos de infecções nosocomiais, sendo os principais agentes infecciosos *Escherichia coli* (20,1%), *Klebsiella pneumoniae* (13,1%), *Acinetobacter baumannii* (10,7%), *Pseudomonas aeruginosa* (5,2%) e *Candida spp* (4,8%). Um total de 541 intervenções foram realizadas em 188 pacientes com IH, incluindo a instalação de catéter venoso periférico ou central, ventilação mecânica e intubação traqueal. O desenvolvimento das IH se deu, em média,  $20,88 \pm 16,83$  dias após a internação.

No Brasil, Rulka, Lima e Neves (2012) identificaram alguns problemas com relação às IH: além dos dados serem pouco divulgados, muitas vezes os mesmos não são fornecidos pelos hospitais, dificultando o conhecimento dimensional do problema no país. Em estudo de caráter regional (feito no estado do Piauí, localizado na região Nordeste do Brasil) desenvolvido por Moura e colaboradores (2007), as informações obtidas foram condizentes aos dados de Siqueira e colaboradores (2011): as infecções sistêmicas ocuparam o segundo lugar como causa mais frequente de IH, juntamente com infecções dos tratos respiratório (primeiro lugar) e urinário (terceiro lugar).

Por fim, cabe destacar que dentre as principais causas de IH, aquelas relacionadas à corrente sanguínea constituem uma das três mais frequentes, com taxa de mortalidade, nos Estados Unidos da América, superiores a 25% (SIQUEIRA et al., 2011). No Brasil, não foram encontrados dados recentes de IH no banco de dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), da ANVISA e do DATASUS, do Ministério da Saúde. Um estudo realizado em 1995 avaliou a prevalência de IH em hospitais terciários das cinco regiões do país e constatou uma taxa correspondente a 15,5%. No entanto, não foram especificados os sítios das infecções (PRADE, OLIVEIRA e RODRIGUES, 1995).

### 2.2.1 Infecção de corrente sanguínea relacionada a catéter

A infecção de corrente sanguínea relacionada a catéter (ICSRC) é considerada o grande impedimento para o uso prolongado deste dispositivo e a principal complicação associada ao uso do mesmo (HORAN; ANDRUS; DUDECK, 2008). Frequentemente, a formação de biofilme microbiano, resistente aos mecanismos de defesa do hospedeiro e também ao tratamento com antibióticos, é uma das causas mais comuns de disfunção/falha dos catéteres e, na maioria das vezes, resulta em casos severos de doenças infecciosas sistêmicas (KATSIKOIANNI e MISSIRLIS, 2004; DWYER, 2008).

De acordo com *National Healthcare Safety Network* dos Estados Unidos da América, na classificação das infecções de corrente sanguínea ocorridas no ano de 2006, destacaram-se aquelas associadas ao uso de CVC, conforme disposto no quadro seguinte (Quadro 2) (KLEVENS et al., 2008).

**Quadro 2.** Classificação das infecções de corrente sanguínea ocorridas em 2006 nos Estados Unidos da América, quanto ao tipo de acesso.

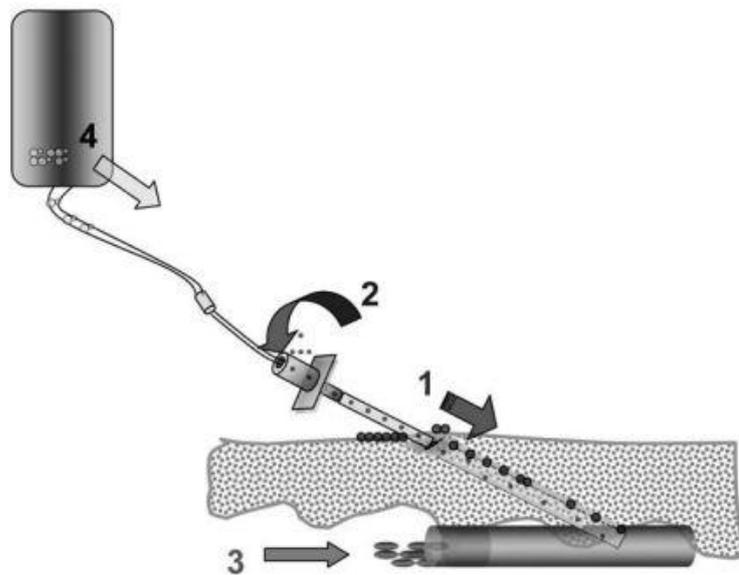
<b>Tipo de acesso</b>	<b>Incidência de infecções de corrente sanguínea (%)</b>
Fístula artério-venosa	0,5
Enxerto	0,9
<b>Catéter venoso central de curta e longa permanência</b>	<b>31,3</b>
Outros	67,3

Fonte: Adaptado de KLEVENS et al. (2008).

Siqueira e colaboradores (2011) destacaram como alguns dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de ICSRC o uso prolongado do catéter, o tipo de catéter, o número de lumens, o tipo de infusão, a técnica de inserção e o sítio de inserção. No entanto, quanto ao sítio de inserção, não há consenso na literatura

de qual é o mais associado à infecção (GE et al., 2012; MARIK, FLEMMER e HARRISON, 2012).

Uma ICSRC pode originar-se por diferentes mecanismos, quer seja pela colonização direta do catéter ou por disseminação no sangue ou mesmo por contaminação da infusão utilizada. O desenvolvimento do quadro infeccioso pode envolver a colonização prévia do dispositivo ou a disseminação de um patógeno previamente presente no sangue para o catéter (Figura 7) (GARCIA-RODRIGUEZ, GÓMEZ e ALTÉS, 2010).



**Figura 7.** Esquema das vias de colonização de um catéter. As vias de colonização de um catéter podem ser: (1) colonização da superfície do catéter no ponto em que atravessa a pele; (2) pelas conexões, contaminando a luz do dispositivo; (3) pela presença de um patógeno prévio na corrente sanguínea (e posterior contaminação do catéter); (4) pela administração de infusões contaminadas. Fonte: GARCIA-RODRIGUEZ, GÓMEZ e ALTÉS (2010).

Destas causas, a mais comum, representando 70 a 90% dos casos, envolve a colonização direta da parte externa do catéter no ponto em que atravessa a pele (LEÓN e ARIZA, 2004). No entanto, a contaminação também pode ocorrer por meio do lúmen no momento de manipulação das conexões (BOUZA, LINARES e PASCOAL, 2004). Em ambos os casos, existem diferentes fatores que facilitam a aderência bacteriana à superfície do catéter, tais como condições próprias do hospedeiro (formação de um leito protéico composto, dentre outros, por colágeno e fibrinogênio que facilitam a aderência do micro-organismo); fatores bacterianos

(capacidade de formar biofilme) e material do catéter (polivinil e polietileno são mais propensos à colonização) (GARCIA-RODRIGUEZ, GÓMEZ e ALTÉS, 2010).

#### 2.2.1.1 Espécies microbianas frequentemente envolvidas em ICSRC

Durante a sua hospitalização, o paciente fica exposto a inúmeras espécies de bactérias e fungos, as quais representam potenciais agentes etiológicos causadores de ICSRC, bem como de outras IH. A probabilidade de ocorrer uma infecção resultante dessa exposição dependerá em parte, da espécie do agente patogênico, da sua resistência aos agentes antimicrobianos e da sua virulência e, por outro lado, de outros fatores como método de transmissão, condições do ambiente hospitalar e vulnerabilidade do indivíduo (RULKA, LIMA e NEVES, 2012).

Destacam-se as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* como espécies frequentemente associadas às infecções nosocomiais oriundas de dispositivos médico-hospitalares (OTTO, 2008). Tal constatação é justificada pelo fato destas infecções ocorrerem, comumente, por espécies capazes de formar biofilmes, como aquelas do gênero *Staphylococcus* (JOO e OTTO; 2012). De modo complementar, tratando-se do perfil de resistência dos micro-organismos isolados a partir de ICSRC, no estudo realizado por Klevens e colaboradores (2008) constataram que 42% das infecções envolviam *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (SARM ou MRSA, do inglês *methicillin resistant Staphylococcus aureus*) e 39% de *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina (ERV).

Os dados supra-citados estão de acordo com os obtidos por Grothe e colaboradores (2010), cujo estudo consistiu em um levantamento dos principais micro-organismos isolados da corrente sanguínea em pacientes em uso de CVC. De 128 micro-organismos isolados, 49% eram Gram-positivos, dos quais 56,6% eram *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina (SASM ou MSSA, do inglês *Methicillin sensible Staphylococcus aureus*) e 43,4% eram MRSA (ROSSI e ANDREAZZI, 2005). De acordo com o *National Nosocomial Infections Surveillance* (NNIS) do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), desde 1999, a proporção de MRSA ultrapassa 50% entre os pacientes internados em UTIs (CENTER FOR

DISEASE CONTROL AND PREVENTION *apud* MOURA et al., 2007). No Brasil, as infecções hospitalares causadas por este patógeno também apresentam índices elevados, apresentando taxas de 40% a 80%, sobretudo em UTIs. Segundo Moura e colaboradores (2007), os índices de mortalidade são maiores em pacientes que desenvolveram bacteremia por MRSA (49% a 55%), se comparados aos casos por MSSA (20% a 32%). Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos realizados no Brasil e no mundo (SOUZA e FIGUEIREDO, 2008; DING et al., 2012).

Abad e Safdar (2011) complementaram estas informações ao descreverem que os micro-organismos mais comumente associados às ICSRC são *Staphylococcus* coagulase-negativos (31%), *Staphylococcus aureus* (20%), *Enterococcus* spp. (9%), *Candida* spp. (9%), *Escherichia coli* (6%) e *Klebsiella* spp. (5%), dentre outros. Os mesmos autores ainda ressaltam que, além do aumento nas taxas de ICSRC causadas por MRSA, destaca-se também a incidência destas infecções por outras bactérias multi-resistentes, como ERV e *Pseudomonas aeruginosa* resistente à ceftazidima. Esmanhoto e colaboradores (2013), ao identificarem os microrganismos presentes na pele pericateter, na ponta do cateter e na corrente sanguínea de pacientes em hemodiálise por cateter venoso central, demonstraram que, além de *Staphylococcus aureus* (76%), *Pseudomonas aeruginosa* (40%) e *Acinetobacter baumannii* (34%) também foram frequentemente isolados.

Garcia-Rodriguez, Gómez e Altés (2010) referem-se a um perfil diferente de micro-organismos responsáveis por bacteriemia secundária a infecção por catéter, onde bacilos Gram-negativos demonstram uma maior importância em pacientes de UTIs, por estarem submetidos a ventilação mecânica e com alto grau de colonização orotraqueal. Ressaltam ainda, que as leveduras do gênero *Candida* também estão se convertendo em patógenos emergentes no contexto clínico.

#### 2.2.1.2 Estratégias para prevenção de ICSRC

A vigilância é o componente essencial em um programa de controle de infecções e também fundamental para a melhoria da qualidade da assistência médico-hospitalar. As precauções padrões consistem, principalmente, na estratégia

primária de prevenção da transmissão de infecções e devem ser aplicadas durante todo o contato com os pacientes (GIAROLA et al., 2012).

Fram e colaboradores (2009) incluíram como estratégia primária medidas básicas como higiene das mãos antes e após o contato com o paciente; utilização de luvas, máscaras, óculos de proteção e aventais quando houver risco de contato com material biológico; cuidados com perfurocortantes; limpeza ambiental; processamento adequado de materiais e equipamentos; e, imunização dos profissionais da saúde.

Especificamente com relação aos catéteres, conforme recomendações nacionais e internacionais, a inserção deste dispositivo deve ser realizada com técnica asséptica prévia e com a utilização de barreira máxima: máscara, avental, luvas e campos estéreis. A antissepsia da pele antes da inserção do catéter e antes das trocas de curativo deve ser realizada com clorexidina alcoólica 2% ou polivinilpirrolidona. O curativo no local de inserção do catéter deve ser feito com gaze ou curativo transparente estéril semipermeável, protegido durante o banho do paciente e trocado sempre que o mesmo estiver úmido, solto ou sujo. Além disso, a observação do sítio de inserção do catéter deve ser sempre feita pelos profissionais responsáveis (FRAM et al., 2009; MERMEL et al., 2009; BOUALLÈGUE et al., 2013).

Conforme recomendações da ANVISA (2009), cinco cuidados básicos devem ser executados no manejo do paciente com CVC, os quais incluem a higienização das mãos, precauções máximas de barreira na passagem do catéter, antissepsia com clorexidina, escolha do sítio de inserção adequado (preferencialmente para a veia subclávia nos casos de catéteres não tunelizados) e reavaliação diária da necessidade de manutenção do catéter, com pronta remoção daqueles desnecessários. Leblebicioglu e colaboradores (2013) complementam estes cuidados básicos pela recomendação do uso de gaze estéril ou curativo estéril transparente para cobrir o local de inserção do catéter e desinfetar conectores que compõem o dispositivo.

Caso o catéter esteja colonizado e o paciente ainda não possa, entretanto, ter o mesmo removido, uma terapia antibiótica aplicada diretamente no catéter pode ser utilizada como estratégia para salvar o dispositivo. Conhecida como ALT (do inglês, *antibiotic lock therapy*), tal procedimento apresenta bons resultados e consiste na infusão de uma solução antimicrobiana concentrada, com ou sem heparina, no lúmen do catéter para efeito de esterilização por um certo tempo, diariamente,

durante o curso do tratamento. A finalidade da ALT é tratar/evitar a ICSRC, minimizar suas complicações e evitar a remoção do catéter (ABAD e SAFDAR, 2011).

Semelhante ao ALT, a terapia com infusão de etanol, denominada ELT (do inglês, *ethanol lock therapy*), consiste no preenchimento e fechamento de lúmen do catéter com solução de etanol com a finalidade de prevenir ou tratar infecções relacionadas ao catéter. As vantagens da ELT incluem a prevenção/erradicação do patógeno colonizador, independentemente da sensibilidade destes microorganismos aos antimicrobianos. Uma solução de etanol a 70% é adequada para a erradicação de infecção e a inibição do crescimento de bactérias formadoras de biofilmes (BELL et al., 2004; VALENTINE, 2011; PIERONI et al., 2013).

Diante de todas as estratégias de prevenção e de erradicação das ICSRC, Stefanidis (2010) considera que programas de educação baseados na combinação de medidas preventivas específicas podem reduzir significativamente a ocorrência e implicações oriundas destas infecções, ainda que novas medidas pautadas no desenvolvimento biotecnológico nesta área sejam esperadas.

Para Betjes (2011), além de medidas preventivas, modificações no material a partir do qual o CVC é feito, poderia influenciar na aderência das bactérias à superfície, afetar a formação do biofilme e diminuir o risco de desenvolvimento de ICSRC no paciente. Desta forma, uma maior ênfase é dada sobre a necessidade de se estabelecer uma proteção antimicrobiana eficaz para aumentar a segurança no uso destes dispositivos (CARSON, GORMAN e GILMORE, 2010; CHAUHAN et al., 2012).

Por este motivo, uma série de estratégias antibiofilme emergiram de estudos *in vitro*, baseados na fisiologia deste agregado (KHAN e AHMAD, 2011; TRENTIN et al., 2011; AIASSA, BARNES e ALBESA, 2012). Além disso, diversos modelos *in vivo* baseados no uso de catéteres vasculares implantados ou subcutâneos já foram utilizados com êxito para avaliar a eficácia de antimicrobianos contra bactérias, como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (COENYE e NELIS, 2010; FERNA´NDEZ-HIDALGO et al., 2010; VAN PRAAGH et al., 2011; WANG et al., 2011; CHAUHAN et al., 2012)

Theilgaard e colaboradores (2013) propuseram em seu estudo, um polímero híbrido que poderia ser utilizado com distribuição controlada e sustentada de fármacos, a fim de combater e prevenir infecções relacionadas ao catéter e, desta

forma, também diminuir o desenvolvimento de resistência bacteriana.

#### *2.2.1.2.1 Catéteres revestidos disponíveis no mercado*

A maioria dos catéteres são fabricados com silicone devido a sua flexibilidade, baixa toxicidade e inércia fisiológica. No entanto, os micro-organismos conseguem aderir facilmente a este material tornando-se capazes de provocar infecções (FUNDEANU et al., 2008). Na tentativa de diminuir este risco, estratégias de tratamento nos catéteres são oportunas, a fim de se evitar a colonização dos mesmos por bactérias formadoras de biofilme. Estas estratégias incluem impregnação com antimicrobianos ou o uso de revestimentos especiais (DING et al., 2012).

Dentre os catéteres impregnados com antimicrobianos, existem aqueles que são revestidos apenas externamente (primeira geração) ou externa e intermanente (segunda geração) com clorexidina e sulfadizina de prata (CH-SS), ou com minociclina e/ou rifampicina ou ainda, tratados com prata. Estes últimos incluem tanto a prata, quanto a platina, carbono e íons ou ligas de prata (ABAD e SAFDAR, 2011).

Em um levantamento realizado por Betjes (2011) comparando diferentes tipos de catéteres, foi constatado que em pacientes internados em UTIs, o uso de CVCs revestidos com heparina ou antimicrobianos foi associado a uma redução de sua colonização com conseqüente diminuição na incidência de ICSRC. O mesmo foi observado para aqueles revestidos com minociclina e rifampicina. No entanto, o uso de CVC com revestimento de prata não demonstrou diminuição significativa na incidência das ICSRC (BETJES, 2011); contudo, metanálises demonstraram que quando a clorexidina aparece em associação com a sulfadiazina de prata como revestimento de um CVC, há uma redução na ocorrência destas infecções (CASEY et al., 2008; HOCKENHULL et al., 2008; WANG et al., 2010).

Com relação aos CVCs revestidos com antimicrobianos, Novikov e colaboradores (2012) descreveram que os dispositivos disponíveis comercialmente podem ser colonizados por bactérias presentes na microbiota do paciente durante seu uso clínico, provavelmente por conta de limites no espectro de atividade

antimicrobiana. Sendo assim, alguns destes dispositivos podem apresentar benefício limitado, apesar das vantagens mais óbvias contra patógenos microbianos específicos, se comparados a um CVC padrão.

A escolha de que tipo de catéter usar deve ser guiada por fatores que incluem a eficácia, o custo, as infecções prévias envolvidas além do risco de resistência microbiana a diferentes fármacos. Isso deve ser levado em conta porque a resistência é um problema intrínseco aos catéteres revestidos com antimicrobianos e que não pode ser negligenciada (ABAD e SAFDAR, 2011).

A fim de se evitar o revestimento de catéteres por antimicrobianos e assim, diminuir problemas de patógenos resistentes a eles, estratégias de mudanças estruturais no material empregado na fabricação do catéter já foram feitas e testadas quanto ao impedimento da aderência de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans* (FUNDEANU et al., 2008; NEJADNIK et al., 2008). Fundeanu e colaboradores (2008), por exemplo, apresentaram um método para obter um revestimento de poliacrilamida a partir de superfícies de borracha de silicone, após a remoção de moléculas de baixo peso molecular, tais como oligómeros de silano. No entanto, a complexidade para se produzir tal polímero poderia conduzir à dificuldade na caracterização do material e em grande variação de lote para lote com relação à espessura e qualidade do revestimento (DING et al., 2012).

Ding e colaboradores (2012) sugeriram o uso de revestimentos nos catéteres por um polímero de caráter hidrofóbico que poderia ser útil para erradicar MRSA e evitar eficientemente a incrustação dos mesmos na superfície do dispositivo, inibindo a formação de biofilme. Percebe-se, portanto, que existe uma necessidade premente de desenvolver um revestimento de catéter não-tóxico e eficaz para a prevenção das ICSC.

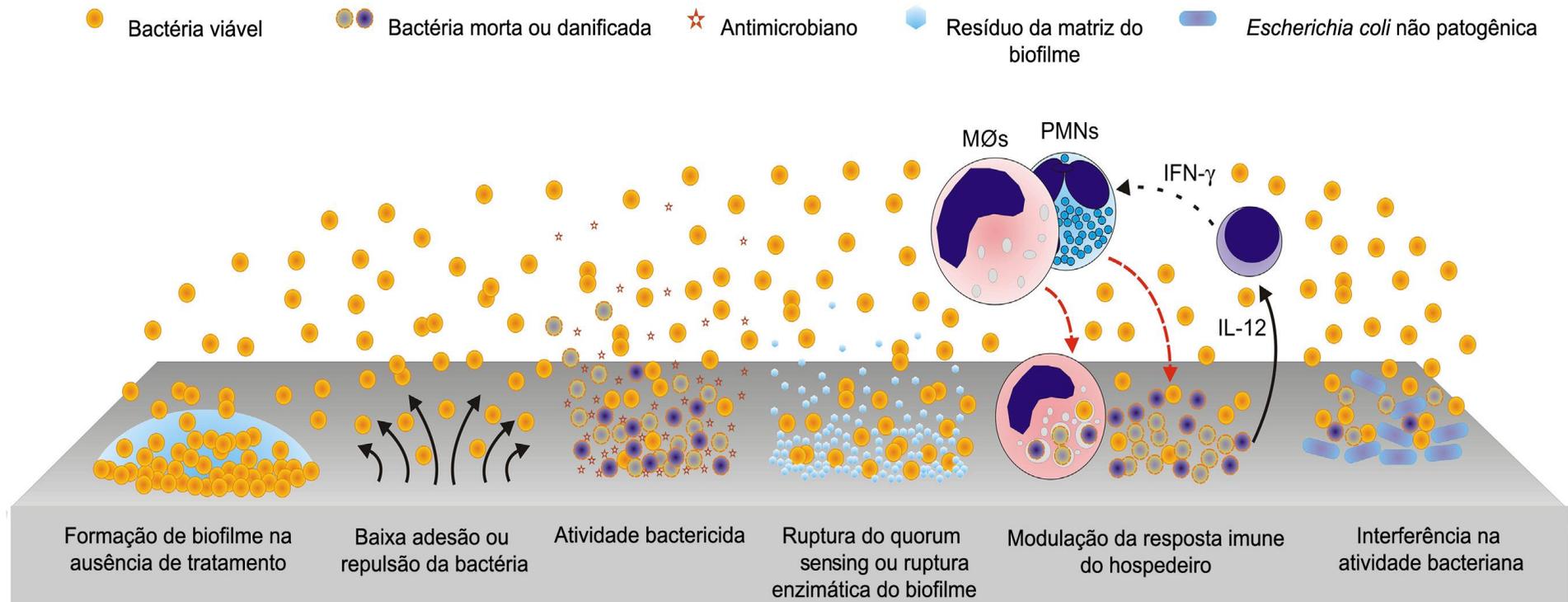
### 2.3 REVESTIMENTO ANTIBIOFILME INOVADOR

Biomateriais com características anti-infecciosas tornaram-se uma estratégia primária para prevenção de infecções associadas aos dispositivos médico-hospitalares, uma vez que contribuem como medida de profilaxia antibiótica no

ambiente hospitalar (UÇKAY et al., 2013).

A capacidade de colonização de um micro-organismo diminui à medida em que este não consegue se fixar na superfície do material ou tecido. Esta adesão é mediada, geralmente, ou por interações físico-químicas com o material ou pela produção de proteínas específicas pela célula bacteriana, como as adesinas (VAN OSS, 1991; FOKA et al., 2012). A redução da infectabilidade de certos dispositivos, como catéteres, pode ser alcançada por meio do impedimento da adesão bacteriana na superfície dos mesmos. Sendo assim, uma ampla variedade de abordagens foi desenvolvida para a disponibilização de biomateriais dotados desta característica, conforme demonstrado na Figura 8 (CAMPOCCIA, MONTANARO e ARCIOLA; 2013).

Dessa forma, o interesse no desenvolvimento de abordagens anti-infecciosas alternativas para a prevenção e/ou tratamento de infecções relacionadas aos dispositivos médico-hospitalares tem sido crescente nos últimos anos (ARTINI, 2012). Uma estratégia bem sucedida não deve afetar processos essenciais para a sobrevivência das bactérias, pois assim, o aparecimento de mutantes de escape seria rapidamente favorecido. Abordagens inovadoras, no entanto, devem ser voltadas contra fatores de virulência dos micro-organismos, de forma a diminuir sua capacidade de infecção, sem afetar sua viabilidade (BOLES e HORSWILL, 2008 e ARTINI et al., 2012).



**Figura 8.** Estratégias para evitar a formação de biofilme microbiano em dispositivos médicos implantáveis: impregnação da superfície do catéter com substâncias antimicrobianas que danifiquem estruturas vitais ou exterminem as bactérias; rompimento da organização da matriz do biofilme e/ou do *quorum sensing*; modulação da resposta imune do hospedeiro, favorecendo o combate aos patógenos; e, interferência na atividade do micro-organismo patogênico, inclusive por meio da inserção de outro micro-organismo, o qual evita a formação daquele biofilme. Fonte: CAMPOCCIA, MONTANARO e ARCIOLA; 2013.

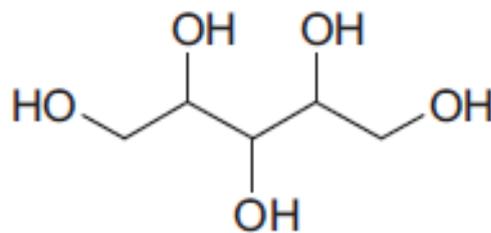
Neste contexto, Papa e colaboradores (2013) avaliaram a capacidade anti-infecciosa de uma proteína – serratiopeptidase –, secretada por *Serratia marcescens*, em prejudicar algumas propriedades de virulência de *Staphylococcus* sp., tais como a fixação em superfícies inertes e a adesão/invasão em células eucarióticas. Como resultado, descobriu-se que culturas de *Staphylococcus aureus* tratadas com serratiopeptidase apresentaram alterações em algumas de suas proteínas, conhecidas por realizar uma variedade de funções, inclusive, de aderência, dependendo da sua localização citoplasmática ou superfície. Os resultados sugeriram que esta estratégia poderia ser utilizada como um potencial "agente anti-infeccioso" capaz de prejudicar a capacidade de bactérias patogênicas de aderir a próteses, catéteres e dispositivos médicos.

No mesmo sentido, Sujimoto e colaboradores (2013) demonstraram que uma serina-protease secretada por *Staphylococcus epidermidis* foi capaz de degradar biofilmes pré-formados de *Staphylococcus aureus*, pela capacidade de interferir na força adesiva e coesiva do biofilme. As análises demonstraram que tal serina-protease é capaz de degradar, pelo menos, 75 proteínas, incluindo algumas que participam da formação do biofilme microbiano (proteína de adesão extracelular, matriz protéica de ligação, proteína de ligação de fibronectina extracelular A, entre outras).

### **2.3.1 Agentes com ação antiaderente**

A resistência microbiana aos fármacos presentes atualmente no mercado é uma das principais dificuldades para um tratamento de sucesso. Dentro deste contexto, tem-se tornado essencial a intensificação de pesquisas para a identificação de novas estratégias para se prevenir e/ou tratar as doenças infecciosas. O conhecimento da aderência de micro-organismos a diferentes superfícies, e de mecanismos que impeçam essa colonização, compreende uma abordagem bastante promissora (OFEK, HASTY e SHARON, 2003). Paralelamente, tem-se a Biotecnologia, um ramo da ciência que vem contribuindo sistematicamente para o desenvolvimento de produtos, técnicas e biofármacos de grande aplicação na vida contemporânea.

O xilitol (1,2,3,4,5-penta-hidroxipentano), uma das substâncias de interesse deste estudo, tem demonstrado ser capaz de atuar de maneira diferenciada em relação aos antimicrobianos clássicos, ao impedir a aderência de importantes micro-organismos patogênicos. Os estudos mais recentes sobre o xilitol se concentram em sua capacidade antiaderente e em sua atuação sobre a expressão de genes relacionados à síntese de matriz extracelular, de forma a ocasionar a dispersão de biofilmes microbianos (KUROLA et al., 2009; WRIGHT et al., 2010; KUROLA et al., 2011; LEE, CHOI e KIN, 2012). As primeiras pesquisas sobre aplicações de xilitol, iniciadas na década de 60, compreendiam suas propriedades antidiabéticas (DOMAREVA, 1967; GOTO, 1967) e anticariogênicas (MÄKINEN, 1976; GALLAGHER e PEARCE, 1977). O efeito não cariogênico é uma consequência do fato do *Streptococcus mutans* não fermentar o xilitol, ou seja, não utilizá-lo como fonte de carbono. Assim, não há a acidificação do pH bucal, o que contribuiria para o crescimento deste micro-organismo. Mäkinen (2000b) reforçou, em seu trabalho, a atividade anticariogênica do xilitol, ao estudar recém-nascidos cujos familiares mascavam gomas contendo este açúcar. Foi constatado que tal hábito evitava que os recém-nascidos apresentassem cáries, uma vez que o xilitol, além de não contribuir para a alteração do pH, impedia a aderência da bactéria nos dentes. O mecanismo de ação do xilitol, neste caso, pode ser explicado pela habilidade das moléculas pentitóis de alterarem a aderência associada às estruturas da superfície dos patógenos. A estrutura molecular do xilitol está apresentada na Figura 9.



**Figura 9.** Estrutura molecular do xilitol (1,2,3,4,5-penta-hidroxipentano). Fonte: KIRILIN et al., 2012.

Várias são as bactérias Gram-positivas (KATSUYAMA et al., 2005a; FERREIRA et al., 2009; KUROLA et al., 2009; KUROLA et al., 2011) e Gram-negativas (SAJJAN et al., 2004; AMMONS et al., 2009; SILVA et al., 2011; SOUSA et al., 2011) sobre as quais o xilitol atua impedindo sua aderência. Katsuyama e

colaboradores (2005a) avaliaram a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus*, através de MEV, na presença de 500 substâncias previamente selecionadas. Observou-se que o xilitol inibiu a formação de glicocálix – principal estrutura responsável pela resistência aos fármacos e que impede o sistema imunológico de reconhecer as bactérias como estranhas ao organismo. Este estudo demonstrou que o xilitol, em sinergismo com outras substâncias, é capaz de inibir a formação do biofilme microbiano, apresentando-se como alternativa útil (sem uso de antibióticos) para proteger a pele da colonização por *Staphylococcus aureus*. Söderling e Hietala-Lenkkeri (2010) constataram que 4% de xilitol foi capaz de inibir, *in vitro* (superfície de vidro lisa), a aderência de seis cepas de *Streptococcus* spp. orais. Estes autores observaram também que este mecanismo antiaderente não era dependente da inibição do crescimento microbiano.

Ammons e colaboradores (2009) trataram, *in vitro*, biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de ferimentos clínicos com 2,0% de lactoferrina e 5,0% de xilitol, isoladamente ou em combinação. Observaram que o tratamento com lactoferrina + xilitol poderia diminuir significativamente a viabilidade dos biofilmes desta espécie bacteriana, o que pode ser explicado pelo efeito sinérgico das duas substâncias. Foi sugerido pelos autores que o resultado obtido após o tratamento combinado seria devido à ruptura estrutural do biofilme e desestabilização da permeabilidade das membranas celulares.

Em estudos prévios realizados pelo nosso grupo, observamos a atividade antiaderente do xilitol (0,5%, 2,5% e 5,0%) sobre cepas de *Escherichia coli* (ATCC 8739 e de proveniência clínica) e sugerimos que o mesmo poderia ser utilizado como adjuvante terapêutico para a prevenção e/ou tratamento de infecções recorrentes do trato gastrintestinal (SILVA et al., 2011). Ainda nesta linha de pesquisa, observamos o bloqueio da aderência de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 por xilitol, nestas mesmas três concentrações (SOUSA et al., 2011). Em ambos os estudos, foi comprovado que o xilitol não apresentou atividade antimicrobiana frente a nenhuma cepa testada (SILVA et al., 2011; SOUSA et al., 2011).

A atividade antiaderente do xilitol frente a leveduras ainda é pouco estudada. Pizzo e colaboradores (2000) investigaram os efeitos dos carboidratos mais consumidos na dieta sobre a adesão de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* à células HeLa. A aderência de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* foi significativamente favorecida pela incubação em meio definido contendo

uma alta concentração (500 mM) de frutose, glicose, maltose e sacarose ( $p < 0,001$ ). Por outro lado, a presença de xilitol reduziu significativamente a adesão de *Candida albicans* ( $p < 0,001$ ) e a presença de sorbitol resultou em apenas um aumento marginal na adesão destas leveduras. Estes autores sugeriram que o consumo frequente de carboidratos, como frutose, glicose, maltose e sacarose poderia representar um fator de risco para candidose oral e, ainda, que a substituição destes açúcares por xilitol ou sorbitol poderia ser considerada para o controle da colonização por *Candida* sp.

O mecanismo pelo qual o xilitol impede a aderência de micro-organismos ainda não foi totalmente esclarecido. Algumas evidências demonstram que o xilitol pode formar complexos com íons cálcio devido à sua estrutura particular – sequência de grupos hidroxila de cadeia aberta –, o que provoca o deslocamento de moléculas de água do ambiente (alteração do equilíbrio osmótico) e a alteração das interações moleculares que regem a aderência bacteriana (MÄKINEN, 2000a). Outra especulação sobre um possível mecanismo de ação do xilitol gira em torno do bloqueio que o mesmo provoca sobre os receptores de lectinas. As lectinas bacterianas, presentes na superfície de muitos micro-organismos patogênicos, são mediadoras da adesão dos mesmos à glicoproteínas ou glicolípidos expressos nas superfícies dos tecidos do hospedeiro (SHARON e OFEK, 2000). Ainda, o xilitol poderia regular a expressão de diferentes genes, que interferem direta ou indiretamente no processo de aderência microbiana, como demonstrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Interferência do xilitol na expressão de diferentes genes.

Micro-organismos	Gene-alvo	Função gênica	Referência
	↓ <i>gtfD</i>	Aderência celular e formação de biofilme	Shemesh et al., 2006
<i>Streptococcus</i>	↓ <i>vicR</i>	Regulador de resposta global	Shemesh et al., 2006
<i>mutans</i>	↓ <i>gtfB</i>	Controle da produção de glucano insolúvel na superfície das bactérias	Lee et al., 2009
<i>Streptococcus</i>	↓ <i>cpsB</i>	Formação de cápsula	Kurola et al., 2009
<i>pneumoniae</i>	↓ <i>lytA</i>	Formação de biofilme	Kurola et al., 2011

↓ diminuição da expressão gênica. *gtfD* e *gtfB*: genes codificadores das glicosiltransferases; *vicR*: gene do sistema regulador; *cpsB*: gene codificador do polissacarídeo capsular; *lytA*: gene codificador da autolisina.

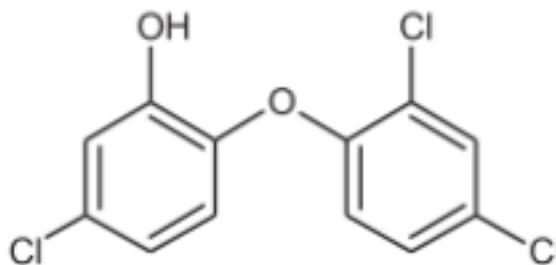
Em vários estudos (KATSUYAMA et al., 2005b; MODESTO e DRAKE, 2006; AMMONS et al., 2009; AMMONS, WARD e JAMES; 2011) o xilitol aparece atuando sinergicamente com outras substâncias no combate à proliferação microbiana. Não diferentemente, optamos por combiná-lo com substâncias de conhecida capacidade antimicrobiana, a fim de formular um revestimento antibiofilme, para materiais médicos-hospitalares, de amplo espectro de ação.

### 2.3.2 Agentes com ação antimicrobiana

Antimicrobianos são definidos como compostos de origem natural ou sintética, com toxicidade seletiva para os micro-organismos, sobre os quais possuem mecanismo de ação sítio-específica microbicida ou microbiostática.

O (cloridrato de) triclosan (éter 2,4,4'-triclora-2'-hidroxi-difenílico) teve a sua eficácia antimicrobiana descrita pela primeira vez em 1974 (VISCHER e REGOS, 1974) e a mesma continua sendo observada, como descrito recentemente em ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado (TURTIAINEN et al., 2012). É um agente com ação antimicrobiana, de amplo espectro de ação e baixa citotoxicidade, cujo principal sítio de atuação é a membrana citoplasmática da bactéria (AQUINO et

al., 2004; WELK et al., 2005; LUBARSKY et al., 2012). Sua ação antimicrobiana está também relacionada a sua capacidade de bloquear a síntese de ácidos graxos por meio de inibição enzimática, impedindo a multiplicação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras. Acredita-se que este mecanismo de ação do triclosan sobre os micro-organismos é baseado na inibição competitiva do enoil-acil transportador da proteína redutase, um componente na via de biossíntese de lipídeos (VERMEIREN, DEVLIEGHERE e DEBEVERE, 2002; LUBARSKY et al., 2012). A estrutura molecular do triclosan está apresentada na Figura 10.



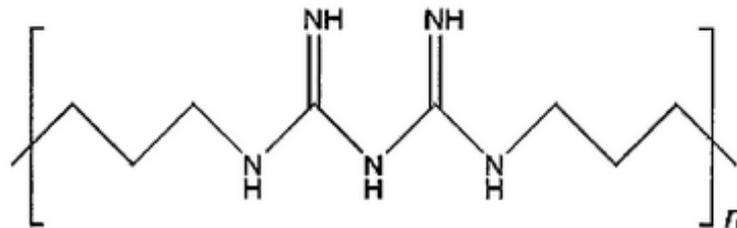
**Figura 10.** Estrutura molecular do triclosan (éter 2,4,4'-triclouro-2'-hidroxi-difenílico). Fonte: SOARES, 2013.

O triclosan é um agente antimicrobiano adicionado a muitos produtos de consumo para reduzir ou evitar a multiplicação microbiana, tais como roupas, utensílios de cozinha e móveis, além de ser adicionado a sabões antibacterianos, cremes dentais e alguns cosméticos (SOARES, 2013). No ambiente hospitalar, o triclosan tem sido utilizado para controlar a propagação de MRSA (JONES et al., 2000; COIA et al., 2006); para limpeza da pele em procedimentos pré-operatórios (COIA et al., 2006) e para prevenir a contaminação do ferimento em suturas cirúrgicas (MING, ROTHENBURGER e YANG, 2007).

Segundo Jones e colaboradores (2000), embora existam preocupações a cerca do uso generalizado de triclosan por causa da pressão seletiva para o surgimento de cepas resistentes, a aceitação e a aplicação do triclosan são baseadas nos testes de segurança e eficácia antimicrobiana documentados. Estes autores sugerem que 1% de triclosan oferece o equilíbrio ideal entre eficácia e baixo risco. Alguns estudos verificaram a existência de resistência ao triclosan por micro-

organismos, como *Pseudomonas aeruginosa* (MIMA et al., 2007), *Staphylococcus* sp. (WIS'NIEWSKA, PIECHOWICZ e GALIN' SKI, 2006) e *Escherichia coli* (YAZDANKHAH et al., 2006). No entanto, a relevância clínica destes resultados ainda não é conhecida, já que as falhas clínicas ocorridas nos últimos 30 anos de uso do triclosan não foram diretamente relacionadas à resistência ao mesmo (JONES et al., 2000).

Outra substância de conhecida e eficaz atividade antimicrobiana é a polihexametileno biguanida (PHMB), uma mistura sintética heterodispersa de polímeros, quimicamente estável e não volátil (Figura 11). As biguanidas, em especial a PHMB, foram por muito tempo usadas como agentes antimicrobianos na preservação de cosméticos e de produtos farmacêuticos, bem como agentes antissépticos (CUNHA et al., 2001).



**Figura 11.** Estrutura molecular da polihexametileno biguanida (PHMB)  $(C_8H_{18}N_5)_n$ . Fonte: EVANS e HOWE, 2013.

A PHMB apresenta ação antimicrobiana frente a micro-organismos patogênicos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, e a endosporos de bactérias termorresistentes (*Bacillus* spp.) e vírus. Seu amplo espectro de ação aliado à baixa toxicidade e alta compatibilidade aos tecidos, resulta em uma melhor relação custo-benefício quando comparada aos antissépticos à base de quaternário de amônio (FENG et al., 2011).

O mecanismo de ação desta substância envolve uma rápida atração da PHMB catiônico, pela superfície bacteriana negativamente carregada, a qual provoca uma falha no mecanismo de defesa do micro-organismo, atribuída à separação de fases dos fosfolípidos e subsequente ruptura da membrana citoplasmática dos mesmos. Esta ruptura pode então levar à perda de substâncias macromoleculares (como, por

exemplo, os nucleotídeos), de íons (sódio e potássio) e à precipitação de substâncias celulares (MAILLARD, 2002; FENG et al., 2011).

Andriessen e Eberlein (2008) avaliaram a eficácia de soluções de limpeza, contendo PHMB, no tratamento de humanos portadores de úlceras venosas na perna e concluíram que a PHMB contribuiu significativamente na cicatrização das feridas locais, impedindo infecções secundárias e contribuindo para a diminuição do tempo de tratamento. Nesta mesma linha de estudo, Uygur e colaboradores (2008) compararam o efeito antibactericida da octonidina, do iodo povidine e da PHMB em ratos que continham lesões oriundas de queimaduras e contaminadas com *Pseudomonas aeruginosa*. A PHMB preveniu a penetração e a multiplicação sistêmica desta bactéria, mas não foi eficiente para eliminá-la totalmente nas escaras. Muller e Kramer (2008) estudaram a atividade antimicrobiana e o efeito citotóxico de vinte agentes antibacterianos e sugeriram a PHMB como um dos mais biocompatíveis.

Apesar da eficácia antimicrobiana já conhecida do triclosan e da PHMB, pouco se sabe sobre a ação destas substâncias na arquitetura de um biofilme (LUBARSKY et al., 2012). Em geral, os antimicrobianos tornam-se ineficazes frente a microorganismos arranjados em biofilmes devido à dificuldade de penetração nas camadas de matriz extracelular e de microcolônias aderidas (CHAUHAN et al., 2012).

Portanto, nossa hipótese é que, em sinergismo com uma substância inibidora da formação do biofilme, o triclosan e a PHMB apresentariam a eficácia antimicrobiana desejada.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Determinar a eficácia antimicrobiana e antibiofilme – *in vitro* e *in vivo* – e a biocompatibilidade tecidual de duas formulações alcoólicas compostas pelos seguintes princípios ativos: 1) xilitol, triclosan e PHMB e 2) xilitol e triclosan.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Verificar a eficácia antimicrobiana *in vitro* das duas formulações propostas, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), frente a micro-organismos comumente relacionados à ICSRC;
- Realizar o teste de aderência *in vitro*, a fim de verificar a eficácia antibiofilme das duas formulações propostas frente a uma cepa Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), uma cepa Gram-negativa (*Escherichia coli clínica*) e uma cepa fúngica (*Candida albicans* ATCC 10231), através da avaliação de fragmentos de CVCs por MEV;
- Avaliar a eficácia antimicrobiana *in vivo* de fragmentos de CVCs revestidos com as duas formulações propostas, através de análises hematológicas e microbiológicas frente a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923;
- Verificar a biocompatibilidade tecidual das duas formulações propostas, através de análises hematológicas e histopatológicas, após inserção subcutânea de fragmentos de CVCs revestidos com as mesmas;
- Propor um revestimento para dispositivos médico-hospitalares, capaz de impedir o desenvolvimento de biofilmes microbianos na superfície destes, como medida preventiva de ICSRC no ambiente hospitalar.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA) localizado na Faculdade de Farmácia (FF) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). As análises de MEV foram executadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e no Centro de Microscopia Eletrônica de Varredura do Museu Nacional da UFRJ. As análises hematológicas e microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas Maurílio Baldi do Hospital Universitário da UFJF.

### 4.1 BIOMATERIAL

Foram utilizados fragmentos do fio guia de kits de cateter triplo lumen para acesso venoso central, fabricados em poliuretano (Medcomp®, MC3L-8S, Lote MAMV090).

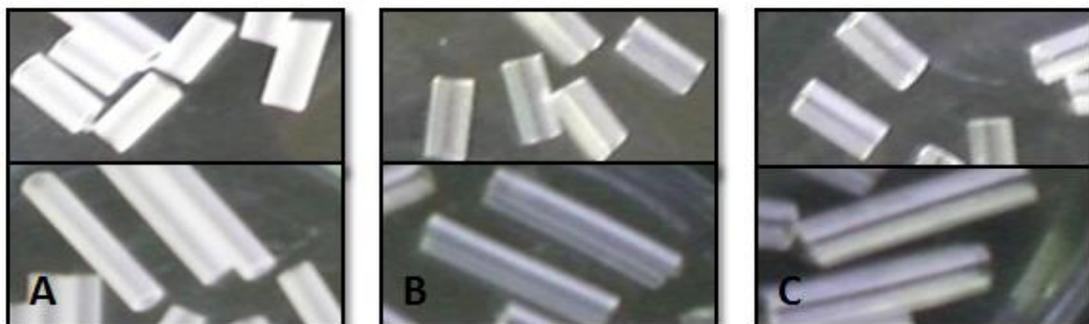
### 4.2 MICRO-ORGANISMOS

Foram utilizados micro-organismos frequentemente envolvidos em episódios de ICSRC. Foram testadas cepas provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC) – *Candida albicans* ATCC 10231, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 – e cepas selvagens, de origem clínica, isoladas no Laboratório de Análises Clínicas Maurílio Baldi do Hospital Universitário da UFJF: *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Estas cepas foram mantidas em meio de cultura adequado para conservação (*Skim Milk*) e armazenadas em freezer -20°C. Foram também cultivadas em meio de cultivo *Tryptone Soy Agar* (TSA) a 37°C por 24 horas, sendo posteriormente

armazenadas em geladeira (4°C). Repiques da cultura foram realizados em intervalos regulares de 15 dias e, após o 6º repique, nova alíquota do *Skim Milk* foi utilizada para recuperação da cepa.

### 4.3 FORMULAÇÕES

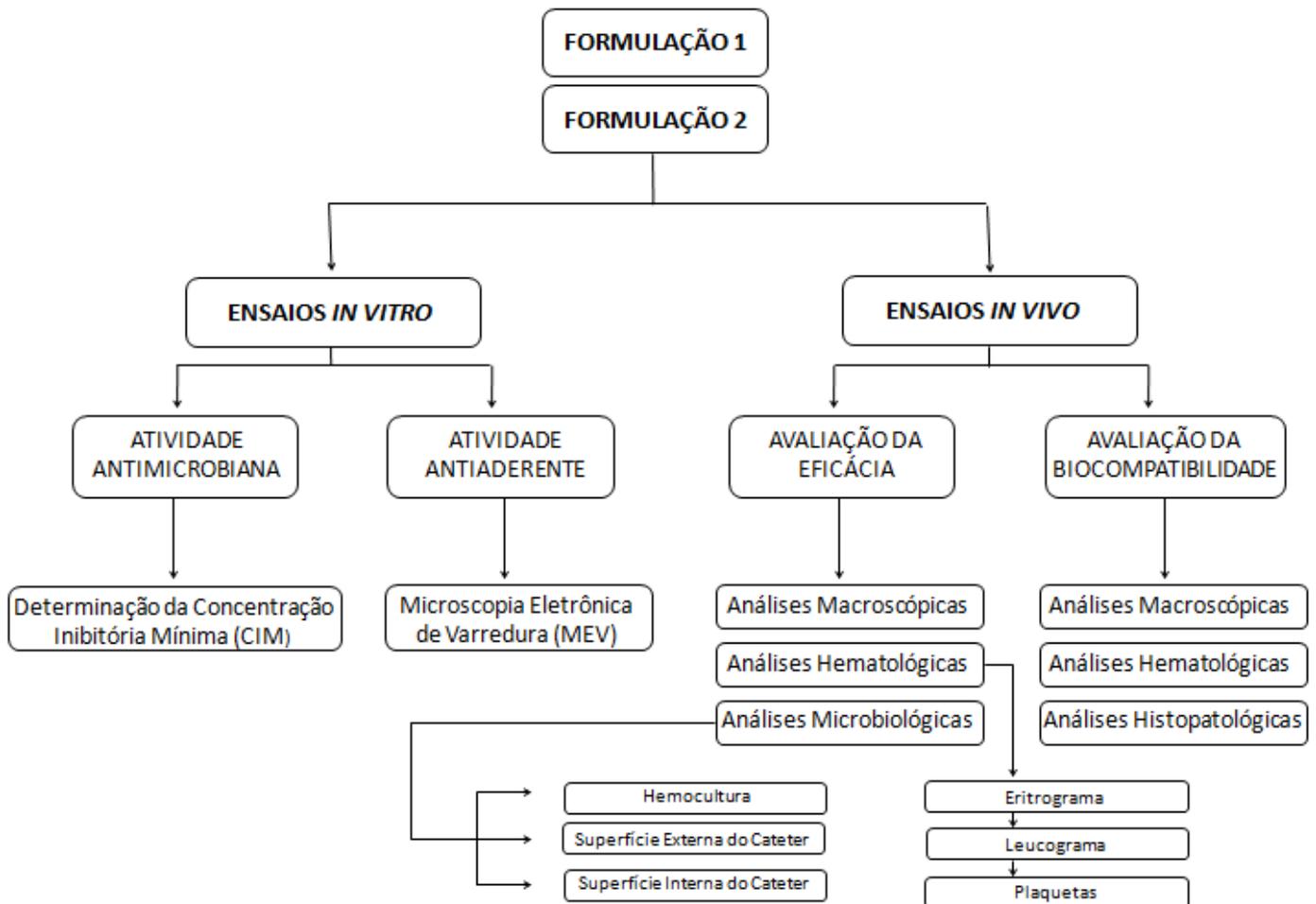
Foram testadas duas formulações para revestimento de dispositivos médico-hospitalares. A formulação 1 compreendia em uma solução composta por 3,0% de silicone, 5,0% de xilitol e 10% de uma solução pré-formulada (0,15% de triclosan, 0,2% de PHMB, 0,3% de cloreto de benzalcônio, 1,0% de silicone volátil, 0,1% essência, 8,25% água destilada e 90,0% de álcool etílico) em quantidade suficiente de Genesolv®. A formulação 2 compreendia em uma solução composta por 3,0% de silicone, 5,0% de xilitol e 1,0% de triclosan em quantidade suficiente de Genesolv®. O Genesolv® é um solvente utilizado industrialmente para carrear e fixar princípios ativos em determinado substrato, após rápida e completa evaporação. O triclosan foi o princípio ativo escolhido como antimicrobiano da formulação 2 devido a comprovada atividade, frente a micro-organismos de interesse, em pequenas concentrações (PI 0305735-6) (SANTOS, 2003). As concentrações dos princípios ativos foram determinadas baseadas em estudos prévios (SANTOS, 2003; SILVA et al., 2011; SOUSA et al., 2011) e na resolução RDC nº30, de 4 de julho de 2011, da ANVISA (ANVISA, 2011). A Figura 12 demonstra os fragmentos de CVC (1 cm e 2,5 cm) antes (A) e depois do revestimento com as formulações 1 (B) e 2 (C).



**Figura 12.** Imagens ilustrativas dos fragmentos de catéter venoso central (CVC) antes e após ao revestimento com as formulações-teste. A) CVC não revestido (CVC-NR), B) CVC revestido com a formulação 1 (CVC-R1) e C) CVC revestido com a formulação 2 (CVC-R2). Fonte: a autora.

#### 4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Inicialmente, foram realizados os ensaios *in vitro* de atividade antimicrobiana com as duas formulações propostas. Na sequência, fragmentos estéreis de CVCs foram revestidos com estas formulações (imersão nas formulações-teste durante 1 minuto e posterior secagem completa – por evaporação – em placas de Petri) para determinação da atividade antiaderente (antibiofilme) *in vitro* e para realização dos ensaios de eficácia *in vivo* e de biocompatibilidade tecidual. Todo o delineamento experimental do presente estudo está apresentado na Figura 13.



**Figura 13.** Fluxograma ilustrativo da metodologia de estudo.

#### 4.4.1 Ensaios *in vitro*

##### 4.4.1.1 Atividade antimicrobiana

Foi empregada a técnica de microdiluição, através da qual foi estabelecida a CIM por método turbidimétrico. Uma suspensão microbiana de cada uma das 6 cepas foi preparada com solução fisiológica estéril (cloreto de sódio - NaCl 9,0 g/L), a 25% de transmitância, com o auxílio de um espectrofotômetro ( $\lambda=580\text{nm}$ ). A suspensão microbiana padronizada foi submetida a diluições seriadas, em solução fisiológica estéril, as quais foram incubadas em meio ágar apropriado – TSA para bactérias e *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) para levedura. Após o período de incubação (24 horas, 37°C para bactérias / 48 horas, 25°C para levedura), foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs), a fim de se obter a concentração de  $2 \times 10^3$  UFC/mL em cada poço da microplaca (adaptado de USP, 1985; CANDAN et al., 2003).

Para o controle negativo, foram adicionados 100 $\mu$ L de caldo estéril aos poços das microplacas enquanto, para o controle positivo, foram empregados 100  $\mu$ L de caldo inoculado. Para a maioria das cepas bacterianas, o *Mueller Hinton Broth* (MHB) foi utilizado, com exceção da cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, para a qual foi utilizado *Tryptone Soy Broth* (TSB). Para a cepa leveduriforme – *Candida albicans* ATCC 10231 – foi utilizado o *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB). No preparo dos poços dos grupos-teste, foram acrescentados 100  $\mu$ L de caldo inoculado e 100  $\mu$ L das formulações propostas em diferentes concentrações (0,04; 0,06; 0,1; 0,15; 0,2; 0,4; 2; 4 e 20%). O cloranfenicol (0,0000025; 0,000025; 0,00025; 0,0025 e 0,025%) foi utilizado como fármaco de referência para as cepas bacterianas, enquanto a nistatina foi empregada como fármaco de referência para a cepa fúngica (0,2; 2; 20; 200 e 2000 U/mL). As microplacas foram então incubadas nas condições de tempo e temperatura supra-citadas.

A CIM foi determinada através da observação da turvação dos poços, após o período de incubação. Após este período, 20  $\mu$ L das substâncias que não apresentaram turvação foram novamente incubados em 4 mL TSB (para bactérias) ou SDB (para levedura), a fim de se determinar se a atividade antimicrobiana

encontrada foi bactericida/fungicida ou bacteriostática/fungistática. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

Para o ensaio de atividade antimicrobiana, as formulações propostas foram empregadas sem silicone e sem Genesolv® (somente com os princípios ativos) uma vez que tais substâncias são empregadas somente como veículo para incorporação e solvente carreador, respectivamente, durante o revestimento de biomateriais (Genesolv®, inclusive, é muito volátil e dissipa completamente).

#### 4.4.1.2 Atividade antiaderente

Uma suspensão microbiana padronizada, de cada cepa, foi preparada como descrito acima – para o ensaio de atividade antimicrobiana (adaptado de USP, 1985; CANDAN et al., 2003), a fim de ser obter  $10^8$  UFC/mL em cada tubo. Foram testadas uma cepa Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), uma cepa Gram-negativa (*Escherichia coli* clínica) e uma cepa fúngica (*Candida albicans* ATCC 10231). Para o controle negativo, foram empregados 1,5 mL de TSB (bactéria) ou SDB (levedura) estéreis. Para o controle positivo, foram adicionados 1,5 mL de caldo inoculado, 5% de glicose e um fragmento de CVC (1 cm) estéril, não revestido. Os tubos-teste foram preparados com 1,5 mL de caldo inoculado, 5% de glicose e um fragmento de CVC (1 cm) previamente revestido com as formulações propostas. Todos os tubos foram incubados (24 horas, 37°C para bactérias / 48 horas, 25°C para levedura) sob agitação (100 rpm) e circulação de ar (adaptado de FERREIRA et al., 2009; SILVA et al., 2011; SOUSA et al., 2011).

Após este período, os fragmentos de CVC foram removidos e mantidos individualmente em tubos contendo 10 mL de tampão fosfato 0,1M pH=7,4, onde foram sonicados (5 minutos a  $40 \pm 6$  KHz). Posteriormente, os fragmentos de catéteres foram fixados com 1,5 mL de glutaraldeído 2,5% por 24 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas (2 vezes) com 1,5 mL de tampão fosfato 0,1M pH=7,4 e desidratadas com concentrações crescentes de etanol (50% a 100%), com intervalo de 20 minutos entre cada troca. Os fragmentos de CVC foram então secos à temperatura ambiente e colados em *stubs* previamente identificados. Finalmente, os fragmentos de CVC foram metalizados com 2 nm de ouro durante 2 minutos e a

superfície externa dos mesmos foi analisada em microscópio eletrônico de varredura em alto vácuo, no modo de elétrons secundários (adaptado de FERREIRA et al., 2009; SILVA et al., 2011; SOUSA et al., 2011).

Para o ensaio de atividade antimicrobiana, as formulações propostas foram empregadas sem silicone, devido ao fato de esta substância prejudicar a visualização adequada das amostras na análise por MEV.

#### **4.4.2. Ensaios *in vivo***

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-UFJF) – protocolo nº 037/2011 (Anexo A) – e estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os animais foram alojados em gaiolas individuais adequadas, em ambiente com temperatura ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade (65 a 75%) controladas e sob ciclo claro-escuro de 12 horas. Durante todo o período experimental, os animais foram alimentados com água e ração *ad libitum*.

##### **4.4.2.1 Avaliação da eficácia antimicrobiana/antibiofilme**

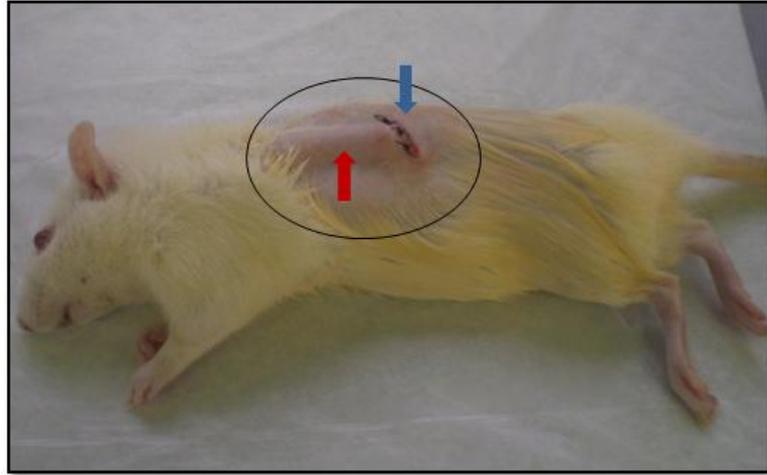
A eficácia antibiofilme das formulações estudadas foi testada frente a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Este microrganismo foi escolhido porque, além de ser um dos mais comumente presente nos casos de ICSRC (LISBOA et al., 2007; NEVES JÚNIOR et al., 2010), foi o que apresentou, no teste de aderência *in vitro*, melhor adesão e formação de biofilme nos fragmentos de CVC utilizados.

No primeiro dia de experimento, os fragmentos de CVC não revestidos (CVC-NR), os revestidos com a formulação 1 (CVC- R1) e aqueles revestidos com a formulação 2 (CVC- R2), todos com 2,5 cm de comprimento, foram imersos em tubos individuais contendo 5,0 mL de uma suspensão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ( $10^8$  UFC/mL) e 5% de glicose, durante 30 minutos. Após este período,

os fragmentos foram removidos e mantidos em placas estéreis até a completa secagem.

Foram utilizadas 41 ratas *Wistar* adultas (*Rattus norvegicus*), com peso variando entre 150 e 200 gramas, distribuídas aleatoriamente em 7 grupos. Os Grupos A, B e C (5 animais/grupo) compreendiam em controles relativos – inserção de fragmentos de CVC-NR, CVC- R1 e CVC- R2, respectivamente, sem imersão prévia na suspensão microbiana. Os Grupos D, E e F (7 animais/grupo) compreendiam nos grupos-teste – inserção de fragmentos de CVC-NR, CVC- R1 e CVC- R2, respectivamente, com imersão prévia na suspensão microbiana. O Grupo G, com 5 animais não manipulados, consistia no controle absoluto. Um número maior de animais foi utilizado nos grupos experimentais (D, E e F) em relação aos demais grupos uma vez que o delineamento do estudo já considerava 2 tipos de controle (relativo - grupos A, B e C e absoluto - grupo G) e permitiu, portanto, priorizar a observação de um maior número de animais que representavam o real objetivo do estudo – eficácia dos fragmento de CVC revestidos frente ao microrganismo.

No primeiro dia, os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina (90 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal) (HAJIGHAHRAMANI e VESAL, 2007) e submetidos à tricotomia na região dorsal. Em seguida, a região foi desinfetada com gaze estéril embebida em clorexidina 2% (degermante) seguida por 0,5% de clorexidina alcoólica. Uma incisão de 1 cm de largura, padronizada a 2 cm de distância da espinha dorsal, foi feita em cada animal e o respectivo fragmento de CVC (2,5 cm) foi inserido na loja cirúrgica subcutânea (Figura 14). No final dos 7 dias, os animais foram eutanasiados por sobredosagem anestésica (adaptado de KOCKRO et al., 2000).



**Figura 14.** Imagem representativa da incisão (1 cm) e da inserção do fragmento de catéter venoso central (CVC) (2,5 cm) na loja cirúrgica subcutânea no dorso do animal. O círculo preto indica a loja cirúrgica, a seta azul indica a incisão e a seta vermelha indica o catéter implantado. Fonte: a autora.

Durante todo o período experimental, o ganho de peso e o consumo de ração foram avaliados. Análises macroscópicas (presença de edema, eritema, secreção e febre), considerando Grau 0: nenhuma reação, Grau 1: reação discreta, Grau 2: reação moderada e Grau 3: reação intensa, foram realizadas. No sétimo dia, foram obtidas amostras de sangue para análises hematológicas (hemograma completo) e microbiológicas (hemocultura). Para as análises hematológicas foi utilizado um contador automatizado (Cell Dyn 3500, Abbott, USA). Para as hemoculturas, 500  $\mu$ L de sangue total foram inseridos em 4,5 mL de *Brain Heart Infusion* (BHI). Na sequência, os fragmentos de CVC foram removidos e submetidos a análise microbiológica: a) rolamento do fragmento de CVC em placa de Petri contendo ágar sangue, para a avaliação da contaminação da superfície externa e, b) injeção de 1 mL de caldo tioglicolato na face interna do fragmento CVC, em tubo contendo 4 mL do mesmo meio de cultura, para a avaliação da contaminação da superfície interna. As placas de Petri e os tubos foram incubados a 37°C durante 24 horas e, após este período, o crescimento bacteriano foi avaliado. A hemocultura e a contaminação da superfície interna foram avaliados pela presença ou ausência de turvação nos meios de cultivo. A contaminação da superfície externa foi avaliada com base na seguinte escala: contagem do número de UFC de 0 a 100 colônias, + = 100 a 300 colônias, ++ = mais de 300 colônias, +++ = colônias incontáveis e ++++ = colônias confluentes (adaptado de KOCKRO et al., 2000). Os micro-organismos detectados foram

posteriormente identificados pelo Laboratório de Análises Clínicas Maurílio Baldi do Hospital Universitário da UFJF. Os fragmentos de CVC também foram submetidos à análise por MEV, para visualização da formação ou desagregação do biofilme. No entanto, as hemáceas e outras células oriundas do sangue dos animais impediram a visualização das células microbianas, o que invalidou a utilização deste parâmetro de análise.

#### 4.4.2.2 Avaliação da biocompatibilidade tecidual

A biocompatibilidade dos fragmentos de CVC (1 cm) revestidos com as formulações estudadas foi testada com 7 e 21 dias. Estes momentos de avaliação são os convencionalmente utilizados para estudos de biocompatibilidade (OKINO NETO, MOURA e DAVIDOWICZ, 2010, MIYAGAKI, 2011), uma vez que as possíveis reações celulares e teciduais ocorrem neste período.

Foram utilizadas 38 ratas *Wistar* (*Rattus norvegicus*), adultas, com peso variando entre 150 e 200 gramas, distribuídas aleatoriamente em 4 grupos. O Grupo 1 foi composto por 6 animais com CVC-NR inseridos na região dorsal, o Grupo 2 por 6 animais com inserção CVC-R1, o Grupo 3 por 6 animais com inserção CVC-R2, e, o Grupo 4 (grupo-controle) foi composto por 10 animais não manipulados. Neste ensaio, um maior número de animais foi utilizado no Grupo 4 pois este representava o único controle de todo o ensaio. Além disso, foi possível analisar dois fragmentos de CVC, em lojas cirúrgicas diferentes, em cada animal dos grupos-teste (1, 2 e 3), o que nos permitiu otimizar o número total de animais estudados.

No primeiro dia, os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina (90 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal) (HAJIGHAHRAMANI e VESAL, 2007) e submetidos à tricotomia na região dorsal; seguida pela desinfecção com gaze estéril embebida em clorexidina 2% (degermante) e, posteriormente, em 0,5% de clorexidina alcoólica. Duas incisões de 1 cm de largura (uma à direita e outra à esquerda), padronizada a 2 cm de distância da espinha dorsal e pelo menos 4 cm uma da outra, foram feitas em cada animal e os respectivos fragmentos de CVC foram inserido nas lojas cirúrgicas subcutâneas. No final de 7 dias, metade dos animais de cada grupo foi eutanasiada por *overdose* de anestesia e, a outra metade,

foi eutanasiada ao final de 21 dias (adaptado de SILVA et al., 2009).

Durante todo o período experimental, o ganho de peso e o consumo de ração foram verificados. Análises macroscópicas (presença de edema, eritema, secreção e febre), considerando Grau 0: nenhuma reação, Grau 1: reação discreta, Grau 2: reação moderada e Grau 3: reação intensa, foram realizadas. No último dia, foram obtidas amostras de sangue para análise hematológica (hemograma completo), realizada por um contador automatizado (Cell Dyn 3500, Abbott, USA). As amostras da pele em torno do implante do fragmento de CVC foram removidas e fixadas em formalina tamponada 10% durante um período mínimo de 24 horas. Seções (4 µm de espessura) foram cortadas e coradas com hematoxilina e eosina para análise histopatológica. As lâminas foram analisadas sob microscópio óptico e as imagens capturadas por uma câmara de vídeo acoplada ao mesmo. Foi realizada a análise de cinco campos microscópios aleatórios de cada amostra de tecido da lâmina histológica (ampliação de 400x). As imagens foram analisadas por meio dos *softwares* ImageJ e Image-Pro Plus (Media Cybernetics), com auxílio de marcação digital, sendo submetidas à contagem de células mononucleares, polimorfonucleares, fibroblastos, vasos sanguíneos e mastócitos. A área de colágeno foi avaliada quantitativamente (porcentagem). A presença de células gigantes, área de necrose e infiltrado inflamatório foi avaliada qualitativamente (adaptado de SILVA et al., 2009).

#### 4.4.2.3 Análise estatística

A análise estatística descritiva foi realizada para o ganho de peso, o consumo de ração, e os parâmetros hematológicos e histopatológicos. Análise de variância (ANOVA) seguida por *post hoc* de Tukey foi utilizada para avaliar a diferença entre as médias dos resultados dos grupos de estudo. O teste *t* de Student para amostras pareadas foi utilizado para a comparação dos parâmetros avaliados com 7 e 21 dias no ensaio de biocompatibilidade. Foi utilizado o *Statistical Software Package for the Social Sciences* (SPSS) 14.0 . O limite de significância foi de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ENSAIOS *IN VITRO*

#### 5.1.1 Atividade antimicrobiana

Ambas as formulações apresentaram atividade antimicrobiana frente a todas as cepas testadas – *Candida albicans* ATCC 10231, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Acinetobacter baumannii* clínica, *Escherichia coli* clínica e *Pseudomonas aeruginosa* clínica – uma vez que, em determinadas concentrações, não foi observada a turvação característica de crescimento microbiano. O controle positivo apresentou turvação, indicativo de crescimento microbiano; enquanto o controle negativo se manteve límpido. Os resultados de CIM de ambas as formulações e dos fármacos de referência, assim como o tipo de atividade antimicrobiana encontrada, frente a estes micro-organismos, estão apresentados na Tabela 2.

Frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Acinetobacter baumannii* clínica e *Escherichia coli* clínica, ambas as formulações apresentaram tanto a atividade bactericida quanto a atividade bacteriostática. Frente a *Candida albicans* ATCC 10231 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, apenas a atividade bactericida/fungicida foi observada, para ambas as formulações. O comportamento foi diferente exclusivamente frente a cepa *Pseudomonas aeruginosa* clínica: a formulação 1 apresentou somente atividade bactericida, enquanto a formulação 2 demonstrou apenas atividade bacteriostática.

**Tabela 2.** Concentração inibitória mínima (CIM) e tipo de atividade antimicrobiana demonstrada pelas formulações e pelos fármacos de referência, frente alguns micro-organismos frequentemente envolvidos em infecções de corrente sanguínea relacionadas à catéter (ICSRC).

MICRO-ORGANISMOS	FORMULAÇÃO 1		FORMULAÇÃO 2		FÁRMACOS DE REFERÊNCIA (CLORANFENICOL e NISTATINA*)	
	Atividade Bactericida / Fungicida*	Atividade Bacteriostática / Fungistática*	Atividade Bactericida / Fungicida*	Atividade Bacteriostática / Fungistática*	Atividade Bactericida / Fungicida*	Atividade Bacteriostática / Fungistática*
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231*	CIM = 2%	-	CIM = 0,4%	-	CIM = 2 U/mL	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	CIM = 2%	-	CIM = 0,04%	-	CIM = 0,025 %	CIM = 0,00025 %
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	CIM = 0,1%	CIM = 0,04%	CIM = 0,06%	CIM = 0,04%	CIM = 0,000025 %	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> clínica	CIM = 0,2%	CIM = 0,04%	CIM = 0,06%	CIM = 0,04%	-	CIM = 0,000025 %
<i>Escherichia coli</i> clínica	CIM = 2%	CIM = 0,2%	CIM = 0,06%	CIM = 0,04%	-	CIM = 0,025 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> clínica	CIM = 4%	-	-	CIM = 20%	-	CIM = 0,025 %

\* para cepa fúngica.

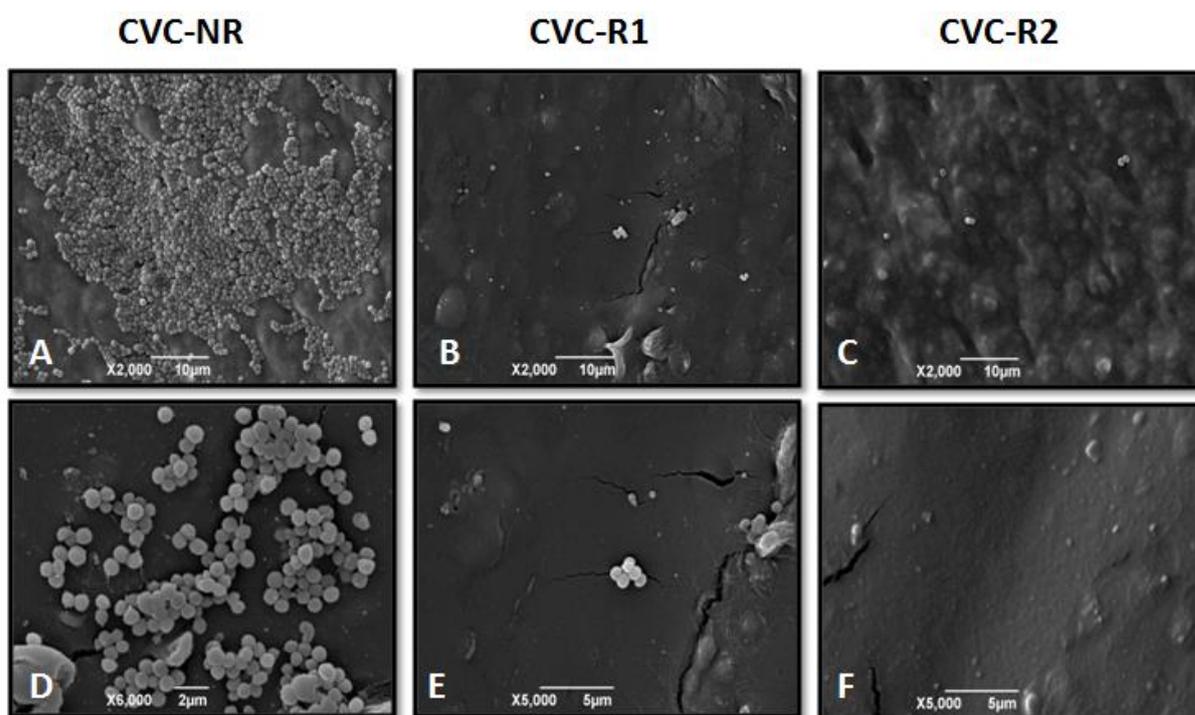
- ausência de atividade frente ao micro-organismo testado.

CIM = concentração inibitória mínima dentro do intervalo testado (formulações-teste: 0,04 - 20%; cloranfenicol: 0,000025 - 0,025%; nistatina: 0,2 - 2000 U/mL).

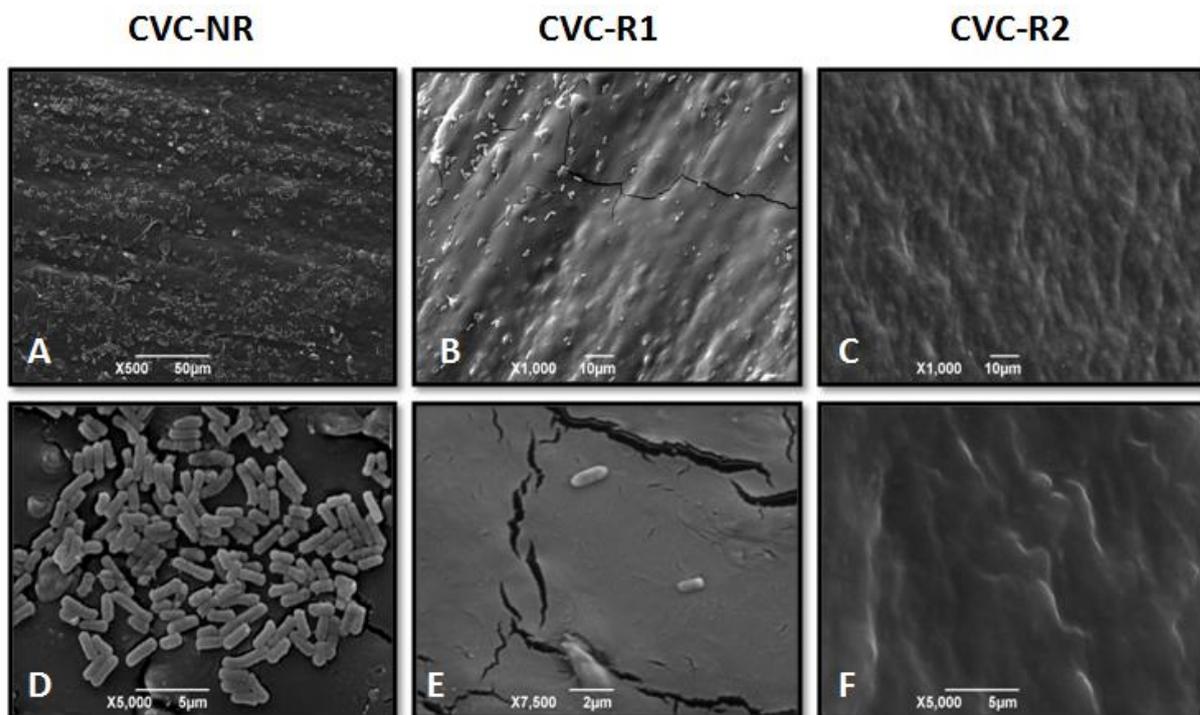
### 5.1.2 Atividade antiaderente

Na superfície externa dos fragmentos de CVC-NR foram encontrados biofilmes de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Figura 15) e de *Escherichia coli* clínica (Figura 16) bem formados e aderidos. Observa-se um comportamento diferente para a cepa *Candida albicans* ATCC 10231 (Figura 17), já que foram visualizadas apenas colônias isoladas aderidas. A inibição da aderência das colônias e da formação do biofilme de todas as cepas testadas foram verificadas pelas eletromicrografias dos fragmentos de CVC-R1 e CVC-R2, o que indica a capacidade antiaderente/antibiofilme de ambas as formulações-teste.

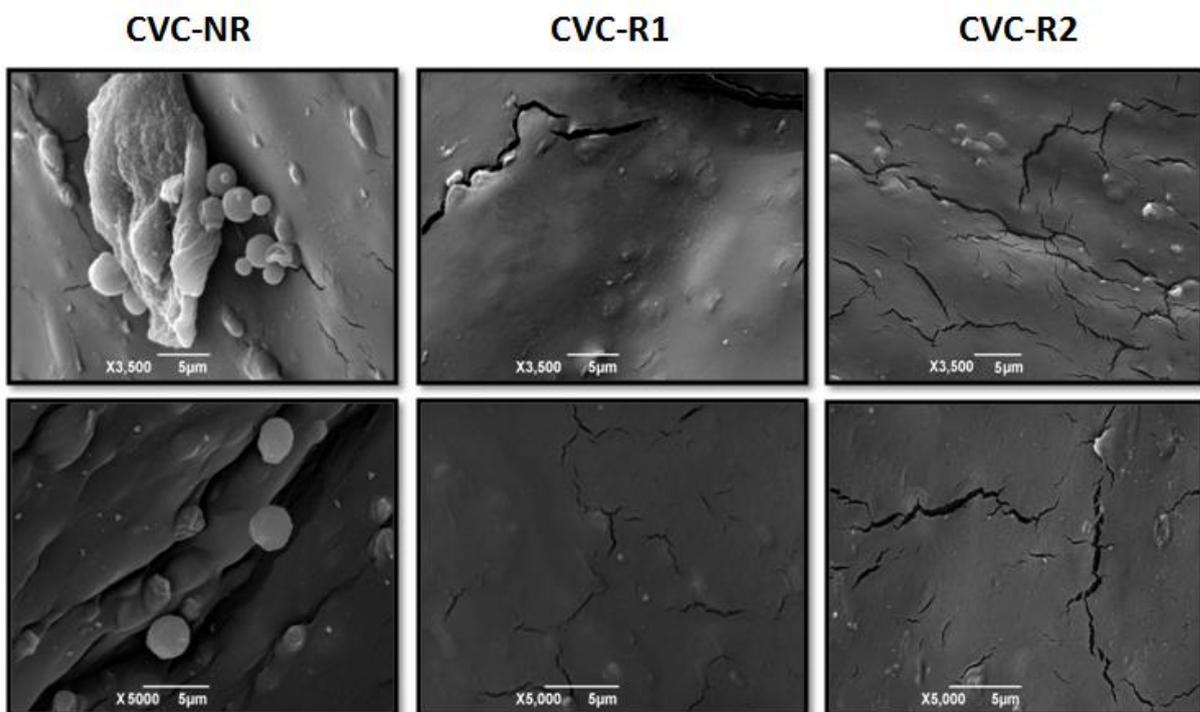
As eletromicrografias estão demonstradas nas Figuras 15, 16 e 17.



**Figura 15.** Eletromicrografias da superfície externa de fragmentos de CVC-NR, CVC-R1 e CVC-R2 após contato com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A-C (aumento X2.000) e D-F (aumento x5.000). As barras representam 2 µm (D), 5 µm (E, F) e 10 µm (A-C). CVC-NR: catéter venoso central não revestido; CVC-R1: catéter venoso central revestido com a formulação 1 e CVC-R2: catéter venoso central revestido com a formulação 2. Fonte: a autora.



**Figura 16.** Eletromicrografias da superfície externa de fragmentos de CVC-NR, CVC-R1 e CVC-R2 após contato com *Escherichia coli* clínica. A-C (aumento x500 e x1.000) e D-F (aumento x5.000 e x7.500). As barras representam 2 μm (E), 5 μm (D, F), 10 μm (B, C) e 50 μm (A). CVC-NR: catéter venoso central não revestido; CVC-R1: catéter venoso central revestido com a formulação 1 e CVC-R2: catéter venoso central revestido com a formulação 2. Fonte: a autora.

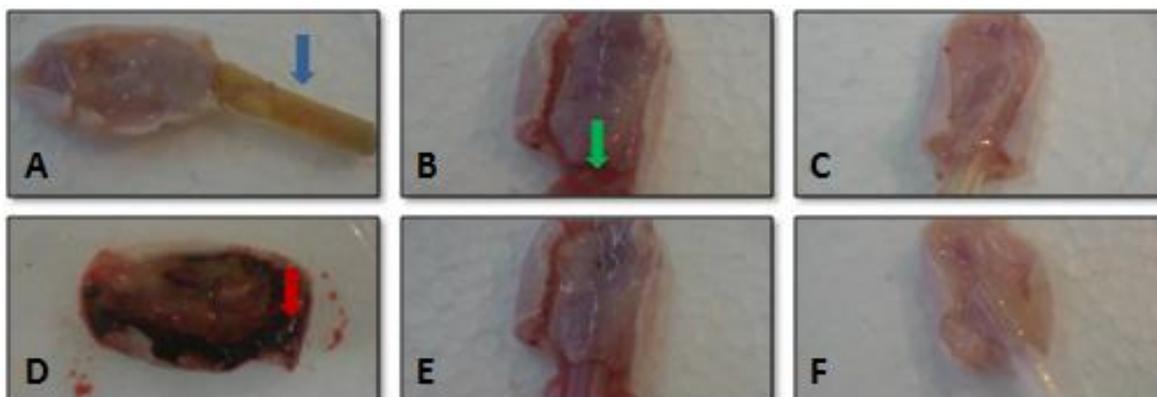


**Figura 17.** Eletromicrografias da superfície externa de fragmentos de CVC-NR, CVC-R1 e CVC-R2 após contato com *Candida albicans* ATCC 10231. A-C (aumento x3.500) e D-F (aumento x5.000). As barras representam 5 μm (A-F). CVC-NR: catéter venoso central não revestido; CVC-R1: catéter venoso central revestido com a formulação 1 e CVC-R2: catéter venoso central revestido com a formulação 2. Fonte: a autora.

## 5.2 ENSAIOS *IN VIVO*

### 5.2.1 Avaliação da eficácia antimicrobiana/antibiofilme

Durante os 7 dias de experimento, o ganho de peso e consumo de ração foram estatisticamente semelhantes entre os grupos experimentais e grupos-controle (Tabela 3). Nenhum dos animais apresentou edema ao redor do implante fragmento CVC. Apenas um animal do grupo A (CVC-NR) e um animal do grupo D (CVC-NR previamente contaminado) apresentaram febre, com sinais de tremor e secreção ao redor do implante, sendo que a febre no animal do grupo D durou 5 dias (Anexo B). Através de uma análise qualitativa e comparativa entre os grupos, observou-se que o eritema apresentado em torno dos implantes de fragmentos CVC nos animais do Grupo D (CVC-NR previamente contaminado) foi mais pronunciado e duradouro do que nos animais dos demais grupos. Notou-se também, que os fragmentos de CVC dos grupos C e F (CVC-R2, sem e com prévia contaminação, respectivamente) foram retirados sem nenhum sinal de pus, exsudato ou sangue, enquanto a minoria dos animais (2 de cada grupo), dos grupos B e E (CVC-R1, sem e com prévia contaminação, respectivamente) e a maioria dos animais (5 de cada grupo), dos grupos A e D (CVC-NR, sem e com prévia contaminação, respectivamente) apresentaram tais características (Anexo B). A Figura 18 demonstra imagens representativas dos tecidos retirados ao redor do implante de CVC de cada grupo experimental.



**Figura 18.** Fotografias dos tecidos ao redor do implante do fragmento de catéter venoso central (CVC). A) Grupo A=CVC-NR; B) Grupo B=CVC-R1 e C) Grupo C=CVC-R2 - grupos controle-relativo, sem imersão prévia dos fragmentos em suspensão bacteriana. D) Grupo D=CVC-NR; E) Grupo E=CVC-R1 e F) Grupo F=CVC-R2 - grupos-teste, cujos fragmentos foram previamente imersos em suspensão bacteriana. A maioria dos fragmentos de CVC retirados dos animais do Grupo A apresentaram pus no seu interior enquanto no Grupo D, além do pus, foi observada inflamação significativa do tecido. Os tecidos dos animais dos Grupos B e E apresentaram menor grau de inflamação, com presença de exsudato. Os fragmentos de CVC dos Grupos C e F foram retirados sem nenhum sinal de inflamação. A seta azul indica a presença de pus, a seta verde indica a presença de exsudato e a seta vermelha indica a presença de inflamação tecidual. Fonte: a autora.

**Tabela 3.** Ganho de peso e consumo de ração dos animais durante a avaliação da eficácia antimicrobiana/antibiofilme.

Parâmetros	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E	Grupo F	Grupo G
Ganho de peso (%)	5,5 ± 9	7,3 ± 2,2	1,6 ± 10	-0,2 ± 10,7	10,2 ± 5,6	2,3 ± 2,5	6,8 ± 1,8
Consumo de ração (g/dia)	19,2 ± 6	21,9 ± 2,7	18,5 ± 6,3	17,0 ± 7	20,7 ± 2	18,9 ± 1,6	21,1 ± 2,8

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=5 animais nos grupos A-C; n=7 animais nos grupos D-F; n=5 animais no grupo G). Grupo A=CVC-NR; Grupo B=CVC-R1 e Grupo C=CVC-R2 (grupos controle-relativo). Grupo D=CVC-NR; Grupo E=CVC-R1 e Grupo F=CVC-R2 (grupos-teste, cujos fragmentos foram previamente contaminados). Grupo G=controle absoluto (animais não manipulados).

Nenhum dos animais apresentou contaminação sanguínea sistêmica, uma vez que todas as hemoculturas foram negativas (não houve crescimento microbiano). A Tabela 4 demonstra os resultados dos parâmetros hematológicos analisados.

**Tabela 4.** Parâmetros hematológicos dos animais durante a avaliação da eficácia antimicrobiana/antibiofilme.

Parâmetros	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E	Grupo F	Grupo G
Hematimetria (x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	7,7 ± 1,3	7,5 ± 1,5	7,4 ± 0,4	6,3 ± 0,8 <sub>a,b</sub>	8,2 ± 0,6 <sub>a</sub>	8,2 ± 0,9 <sub>b</sub>	7,1 ± 1,3
Hemoglobina (g/dL)	14,5 ± 2,4	14,1 ± 2,8	14,2 ± 1	11,9 ± 1,3 <sub>c,d</sub>	15,8 ± 1,4 <sub>c</sub>	16 ± 1,9 <sub>d</sub>	14,5 ± 2,7
Hematócrito (%)	44,2 ± 7,8	42,5 ± 8,2	42,8 ± 2,3	35,9 ± 4,2 <sub>e,f</sub>	46,6 ± 4 <sub>e</sub>	46,4 ± 5,4 <sub>f</sub>	41,5 ± 7,7
Leucometria Global (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	9,9 ± 2,5	8,1 ± 3,1	7,7 ± 2,6	6,9 ± 2,5	9 ± 3,1	7,3 ± 1,8	7,3 ± 1,8
Segmentados (%)	39 ± 19	29 ± 10	22 ± 3	25 ± 5	23 ± 6	33 ± 25	24 ± 5
Linfócitos (%)	52 ± 17	67 ± 11	68 ± 6	69 ± 8	72 ± 7	63 ± 24	70 ± 5
Monócitos (%)	6 ± 5	2 ± 2	3 ± 1	4 ± 3	3 ± 2	2 ± 2	3 ± 2
Eosinófilos (%)	2 ± 1 <sub>g</sub>	2 ± 1 <sub>h</sub>	8 ± 2 <sub>g-L</sub>	2 ± 2 <sub>i</sub>	2 ± 1 <sub>j</sub>	2 ± 1 <sub>k</sub>	3 ± 1 <sub>L</sub>
Basófilos (%)	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	788 ± 466	864 ± 136	831 ± 128	913 ± 300	1092 ± 187	1242 ± 605	837 ± 151

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=5 animais nos grupos A-C; n=7 animais nos grupos D-F; n=6 animais no grupo G). Médias seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste de ANOVA seguido por *post hoc* de Tukey (<sup>a</sup>p=0,029; <sup>b</sup>p=0,022; <sup>c</sup>p=0,020; <sup>d</sup>p=0,013; <sup>e</sup>p=0,037; <sup>f</sup>p=0,044 e <sup>g-L</sup>p<0,001 ). Grupo A=CVC-NR; Grupo B=CVC-R1 e Grupo C=CVC-R2 (grupos controle-relativo). Grupo D=CVC-NR; Grupo E=CVC-R1 e Grupo F=CVC-R2 (grupos-teste, cujos fragmentos foram previamente contaminados). Grupo G=controle absoluto (animais não manipulados).

A hematimetria, a hemoglobina e o hematócrito dos animais do grupo D (CVC-NR previamente contaminado) foram estatisticamente menor do que nos animais do grupo E – CVC-R1 previamente contaminado – (p=0,029; p=0,020 e p=0,037; respectivamente) e do grupo F – CVC-R2 previamente contaminado – (p=0,022; p=0,013 e p=0,044; respectivamente). No entanto, estes parâmetros foram semelhantes aos encontrados para os animais do grupo G (controle). Em relação à série branca, foi encontrado maior número de eosinófilos no grupo C (CVC-R2) no que nos demais grupos (p<0,001 para todas comparações) (Tabela 4).

A Tabela 5 demonstra os resultados da análise microbiológica das superfícies externa e interna dos fragmentos de CVC implantados nos animais de experimentação.

Dentre os grupos A, B e C, aqueles que compreendiam em controles relativos, foi observada uma colonização acentuada nos fragmentos de CVC-NR (Grupo A) por diferentes micro-organismos. Nesse grupo, 20% dos animais apresentaram *Staphylococcus aureus* (+) e 20% apresentaram *Pseudomonas aeruginosa* (++++) como colonizadores da superfície externa. Além disso, 20% dos animais apresentaram *Citrobacter* sp e *Enterococcus faecalis* na superfície interna de CVC-NR. Os animais do Grupo B (CVC-R1) apenas apresentaram colonização na superfície interna (40% apresentaram *Staphylococcus aureus*) enquanto os animais do Grupo C não apresentaram nenhuma colonização em ambas as superfícies.

Entre os grupos experimentais, cujos fragmentos de CVC foram incubados anteriormente com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, foi observada uma diferença de intensidade na colonização de ambas as superfícies dos catéteres. Todos os animais do grupo D (CVC-NR) apresentaram colonização externa por *Staphylococcus aureus* com diferenças no número de colônias: apenas 28,6% dos animais apresentaram menos que 100 UFC; 14,3% dos animais apresentaram de 100 a 300 UFC (+); 42,8% dos animais apresentaram crescimento incontável (+++); e, 14,3% dos animais apresentaram crescimento confluyente (++++). A superfície interna de 85,7% dos animais foi colonizada por *Staphylococcus aureus* enquanto 14,3%, além de colonização por *Staphylococcus aureus*, apresentou também *Klebsiella* spp. O Grupo E (CVC-R1) apresentou, na superfície externa, 85,7% dos animais com menos de 100 UFC e 14,3% com 100 a 300 UFC (+) de *Staphylococcus aureus*; enquanto a superfície interna já apresentou 28,6% de animais sem nenhum crescimento. No Grupo F (CVC-R2), 57,1% dos animais não apresentaram colonização na superfície externa enquanto nenhum animal apresentou crescimento na superfície interna dos fragmentos de catéteres.

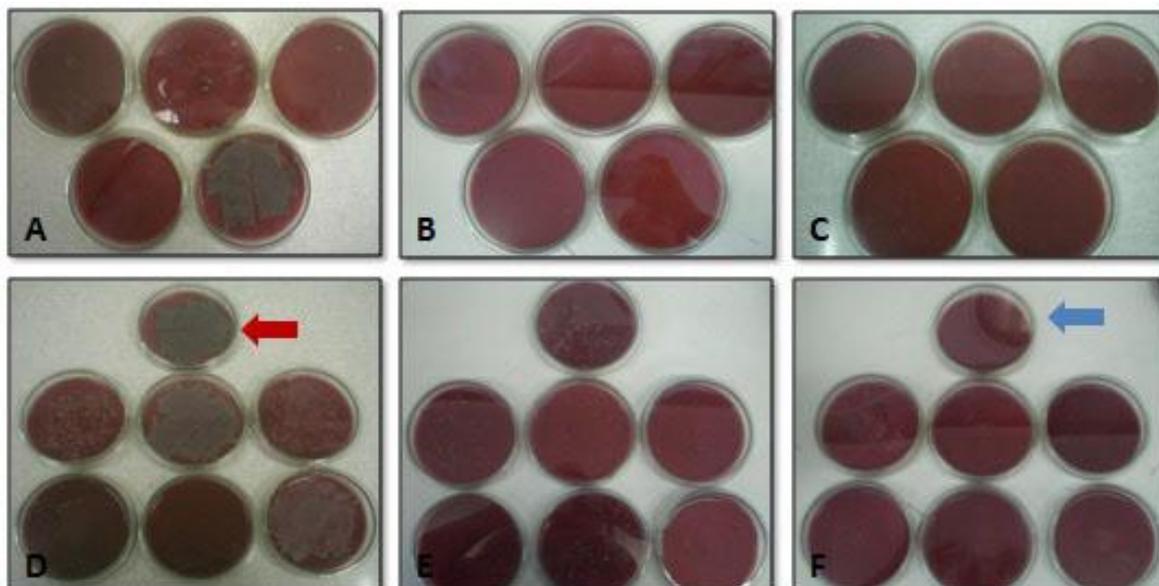
**Tabela 5.** Resultados da análise microbiológica das superfícies externa e interna de fragmentos de catéter venoso central (CVC) implantados nos animais durante o ensaio de avaliação da eficácia antimicrobiana/antiaderente: detecção e identificação de micro-organismos colonizadores.

Grupos	Superfície externa dos fragmentos de CVC	Superfície interna dos fragmentos de CVC
<b>Grupo A</b> CVC-NR	20% <i>Staphylococcus aureus</i> (+) 20% <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (++++) 60% negativo	20% <i>Citrobacter</i> spp. + <i>Enterococcus faecalis</i> 80% negativo
<b>Grupo B</b> CVC-R1	100% negativo	40% <i>Staphylococcus aureus</i> 60% negativo
<b>Grupo C</b> CVC-R2	100% negativo	100% negativo
<b>Grupo D</b> CVC - NR previamente contaminado	28,6% <i>Staphylococcus aureus</i> (<100 UFC) 14,3% <i>Staphylococcus aureus</i> (+) 42,8% <i>Staphylococcus aureus</i> (+++) 14,3% <i>Staphylococcus aureus</i> (++++)	85,7% <i>Staphylococcus aureus</i> 14,3% <i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Klebsiella</i> spp.
<b>Grupo E</b> CVC - R1 previamente contaminado	85,7% <i>Staphylococcus aureus</i> (<100 UFC) 14,3% <i>Staphylococcus aureus</i> (+)	57,1% <i>Staphylococcus aureus</i> 14,3% <i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Klebsiella</i> spp. 28,6% negativo
<b>Grupo F</b> CVC - R2 previamente contaminado	14,3% <i>Staphylococcus aureus</i> (<100 UFC) 14,3% <i>Staphylococcus aureus</i> (+) 14,3% <i>Streptococcus pneumoniae</i> (<100 UFC) 57,1% negativo	100% negativo

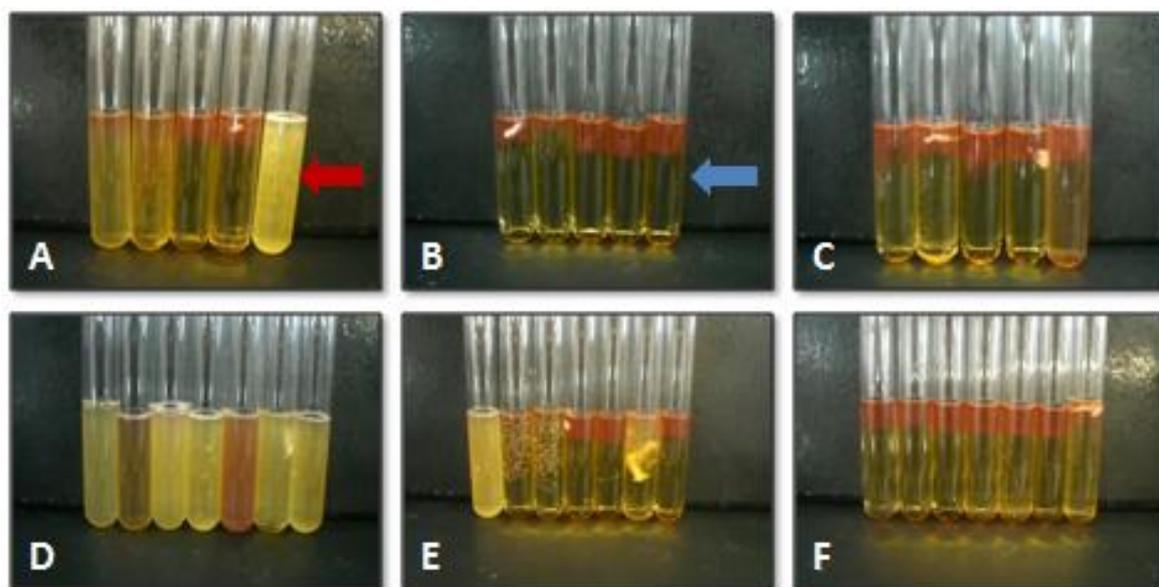
Resultados expressos em porcentagem de animais por grupo.

Negativo = sem crescimento microbiano; até 100 unidades formadoras de colônia (UFC) = <100 UFC; + = de 100 a 300 colônias; ++ = mais de 300 colônias; +++ = colônias incontáveis e ++++ = colônias confluentes.

A Figura 19 demonstra as placas de ágar sangue utilizadas para avaliação da contaminação da superfície externa dos fragmentos de CVC, enquanto a Figura 20 demonstra os tubos de tioglicolato usados para verificação da contaminação da superfície interna dos mesmos.



**Figura 19.** Fotografias das placas de ágar sangue utilizadas para avaliação da contaminação da face externa dos fragmentos de catéter venoso central (CVC). A) Grupo A=CVC-NR; B) Grupo B=CVC-R1 e C) Grupo C=CVC-R2 - grupos controle-relativo, sem imersão prévia dos fragmentos em suspensão bacteriana. D) Grupo D=CVC-NR; E) Grupo E=CVC-R1 e F) Grupo F=CVC-R2 - grupos-teste, cujos fragmentos foram previamente imersos em suspensão bacteriana. A seta vermelha indica a presença de crescimento microbiano e a seta azul indica a ausência do mesmo. Fonte: a autora.



**Figura 20.** Fotografias dos tubos de tioglicolato utilizados para avaliação da contaminação da face interna dos fragmentos de catéter venoso central (CVC). A) Grupo A=CVC-NR; B) Grupo B=CVC-R1 e C) Grupo C=CVC-R2 - grupos controle-relativo, sem imersão prévia dos fragmentos em suspensão bacteriana. D) Grupo D=CVC-NR; E) Grupo E=CVC-R1 e F) Grupo F=CVC-R2 - grupos-teste, cujos fragmentos foram previamente imersos em suspensão bacteriana. A seta vermelha demonstra a turvação do meio de cultura, o que indica crescimento microbiano. A seta azul demonstra o meio de cultura límpido, sem crescimento de micro-organismos. Fonte: a autora.

### 5.2.2 Avaliação da biocompatibilidade tecidual

Durante os 7 primeiros dias de experimento, o ganho de peso e consumo de ração foram estatisticamente semelhantes entre os grupos experimentais e o grupo controle. Após o 7° até o 21° dia do experimento, embora o consumo de ração tenha se mantido estatisticamente semelhante entre os grupos, foi observado maior ganho de peso nos animais do grupo 3 no que nos animais dos grupos 1, 2 e 4 ( $p=0,038$ ;  $p=0,045$  e  $p=0,022$ ; respectivamente) (Tabela 6).

Durante os primeiros 7 dias, nenhum dos animais apresentou edema e secreção em torno do fragmento de CVC implantado, nem sinais de febre. Através da análise comparativa entre os grupos, observou-se que o eritema em torno do fragmento de CVC dos animais do grupo 2 (CVC-R1) foi mais acentuado do que nos animais do grupo 1 (CVC-NR). Os animais do grupo 3 (CVC-R2) foram os que menos apresentaram eritema em torno do implante, sendo que, quando presente, o eritema apareceu de forma menos pronunciada (Anexo E).

Até o 21° dia de experimento, a intensidade do eritema em torno do fragmento de CVC tornou-se semelhante nos grupos 1 (CVC-NR) e 2 (CVC-R1). O eritema presente nos animais do grupo 3 (CVC-R2) se manteve leve e de forma menos pronunciada que nos animais dos demais grupos. Também foram observados, ao redor do fragmento de CVC dos animais do grupo 1 (CVC-NR) sinais de secreção, enquanto nos animais dos grupos 2 (CVC-R1) e 3 (CVC-R2) notou-se a presença de edema em torno do implante. Nenhum dos animais apresentou sinais de febre (Anexo E).

**Tabela 6.** Ganho de peso e consumo de ração dos animais durante o ensaio de biocompatibilidade tecidual.

<b>7 DIAS</b>				
<b>Parâmetros</b>	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Grupo 4</b>
Ganho de peso (%)	6 ± 4,8	4,2 ± 4,6	10,6 ± 1,8	10 ± 2,4
Consumo de ração (g/dia)	16 ± 2,9	11,9 ± 7,3	16,2 ± 0,8	18,1 ± 1,3
<b>21 DIAS</b>				
	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Grupo 4</b>
Ganho de peso (%)	23,1 ± 2,5 <sup>a</sup>	23,7 ± 6,9 <sup>b</sup>	43,2 ± 12,2 <sup>a,b,c</sup>	23,2 ± 6,7 <sup>c</sup>
Consumo de ração (g/dia)	20,5 ± 2,3	20,7 ± 0,5	18,6 ± 0,9	19,1 ± 2,4

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=6 animais até 7º dia e n=3 animais até 21º dia, nos grupos 1-3; n=10 animais até 7º dia e n=5 animais até 21º dia, no grupo 4). Médias seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste de ANOVA seguido por *post hoc* de Tukey (<sup>a</sup>p=0,038; <sup>b</sup>p=0,045 e <sup>c</sup>p=0,022). Grupo 1=CVC-NR; Grupo 2=CVC-R1; Grupo 3=CVC-R2 e Grupo 4=controle absoluto (animais não manipulados).

A Tabela 7 demonstra os resultados dos parâmetros hematológicos observados nos animais de experimentação. Com 7 dias de experimento, a hematimetria encontrada nos animais do grupo 2 (CVC-R1) foi menor estatisticamente do que nos animais do grupo 4 (controle) (p=0,050). As plaquetas dos animais do grupo 1 (CVC-NR) apresentaram a contagem estatisticamente maior do que nos animais do grupo 2 (CVC-R1) e grupo 4 (controle) – p=0,016 e p=0,027 respectivamente – enquanto, a contagem de plaquetas do grupo 3 (CVC-R2) foi estatisticamente maior que no grupo 2 (CVC-R1) (p=0,042). Os grupos-teste apresentaram as plaquetas estatisticamente semelhante ao grupo-controle, com exceção do grupo 1 (CNR-NR) que apresentou níveis maiores (p=0,027).

Aos 21 dias de ensaio, os níveis de células vermelhas e de plaquetas tornaram-se semelhantes entre todos os grupos. No final do experimento, notou-se diferença estatística apenas na contagem diferencial de leucócitos: o grupos 1 (CVC-NR) e 2 (CVC-R1) apresentaram maior contagem de segmentados – p=0,043 e p=0,037 respectivamente –, em relação ao grupo 4 (controle),

enquanto o grupo 3 (CNR-R2) se manteve estatisticamente igual ao mesmo. Proporcionalmente, a contagem de linfócitos do grupo 1 (CNR-NR) foi estatisticamente inferior ao do grupo controle ( $p=0,019$ ). As demais comparações foram estatisticamente semelhantes.

A comparação realizada entre o período inicial (7 dias) e o período final (21 dias) do experimento demonstra que, mesmo que o contato com os CVC revestidos ocorra por um tempo maior, os parâmetros hematológicos não apresentaram diferenças significativas. Apenas foram encontradas diferenças estatísticas na hematimetria dos animais do grupo 2 (CVC-R1), que se demonstrou menor inicialmente ( $p=0,030$ ), e na contagem de monócitos dos animais do grupo 4 (controle), que se mostrou também menor nos primeiros 7 dias de experimento ( $p=0,015$ ).

**Tabela 7.** Parâmetros hematológicos dos animais no ensaio de biocompatibilidade tecidual.

Parâmetros	7 DIAS				21 DIAS			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Hematimetria (x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	8,1 ± 0,5	7,1 ± 0,1 <sup>a*</sup>	7,6 ± 0,1	8,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	7,9 ± 0,8	8,3 ± 0,4 <sup>*</sup>	7,7 ± 1	7,4 ± 0,5
Hemoglobina (g/dL)	15,2 ± 0,2	14,1 ± 0,6	14,8 ± 0,2	15,2 ± 0,7	14,9 ± 0,9	15,1 ± 0,7	13,9 ± 2,6	13,8 ± 1,0
Hematócrito (%)	44,2 ± 1,8	40,4 ± 0,9	42,5 ± 0,2	43,8 ± 1,9	44,1 ± 3,6	45 ± 2,7	41 ± 8,4	41 ± 3,1
Leucometria Global (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	6,1 ± 1,6	5,8 ± 2,7	4,7 ± 2,1	6,4 ± 2,9	6,6 ± 3,8	6,8 ± 2,1	6,1 ± 3,1	6,1 ± 1,4
Segmentados (%)	29 ± 9	27 ± 6	23 ± 5	19 ± 9	28 ± 13 <sup>e</sup>	27 ± 2 <sup>f</sup>	17 ± 1	15 ± 2 <sup>e,f</sup>
Linfócitos (%)	66 ± 10	67 ± 8	73 ± 3	77 ± 10	64 ± 9 <sup>g</sup>	68 ± 3	76 ± 1	77 ± 3 <sup>g</sup>
Monócitos (%)	3 ± 3	5 ± 4	3 ± 2	2 ± 1 <sup>#</sup>	5 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	5 ± 4 <sup>#</sup>
Eosinófilos (%)	2 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	3 ± 2	3 ± 1	3 ± 1	4 ± 1	3 ± 2
Basófilos (%)	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	999 ± 74 <sup>b,c</sup>	499 ± 42 <sup>b,d</sup>	910 ± 127 <sup>d</sup>	624 ± 183 <sup>c</sup>	744 ± 257	915 ± 19	942 ± 48	827 ± 152

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=6 animais até 7º dia e n=3 animais até 21º dia, nos grupos 1-3; n=10 animais até 7º dia e n=5 animais até 21º dia, no grupo 4). Médias seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste de ANOVA seguido por *post hoc* de Tukey – comparação entre grupos, no mesmo tempo (<sup>a</sup>p=0,050; <sup>b</sup>p=0,016; <sup>c</sup>p=0,027; <sup>d</sup>p=0,042; <sup>e</sup>p=0,043; <sup>f</sup>p=0,037 e <sup>g</sup>p=0,019). Médias seguidas pelo mesmo símbolo diferem entre si pelo teste *t* de Student para amostras emparelhadas – comparação entre tempos, no mesmo grupo (<sup>\*</sup>p=0,030 e <sup>#</sup>p=0,015). Grupo 1=CVC-NR; Grupo 2=CVC-R1; Grupo 3=CVC-R2 e Grupo 4=controle absoluto (animais não manipulados). CVC-NR: catéter venoso central não revestido; CVC-R1: catéter venoso central revestido com a formulação 1 e CVC-R2: catéter venoso central revestido com a formulação 2.

Na Tabela 8 são apresentados os resultados da análise histopatológica, após avaliação microscópica e a Figura 21 reúne imagens microscópicas representativas do tecido ao redor do CVC implantado, em cada grupo experimental.

Nos primeiros 7 dias de experimentos, destaca-se para os grupos 2 (CVC-R1) e 3 (CVC-R2) um maior número de fibroblastos ( $p=0,013$  e  $p<0,001$ , respectivamente), vasos sanguíneos ( $p=0,009$  e  $p=0,002$ , respectivamente) e maior área de colágeno ( $p=0,005$  e  $p<0,001$ , respectivamente) quando comparado com o grupo 4 (controle). Observou-se, que o grupo 3 (CVC-R2) apresentou maior número de células mononucleares ( $p<0,001$ ) e polimorfonucleares ( $p=0,001$ ) em relação ao grupo 4 (controle), porém sem diferença estatística ao encontrado para o grupo 1 (CVC-NR).

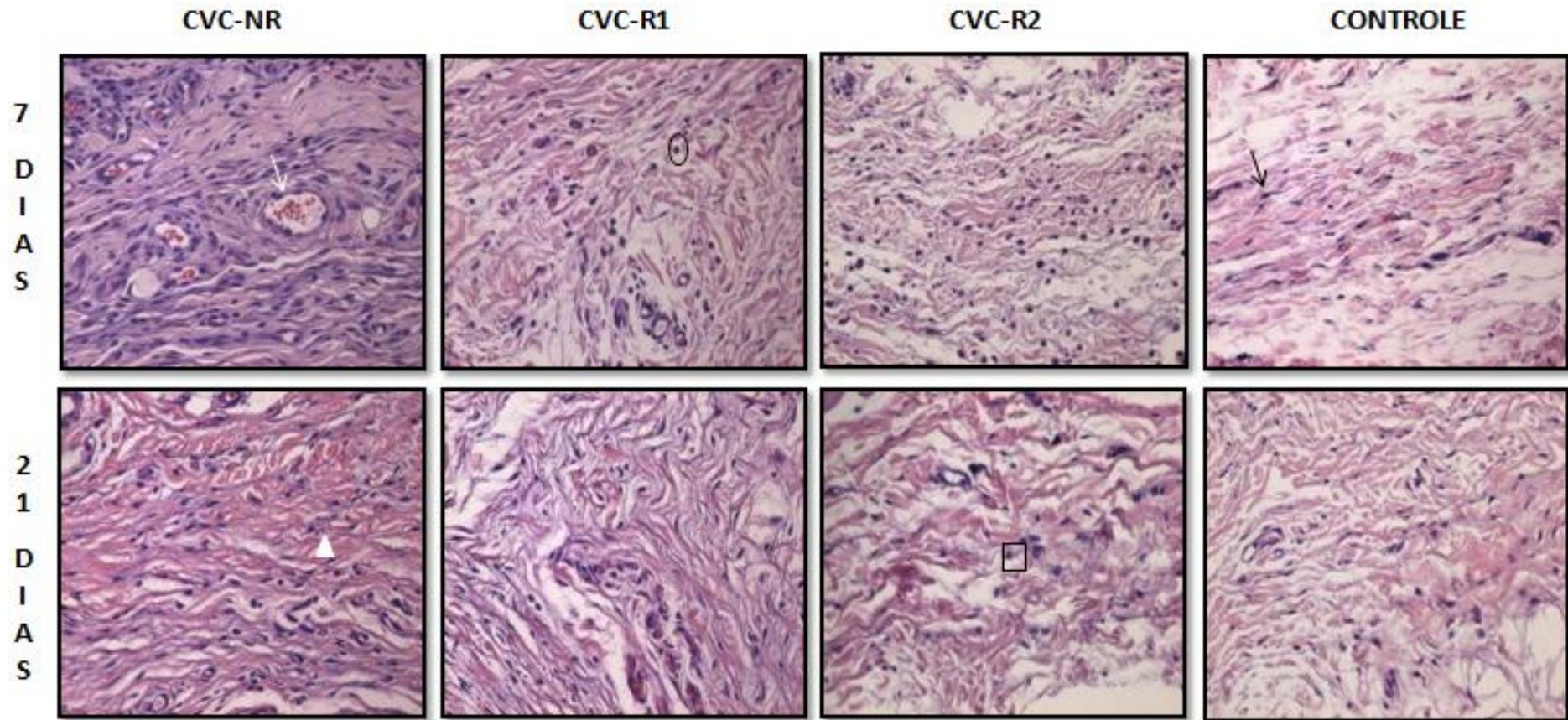
Do 7° ao 21° dia, encontrou-se um maior número de fibroblastos ( $p=0,002$ ) e área de colágeno ( $p=0,005$ ), e também de mononucleados ( $p<0,001$ ) e polimorfonucleados ( $p=0,033$ ), no grupo 2 (CVC-R1) em relação ao grupo 4 (controle); enquanto o grupo 3 (CVC-R2) apresentou, também em relação ao grupo 4 (controle), um maior número de fibroblastos ( $p=0,002$ ), vasos sanguíneos ( $p=0,004$ ), mononucleados ( $p<0,001$ ) e polimorfonucleados ( $p=0,004$ ). Contudo, no final do experimento, ambos os grupos experimentais apresentaram os parâmetros histopatológicos semelhantes ao grupo 1 (CVC-NR), com exceção do grupo 2 (CVC-R1) que continuou apresentando maior número de mononucleados ( $p=0,002$ ). Células gigantes, área necrótica e infiltrado inflamatório foram ausentes nos quatro grupos, durante todo o ensaio.

Após a análise comparativa dos parâmetros encontrados no período inicial (7 dias) com aqueles encontrados no período final (21 dias) do experimento, observou-se que no grupo 2 (CVC-R1) o número de polimorfonucleados ( $p=0,014$ ) e de mastócitos ( $p=0,001$ ) diminuiu ao longo do tempo, enquanto a área de colágeno aumentou ( $p=0,009$ ) no final do ensaio. Já no grupo 3, notou-se uma redução significativa no número de mononucleados, polimorfonucleados e fibroblastos ( $p<0,001$ ,  $p=0,004$  e  $p<0,001$ , respectivamente) e um aumento no número de mastócitos ( $p=0,020$ ) ao longo do experimento.

**Tabela 8.** Parâmetros histopatológicos obtidos após avaliação microscópica do tecido ao redor dos fragmentos de catéter venoso central implantados nos animais durante o ensaio de biocompatibilidade tecidual.

Parâmetros	7 DIAS				21 DIAS			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Mononucleados	23,7 ± 20,8 <sup>a,*</sup>	13,1 ± 7,9 <sup>b</sup>	32,8 ± 20,5 <sup>b,c,®</sup>	5,9 ± 4,9 <sup>a,c,¶</sup>	6,1 ± 5,5 <sup>a,*</sup>	12,5 ± 9,1 <sup>a,b</sup>	10,4 ± 6 <sup>c,®</sup>	2,9 ± 2,3 <sup>b,c,¶</sup>
Polimorfonucleados	7,6 ± 7,5 <sup>d,#</sup>	4,8 ± 3,8 <sup>Δ</sup>	7,2 ± 6,4 <sup>e,‡</sup>	0,9 ± 1,3 <sup>d,e</sup>	3,3 ± 2,8 <sup>d,#</sup>	2,6 ± 2,1 <sup>e,Δ</sup>	3,1 ± 3,4 <sup>f,‡</sup>	0,6 ± 0,9 <sup>d,e,f</sup>
Fibroblastos	253,8 ± 89,2 <sup>f,g</sup>	240 ± 76,6 <sup>h,i</sup>	401,6 ± 96,2 <sup>f,h,j,Ω</sup>	167,6 ± 35,4 <sup>g,i,j</sup>	211 ± 69,8	242 ± 84,4 <sup>g</sup>	241,6 ± 85 <sup>h,Ω</sup>	163,9 ± 45,7 <sup>g,h</sup>
Vasos sanguíneos	12,7 ± 6,7 <sup>k</sup>	13,8 ± 8,8 <sup>L</sup>	15 ± 10,6 <sup>m</sup>	6 ± 5,5 <sup>k,L,m</sup>	11,3 ± 7,4	12,3 ± 6,3	17,2 ± 12,4 <sup>i</sup>	8,8 ± 7 <sup>i</sup>
Mastócitos	0,9 ± 1,7 <sup>n</sup>	2,9 ± 3,5 <sup>n,o,p,•</sup>	0,5 ± 1,8 <sup>o,†</sup>	0 ± 0 <sup>p,§</sup>	1,6 ± 2,2	0,4 ± 1,2 <sup>i,•</sup>	2,6 ± 3,8 <sup>i,k,†</sup>	0,7 ± 1,1 <sup>k,§</sup>
Colágeno (%)	67,1 ± 13,4	64,4 ± 11,1 <sup>q,+</sup>	76 ± 16,5 <sup>q,r</sup>	57,9 ± 9,4 <sup>r</sup>	68,6 ± 20,1	73,2 ± 10,6 <sup>L,+</sup>	67,7 ± 14,4	57 ± 19,9 <sup>L</sup>
Células gigantes	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Área necrótica	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Infiltrado inflamatório	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=6 animais até 7º dia e n=3 animais até 21º dia, nos grupos 1-3; n=10 animais até 7º dia e n=5 animais até 21º dia, no grupo 4). Médias seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste de ANOVA seguido por *post hoc* de Tukey – comparação entre grupos, no mesmo tempo – 7 dias (<sup>a,e</sup>p=0,001; <sup>b,c,d,f,h,j,p,r</sup>p<0,001; <sup>g,m</sup>p=0,002; <sup>l</sup>p=0,013; <sup>k</sup>p=0,031; <sup>L</sup>p=0,009; <sup>n</sup>p=0,004 e <sup>q</sup>p=0,005) e 21 dias (<sup>a,g,h</sup>p=0,002; <sup>b,c</sup>p<0,001; <sup>d</sup>p=0,001; <sup>e,k</sup>p=0,033; <sup>f,i</sup>p=0,004; <sup>j</sup>p=0,007 e <sup>L</sup>p=0,005). Médias seguidas pelo mesmo símbolo diferem entre si pelo teste *t* de Student para amostras emparelhadas – comparação entre tempos, no mesmo grupo (<sup>•,®,Ω</sup>p<0,001; <sup>#</sup>p=0,017; <sup>Δ</sup>p=0,014; <sup>•</sup>p=0,001; <sup>‡</sup>p=0,009; <sup>‡</sup>p=0,004; <sup>†</sup>p=0,020; <sup>¶</sup>p=0,007; <sup>§</sup>p=0,012). Grupo 1=CVC-NR; Grupo 2=CVC-R1; Grupo 3=CVC-R2 e Grupo 4=controle absoluto (animais não manipulados). CVC-NR: catéter venoso central não revestido; CVC-R1: catéter venoso central revestido com a formulação 1 e CVC-R2: catéter venoso central revestido com a formulação 2.



**Figura 21.** Imagens representativas da análise microscópica realizada no tecido ao redor dos implantes de catéter venoso central. CVC-NR: catéter venoso central não revestido, CVC-R1: catéter venoso central revestido com a formulação 1, CVC-R2: catéter venoso central revestido com a formulação 2 e CONTROLE: tecido de animais não manipulados. Através de análise qualitativa das imagens observa-se um processo inflamatório mais pronunciado no tecido ao redor de CVC-NR do que de CVC-R1 e CVC-R2 e no tecido controle, tanto nos primeiros 7 dias quanto ao final do experimento (21 dias). Diferentes símbolos identificam os principais parâmetros analisados: quadrado preto = mononucleado, círculo preto = polimorfonucleado, seta preta = fibroblastos, seta branca = vaso sanguíneo e triangulo branco = colágeno. Aumento de 40X. Fonte: a autora.

## 6 DISCUSSÃO

Catéteres cobertos ou impregnados de agentes antimicrobianos podem diminuir o risco de ICSRC e os custos hospitalares associados ao tratamento destas infecções, apesar do custo adicional para aquisição deste tipo de catéter. O presente estudo propôs duas formulações inovadoras para o revestimento de CVC com prováveis capacidades antiaderente e antimicrobiana na prevenção de ICSRC.

Tanto a formulação 1 quanto a formulação 2, cujos princípios ativos compreendiam em xilitol + triclosan + PHMB e xilitol + triclosan, respectivamente, apresentaram significativa atividade antimicrobiana, tanto bacteriostática quanto bactericida, frente a todas as cepas testadas. O triclosan e a PHMB foram incluídos nas formulações devido ao amplo espectro antibacteriano e antifúngico já conhecido destas substâncias, além do perfil de segurança favorável (baixa citotoxicidade) associado a elas (WELK et al., 2005; GAO e CRANSTON, 2010; LEAPER et al., 2011; BUTCHER, 2012; LUBARSKY et al., 2012). O triclosan foi originalmente introduzido no mercado como um biocida não específico, contudo seu mecanismo de ação tem sido relacionado ao fato de tal substância afetar as membranas bacterianas como consequência da inibição específica da biossíntese de ácidos graxos (LUBARSKY et al., 2012). A PHMB é conhecido por interagir com fosfolípidos da membrana de bactérias Gram-negativas prejudicando a integridade da mesma. É um agente potente, com grande atividade espectral antibacteriana, mas com baixa toxicidade para organismos eucarióticos (GAO e CRANSTON, 2010).

Somente frente à cepa *Pseudomonas aeruginosa* clínica o comportamento foi diferente: a formulação 1 apresentou CIM bactericida menor (CIM=4%) que a formulação 2, cuja atividade foi bacteriostática e com CIM=20%. Isso se deve, possivelmente, à presença de PHMB na formulação 1 que confere o caráter bactericida a mesma pelo seu próprio mecanismo de ação: ruptura da membrana plasmática dos microrganismos (MAILLARD, 2002; FENG et al., 2011).

Apesar da formulação 1 contemplar a associação de dois antimicrobianos, no intuito de potencializar a ação antibacteriana e antifúngica do revestimento, foi a formulação 2 que apresentou menor CIM, tanto bactericida/fungicida quanto

bacteriostática/fungistática, frente a todos os micro-organismos testados. No entanto, esta assertiva só é válida quando consideramos as formulações completas, já que as CIM apresentadas na Tabela 2 representam a CIM das formulações, e não dos princípios ativos. Por exemplo, frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (cepa-alvo deste estudo, testada posteriormente *in vivo*), a CIM bactericida do triclosan e do PHMB na formulação 1 foram 0,00015% e 0,0002%, respectivamente; enquanto a CIM bacteriostática do triclosan e do PHMB foram 0,00006% e 0,00008%, respectivamente. Já o triclosan, na formulação 2, apresentou CIM bactericida de 0,0006% e bacteriostática de 0,0004%. Estas CIM dos princípios ativos tornam-se equiparáveis à CIM bacteriostática apresentada pelo cloranfenicol, fármaco de referência, para a referida cepa (0,000025%). Posteriormente, *in vivo*, a eficácia antimicrobiana da formulação 2 (1% de triclosan) foi superior a da formulação 1 (0,015% de triclosan e 0,02% de PHMB) uma vez que, *in vivo* torna-se necessário uma maior concentração de ativo, do que a CIM determinada *in vitro*, a fim de evitar interferências pelas variáveis fisiológicas existentes.

A multirresistência às diferentes drogas por cepas microbianas tem estimulado investigações envolvendo compostos com efeito potencializador de antimicrobianos ou que atuam sinergicamente. Alguns estudos demonstraram os resultados de algumas dessas associações. Tanaka e colaboradores (2002) sugerem a efetividade da combinação de Tris (hidroximetil-aminometano) e/ou ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) com antimicrobianos convencionais. O EDTA apresenta as propriedades de aumentar a permeabilidade da parede celular bacteriana e de alterar a estabilidade dos ribossomos de micro-organismos, potencializando a ação de determinadas drogas. O Tris potencializa os efeitos do EDTA nos micro-organismos, por interferir na síntese do peptideoglicano, bloqueando a utilização de compostos necessários a biossíntese da parede bacteriana. Observou-se que os aminoglicosídeos, as quinolonas e as cefalosporinas testadas apresentaram maior efetividade antimicrobiana, frente a amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, quando combinados com Tris-EDTA. Lins (2011) avaliou diversas associações de metabólitos naturais extraídos das plantas *Zanthoxylum tingoassuiba* e *Dictyoloma vandellianum* com antimicrobianos sintéticos e constatou, na maioria das vezes, um efeito sinérgico e potencializador da ação antimicrobiana. Como exemplo, o óleo essencial de *Zanthoxylum*

*tingoassuiba* potencializou a ação de fluoroquinolonas diminuindo os valores de CIM em no mínimo 02 vezes.

No presente estudo, a associação de triclosan com PHMB foi menos vantajosa que o uso isolado de triclosan, possivelmente pela diferença de concentração destas substâncias em cada formulação. A formulação 1, onde observa-se a associação dos dois antimicrobianos, possui apenas 0,015% de triclosan (10% de uma solução pré-formulada com 0,15% de triclosan) enquanto a formulação 2 continha 1% de triclosan.

Paralelamente à avaliação antimicrobiana, foi realizado o teste de aderência, ou seja, de avaliação da capacidade antibiofilme das duas formulações, já que na maioria das vezes os micro-organismos se encontram aderidos nos dispositivos médico-hospitalares na forma de biofilme. Esta capacidade de aderência tem grande importância na patogênese das ICSRC. Biofilmes formados em catéteres são responsáveis por cerca de 85% das ICSRC em unidades de terapia intensiva (UTIs), e representam causa significativa de morbi-mortalidade (VENKATESH et al., 2009).

As eletromicrografias dos fragmentos de CVC, obtidas por MEV, corroboram os resultados obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana. Ambas formulações demonstraram eficácia antibiofilme frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* clínica e *Candida albicans* ATCC 10231. A avaliação qualitativa das imagens obtidas por MEV demonstrou que, apenas frente à cepa Gram-negativa, no menor aumento, foram ainda visualizados bacilos aderidos no fragmento de CVC revestido com a formulação 1 (CVC-R1). No entanto, na imagem de maior aumento, é possível observar a inibição do biofilme já que foram encontrados apenas raros bacilos aderidos de forma planctônica. Esta inibição por si só já é considerada relevante, uma vez que infecções clínicas oriundas de biofilme são difíceis de serem erradicadas. Os micro-organismos arranjados em biofilme ficam embebidos em uma matriz extracelular a qual dificulta a penetração dos antibióticos (protegendo o biofilme) o que torna, na maioria dos casos, o uso de antimicrobianos ineficaz (DWYER, 2008; LANDINI et al., 2010; CAVA et al., 2011). Ainda, embora as bactérias tenham a capacidade de liberar antígenos que estimulam a produção de anticorpos pelo hospedeiro, os micro-organismos envolvidos em biofilme são resistentes a estes anticorpos (DWYER, 2008). Além destes fatores, deve-se também considerar que os biofilmes facilitam a

propagação de resistência à antibióticos por permitir a transferência horizontal de genes (FUX et al., 2005). Giacometti e colaboradores (2007) afirmam que a resistência dos micro-organismos quando formados em biofilme muitas vezes leva à falha da terapia convencional e à consequente necessidade de remoção dos dispositivos médico-hospitalares infectados.

A inibição da formação do biofilme causada por ambas as formulações-teste, mesmo que algumas formas microbianas ainda possam estarem aderidas isoladamente, demonstra a capacidade dos catéteres revestidos em reduzir a chance de ocorrência de infecções sistêmicas. Tal capacidade antibiofilme é oriunda da presença de xilitol nas formulações e, possivelmente, pela sua capacidade em atuar por diferentes mecanismos de ação (formação de complexos com íons  $\text{Ca}^{+2}$ , bloqueio de receptores de lectinas, inibição da expressão gênica de genes formadores de biofilmes, entre outros) (SHARON e OFEK, 2000; MAILLARD, 2002; KUROLA et al., 2009; FENG et al., 2011; LUBARSKY et al., 2012).

Existem na literatura diversos estudos que contemplam a propriedade antiaderente do xilitol frente a bactérias Gram-positivas (TAPIAINEN et al., 2004; FERREIRA et al., 2009; KUROLA et al., 2011; RUIZ et al., 2011), Gram-negativas (AMMONS et al., 2009; SILVA et al., 2011; SOUSA et al., 2011) e leveduras (ICHIKAWA et al., 2008). Kurola e colaboradores (2011) verificaram que o xilitol foi eficaz no controle da formação do biofilme de 20 cepas de *Streptococcus pneumoniae* isoladas da boca de crianças, através da inibição da expressão de do gene *lytA* envolvido na formação de biofilmes. Sousa e colaboradores (2011) demonstraram que 0,5; 2,5 e 5,0% de xilitol foi capaz de inibir significativamente a aderência de cepas, ATCC e clínica, de *Pseudomonas aeruginosa*, tanto através da contagem do número de UFC's desprendidas do corpo de prova quanto por fotografias de MEV. Uma das cepas utilizadas no presente estudo – *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 – também foi avaliada por Ferreira e colaboradores (2009) os quais observaram, através de MEV, a capacidade antiaderente do xilitol nas concentrações 1,0; 5,0 e 10,0%.

O mecanismo capaz de explicar como o xilitol é eficaz no impedimento da aderência de micro-organismos ainda não foi totalmente esclarecido. Algumas hipóteses têm sido sugeridas: Kontiokari e colaboradores (1998) verificaram que 5% de xilitol impedia a aderência de *Streptococcus pneumoniae* à superfície de

células epiteliais e atribuíram ao resultado encontrado possivelmente a capacidade do xilitol em inibir o movimento das lectinas bacterianas. Assim, as lectinas presentes na superfície de muitas bactérias patogênicas tornam-se incapazes de mediar a ligação do micro-organismo às glicoproteínas ou glicolípídeos expressos na superfície dos tecidos do hospedeiro. Além disso, na presença de hidratos de carbono solúveis, especialmente xilitol, ocorre uma perturbação do metabolismo bacteriano que pode resultar na separação de bactérias, já aderidas, do tecido celular (SHARON e OFEK, 2000). Katsuyama e colaboradores (2005a, 2005b) observaram, através de MEV, a capacidade de diversas substâncias, entre elas o xilitol, em impedir a formação do biofilme de *Staphylococcus aureus*. O xilitol (5%) atuou sinergicamente com farnesol (0,02%) – sesquiterpeno comumente encontrados em óleos essenciais, com potencial antimicrobiano – ao inibir a formação do glicocálix bacteriano, principal estrutura responsável pela resistência aos fármacos e que impede o reconhecimento dos micro-organismos, como estranhos ao organismo, pelo sistema imunológico. Por fim, alguns estudos têm demonstrado que o xilitol pode regular a expressão de genes, por exemplo, através da: diminuição da expressão de *gtfD*, gene responsável pela codificação de enzimas importantes na aderência celular e formação de biofilmes de *Streptococcus mutans* (SHEMESH et al., 2006); diminuição da expressão de *gtfB*, gene que controla a produção de glucanos extracelulares insolúveis na superfície da bactéria *Streptococcus mutans* (LEE et al., 2009); diminuição da expressão de *cpsB*, gene responsável pela formação da cápsula de *Streptococcus pneumoniae* (KUROLA et al., 2009); e, diminuição da expressão de *lytA*, gene que controla a formação do biofilme de *Streptococcus pneumoniae* (KUROLA et al., 2009).

O sinergismo da atividade antimicrobiana oriunda das substâncias anteriormente discutidas, triclosan e PHMB, juntamente com a capacidade antiaderente do xilitol, representam uma importante estratégia a ser considerada na obtenção de formulações para revestimento de materiais médico-hospitalares. Uma vez atestada, *in vitro*, a eficácia antimicrobiana e antibiofilme das formulações, tornou-se indicado avaliar a eficácia *in vivo* e a biocompatibilidade das mesmas.

Durante o ensaio de avaliação da eficácia *in vivo* dos catéteres revestidos, não foi observada nenhuma diferença no consumo de ração e no ganho de peso

entre os animais pertencentes aos grupos experimentais e aos grupos-controle (Tabela 3). As alterações comportamentais (como, a alteração do apetite) juntamente com a observação de sinais fisiológicos (por exemplo, a perda de peso) são bons indicadores de estresse crônico, desconforto ou dor (RIVERA, 2002). No referido ensaio, os animais pertencentes ao grupos com catéteres revestidos (CVC-R1 e CVC-R2) não apresentaram diferença no estado geral e nenhum sinal de estresse em comparação com os animais pertencentes ao grupo controle e aos grupos com catéteres não revestidos (CVC-NR).

A observação macroscópica dos tecidos retirados demonstrou que os tecidos ao redor de CVC-R2 apresentaram sinais de inflamação diminuídos em comparação com os tecidos ao redor de CVC-R1 e CVC-NR, sendo que o fragmento de CVC não revestido foi o que mais provocou inflamação local, com sinais visíveis de secreção purulenta, exsudato sanguinolento e edema (Figura 19). Estes resultados foram posteriormente explorados no ensaio de biocompatibilidade que avaliou, além destes sinais, parâmetros microscópicos. Os resultados obtidos com as análises hematológicas demonstraram que as diferenças estatísticas encontradas na série vermelha (células vermelhas do sangue, hemoglobina e hematócrito) dos grupos experimentais (CVC-R1 e CVC-R2 em relação a CVC-NR) não foram estatisticamente significantes em relação aos grupos controle-relativo (com inserção de fragmentos de CVC não contaminados) e ao grupo controle-absoluto. Os resultados da série branca demonstraram uma eosinofilia no Grupo C (CVC-R2, não previamente contaminado) em relação aos demais grupos. A eosinofilia pode representar uma resposta alérgica ou uma reação inflamatória tissular (CHAUFFAILLE, 2010); no entanto, esta resposta não foi necessariamente provocada pelo revestimento (formulação 2), já que biomateriais exógenos implantados (corpo estranho) podem produzir reações deste tipo (FRANZ et al., 2011).

Os resultados negativos das hemoculturas indicaram que não houveram episódios de infecção da corrente sanguínea em qualquer animal. Em conjunto com a contagem de segmentados do hemograma, que se apresentou dentro dos limites normais em todos os grupos, pode-se concluir que não houve infecção generalizada, em nenhum grupo, durante todo o experimento. Este resultado é relevante uma vez que a hemocultura é o método tradicionalmente empregado para avaliação de episódios de bacteremia e sepse. Crump e Collignon (2000)

sugeriram que grande parte dos catéteres inseridos por longos períodos (geralmente mais do que 8 dias) irão apresentar micro-organismos embebidos em uma matriz, caracterizando um biofilme microbiano, suficientemente resistente e capaz de causar uma sepse sistêmica. A ocorrência e a taxa dessa proliferação depende de fatores de virulência microbianos, de fatores do hospedeiro e das características do dispositivo médico-hospitalar. As Diretrizes para a Prevenção de Infecções Relacionadas a Catéteres Intravasculares, elaboradas pela *Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology* (APIC) (O'GRADY et al., 2002), sugerem um risco aumentado para ICSRC após 5 a 7 dias de cateterismo e, ainda, sugerem que a substituição do catéter em intervalos de tempo programados é uma medida ineficaz para redução das taxas de infecção. Por estes motivos, optou-se por um período de 7 dias para avaliação da bacteremia e, após este período, foi observado que a utilização de catéteres impregnados com formulações antibiofilme representa uma alternativa eficaz para prevenir episódios de ICSRC.

A análise microbiológica das superfícies, tanto interna quanto externa, dos fragmentos de CVC, demonstrou uma diminuição na colonização de CVC-R1 e de CVC-R2, em comparação com CVC-NR. Ainda que os revestimentos não tenham impedido totalmente esta colonização, pode-se observar uma diminuição na intensidade de colonização nos catéteres revestidos (de forma mais pronunciada no CVC-R2 do que no CVC-R1) em relação aos fragmentos sem nenhum tratamento. Com as imagens obtidas por MEV (*in vitro*), torna-se possível afirmar que as colônias ainda encontradas aderidas nos catéteres revestidos estão presentes na forma planctônica, e não organizadas em biofilme, o que indica a vantagem do revestimento antiaderente/antimicrobiano. Mesmo se estas colônias causarem algum tipo de infecção no paciente, esta, provavelmente, será local e não sistêmica – uma vez que, até o sétimo dia, a hemocultura foi negativa – a infecção seria facilmente combatida por defesas do hospedeiro ou por algum tratamento antibiótico adequado, se necessário.

Kockro e colaboradores (2000) investigaram, de forma semelhante ao presente estudo, a colonização da superfície de fragmentos de catéteres impregnados com rifampicina, por *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e *Staphylococcus aureus* clínico, através de MEV e de cultura microbiológica. Foi observada uma redução na adesão bacteriana inicial (apenas algumas células

individuais) na superfície dos fragmentos de catéter impregnados em contraste com fragmentos de catéteres não impregnados. Os autores sugeriram que, embora a incorporação de rifampicina em polímeros de silicone não tenha sido suficiente para prevenir completamente a aderência microbiana inicial, a colonização subsequente nestes fragmentos revestidos poderia ser evitada, o que impediria a continuidade da colonização/infecção e aumentaria a eficiência do cateterismo e das terapias paralelas.

Ao observarmos os grupos experimentais, cujos fragmentos de CVC foram inseridos sem contaminação prévia, verificou-se que a formulação 2 (Grupo C) impediu totalmente a colonização por micro-organismos exógenos tanto na face externa quanto na interna (ausência de crescimento), enquanto a formulação 1 (Grupo B) impediu totalmente a colonização apenas na face externa. Os animais do Grupo A, os quais mimetizam o que ocorre atualmente nos hospitais – inserção de fragmentos de CVC sem nenhum revestimento – apresentaram diferentes micro-organismos em ambas as faces do catéter. Já nos grupos experimentais, cujos fragmentos de CVC foram inseridos após contaminação prévia, observou-se no Grupo D (CVC-NR) toda as intensidades de colonização de face externa (variando de <100 colônias até ++++). No Grupo E (CVC-R1) foram encontrados 85,7% dos animais apenas com < 100 colônias aderidas enquanto no Grupo F, 57,1% já apresentaram os fragmentos de CVC sem nenhuma colonização. A diminuição da colonização da face interna ocorreu da mesma forma: enquanto 85,7% dos animais do Grupo D apresentaram crescimento positivo, 28,6% dos animais do Grupo E e 100% dos animais do Grupo F apresentaram crescimento negativo.

Assim como observado nos ensaios *in vitro* de atividade antimicrobiana e antibiofilme, a formulação 2 (com 1% de triclosan) foi mais eficaz do que a formulação 1 (associação de 0,015% de triclosan com 0,02% de PHMB), –em especial considerando a superfície interna –, possivelmente pela maior concentração do ativo.

O triclosan apresenta atividade frente a diferentes tipos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e tem sido utilizado clinicamente, para distintos propósitos, há mais de 20 anos. Se apresenta bacteriostático em concentrações baixas, porém em concentrações mais altas é bactericida. No geral, a membrana citoplasmática do micro-organismo é o alvo principal de tal substância. No

entanto, foi demonstrado frente a bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, bem como *Mycobacterium smegmatis*, que o mecanismo de ação do triclosan envolve também o bloqueio da síntese lipídica através da inibição específica da enzima 2-trans-Enoil-ACP (CoA) redutase (RUSSELL, 2004)

Não foram encontrados na literatura científica, trabalhos de CVC revestidos com triclosan e PHMB, já que esta é uma proposta inovadora. No entanto, outros dispositivos médico-hospitalares já foram revestidos com triclosan, isoladamente, com a mesma finalidade (ação antimicrobiana) contemplada no presente estudo (FORD et al., 2005; DAROUICHE et al., 2009; WANG et al., 2013).

Wang e colaboradores (2013) fizeram uma revisão sistemática de dezessete ensaios randomizados, incluindo 3.720 participantes, e compararam a eficácia de suturas revestidas com triclosan com suturas convencionais. Concluíram que o uso das suturas revestidas reduziu cerca de 30% o risco de infecções no sítio cirúrgico, especialmente em pacientes adultos submetidos a procedimentos abdominais. Ford e colaboradores (2005) compararam as características do manuseio intraoperatório e da cicatrização de feridas de suturas revestidas (VICRYL<sup>®</sup> Plus Antibacterial) e não revestidas (VICRYL<sup>®</sup>) com triclosan, em pacientes pediátricos submetidos a procedimentos cirúrgicos gerais. As pontuações de avaliação do manuseio intraoperatório foram favoráveis e não significativamente diferente para ambas as suturas, embora a sutura revestida com triclosan tenha recebido mais o score "excelente" (71% x 59%). As características da cicatrização também foram comparáveis para ambas as suturas, exceto quando avaliado o aparecimento de dor no período pós-operatório: um número significativamente menor de pacientes tratados com sutura revestida triclosan (em relação aos pacientes tratados com a sutura convencional) relataram dor no primeiro dia (68% x 89%, p=0,01). Os autores sugerem que a sutura revestida com triclosan pode ter inibido a colonização bacteriana e evitado um quadro infeccioso local e dolorido.

Em relação ao revestimento de catéteres utilizando triclosan, cita-se o estudo de Darouiche e colaboradores (2009), os quais avaliaram a combinação de triclosan (10 mg/mL) e Dispersin B<sup>®</sup> (100 mg/mL) (enzima antibiofilme) como revestimento de catéteres vasculares. A referida combinação demonstrou sinergismo antimicrobiano e antibiofilme *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, reduzindo

significativamente a colonização quando comparados aos cateteres-controle (não revestidos). Ainda, verificaram que a atividade antimicrobiana dos catéteres revestidos com triclosan e Dispersin B<sup>®</sup> foi superior e mais prolongada do que a propiciada pelo revestimento com CH-SS. *In vivo*, foi verificado que ambos os catéteres revestidos são mais eficazes na redução da colonização de *Staphylococcus aureus* comparados aos catéteres não revestidos. Os autores sugerem que a utilização de uma formulação antimicrobiana/antibiofilme como revestimento de catéteres propicia uma atividade sinérgica, de amplo espectro de ação e de significativa durabilidade.

Além de comprovar a eficácia das formulações antibiofilme estudadas, tornou-se necessário também avaliar a biocompatibilidade das mesmas, a fim de viabilizar a utilização clínica de biomateriais revestidos com as referidas formulações. De acordo com Mittelman (1996), o primeiro critério para a seleção de um material médico-hospitalar é a biocompatibilidade do mesmo com o tecido ao redor do sítio de implante. A biocompatibilidade ocorre quando os tecidos entram em contato com um determinado material e não manifestam qualquer tipo de experiência tóxica, irritante, inflamatória, alérgica ou de fundo mutagênico ou carcinogênico. Como nenhum biomaterial a ser implantado é absolutamente seguro, sua seleção deve ser baseada na garantia de que os benefícios se sobreporão aos riscos biológicos (MENEZES, FREITAS e GONÇALVES, 2009).

A observação macroscópica dos tecidos adjacentes aos implantes de CVC retirados no ensaio *in vivo* de avaliação da biocompatibilidade demonstrou que os fragmentos de CVC-R2 provocaram menos inflamação tecidual do que os fragmentos de CVC-NR e CVC-R1, nesta ordem. Ainda, foi possível observar macroscopicamente que a intensidade dos sinais inflamatórios, quando presentes, foram diminuindo ao longo do tempo em todos os grupos. Não foi verificado nenhum sinal de rejeição ou falha no implante de CVC e nem características de complicações.

Os resultados obtidos com as análises hematológicas não demonstraram nenhuma alteração clinicamente significativa nos primeiros 7 dias de implante. Após 21 dias, ao final do experimento, foi somente observado que a contagem de neutrófilos foi maior nos animais que tiveram CVC-NR e CVC-R1 implantados ( $p=0,043$  e  $p=0,037$ , respectivamente) do que nos animais do Grupo 4 (controle). Casos de neutrofilia ocorrem devido a infecções bacterianas ou condições de

inflamação, uma vez que os neutrófilos são as primeiras células de defesa do corpo a chegar nas áreas inflamadas (MUNFORD e PUGIN, 2001). Deve-se considerar que, embora tenha sido encontrada uma neutrofilia nos animais com CVC-R1 implantados, comparados aos animais controle, o número de neutrófilos, assim como todos os demais parâmetros hematológicos, foram estatisticamente semelhantes aos encontrados nos animais do Grupo 1 (CVC-NR), cujo catéter convencional é o aceito e utilizado atualmente em hospitais. Os animais do Grupo 3 (CVC-R2) não apresentaram nenhuma alteração hematológica significativa.

O mesmo foi observado na análise histopatológica: os parâmetros teciduais inflamatórios analisados nos animais que tiveram catéteres revestidos implantados (Grupo 2 - CVC-R1 e Grupo 3 - CVC-R2), apesar de diferentes do grupo-controle (Grupo 4), foram estatisticamente semelhante aos encontrados nos animais do grupo 1 (CVC-NR).

Destacou-se, nos primeiros 7 dias de experimento, um maior número de polimorfonucleados, comparados ao controle, em animais com CVC-R2 (Grupo 3) ( $p=0,001$ ) – porém semelhante aos encontrado nos animais com CVC-NR implantado ( $p>0,05$ ); e de fibroblastos ( $p<0,001$ , na comparação com todos os demais grupos). Além disso, o número de mononucleados no Grupo 3 (CVC-R2) foi maior que no Grupo 2 (CVC-R1) e no Grupo 4 (controle) ( $p<0,001$ , para ambos), o que indica uma resposta inflamatória inicial ativa. Segundo Mittelman (1996), a migração de polimorfonucleados e de fibroblastos ocorre em poucos minutos após ao implante de um biomaterial. Os polimorfonucleados se unem para formar células gigantes multinucleadas e os fibroblastos atuam produzindo colágeno e sintetizando novo tecido conjuntivo. O colágeno produzido nos tecidos adjacentes ao implante de CVC-R2 apresentou-se, como previsto, aumentado no início do experimento ( $p=0,005$  em comparação com CVC-R1 e  $p<0,001$  em comparação com os animais-controle), e, no final dos 21 dias, já apresentou-se estatisticamente semelhante ao grupo-controle (Grupo 4), o que demonstra a reconstituição do tecido conjuntivo ao redor do biomaterial. O mesmo não ocorreu nos animais cujo implante apresentado foi de CVC-R1, os quais continuaram apresentando maior porcentagem de área de colágeno no final do período experimental do que os animais do grupo-controle ( $p=0,009$ ) (porém  $p>0,05$  comparado ao grupo CVC-NR). Os vasos sanguíneos mantiveram-se semelhantes entre os grupos experimentais (com CVC não revestidos e

revestidos) e aumentados em relação ao controle, durante todo o experimento. Ao longo dos dias, o número de mononucleados diminuiu no grupo 3 (CVC-R2) e o de polimorfonucleados diminuiu nos grupos 2 e 3 (CVC-R1 e CVC-R2), o que indica a diminuição do processo inflamatório ao longo do experimento.

O reparo tecidual é um estado dinâmico que compreende diferentes processos, entre eles, inflamação, proliferação celular e síntese de elementos que constituem a matriz extracelular, como colágeno, elastina e fibras reticulares. A síntese de colágeno é processo rápido e harmônico que tem seu início com a lesão intersticial e se estende até o final da fase de cicatrização, quando ocorre a remodelação dos tecidos (ROCHA JÚNIOR et al., 2006).

No Grupo 3 (CVC-R2) observou-se, inicialmente, um maior número de fibroblastos, uma síntese de colágeno expressiva e uma neovascularização dos tecidos lesados, os quais, juntamente com a diminuição do número de células inflamatórias ao longo do experimento ( $p < 0,001$  para mononucleados e  $p = 0,004$  para polimorfonucleados) sugerem a biocompatibilidade tecidual. No entanto, os animais com CVC-R2, no final dos 21 dias, apresentaram maior número de mastócitos que os animais com CVC-R1 ( $p = 0,007$ ) e animais controle ( $p = 0,033$ ), o que pode ser indicativo de uma hipersensibilidade do tipo I (ou imediata).

Nas primeiras 24 horas após o trauma tecidual ocorre a reação inflamatória aguda com resposta vascular e celular, com predomínio de polimorfonucleados. Após as 48hs da injúria, conforme observado no presente estudo para ambos os CVC revestidos, o número de polimorfonucleados diminuiu e evidencia-se a infiltração por células mononucleares e fibroblásticas. Paralelamente, a produção de fibras colágenas (pelos fibroblastos) e de todos os elementos da matriz extracelular ajudam no processo de atenuação dos efeitos inflamatórios teciduais (PEREIRA, 2005).

Aos analisarmos todos os dados em conjunto, observamos que a reação tecidual dos animais do grupo 3 (CVC-R2) foi mais pronunciada, inicialmente, do que nos animais do grupo 2 (CVC-R1), possivelmente pela maior concentração de ativo (triclosan) na formulação 2. No entanto, ao confrontarmos os dados encontrados com 7 dias e 21 dias de experimento, verificamos uma maior velocidade de diminuição da reação tecidual no grupo 3 (CVC-R2), o que permitiu, ao final dos 21 dias, que os parâmetros histológicos de ambos os grupos experimentais tenham ficado equiparados aos encontrados no grupo 1 (CVC-NR),

sugerindo que ambas as formulações antibiofilme testadas são biocompatíveis.

Muller e Kramer (2008) estudaram a atividade microbicida e o efeito citotóxico de doze agentes antibacterianos e a PHMB foi sugerido como um dos agentes mais biocompatíveis. Já Leaper e colaboradores (2011) apresentam o triclosan como um agente antibacteriano seguro por apresentar baixa toxicidade sistêmica e por possuir baixo potencial alergênico. No entanto, no que diz respeito a outras formulações de revestimento de CVC, o estudo de Cobrado e colaboradores (2013) sugere que catéteres impregnados com CH-SS, apesar de parecerem eficazes na redução da colonização e dos casos de infecção, apresentam reações de hipersensibilidade documentadas. Oda e colaboradores (1997) relataram um caso de choque anafilático, que ocorreu durante a colocação de um CVC revestido com CH-SS e sugeriram que uma pequena quantidade de clorexidina liberada do catéter poderia ter sido a causa de tal reação.

Raad e colaboradores (2008) compararam catéteres impregnados com a) minociclina e rifampina, b) prata-platina e carbono e c) clorexidina e sulfadiazina de prata, com catéteres não revestidos, utilizando um modelo estabelecido, *in vitro*, de formação de biofilme. Catéteres impregnados com minociclina e rifampicina apresentaram capacidade antiaderente superior aos demais e atividade antimicrobiana mais prolongada contra bactérias multirresistentes (*Staphylococcus aureus* e bactérias Gram-negativas), quando comparado com outros catéteres anti-infecciosos. No entanto, dados *in vitro* indicam que esses catéteres impregnados poderiam aumentar o desenvolvimento da resistência aos dois antimicrobianos, minociclina e rifampina, entre patógenos, especialmente estafilococos (O'GRADY et al., 2002; COBRADO et al., 2013).

No presente estudo, duas novas formulações são apresentadas como opções para o revestimento de CVC, já que alguns catéteres impregnados, embora eficazes, já demonstraram reações de hipersensibilidade (ODA et al., 1997) ou resistência antimicrobiana (GILBERT e HARDEN, 2008). De um modo geral, o revestimento com a formulação 2 (5,0% de xilitol e 1% de triclosan) demonstrou, após análise e discussão de todos os resultados, ser uma melhor opção do que o revestimento 1 (5,0% de xilitol, 0,015% de triclosan e 0,02% de PHMB), por ter se apresentado mais eficaz e igualmente biocompatível. O diferencial destas formulações é que, além de um agente antimicrobiano, há a presença de uma substância antiaderente. Ambas as substâncias agiriam de

maneira complementar impedindo a formação de biofilmes microbianos e o aparecimento de infecções oriundas de catéteres vasculares. A desagregação do biofilme aumenta a eficácia de uma terapia antimicrobiana adjuvante, se necessária, uma vez que torna o fármaco eficaz no combate aos microorganismos na forma planctônica.

## 7 CONCLUSÃO

As formulações propostas neste estudo, para revestimento de dispositivos médico-hospitalares, parecem exercer um papel importante na prevenção de infecções relacionadas aos mesmos, nas condições testadas, uma vez que:

- Ambas as formulações apresentaram eficácia antimicrobiana e antibiofilme *in vitro*, frente aos micro-organismos avaliados;
- Ambas as formulações apresentaram eficácia antimicrobiana e antibiofilme, *in vivo*, frente a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e demonstraram ser biocompatíveis;
- As formulações estudadas, especialmente a formulação 2, que apresentou eficácia e biocompatibilidade superiores às da formulação 1, demonstraram capacidade de prevenir a formação de biofilmes microbianos na superfície de dispositivos médico-hospitalares e, portanto, podem ser indicadas para serem usadas como revestimento de biomateriais, a fim de prevenir episódios de ICSRC no ambiente hospitalar.

## 8 PERSPECTIVAS

- Estudos futuros devem ser baseados na avaliação da força de fixação do revestimento nos dispositivos médico-hospitalares e, conseqüentemente, na avaliação da liberação dos princípios ativos tanto da superfície externa (pela manipulação, por exemplo) quanto da superfície interna (pela passagem do fluxo sanguíneo e de medicações).
- Testes *in vivo*, com diferentes micro-organismos, devem ser conduzidos.
- Estudos clínicos também devem ser realizados.

## REFERÊNCIAS

ABAD, C.L.; SAFDAR, N. 2011. Catheter-related bloodstream infections. **Infectious Disease, Especial Edition 2011**: 84-98.

ABEE, T.; KOVACS, A.T.; KUIPERS, O.P.; VEEN, S. 2011. Biofilm formation and dispersal in gram-positive bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, **22(2)**: 172-179.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2009. Corrente sanguínea – Critérios nacionais de infecções relacionadas à assistência à saúde. Unidade de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Efeitos Adversos. Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde. 8p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2011. Substitui a lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos saneantes. RDC nº30, de 4 de julho de 2011. 2p.

AIASSA, V.; BARNES, A.I.; ALBESA, I. 2012. *In vitro* oxidant effects of D-glucosamine reduce adhesion and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Revista Argentina de Microbiologia**, **44(1)**: 16-20.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. 2012. **Implantable medical devices**.

AMMONS, M.C.B.; WARD, L.S.; FISHER, S.T.; WOLCOTT, R.D.; JAMES, G.A. 2009. In vitro susceptibility of established biofilms composed of a clinical wound isolated of *Pseudomonas aeruginosa* treated with lactoferrin and xylitol. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **33(3)**: 230-236.

AMMONS, M.C.; WARD, L.S.; JAMES, G.A. 2011. Anti-biofilm efficacy of a lactoferrin / xylitol wound hydrogel used in combination with silver wound dressings. **International Wound Journal**, **8(3)**: 268-273.

ANDERSON, J.M. 2012. Biocompatibility. **Polymers in Biology and Medicine**, **9**: 363-383.

ANDRIESSEN, A.E.; EBERLEIN, T. 2008. Assessment of a wound cleansing solution in the treatment of problem wounds. **Wounds: a Compendium of Clinical Research and Practice**, **20(6)**: 171-175.

- AQUINO, D.R.; CORTELLI, J.R.; FARIA, I.S.; SIQUEIRA, A.F.; CORTELLI, S.C. 2004. Ação antimicrobiana do triclosan sobre microbiota cariogênica. **Revista Biociências**, **10(1-2)**: 79-86.
- ARAÚJO, E.A.; ANDRADE, N.J.; CARVALHO, A.F.; RAMOS, A.M.; SILVA, C.A.S. 2010. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Química Nova**, **33(9)**: 1940-1948.
- ARTINI, M.; PAPA, R.; BARBATO, G.; SCOARUGHI, G.L.; CELLINI, A.; MORAZZONI, P.; BOMBARDELLI, E.; SELAN, L. 2012. Bacterial biofilm formation inhibitory activity revealed for plant derived natural compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **20(2)**: 920-926.
- BADDOUR, L.M.; EPSTEIN, A.E.; ERICKSON, C.C.; KNIGHT, B.P.; LEVISON, M.E.; LOCKHART, P.B.; MASOUDI, M.D.; OKUM, E.J.; WILSON, W.R.; BEERMAN, L.B.; BOLGER, A.F.; ESTES, M.; GEWITZ, M.; NEWBURGER, J.W.; SCHRON, E.B.; TAUBERT, K.A. 2010. Update on cardiovascular implantable electronic device infections and their management: a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, **121(3)**: 458–477.
- BATH, S.; KUMAR, A. 2013. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. **Biomatter**, **3(2)**: 1-11.
- BATISTA, T.F.; RODRIGUES, M.C.S. 2012. Vigilância de infecção de sítio cirúrgico pós-alta hospitalar em hospital de ensino do Distrito Federal, Brasil: estudo descritivo retrospectivo no período 2005-2010. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, **21(2)**: 253-264.
- BELL, A.; GU, X.; BURCZYNSKI, F.J.; VERCAIGNE, L.M. 2004. Ethanol/trisodium citrate for hemodialysis catheter lock. **Clinical Nephrology**, **62(5)**: 369-373.
- BETJES, M.G.H. 2011. Prevention of catheter-related bloodstream infection in patients on hemodialysis. **Nature Reviews – Nephrology**, **7(5)**: 257-265.
- BOLLES, B.R.; HORSWILL, A.R. 2008. Agr-Mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. **PLoS Pathogens**, **4 (4)**: 1-12.
- BOUALLÈGUE, O.; NAIJA, W.; NOURIA, A.; JAIDANE, N.; DHIDAH, L.; BOUJAAFAR, N. 2013. Incidence of ICU acquired nosocomial infections in University Hospital of Sahloul (Sousse-Tunisia). **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, **2 (Suppl 1)**: P233.

BOUZA, E.; LIÑARES, J.; PASCUAL, A. 2004. **Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a catéteres intravasculares**. Procedimientos em Microbiología Clínica. Editores: CERCENADO, E.; CANTÓN, R. SEIMC.

BRASIL. 1998. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2.616**, de 12 de maio de 1998. Disponível em: <http://www.ccih.med.br/portaria2616.html>. Acesso em 08 de agosto de 2013.

BRUZI, L.M.; MENDES, D.C. 2011. The importance of nursing care in managing complications related to fully-implantable catheters. **Revista da Escola de Enfermagem**, **45(2)**: 510-514.

BURMOLLE, M.; THOMSEN, T.R.; FAZLI, M.; DIGE, I.; CHRISTENSEN, L.; HOMOE, P.; TVEDE, M.; NYVAD, B.; TOLKER-NIELSEN, T.; GIVSKOV, M.; MOSER, C.; KIRKETERP-MOLLER, K.; JOHANSEN, H.K.; HOIBY, N.; JENSEN, P.O.; SORENSEN, S.J.; BJARNSHOLT, T. 2010. Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections. **Immunology & Medical Microbiology**, **59(3)**: 324-336.

BUTCHER, M. 2012. PHMB: an effective antimicrobial in wound bioburden management. **British Journal of Nursing**, **21(12)**: S16, S18-21.

CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C.R. 2013. A review of the biomaterials Technologies for infection-resistant. **Biomaterials**, **34(34)**: 8533-8554.

CANDAN, F.; UNLU M.; TEPE, B.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SÖKMEN, A.; AKPULAT, A. 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, **87(2-3)**: 215-220.

CARDOSO, A.M.; COIMBRA JÚNIOR, C.E.A.; TAVARES, F.G. 2010. Morbidade hospitalar indígena Guarani no Sul e Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, **13(1)**: 21-34.

CARSON, L.; GORMAN, S.P.; GILMORE, B.F. 2010. The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. **Immunology & Medical Microbiology**, **59(3)**: 447-455.

CASEY, A.L.; MERMEL, L.A.; NIGHTINGALE, P.; ELLIOTT, T.S.J. 2008. Antimicrobial central venous catheters in adults: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infectious Diseases**, **8(12)**:763–776

CAVA, F.; LAM, H.; PEDRO, M.A.; WALDOR, M.K. 2011. Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. **Cellular and Molecular Life Sciences**, **68(5)**: 817–831.

CHAUFFAILLE, M.L.L.F. 2010. Eosinofilia reacional, leucemia eosinofílica crônica e síndrome hipereosinofílica idiopática. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, **32(5)**: 395-401.

CHAUHAN, A.; LEBEAUX, D.; DECANTE, B.; KRIEGEL, I.; ESCANDE, M.C.; GHIGO, J.M.; BELOIN, C. 2012. A rat model of central venous catheter to study establishment of long-term bacterial biofilm and related acute and chronic infections. **PLoS One**, **7(5)**: e37281.

CHIFIRIUC, C.; GRUMEZESCU, V.; GRUMEZESCU, A.M.; SAVIUC, C.; LAZAR, V.; ANDRONESCU, E. 2012. Hybrid magnetite nanoparticles/*Rosmarinus officinalis* essential oil nanobyosystem with antibiofilm activity. **Nanoscale Research Letters**, **7(209)**: 2-7.

CHIM, H.; GOSAIN, A.K. 2009. Biomaterials in craniofacial surgery: experimental studies and clinical application. **The Journal of Craniofacial Surgery**, **20(1)**: 29-33.

COBRADO, L.; SILVA-DIAS, A.; AZEVEDO, M.M.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.G. 2013. *In vivo* anti-biofilm effect of cerium, chitosan and hamamelitannin against usual agents of catheter-related bloodstream infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **68(1)**: 126-130.

COENYE, T.; NELIS, H.J. 2010. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, **83(2)**: 89–105.

COIA, J.E.; DUCKWORTH, G.J.; EDWARDS, D.I.; FARRINGTON, M.; FRY, C.; HUMPHREYS, H.; MALLAGHAN, C.; TUCKER, D.R. 2006. Guidelines for the control and prevention of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. **Journal of Hospital Infections**, **63(Suppl 1)**: S1-44.

CRUMP, J.A.; COLLIGNON, P.J. 2000. Intravascular catheter-associated infections. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, **19(1)**: 1-8.

CUNHA, P.H.J.; SILVA, L.A.F.; MESQUITA, A.J.; BORGES, N.C.; FIORAVANTE, M.C.S.; MORAES, R.R.; SANTANA, A.P. 2001. Avaliação da estabilidade do cloridrato de polihexametileno biguanida em pedilúvio para bovinos. **Ciência Animal Brasileira**, 2(1): 42-50.

DAROUICHE, R.O.; MANSOURI, M.D.; GAWANDE, P.V.; MADHYASTHA, S. 2009. Antimicrobial and antibiofilm efficacy of triclosan and Dispersin B<sup>®</sup> combination. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 64(1): 88–93.

DING, X.; YANG, C.; LIM, T.P.; HSU, L.Y.; ENGLER, A.C.; HEDRICK, J.L.; YANG, Y.Y. 2012. Antibacterial and antifouling catheter coatings using surface grafted PEG-*b*-cationic polycarbonate diblock copolymers. **Biomaterials**, 33(28): 6593-6603.

DOMAREVA, I.V. 1967 The use of xylitol in diabetes mellitus (literature survey). **Voprosy Pitaniia**, 26(3): 46-52.

DONELLI, G. 2006. Vascular Catheter-Related Infection and Sepsis. **Surgical Infections**, 7(S2): S25-S27.

DWYER, A. 2008. Surface-Treated Catheters - A Review. **Seminars in Dialysis**: 21(6): 542-546.

ESMANHOTO, C.G.; TAMINATO, M.;FRAM, D.S.; BELASCO, A.G.S.; BARBOSA, D.A. 2013. Microrganismos isolados de pacientes em hemodiálise por cateter venoso central e evolução clínica relacionada. **Acta Paulista de Enfermagem**, 26(5): 413-420.

EVANS, D.T.; HOWE, T.M. 2013. **Biocidal composition comprising a biguanide polymer and a tertiary amine oxide**. WO2013005036 A1, 10 jan.

FENG, L.; WU, F.; LI, J.; JIANG, Y.; DUAN, X. 2011. Antifungal activities of polyhexamethylene biguanide and polyhexamethylene guanide against the citrus sour rot pathogen *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. **Postharvest Biology and Technology**, 61: 160-164.

FERNÁNDEZ-HIDALGO, N.; GAVALD`A, J.; ALMIRANTE, B.; MARTI`N, M.T.; ONRUBIA, P.L.; GOMIS, X.; PAHISSA, A. 2010. Evaluation of linezolid, vancomycin, gentamicin and ciprofloxacin in a rabbit model of antibiotic-lock technique for *Staphylococcus aureus* catheter related infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 65(3): 525–530.

FERREIRA, A.S.; BARBOSA, N.R.; JÚNIOR, D.R.; SILVA, S.S. 2009. *In vitro* mechanism of xylitol action against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. In: **Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, Ed. Mendez-Vilas, A. Seville: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, p. 505-509.

FOKA, A.; KATSIKOIANNI, M.G.; ANASTASSIOU, E.D.; SPILIOPOULOU, I.; MISSIRLIS, Y.F. 2012. The combined effect of surface chemistry and flow conditions on *Staphylococcus epidermidis* adhesion and ica operon expression. **Journal of European Cells and Materials**, **24**: 386-402.

FORD, H.R.; JONES, P.; GAINES, B.; REBLOCK, K.; SIMPKINS, D.L. 2005. Intraoperative handling and wound healing: controlled clinical trial comparing coated VICRYL® plus antibacterial suture (coated polyglactin 910 suture with triclosan) with coated VICRYL® suture (coated polyglactin 910 suture). **Surgical Infections**, **6(3)**: 313-321.

FRAM, D.S.; TAMINATO, M.; FERREIRA, D.; NEVES, L.; BELASCO, A.G.S.; BARBOSA, D.A. 2009. Prevenção de infecções de corrente sanguínea relacionadas a cateter em pacientes em hemodiálise. **Acta Paulista de Enfermagem**, **22 (spe1)**: 564-568.

FRANCOLINI, I.; DONELLI, G. 2010. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. **Immunology & Medical Microbiology**, **59(3)**: 227-238.

FRANZ, S.; RAMMELT, S.; SCHARNWEBER, D.; SIMIN, J C. 2011. Immune responses to implants e A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. **Biomaterials**, **32(28)**: 6692-6709.

FREIRE, A.R.; QUEIROZ, T.P.; OKAMOTO, R. 2010. Utilização de biomateriais poliméricos associados a implantes dentários: revisão da literatura. **International Journal of Dentistry**, **9(2)**: 93-95.

FUNDEANU, I.; MEI, H.C.; SCHOUTEN, A.J.; BUSSCHER, H.J. 2008. Polyacrylamide brush coatings preventing microbial adhesion to silicone rubber. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, **64(2)**: 297-301.

FUX, C.A.; COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; STOODLEY, P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends in Microbiology**, **13(1)**: 34-40.

GALLAGHER, I.H.; PEARCE, E.I. 1977. The sugar alcohols. Non-cariogenic sweeteners. **The New Zealand Dental Journal**, **73(334)**: 200-206.

GAO, Y.; CRANSTON, R. 2010. An effective antimicrobial treatment for wool using polyhexamethylene biguanide as the biocide, part 1: biocide uptake and antimicrobial activity. **Journal of Applied Polymer Science**, **117(5)**: 3075–3082.

GARCIA-RODRIGUEZ, J.; GOMEZ, M.P.; ALTES, A.G. 2010. El microbiólogo y la infección asociada a catéter. **Revista Española de Quimioterapia**, **23(2)**: 53-62.

GE, X.; CAVALLAZI, R.; LI, C.; PAN, S.M.; WANG, Y.W.; WANG, F.L. 2012. Central venous access sites for the prevention of venous thrombosis, stenosis and infection. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, **3**: CD004084.

GIACOMETTI, A.; CIRIONI, O.; GHISELLI, R.; ORLANDO, F.; SILVESTRI, C.; RENZONE, G.; TESTA, I.; MOCCHEGIANI, F.; VITTORIA, A.D.; SABA, V.; SCALONI, A.; SCALISE, G. 2007. Distinctin improves the efficacies of glycopeptides and betalactams against staphylococcal biofilm in an experimental model of central venous catheter infection. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, **81(1)**: 233-239.

GIAROLLA, L.B.; BARATIERI, T.; COSTA, A.M.; BEDENDO, J.; MARCOS, S.S.; WAIDMAN, M.A.P. 2012. Infecção Hospitalar na perspectiva dos profissionais de enfermagem: um estudo bibliográfico. **Cogitare Enfermagem**, **17(1)**: 151-157.

GILBERT, R.E.; HARDEN, M. 2008. Effectiveness of impregnated central venous catheters for catheter related blood stream infection: a systematic review. **Current Opinion in Infectious Diseases**, **21(3)**: 235-245.

GOTO, Y. 1967. Metabolism of various carbohydrates in diabetes mellitus. **Nihon Rinsho**, **25(2)**: 261-267.

GROTHER, C.; BELASCO, A.G.S.; BITTENCOURT, A.R.C.; VIANNA, L.A.C.; SESSO, R.C.C.; BARBOSA, D.A. 2010. Incidência de infecção da corrente sanguínea nos pacientes submetidos à hemodiálise por cateter venoso central. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, **(18)**:1, 1-8.

GUL, H.; KARAKAS, A.; AYTEMİZ, S.; MERT, G.; EYİGUN, C.P. 2013. Nosocomial infections and infectious agents determined in geriatric patients. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, **2(Suppl 1)**: P237.

HAJIGHAHRAMANI, S.; VESAL, N. 2007. Evaluation of several drug combinations for intraperitoneal anaesthesia in adult male rats. **Iranian Journal of Veterinary Research**, **8(2)**:106-115.

HARMSSEN, M.; YANG, L.; PAMP, S.J.; TOLKER-NIELSEN, T. 2010. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. **Immunology & Medical Microbiology**, **59(3)**: 253-268.

HOCKENHULL, J.C.; DWAN, K.; BOLAND, A.; SMITH, G.; BAGUST, A.; DUNDAR, Y.; GAMBLE, C.; McLEOD, C.; WALLEY, T.; DICKSON, R. 2008. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of central venous catheters treated with anti-infective agents in preventing bloodstream infections: a systematic review and economic evaluation. **Health Technology Assessment**; **12(12)**: 1-154.

HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. 2010. Antibiotic resistance os bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **35(4)**: 322-332.

HORAN, T.G.; ANDRUS, M.; DUDECK, M.A. 2008. CDC/ NHSN surveillance definition of healthcare-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute setting. **American Journal of Infection Control**, **36(5)**: 309-32.

HOUDT, R.V.; AERTSEN, A.; JANSEN, A.; QUINTANA, A.L.; MICHIELS, C.W. 2004. Biofilm formation and cell-to-cell signalling in Gram-negative bacteria isolated from a food processing environment. **Journal of Applied Microbiology**, **96(1)**: 177-184.

ICHIKAWA, T.; YANO, Y.; FUJITA, Y.; KASHIWABARA, T.; NAGAO, K. 2008. The enhancement effect of three sugar alcohols on the fungicidal effect of benzethonium chloride toward *Candida albicans*. **Journal of Dentistry**, **36(11)**: 965-968.

JONES, R.D.; JAMPANI, H.B.; NEWMAN, J.L.; LEE, A.S. 2000. Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. **American Journal of Infection Control**, **28(2)**: 184–196.

JOO, H.S.; OTTO, M. 2012. Molecular basis of *in vivo* biofilm formation by bacterial pathogens. **Chemistry & Biology**, **19(12)**: 1503-1513.

JUNGE, K.; BINNEBOSEL, M.; TROTHA, K.T.; ROSCH, R.; KLINGE, U.; NEUMANN, U.P.I.; JANSEN, P.L. 2012. Mesh biocompatibility: effects of cellular inflammation and tissue remodeling. **Langenbeck's Archives of Surgery**, **397(2)**: 255-270.

KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y.F. 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. **European Cells and Materials**, **8**: 37-57.

KATSUYAMA, M.; ICHIKAWA, H.; OGAWA, S.; IKEZAWA, Z. 2005a. A novel method to control the balance of skin microflora. Part 1: Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. **Journal of Dermatological Science**, **38(3)**: 197-205.

KATSUYAMA, M.; KOBAYASHI, Y.; ICHIKAWA, H.; MIZUNO, A.; MIYACHI, Y.; MATSUNAGA, K.; KAWASHIMA, M. 2005b. A novel method to control the balance of skin microflora. Part 2: A study to assess the effect of a cream containing farnesol and xylitol on atopic dry skin. **Journal of Dermatological Science**, **38(3)**: 207-213.

KHAN, M.S.A.; AHMAD, I. 2012. Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, **67(3)**: 618-621.

KHUN, L.T. 2005. **Biomaterials**. In: ENDERLE, J.; BRONZINO, J. Introduction to Biomedical Engineering. 3rd ed. United State of America: Elsevier. 1272p.

KIRILIN, A.V.; TOKAREV, A.V.; KUSTOV, L.M.; SALMI, T.; MIKKOLA, J.P.; MURZIN, D.Y. 2012. Aqueous phase reforming of xylitol and sorbitol: Comparison and influence of substrate structure. **Applied Catalysis A: General**, **435-436(5)**: 172-180.

KLEVENS, R.M.; EDWARDS, J.R.; ANDRUS, M.L.; PETERSON, K.D.; DUDECK, M.A.; HORAN, T.C. 2008. NHSN Participants in Outpatient Dialysis Surveillance. Dialysis Surveillance Report: National Healthcare Safety Network (NHSN) - data summary for 2006. **Seminars in Dialysis**, **21(1)**: 24-28.

KOCKRO, R.A.; HAMPL, J.A.; JANSEN, B.; PETERS, G.; SCHEIHING, M.; GIACOMELLI, R.; KUNZE, S.; ASCHOFF, A. 2000. Use of scanning electron microscopy to investigate the prophylactic efficacy of rifampin-impregnated CSF shunt catheters. **Journal of Medical Microbiology**, **49(5)**: 441-450.

KONTIOKARI, T.; UHARI, M.; KOSKELA, M. 1998. Antiadhesive effects of xylitol on otopathogenic bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **41(5)**: 563-565.

KUMAR, L.; CHHIBER, S.; HARJAI, K. 2013. Zingerone inhibit biofilm formation and improve antibiofilm efficacy of 2 ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Fitoterapia**, **90**: 73-78.

KUROLA, P.; TAPIANIEN, T.; KAIJALAINEN, T.; UHARI, M.; SAUKKORIPPI, A. 2009. Xylitol and capsular gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Medical Microbiology**, **58(11)**: 1470-1473.

KUROLA, P.; TAPIAINEN, T.; SEVANDER, J.; KAIJALAINEN, T.; LEINONEN, M.; UHARI, M.; SAUKKORIPPI, A. 2011. Effect of xylitol and other carbon sources on *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and gene expression *in vitro*. **APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, **119(2)**: 135-142.

LANDINI, P.; ANTONIANI, D.; BURGESS, G.; NIJLAND, R. 2010. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **86(3)**: 813–823.

LASA, I.; DEL POZO, J.L.; PENADES, J.R.; LEIVA, J. 2005. Biofilmes bacterianos e infección. **Anales Del Sistema Sanitario de Navarra**, **28(2)**: 163-175.

LEAPER, D.; ASSADIAN, O.; HUBNER, N.O.; MCBAIN, A.; BARBOLT, T.; ROTHENBURGER, S.; WILSON, P. 2011. Antimicrobial sutures and prevention of surgical site infection: assessment of the safety of the antiseptic triclosan. **International Wound Journal**, **8(6)**: 556-566.

LEBLEBICIOGLU, H.; OZTURK, R.; ROSENTHAL, V.D.; AKAN, O.A.; SIRMATEL, F.; OZDEMIR, D. 2013. Impact of a multidimensional infection control approach on central line-associated bloodstream infections rates in adult intensive care units of 8 cities of Turkey: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC). **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, **12(10)**: 1-10.

LEE, S.; CHOI, B.; KIN, Y. 2012. The cariogenic characters of xylitol-resistant and xylitol-sensitive *Streptococcus mutans* in biofilm formation with salivary bacteria. **Archives of Oral Biology**, **57(6)**: 697-703.

LEE, Y.; CHOI, Y.; JEONG, S.; KIM, H.; LEE, S.; SONG, K. 2009. Morphological changes in *Streptococcus mutans* after chewing gum containing xylitol for twelve months. **Current Microbiology**, **58(4)**: 332-337.

LEON, C.; ARIZA, J. 2004. SEIMC; SEMICYUC. Guías para el tratamiento de las infecciones relacionadas con catéteres intravasculares de corta permanencia en adultos: conferencia de consenso SEIMC-SEMICYUC. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, **22(2)**: 92-101.

LIANGOS, O.; GUL, A.; MADIAS, N.E.; JABER, B.L. 2006. Long-term management of the tunneled venous catheter. **Seminars in Dialysis**, **19(2)**: 158-64.

LIM, G.T.; VALENTE, S.A.; HART-SPICEF, C.R.; EVANCHO-CHAPMAN, M.M.; PUSKAS, J.E.; HORNE, W.L.; SCHMIDT, S.P. 2013. New biomaterial as a promising alternative to silicone breast implants. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, **21**: 47-56.

LINS, M.O. 2011. **Atividade antimicrobiana e sinérgica de metabólitos de Rutaceae**. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Farmácia). Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, Salvador - BA, 92f.

LISBOA, T.; FARIA, M.; HOHER, J.A.; BORGES, L.A.A.; GÓMEZ, J.; SCHIFELBAIN, L.; DIAS, F.S.; LISBOA, J.; FRIEDMAN, G. 2007. Prevalência de infecção nosocomial em Unidades de Terapia Intensiva do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, **19(4)**: 414-420.

LUBARSKY, H.V.; GERBERSDORF, S.U.; HUBAS, C.; BEHRENS, S.; RICCIARDI, F.; PATERSON, D.M. 2012. Impairment of the bacterial biofilm stability by triclosan. **PLoS ONE**, **7(4)**: e31183.

MACHADO, A.F.P.; HOCHMAN, B.; TACANI, P.M.; LIEBANO, R.E.; FERREIRA, L.M. 2011. Medical devices registration by ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Clinics**, **66(6)**: 1095-1096.

MAIA, M.; KLEIN, E.S.; MONJE, T.V.; PAGLIOSA, C. 2010. Reconstrução da estrutura facial por biomateriais: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, **25(3)**: 566-572.

MAILLARD, J.Y. 2002. Bacterial target sites for biocide action. **Journal of Applied Microbiology**, **92(31)**: 16S-27S.

MÄKINEN, K.K. 1976. Possible mechanisms for the cariostatic effect of xylitol. **Internationale Zeitschrift für Vitamin - und Ernährungsforschung. Beiheft, 15:** 368-380.

MÄKINEN, K.K. 2000a. Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observations made with xylitol? **Medical Hypotheses, 54(4):** 603-613.

MÄKINEN, K.K. 2000b. The rocky road of xylitol to its clinical application. **Journal of Dental Research, 79(6):** 1352-1355.

MARIK, P.E.; FLEMMER, M.; HARRISON, W. 2012. The risk of catheter-related bloodstream infection with femoral venous catheters as compared to subclavian and internal jugular venous catheters: a systematic review of the literature and meta-analysis. **Critical Care Medicine, 40(8):** 2479-2485.

MENEZES, L.M.; FREITAS, M.P.M.; GONÇALVES, T.S. 2009. Biocompatibilidade dos materiais em Ortodontia: mito ou realidade? **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial, 14(2):** 144-157.

MERMEL, L.A. 2001. New technologies to prevent intravascular catheter-related bloodstream infections. **Emerging Infectious Diseases, 7(2):** 197-199.

MERMEL, L.A.; ALLON, M.; BOUZA, E.; CRAVEN, D.E.; FLYNN, P.; O'GRADY, N.P.O; RAAD, I.I.; RIJNDERS, B.J.A.; SHERETZ, R.J.; WARREN, D.K. 2009. Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of intravascular Catheter-Related Infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. **IDSA Guidelines for Intravascular Catheter-Related Infection, 49(1):** 1-45.

MIMA, T., JOSHI, S., GOMEZ-ESCALADA, M.; SCHWEIZER, H.P. 2007. Identification and characterization of TriABCOpH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. **Journal of Bacteriology, 189(21):** 7600–7609.

MING, X.; ROTHENBURGER, S.; YANG, D. 2007. *In vivo* antibacterial efficacy of MONOCRYL plus antibacterial suture (Poliglecaprone 25 with triclosan). **Surgery Infections (Larchmt), 8(2):** 201-208.

MITTELMAN, M.W. 1996. Adhesion to Biomaterials. In: **Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity**, Wiley-Liss, Inc., p. 89-127.

MIYAGAKI, D.C. 2011. **Avaliação da biocompatibilidade de cimentos endodônticos em tecido subcutâneo de rato e sua relação com o subtipo de macrófago M1**. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG, 97f.

MODESTO, A.; DRAKE, D.R. 2006. Multiple exposure to chlorhexidine and xylitol: adhesion and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **Current Microbiology**, **52(6)**: 418-423.

MORAES, M.N.; SILVEIRA, W.C.; TEIXEIRA, L.E.M.; ARAÚJO, I.D. 2013. Mecanismos de adesão bacteriana aos biomateriais. **Revista Médica de Minas Gerais**, **23(1)**: 99-104.

MOURA, M.E.B.; CAMPELO, S.M.A.; BRITO, F.C.P.; BATISTA, O.M.A.; ARAÚJO, T.M.E.; OLIVEIRA, A.D.S. 2007. Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino. **Revista Brasileira de Enfermagem**, **60(4)**: 416-421.

MULLER, G.; KRAMER, A. 2008. Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **61(6)**: 1281-1287.

MUNFORD, R.S.; PUGIN, J. 2001. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, **163(2)**: 316-321.

MURPHY, S.V.; ATALA, A. 2012. Organ engineering – combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation. **Bioessays**, **35(3)**: 163-172.

NASCIMENTO, C.; ISSA, J.P.M.; OLIVEIRA, R.R.; IYOMASA, M.M.; SIESSERE, S.; REGALO, S.C.H. 2007. Biomaterials applied to the bone healing process. **International Journal of Morphology**, **25(4)**: 839-846.

NEJADNIK, M.R.; MEI, H.C.; NORDE, W.; BUSSCHER, H.J. 2008. Bacterial adhesion and growth on a polymer brush-coating. **Biomaterials**, **29(30)**: 4117-4121.

NEVES JÚNIOR, M.A.; MELO, R.C.; GOES JÚNIOR, A.M.O.; PROTTA, T.R.; ALMEIDA, C.C.; FERNANDES, A.R.; PETNYS, A.; RABONI, E. 2010. Infecções em cateteres venosos centrais de longa permanência: revisão da literatura. **Jornal Vascular Brasileiro**, **9(1)**: 46-50.

NOGUEIRA, P.S.F.; MOURA, E.R.F.; COSTA, M.M.F.; MONTEIRO, W.M.S.; BRONDI, L. 2009. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. **Revista de Enfermagem**, **17(1)**: 96-101.

NOVIKOV, A.; LAM, M.Y.; LEONARD, L.A.; CASEY, A.L.; ELLIOT, T.S.; NIGHTINGALE, P. 2012. Impact of cateter antimicrobial coating on species-specific risk of cateter colonization: a meta-analysis. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, **1(1)**: 1-9.

ODA, T.; HAMASAKIM J.; KANDA, N.; MIKAMI, K. 1997. Anaphylactic shock induced by an antiseptic-coated central venous [correction of nervous] catheter. **Anesthesiology**, **87(5)**: 1242-1244.

OFEK, I.; HASTY, D.; SHARON, N. 2003. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, **38(3)**: 181-191.

O'GRADY, N.P.; ALEXANDER, M.; DELLINGER, E.P.; GERBERDING, J.L.; HEARD, S.O.; MAKI, D.G.; MASUR, H.; MCCORMICK, R.D.; MERMEL, L.A.; PEARSON, M.L.; RAAD, I.I.; RANDOLPH, A.; WEINSTEIN, R.A. 2002. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. **Pediatrics**, **110(5)**: e51.

OKINO NETO, K.; MOURA, A.A.M.; DAVIDOWICZ, H. 2010. Estudo comparativo da reação tecidual conjuntiva de ratos, frente a três cimentos endodônticos resinosos. **Journal of the Health Sciences Institute**, **28(1)**: 67-70.

OLIVEIRA, A.S.S.; PARREIRA, P.M.S.D. 2010. Intervenções de enfermagem e flebites decorrentes de cateteres venosos periféricos. Revisão sistemática da literatura. **Revista de Enfermagem Referência**, **III(2)**: 137-147.

OTTO, M. 2008. Staphylococcal biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, **322**: 207-228.

PAPA, R.; ARTINI, M.; CELLINI, A.; TILOTTA, M.; GALANO, E.; PUCCI, P.; AMORESANO, A.; SELAN, L. 2013. A new anti-infective strategy to reduce the spreading of antibiotic resistance by the action on adhesion-mediated virulence factors in *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, **63**: 44-53.

PEREIRA, R.M. 2005. **Efeitos de lasers de baixa potência em três diferentes comprimentos de onda no processo de cicatrização de queimaduras de 3º grau**. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia). Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos - SP, 78f.

PIERONI, K.P.; NESPOR, C.; POOLE, R.L.; KERNER, J.A.J; BERQUIST, W.E. 2013. Echinocandin and ethanol lock therapy treatment of fungal catheter infections. **Pediatric Infectious Diseases**, **32(3)**: 289-291.

PIZZO, G.; GIULIANA, G.; MILICI, M.E.; GIANGRECO, R. 2000. Effect of dietary carbohydrates on the *in vitro* epithelial adhesion of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei*. **The New Microbiologica**, **23(1)**: 63-71.

PRADE, S.S.; OLIVEIRA, S.T.; RODRIGUES, R. 1995. Estudo brasileiro da magnitude das infecções hospitalares em hospitais terciários. **Revista do Controle de Infecção Hospitalar**, **2**:11-24.

RAAD, I.; REITZEL, R.; JIANG, Y.; CHEMALY, R.F.; DVORAK, T.; HACHEM, R. 2008. Anti-adherence activity and antimicrobial durability of anti-infective-coated catheters against multidrug-resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**; **62(4)**: 746-750.

RAMAN, G.; GAYLOR, J.M.; RAO, M.; CHAN, J.; EARLEY, A.; CHANG, L.K.W. SALVI, P.; LAMONT, J.; LAU, J. 2012. Quality of reporting in systematic reviews of implantable medical devices. **Methods Research Report**, **12(13)**: EHC116-EF

RIVERA, E.A.B. 2002. **Estresse em animais de laboratório**. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. Animais de Laboratório: criação e experimentação, Ed. FIOCRUZ, p. 263-273.

ROCHA JÚNIOR, A.M.; OLIVEIRA, R.G.; FARIAS, R.E.; ANDRADE, L.C.F.; ARESTRUP, F.M. 2006. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, **81(2)**: 150-156.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D.B. 2005. **Resistência Bacteriana – interpretando antibiograma**. 1ª ed. São Paulo (SP): Atheneu. 118p.

RUIZ, V.; RODRIGUEZ-CERRATO, V.; HUELVES, L.; DEL PRADO, G.; NAVES, P.; PONTE, C.; SORIANO, F. 2011. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to polystyrene plates and epithelial cells and the antiadhesive potential of albumin and xylitol. **Pediatric Research**, **69(1)**: 23-27.

RULKA, E.L.; LIMA, M.; NEVES, E.B. 2012. Perfil das publicações científicas sobre a infecção hospitalar na base de dados SciELO. **Journal of the Health Sciences Institute**, **30(2)**: 161-165.

RUSSELL, A.D. 2004. Whither triclosan? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **53(5)**: 693-695.

SAJJAN, U.; MOREIRA, J.; LIU, M.; HUMAR, A.; CHAPARRO, C.; FORSTNER, J.; KESHAYJEE, S. 2004. A novel model to study bacterial adherence to the transplanted airway: Inhibition of *Bukholderia cepacia* adherence to human airway by dextran and xylitol. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, **23(12)**: 1382-1391.

SANTOS, L.A.S. **Composições germicidas e antissépticas de múltiplas aplicações e, processo de desinfecção, higienização e esterilização de objetos e superfícies**. PI0305735-6, 08 dezembro 2003.

SANTOS, N.Q.A. 2004. Resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto – Enfermagem**, **13**: 64-70.

SCHIFFER, C.A.; MANGU, P.B.; WADE, J.C.; CAMP-SORREL, D.; COPE, D.G.; EL-RAYERS, B.F.; GORMAN, M.; LIGIBEL, J.; MANSFIELD, P.; LEVINE, M. 2013. Central venous catheter care for the patient with cancer: American Society Of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. **Journal of Clinical Oncology**, **31(10)**: 1357-1370.

SHARON, N.; OFEK, I. 2000. Safe as mother's milk: carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases. **Glycoconjugate Journal**, **17(7-9)**: 659-664.

SHEMESH, M.; TAM, A.; FELDMAN, M.; STEINBERG, D. 2006. Differential expression profiles of *Streptococcus mutans* *fff*, *gtf* and *vicR* genes in the presence of dietary carbohydrates at early and late exponential growth phases. **Carbohydrate Research**, **341(12)**: 2090-2097.

SILVA, A.J.R.; OLIVEIRA, F.M.D.; RAMOS, M.E.P. 2009. Infecção associada ao cateter venoso central. **Revista Referência**, **2**: 125-134.

SIMÕES, M. 2011. Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. **Current Medicinal Chemistry**, **18(14)**: 2129-2145.

SIQUEIRA, G.L.G.; HUEB, W.; CONTREIRA, R.; NOGUERON, M.A.; CANCIO, D.M.; CAFFARO, R.A. 2011. Infecção de corrente sanguínea relacionada a cateter venoso central (ICSRC) em enfermarias: estudo prospectivo comparativo entre veia subclávia e veia jugular interna. **Jornal Vascular Brasileiro**, **10(3)**: 211-216.

SILVA, A.F.; SUZUKI, E.Y.; FERREIRA, A.S.; OLIVEIRA, M.G.; SILVA, S.S.; RAPOSO, N.R.B. 2011. *In vitro* inhibition of adhesion of *Escherichia coli* strains by xylitol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, **54(2)**: 235-241.

SILVA, R.A.; ASSED, S.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, L.A.B.; CONSOLARO, A. 2009. Subcutaneous tissue response of isogenic mice to calcium hydroxide-based pastes with chlorhexidine. **Brazilian Dental Journal**, **20(2)**: 99-106.

SOARES, M.P.M. 2013. **Avaliação da eficiência de sabonetes com triclosan sobre suspensões bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* aplicadas sobre a superfície das mãos de voluntários**. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 69f.

SÖDERLING, E.; HIETALA-LENKKERI, A. 2010. Xylitol and erythritol decrease adherence of polysaccharide-producing oral streptococci. **Current Microbiology**, **60(1)**: 25-29.

SOUSA, L.P.; SILVA, A.F.; CALIL, N.O.; OLIVEIRA, M.G.; SILVA, S.S.; RAPOSO, N.R.B. 2011. *In vitro* inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion by xylitol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, **54(5)**: 877-884.

SOUZA, L.B.G.; FIGUEIREDO, B.B. 2008. Prevalencia de infecções nosocomiais provocadas por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (M.R.S.A.) no Hospital Universitário Regional de Maringá. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, **40(1)**: 31-34.

STEFANIDIS, C.J. 2010. Preventing catheter-related infections in children undergoing hemodialysis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy's**, **8(11)**: 1239-1249.

STEPHAN, P. 2011. Central venous catheters. Medical Review Board. Disponível em <http://breastcancer.about.com/od/chemotherapydrugs/tp/Central-Venous-Catheter.htm>. Acesso em 27 de julho de 2013.

STICKLER, D.J. 2008. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. **Natural Clinical Practice**, **5(11)**: 598-608.

SUJIMOTO, S.; IWAMOTO, T.; TAKADA, K.; OKUDA, K.; TAJIMA, A.; IWASE, T.; MIZUNOE, Y. 2013. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. **Journal of Bacteriology**, **195(8)**: 1645-1655.

TANAKA, E.M.; RIBEIRO, M.G.; MEGID, J.; LISTONI, F.J.P. 2002. Tris-EDTA no teste de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* em amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, **54(3)**: 331-334.

TAPIAINEN, T.; SORMUNEN, R.; KAIJALAINEN, T.; KONTIOKARI, T.O.; IKAHEIMO, I.; UHARI, M. 2004. Ultrastructure of *Streptococcus pneumoniae* after exposure to xylitol. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **54(1)**: 225-228.

THEILGAARD, N.; SVENSSON, A.; THOMSEN, P.; ALM, M. 2013. O014: A new generation of hybrid biomaterials for antimicrobial medical devices. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, **2 (suppl 1)**: O14.

TRENTIN, D.S.; GORZIZA, D.F.; ABRAHAM, W.R.; ANTUNES, A.L.S.; MOTHE, B.; TERMIGNONI, C.; MACEDO, A.J. 2011. Antibiofilm activity of *Cobetia marina* filtrate upon *Staphylococcus epidermidis* catheter-related isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, **42(4)**: 1329-1333.

TURTIAINEN, J.; SAIMANEN, E.I.; MÄKINEN, K.T.; NYKÄNEN, A.I.; VENERMO, M.A.; UURTO, I.T.; HAKALA, T. 2012. Effect of triclosan-coated sutures on the incidence of surgical wound infection after lower limb revascularization surgery: a randomized controlled trial. **World Journal of Surgery**, **36(10)**: 2528-2534.

UÇKAY, I.; HOFFMEYER, P.; LEW, D.; PITTET, D. 2013. Prevention of surgical site infections in orthopaedic surgery and bone trauma: state-of-the-art update. **Journal of Hospital Infection**, **84(1)**: 5-12.

USP – **The United States Pharmacopeia**. 1985. USP XXI, 16<sup>th</sup> edition.

UYGUR, F.; OZYURT, M.; EVINÇ, R.; HOSBUL, T.; ÇELIKOZ, B.; HAZNEDAROGLU, T. 2008. Comparison of octenidine dihydrochloride (Octenisept®), polihexanide (Prontosan®) and povidon iodine (Betadine®) for topical antibacterial effects in *Pseudomonas aeruginosa*-contaminated, full-skin thickness burn wounds in rats. **Central European Journal of Medicine**, **3(4)**: 417-421.

VAN OSS, C.J. 1991. Interaction forces between biological and other polar entities in water: how many different forces are there? **Journal of Dispersion Science and Technology**, **12(2)**: 201-219.

VAN PRAAGH, A.D.G.; LI, T.; ZHANG, S.; ARYA, A.; CHEN, L.; ZHANG, X.X. BERTOLAMI, S.; MORTIN, L.I. 2011. Daptomycin Antibiotic-Lock Therapy in a Rat Model of Staphylococcal 1 Central Venous Catheter Biofilm Infections. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **55(11)**: 4081-4089.

VALENTINE, K.M. 2011. Ethanol lock therapy for catheter-associated blood stream infections in a pediatric intensive care unit. **Pediatric Critical Clinical Medical**, **12(6)**: 292-296.

VENKATESH, M.; RONG, L.; RAAD, I.; VERSALOVIC, J. 2009. Novel synergistic antibiofilm combinations for salvage of infected catheters. **Journal of Medical Microbiology**, **58**: 936-944.

VEPARI, C.; KAPLAN, D.L. 2007. Silk as a biomaterial. **Progress in Polymer Science**, **32(8-9)**: 991–1007.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. 2002. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. **Food Additives and Contaminants**, **19**: 163-171.

VILLANOVA, J.C.O.; ORÉFICE, R.L.; CUNHA, A.S. 2010. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, **20(1)**: 51-64.

VISCHER, W.A.; REGOS, J. 1974. Antimicrobial spectrum of triclosan a broad spectrum antimicrobial agent. **Zentralbl Bakteriol Orig A**; **226(3)**: 376-389.

YAZDANKHAH, S.P., SCHEIE, A.A., HØIBY, E.A., LUNESTAD, B.T., HEIR, E., FOTLAND, T.Ø., NATERSTAD, K.; KRUSE, H. 2006. Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview. **Microbial Drug Resistance**, **12(2)**: 83–90.

WANG, H.; HUANG, T.; JING, J.; JIN, J.; WANG, P.; YANG, M.; CUI, W.; ZHENG, Y.; SHEN, H. 2010. Effectiveness of different central venous catheters for catheter-related infections: a network meta-analysis. **Journal of Hospital Infection**, **76(1)**: 1–11.

WANG, R.; KHAN, B.A.; CHEUNG, G.Y.C.; BACH, T.H.L.; JAMESON-LEE, M.; KOMG, K.F.; QUECK, S.Y.; OTTO, M. 2011. *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, **121(1)**: 238-248.

WANG, Z.X.; JIANG, C.P.; CAO, Y.; DING, Y.T. 2013. Systematic review and meta-analysis of triclosan-coated sutures for the prevention of surgical-site infection. **British Journal of Surgery**, **100(4)**: 465–473.

WELK, A.; SPLIETH, C.H.; SCHMIDT-MARTENS, G.; SCHWAHN, C.H.; KOCHER, T.H.; KRAMER, A.; ROSIN, M. 2005. The effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse compared with a triclosan rinse and a chlorhexidine rinse on bacterial counts and 4-day plaque re-growth. **Journal of Clinical Periodontology**, **32(5)**: 499-505.

WILLIAMS, D.F. 2009. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, **30(3)**: 5897-909.

WISŃNIEWSKA, K., PIECHOWICZ, L.; GALIŃSKI, J. 2006. Reduced susceptibility to triclosan in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia**, **58(1)**: 11–17.

WOOD, T.K.; HONG, S.H.; MA, Q. 2011. Engineering biofilm formation and dispersal. **Trends in Biotechnology**, **29(2)**: 87-94.

WRIGHT, C.; HERBERT, G.; PILKINGTON, R.; CALLAGHAN, M.; MCCLEAN, S. 2010. Real-time PCR method for the quantification of *Burkholderia cepacia* complex attached to lung epithelial cells and inhibition of that attachment. **Letters in Applied Microbiology**, **50(5)**: 500-506.

**ANEXO A**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PRO-REITORIA DE PESQUISA**  
**Comissão de Ética na Experimentação Animal**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 037/2011 – CEEA sobre “REVESTIMENTO ANTIBIOFILME PARA SUPERFÍCIE EXTERNA DE CATÉTER VENOSO CENTRAL” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de NÁDIA REZENDE BARBOSA RAPOSO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 06/09/2011.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº 037/2011 - CEEA about “ANTIBIOFILM COATING FOR EXTERNAL SURFACE OF CENTRAL VENOUS CATHETER” - NÁDIA REZENDE BARBOSA RAPOSO, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 06/09/2011.

**Juiz de Fora, 14 de setembro de 2011.**

  
\_\_\_\_\_  
**Presidente/CEEA**

  
\_\_\_\_\_  
**Secretário/CEEA**

## ANEXO B

Tabela com os resultados de ganho de peso, consumo de ração e avaliação macroscópica dos animais estudados durante o ensaio *in vivo* de avaliação da eficácia antimicrobiana/antibiofilme.

		ENSAIO DE EFICÁCIA									
7 DIAS		Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Ganho de Peso (g)	Ganho de Peso (%)	Consumo Ração / Dia (g)	Edema	Eritema	Secreção	Febre	Retirada do Cateter
GA CNR	GAR1	193,35	208,28	14,93	7,72	22,77	0	1-1-1	0	0	Pouco Pus
	GAR2	165,62	178,05	12,43	7,51	21,85	0	1	0	0	Muito Pus
	GAR3	177,57	203,99	26,42	14,88	22,32	0	1-1	0	0	Muito Pus
	GAR4	181,30	194,28	12,98	7,16	20,21	0	1-1	0	0	Pouco Pus
	GAR5	182,43	164,96	-17,47	-9,58	8,61	0	0	1	1	Muito Pus
	MÉDIA	-	-	-	5,54	19,15	-	-	-	-	-
DESVIO PADRÃO		-	-	-	9,04	5,97	-	-	-	-	-
GB CR1	GBR1	202,31	213,08	10,77	5,32	21,91	0	0	0	0	Normal
	GBR2	182,24	198,01	15,77	8,65	20,88	0	1	0	0	Pouco Pus
	GBR3	197,12	216,78	19,66	9,97	25,16	0	1-1-1	0	0	Pouco Pus
	GBR4	188,33	197,36	9,03	4,79	18,12	0	1-1	0	0	Normal
	GBR5	202,75	218,26	15,51	7,65	23,59	0	1-1	0	0	Pouco Pus
	MÉDIA	-	-	-	7,28	21,93	-	-	-	-	-
DESVIO PADRÃO		-	-	-	2,20	2,68	-	-	-	-	-
GC CR2	GCR1	170,57	151,80	-18,77	-11,00	9,18	0	0	0	0	Normal
	GCR2	181,40	205,70	24,30	13,40	23,13	0	1-1-1-1	0	0	Normal
	GCR3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GCR4	201,66	206,21	4,55	2,26	21,46	0	2-1-1-1-1	0	0	Normal
	GCR5	190,70	194,08	3,38	1,77	20,07	0	1-1-1	0	0	Normal
	MÉDIA	-	-	-	1,61	18,46	-	-	-	-	-
DESVIO PADRÃO		-	-	-	9,97	6,31	-	-	-	-	-
GD CNR <i>S.aureus</i>	GDR1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GDR2	178,04	183,71	5,67	3,18	21,20	0	1	1	0	Pouco Pus
	GDR3	185,28	204,78	19,50	10,52	18,62	0	0	0	0	Muito Pus e Sangue
	GDR4	200,51	202,12	1,61	0,80	20,27	0	1-1-1-1-1	0	0	Normal
	GDR5	161,07	166,75	5,68	3,53	19,25	0	2-2-1-1-1	0	0	Normal
	GDR6	186,16	188,80	2,64	1,42	20,02	0	1-2-2-2-2	0	0	Normal
	GDR7	156,75	124,08	-32,67	-20,84	2,89	0	0	0	1-1-1-1-1	Normal
	MÉDIA	-	-	-	-0,23	17,04	-	-	-	-	-
DESVIO PADRÃO		-	-	-	10,68	6,99	-	-	-	-	-
GE CR1 <i>S.aureus</i>	GER1	190,50	205,70	15,20	7,98	18,26	0	0	0	0	Normal
	GER2	201,86	213,44	11,58	5,74	23,85	0	0	0	0	Normal
	GER3	183,91	209,54	25,63	13,94	21,97	0	1-1-1	1	0	Normal - Com Exsudato
	GER4	200,72	208,93	8,21	4,09	19,65	0	0	0	0	Normal - Com Exsudato
	GER5	198,60	216,00	17,40	8,76	21,38	0	1-1-1-1	0	0	Normal - Com Exsudato
	GER6	152,45	184,01	31,56	20,70	18,47	0	0	0	0	Muito Pus
	GER7	168,93	185,89	16,96	10,04	21,30	0	1-1	0	0	Normal
	MÉDIA	-	-	-	10,18	20,70	-	-	-	-	-
DESVIO PADRÃO		-	-	-	5,61	2,02	-	-	-	-	-
GF CR2 <i>S.aureus</i>	GFR1	205,14	205,79	0,65	0,32	20,73	0	1-1-1	0	0	Normal
	GFR2	197,44	204,67	7,23	3,66	20,81	0	0	0	0	Normal
	GFR3	163,90	175,60	11,70	7,14	16,29	0	1-1	0	0	Normal
	GFR4	193,06	196,85	3,79	1,96	18,45	0	1-1-1-1	0	0	Normal
	GFR5	189,31	192,31	3,00	1,58	19,21	0	0	0	0	Normal
	GFR6	173,25	172,45	-0,80	-0,46	18,44	0	0	0	0	Normal
	GFR7	192,54	195,97	3,43	1,78	18,68	0	0	0	0	Normal
	MÉDIA	-	-	-	2,28	18,94	-	-	-	-	-
DESVIO PADRÃO		-	-	-	2,51	1,55	-	-	-	-	-
GG CONT	GGR1	185,35	195,80	10,45	5,64	21,74	-	-	-	-	-
	GGR2	182,53	194,12	11,59	6,35	24,62	-	-	-	-	-
	GGR3	185,81	204,92	19,11	10,28	23,61	-	-	-	-	-
	GGR4	185,61	197,49	11,88	6,40	17,87	-	-	-	-	-
	GGR5	170,54	182,22	11,68	6,85	20,68	-	-	-	-	-
	GGR6	195,87	206,29	10,42	5,32	17,89	-	-	-	-	-
	MÉDIA	-	-	-	6,81	21,07	-	-	-	-	-
DESVIO PADRÃO		-	-	-	1,79	2,83	-	-	-	-	-

\*Grupo G (controle): animais não manipulados, sem inserção de fragmentos de CVC.

\*\*Animal GCR3e GDR1: óbito durante experimento por causa não determinada.

\*\*\*Escala de avaliação dos parâmetros macroscópicos (edema, eritema, secreção e febre) – Grau 0: nenhuma reação, Grau 1: reação discreta, Grau 2: reação moderada e Grau 3: reação intensa.

## ANEXO C

Tabela com os parâmetros hematológicos dos animais estudados durante o ensaio *in vivo* de avaliação da eficácia antimicrobiana/antibiofilme.

ENSAIO DE EFICÁCIA																
		SÉRIE VERMELHA							SÉRIE BRANCA							Plaquetas x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>
		Hematimetria x10 <sup>5</sup> /mm <sup>3</sup>	Hemoglobina g/dL	Hematócrito %	VCM fl	HCM pg	CHCM g/dL	RDW %	Leucometria Global x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	Neutrófilos %	Linfócitos %	Monócitos %	Eosinófilos %	Basófilos %		
GA CNR	GAR1	8,40	15,98	50,20	59,90	19,00	31,80	13,80	11100	20	72	6	2	0	1186	
	GAR2	8,46	14,68	44,80	53,10	17,30	32,70	16,10	6100	40	44	12	4	0	121	
	GAR3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	GAR4	8,20	16,26	48,60	59,30	19,80	33,40	12,80	11200	32	60	4	2	0	1004	
	GAR5	5,82	11,00	33,00	56,60	18,90	33,40	14,80	11100	64	33	1	1	1	842	
	MÉDIA	7,72	14,48	44,15	57,23	18,75	32,83	14,38	9875	39	52	6	2	0	788	
DESVIO PADRÃO	1,27	2,42	7,77	3,10	1,05	0,76	1,41	2517	19	17	5	1	1	466		
GB CR1	GBR1	9,12	17,18	51,80	56,80	18,80	33,10	14,70	11500	26	72	0	2	0	1078	
	GBR2	6,44	12,18	37,40	57,90	18,90	32,70	14,20	9500	46	48	4	2	0	804	
	GBR3	6,12	11,56	34,60	56,50	18,90	33,40	13,80	3300	22	73	3	2	0	730	
	GBR4	9,04	17,18	51,00	56,40	19,00	33,70	13,40	8800	26	71	2	1	0	908	
	GBR5	6,54	12,48	37,60	57,50	19,10	33,30	13,80	7400	24	72	1	3	0	798	
	MÉDIA	7,45	14,12	42,48	57,02	18,94	33,24	13,98	8100	29	67	2	2	0	864	
DESVIO PADRÃO	1,49	2,82	8,23	0,65	0,11	0,37	0,49	3063	10	11	2	1	0	136		
GC CR2	GCR1	7,66	14,98	44,60	58,20	19,50	33,60	14,30	7300	20	69	3	7	1	712	
	GCR2	7,64	14,48	43,60	57,10	19,00	33,20	16,50	5900	24	67	2	7	0	1012	
	GCR3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	GCR4	7,56	14,54	43,60	57,70	19,20	33,30	14,00	11500	26	60	4	10	0	790	
	GCR5	6,74	12,78	39,40	58,60	19,00	32,40	13,90	6200	19	74	1	6	0	808	
	MÉDIA	7,40	14,20	42,80	57,90	19,18	33,13	14,68	7725	22	68	3	8	0	831	
DESVIO PADRÃO	0,44	0,97	2,32	0,65	0,24	0,51	1,23	2588	3	6	1	2	1	128		
GD CNR S.aureus	GDR1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	GDR2	6,60	11,48	34,60	52,60	17,40	33,10	12,60	7800	24	73	3	0	0	858	
	GDR3	5,28	10,78	33,00	62,30	20,40	32,70	18,30	6900	21	74	5	0	0	1404	
	GDR4	7,38	14,22	43,40	58,60	19,20	32,80	15,40	10600	18	77	3	2	0	1016	
	GDR5	6,86	12,68	38,00	55,20	18,50	33,40	13,90	6300	25	68	1	6	0	770	
	GDR6	5,68	11,16	33,40	59,00	19,70	33,30	14,40	2800	28	70	1	1	0	936	
GDR7	5,94	10,92	32,80	55,30	18,40	33,30	15,10	7100	33	54	10	3	0	496		
MÉDIA	6,29	11,87	35,87	57,17	18,93	33,10	14,95	6917	25	69	4	2	0	913		
DESVIO PADRÃO	0,79	1,34	4,16	3,46	1,06	0,29	1,92	2518	5	8	3	2	0	300		
GE CR1 S.aureus	GER1	7,16	13,00	38,40	53,80	18,20	33,70	12,80	9100	17	80	2	1	0	942	
	GER2	8,14	16,30	48,40	59,50	20,00	33,60	15,40	9500	19	74	4	3	0	1238	
	GER3	8,82	17,22	50,60	57,50	19,50	34,00	14,40	6600	21	75	2	2	0	740	
	GER4	7,94	15,68	46,00	57,90	19,70	34,10	15,00	7100	22	72	2	4	0	1222	
	GER5	7,94	15,32	45,60	57,40	19,30	33,70	13,60	6100	31	60	7	2	0	1098	
	GER6	8,58	16,88	49,20	57,20	19,60	34,40	13,80	15300	32	66	1	1	0	1230	
GER7	8,58	16,38	48,20	56,20	19,10	34,00	15,50	9400	21	74	3	2	0	1176		
MÉDIA	8,17	15,83	46,63	57,07	19,34	33,93	14,36	9014	23	72	3	2	0	1092		
DESVIO PADRÃO	0,56	1,41	4,02	1,75	0,58	0,28	1,01	3106	6	7	2	1	0	187		
GF CR2 S.aureus	GFR1	8,34	16,88	49,00	58,20	20,20	34,40	13,40	6300	29	68	1	2	0	1086	
	GFR2	8,70	17,30	50,00	57,50	19,90	34,50	13,90	8000	20	77	1	2	0	1510	
	GFR3	8,50	17,08	48,40	57,00	20,10	35,30	13,70	7500	89	10	0	1	0	878	
	GFR4	7,14	13,46	39,20	54,80	18,90	34,40	11,60	8200	18	80	0	2	0	824	
	GFR5	9,02	17,42	51,20	56,70	19,30	34,10	15,30	6900	22	75	2	1	0	1604	
	GFR6	6,92	13,08	38,20	55,30	18,90	34,20	12,20	4100	33	60	4	3	0	496	
GFR7	8,98	16,84	48,80	54,40	18,80	34,50	13,30	9800	22	74	3	1	0	2294		
MÉDIA	8,23	16,01	46,40	56,27	19,44	34,49	13,34	7257	33	63	2	2	0	1242		
DESVIO PADRÃO	0,86	1,89	5,35	1,45	0,61	0,39	1,20	1778	25	24	2	1	0	605		
GG CONT	GGR1	8,38	15,52	48,00	57,20	18,50	32,40	14,20	9000	26	69	2	3	0	900	
	GGR2	5,02	9,66	29,40	58,70	19,20	32,80	14,30	6100	21	72	3	4	0	672	
	GGR3	6,40	16,28	37,20	58,30	19,20	32,90	13,90	5500	27	70	2	1	0	746	
	GGR4	8,32	17,10	50,20	60,40	20,50	34,00	15,00	5700	16	78	2	4	0	1062	
	GGR5	7,48	14,66	44,80	59,90	19,60	32,80	13,40	8100	29	61	6	4	0	806	
	GGR6	7,16	13,50	39,60	55,30	18,90	34,20	12,20	9600	26	70	3	1	0	-	
MÉDIA	7,13	14,45	41,53	58,30	19,32	33,18	13,83	7333	24	70	3	3	0	837		
DESVIO PADRÃO	1,27	2,66	7,71	1,86	0,69	0,73	0,96	1792	5	5	2	1	0	151		

\*Animal GAR3: amostra de sangue coagulada, impedindo realização das análises hematológicas.

\*\*Animal GCR3e GDR1: óbito durante experimento por causa não determinada.

## ANEXO D

Tabela com os resultados da análise microbiológica das superfícies externa e interna de fragmentos de catéter venoso central (CVC) implantados nos animais de experimentação durante o ensaio *in vivo* de avaliação da eficácia antimicrobiana/antibiofilme.

ENSAIO DE EFICÁCIA				
		Ágar Sangue (Face externa)	Tioglicolato (Face interna)	BHI (Hemocultura)
GA CNR	GAR1	NEGATIVO	NEGATIVO (BGP)	NEGATIVO
	GAR2	STAPHYLOCOCCUS AUREUS +	NEGATIVO (BGP)	NEGATIVO
	GAR3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	GAR4	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	GAR5	PSEUDOMONAS AERUGINOSA +++	CITROBACTER SP. / ENTEROCOCCUS FAECALIS	NEGATIVO
	MÉDIA	2 COLONIZAÇÕES EXTERNAS	1 COLONIZAÇÃO EXTERNA	NEGATIVO
DESvio PADRÃO		-	-	-
GB CR1	GBR1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	GBR2	NEGATIVO	NEGATIVO (BGP)	NEGATIVO
	GBR3	NEGATIVO	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	NEGATIVO
	GBR4	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	GBR5	NEGATIVO	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	NEGATIVO
	MÉDIA	NEGATIVO	2 COLONIZAÇÕES EXTERNAS	NEGATIVO
DESvio PADRÃO		-	-	-
GC CR2	GCR1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	GCR2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	GCR3	-	-	-
	GCR4	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	GCR5	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	MÉDIA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
DESvio PADRÃO		-	-	-
GD CNR <i>S.aureus</i>	GDR1	-	-	-
	GDR2	STAPHYLOCOCCUS AUREUS +	KLEBSIELLA SP. / STAPHYLOCOCCUS AUREUS	NEGATIVO
	GDR3	STAPHYLOCOCCUS AUREUS +++	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	NEGATIVO
	GDR4	STAPHYLOCOCCUS AUREUS +++	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	NEGATIVO
	GDR5	STAPHYLOCOCCUS AUREUS 11	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	NEGATIVO
	GDR6	STAPHYLOCOCCUS AUREUS 4	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	NEGATIVO
	GDR7	STAPHYLOCOCCUS AUREUS ++	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	NEGATIVO
	MÉDIA	100% STAPHYLOCOCCUS AUREUS - INCONTÁVEL(+++)	100% STAPHYLOCOCCUS AUREUS + 1 COLONIZAÇÃO EXTERNA	NEGATIVO
DESvio PADRÃO		-	-	-
GE CR1 <i>S.aureus</i>	GER1	STAPHYLOCOCCUS AUREUS 98	KLEBSIELLA SP. / STAPHYLOCOCCUS AUREUS	NEGATIVO
	GER2	STAPHYLOCOCCUS AUREUS 99	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	NEGATIVO
	GER3	STAPHYLOCOCCUS AUREUS 31	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	NEGATIVO
	GER4	STAPHYLOCOCCUS AUREUS 13	NEGATIVO	NEGATIVO
	GER5	STAPHYLOCOCCUS AUREUS 42	NEGATIVO	NEGATIVO
	GER6	STAPHYLOCOCCUS AUREUS +	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	NEGATIVO
	GER7	STAPHYLOCOCCUS AUREUS 22	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	NEGATIVO
	MÉDIA	100 % STAPHYLOCOCCUS AUREUS - 72	71% STAPHYLOCOCCUS AUREUS + 1 COLONIZAÇÃO EXTERNA	NEGATIVO
DESvio PADRÃO		-	-	-
GF CR2 <i>S.aureus</i>	GFR1	STAPHYLOCOCCUS AUREUS 26	NEGATIVO	NEGATIVO
	GFR2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	GFR3	STAPHYLOCOCCUS AUREUS +	NEGATIVO	NEGATIVO
	GFR4	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	GFR5	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	GFR6	STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE 36	NEGATIVO	NEGATIVO
	GFR7	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	MÉDIA	29% STAPHYLOCOCCUS AUREUS - 87 + 1 COLONIZAÇÃO EXTERNA	NEGATIVO	NEGATIVO
DESvio PADRÃO		-	-	-
GG CONT	GGR1	-	-	-
	GGR2	-	-	-
	GGR3	-	-	-
	GGR4	-	-	-
	GGR5	-	-	-
	MÉDIA	-	-	-
DESvio PADRÃO		-	-	-

\*Grupo G (controle): animais não manipulados, sem inserção de fragmentos de CVC.

\*\* Animal GCR3 e GDR1: óbito durante experimento por causa não determinada.

\*\*\*Negativo = sem crescimento microbiano; até 100 unidades formadoras de colônia (UFC) = <100 UFC; + = de 100 a 300 colônias; ++ = mais de 300 colônias; +++ = colônias incontáveis e ++++ = colônias confluentes.

## ANEXO E

Tabela com os resultados de ganho de peso, consumo de ração e avaliação macroscópica dos animais estudados durante o ensaio *in vivo* de avaliação da biocompatibilidade tecidual (7 e 21 dias).

ENSAIO DE TOXICIDADE TECIDUAL												
7 DIAS	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Ganho de Peso (g)	Ganho de Peso (%)	Consumo Ração / Dia (g)	Edema	Eritrema	Secreção	Febre	Retirada do Cateter		
GA - CNR	GAR1	184,15	186,45	2,30	1,25	12,92	0/0	1/0	0/0	0	Normal / Normal	
	GAR2	186,07	197,12	11,05	5,94	16,32	0/0	0/0	0/0	0	Normal / Normal	
	GAR3	174,45	193,51	19,06	10,93	18,66	0/0	0/1	0/0	0	Normal / Pouco Pus	
	MÉDIA	-	-	-	6,04	15,97	-	-	-	-	-	-
	DESVMIO PADRÃO	-	-	-	4,84	2,89	-	-	-	-	-	-
GB - CR1	GBR1	179,42	180,00	0,58	0,32	6,51	0/0	0/0	0/0	0	Normal / Normal	
	GBR2	203,12	222,00	18,88	9,29	20,21	0/0	0/1-1	0/0	0	Normal / Normal	
	GBR3	161,79	166,56	4,77	2,95	9,01	0/0	1-1/2-1	0/0	0	Normal / Pouco Pus	
	MÉDIA	-	-	-	4,19	11,91	-	-	-	-	-	-
	DESVMIO PADRÃO	-	-	-	4,61	7,30	-	-	-	-	-	-
GC - CR2	GCR1	162,03	182,24	20,21	12,47	16,88	0/0	1/0	0/0	0	Normal / Normal	
	GCR2	169,52	184,64	15,12	8,92	15,31	0/0	0/0	0/0	0	Normal / Normal	
	GCR3	172,10	190,12	18,02	10,47	16,38	0/0	0/0	0/0	0	Normal / Normal	
	MÉDIA	-	-	-	10,62	16,19	-	-	-	-	-	-
	DESVMIO PADRÃO	-	-	-	1,78	0,80	-	-	-	-	-	-
GD - CONT	GDR1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	GDR2	175,50	189,00	13,50	7,69	19,12	-	-	-	-	-	
	GDR3	171,53	192,87	21,34	12,44	16,28	-	-	-	-	-	
	GDR4	165,41	184,63	19,22	11,62	18,55	-	-	-	-	-	
	GDR5	192,27	207,87	15,60	8,11	18,46	-	-	-	-	-	
	MÉDIA	-	-	-	9,97	18,10	-	-	-	-	-	-
DESVMIO PADRÃO	-	-	-	2,41	1,25	-	-	-	-	-	-	
ENSAIO DE TOXICIDADE TECIDUAL												
21 DIAS	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Ganho de Peso (g)	Ganho de Peso (%)	Consumo Ração / Dia (g)	Edema	Eritrema	Secreção	Febre	Retirada do Cateter		
GA - CNR	GAR4	170,51	213,95	43,44	25,48	22,26	0/0	0/0	1/1	0	Normal / Normal	
	GAR5	165,15	203,50	38,35	23,22	17,96	0/0	1-1/1	1/0	0	Normal / Normal	
	GAR6	170,19	205,05	34,86	20,48	21,39	0/0	2-1-1-1/1-1-1-1	0/0	0	Normal / Normal	
	MÉDIA	-	-	-	23,06	20,54	-	-	-	-	-	-
	DESVMIO PADRÃO	-	-	-	2,50	2,27	-	-	-	-	-	-
GB - CR1	GBR4	171,40	225,66	54,26	31,66	21,20	0/0	1/1-1-1	0/0	0	Normal / Normal	
	GBR5	166,84	199,04	32,20	19,30	20,71	1-1/0	1/1-1-1	0/0	0	Normal / Normal	
	GBR6	180,58	216,80	36,22	20,06	20,30	0/0	1-1-1-1/1	0/0	0	Pouco Pus / Normal	
	MÉDIA	-	-	-	23,67	20,74	-	-	-	-	-	-
	DESVMIO PADRÃO	-	-	-	6,93	0,45	-	-	-	-	-	-
GC - CR2	GCR4	148,27	231,66	83,39	56,24	17,63	2-1/1-1	1-1/1-1	0/0	0	Normal / Normal	
	GCR5	174,40	246,70	72,30	41,46	18,97	0/0	2/0	0/0	0	Normal / Normal	
	GCR6	196,54	259,38	62,84	31,97	19,39	1/2-1	0/1-1-1	0/0	0	Normal / Normal	
	MÉDIA	-	-	-	43,22	18,66	-	-	-	-	-	-
	DESVMIO PADRÃO	-	-	-	12,23	0,92	-	-	-	-	-	-
GD - CONT	GDR6	165,19	216,31	51,12	30,95	19,60	-	-	-	-	-	
	GDR7	178,15	229,55	51,40	28,85	19,91	-	-	-	-	-	
	GDR8	178,17	217,72	39,55	22,20	20,62	-	-	-	-	-	
	GDR9	162,28	186,85	24,57	15,14	14,93	-	-	-	-	-	
	GDR10	186,92	221,73	34,81	18,62	20,65	-	-	-	-	-	
	MÉDIA	-	-	-	23,15	19,14	-	-	-	-	-	-
DESVMIO PADRÃO	-	-	-	6,69	2,40	-	-	-	-	-	-	

\*Grupo D (controle): animais não manipulados, sem inserção de fragmentos de CVC.

\*\*GDR1: óbito durante experimento por causa não determinada.

\*\*\*Escala de avaliação dos parâmetros macroscópicos (edema, eritema, secreção e febre) – Grau 0: nenhuma reação, Grau 1: reação discreta, Grau 2: reação moderada e Grau 3: reação intensa.

## ANEXO F

Tabela com os parâmetros hematológicos dos animais estudados durante o ensaio *in vivo* de avaliação da biocompatibilidade tecidual (7 e 21 dias).

ENSAIO DE TOXICIDADE TECIDUAL																
7 DIAS	SÉRIE VERMELHA								SÉRIE BRANCA						Plaquetas x10 <sup>7</sup> /mm <sup>3</sup>	
	Hematimetria x10 <sup>5</sup> /mm <sup>3</sup>	Hemoglobina g/dL	Hematócrito %	VCM fl	HCM pg	CHCM g/dL	RDW %	Leucometria Global x10 <sup>7</sup> /mm <sup>3</sup>	Neutrófilos %	Linfócitos %	Monócitos %	Eosinófilos %	Basófilos %			
GA - CNR	GAR1	8,56	15,30	46,20	53,60	17,87	35,20	15,00	7700	20	77	2	1	0	1060	
	GAR2	7,70	15,00	42,80	54,90	19,30	35,10	15,60	4600	38	58	1	3	0	1020	
	GAR3	7,91	15,30	43,50	55,00	19,40	35,20	15,80	6000	30	62	6	2	0	916	
	MÉDIA	8,06	15,20	44,17	54,50	18,86	35,17	15,47	6100	29	66	3	2	0	999	
	DESVIO PADRÃO	0,45	0,17	1,80	0,78	0,86	0,06	0,42	1552	9	10	3	1	0	74	
GB - CR1	GBR1	7,13	13,60	39,80	55,80	19,10	34,30	14,80	3900	31	61	7	1	0	469	
	GBR2	7,08	14,50	41,00	57,80	20,40	35,30	16,00	7700	22	73	2	3	0	529	
	GBR3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	MÉDIA	7,11	14,05	40,40	56,80	19,75	34,80	15,40	5800	27	67	5	2	0	499	
	DESVIO PADRÃO	0,04	0,64	0,85	1,41	0,92	0,71	0,85	2687	6	8	4	1	0	42	
GC - CR2	GCR1	7,52	15,00	42,60	56,70	19,90	35,10	16,00	3000	18	76	4	1	1	772	
	GCR2	7,65	14,60	42,30	55,30	19,10	34,70	15,50	7100	22	72	4	2	1	934	
	GCR3	7,70	14,90	42,70	55,50	19,30	34,80	15,20	4000	28	70	1	1	0	1023	
	MÉDIA	7,62	14,83	42,53	55,83	19,43	34,87	15,57	4700	23	73	3	1	1	910	
	DESVIO PADRÃO	0,09	0,21	0,21	0,76	0,42	0,21	0,40	2138	5	3	2	1	1	127	
GD - CONT	GDR1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	GDR2	8,74	15,90	46,20	52,20	18,40	34,70	16,70	7800	15	77	4	4	0	804	
	GDR3	7,65	14,40	41,80	54,60	18,80	34,50	15,90	9200	21	75	2	2	0	370	
	GDR4	8,24	15,50	44,20	52,70	18,20	33,90	16,50	2400	8	90	2	0	0	639	
	GDR5	7,89	15,00	43,00	54,60	19,00	34,90	17,20	6200	30	65	1	4	0	683	
	MÉDIA	8,13	15,20	43,80	53,53	18,60	34,50	16,58	6400	19	77	2	3	0	624	
	DESVIO PADRÃO	0,47	0,65	1,88	1,26	0,37	0,43	0,54	2935	9	10	1	2	0	183	
21 DIAS	SÉRIE VERMELHA								SÉRIE BRANCA						Plaquetas x10 <sup>7</sup> /mm <sup>3</sup>	
	Hematimetria x10 <sup>5</sup> /mm <sup>3</sup>	Hemoglobina g/dL	Hematócrito %	VCM fl	HCM pg	CHCM g/dL	RDW %	Leucometria Global x10 <sup>7</sup> /mm <sup>3</sup>	Neutrófilos %	Linfócitos %	Monócitos %	Eosinófilos %	Basófilos %			
GA - CNR	GAR4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	GAR5	7,40	14,20	41,50	56,10	19,20	34,30	15,70	9200	19	70	6	4	1	562	
	GAR6	8,46	15,50	46,60	55,10	18,30	33,20	12,20	3900	37	57	4	2	0	925	
	MÉDIA	7,93	14,85	44,05	55,60	18,75	33,75	13,95	6550	28	64	5	3	1	744	
	DESVIO PADRÃO	0,75	0,92	3,61	0,71	0,64	0,78	2,47	3748	13	9	1	1	1	257	
GB - CR1	GBR4	8,46	15,84	47,20	55,90	18,70	33,50	14,10	6900	25	70	3	2	0	930	
	GBR5	8,54	14,84	45,80	53,60	17,40	32,40	14,40	8900	28	65	4	3	0	920	
	GBR6	7,83	14,50	42,00	53,70	18,50	34,60	15,00	4700	27	68	2	3	0	894	
	MÉDIA	8,28	15,06	45,00	54,40	18,20	33,50	14,50	6833	27	68	3	3	0	915	
	DESVIO PADRÃO	0,39	0,70	2,69	1,30	0,70	1,10	0,46	2101	2	3	1	1	0	19	
GC - CR2	GCR4	8,46	15,74	47,00	54,80	18,60	33,40	13,60	8300	17	75	4	4	0	908	
	GCR5	7,02	12,04	35,08	51,10	17,10	33,60	12,30	3900	17	77	2	4	0	976	
	GCR6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	MÉDIA	7,74	13,89	41,04	52,95	17,85	33,50	12,95	6100	17	76	3	4	0	942	
	DESVIO PADRÃO	1,02	2,62	8,43	2,62	1,06	0,14	0,92	3111	0	1	1	0	0	48	
GD - CONT	GDR6	7,54	13,82	41,80	55,40	18,30	33,10	12,70	3800	16	72	12	0	0	963	
	GDR7	7,82	14,80	44,00	56,30	18,90	33,60	15,40	6000	14	79	5	2	0	609	
	GDR8	7,76	14,30	42,60	54,80	18,40	33,60	12,60	6500	17	76	3	4	0	933	
	GDR9	6,66	12,04	36,00	54,00	18,10	33,50	13,40	6700	15	79	4	2	0	899	
	GDR10	7,12	13,88	40,80	57,40	19,50	34,00	13,00	7500	12	80	2	5	1	729	
	MÉDIA	7,38	13,77	41,04	55,58	18,64	33,56	13,42	6100	15	77	5	3	0	827	
	DESVIO PADRÃO	0,49	1,04	3,05	1,32	0,56	0,32	1,15	1395	2	3	4	2	0	152	

\*Animal GBR3, GAR4, GCR6 : amostra de sangue coagulada impedindo realização das análises hematológicas.

\*\*GDR1: óbito durante experimento por causa não determinada.

## ANEXO G

Tabela com os parâmetros histopatológicos obtidos após avaliação microscópica do tecido ao redor dos fragmentos de catéter venoso central implantados nos animais de experimentação durante o ensaio de biocompatibilidade tecidual (7 e 21 dias) - GRUPO 1 (CVC-NR).

ENSAIO DE TOXICIDADE TECIDUAL													
GRUPO A - CNR	ANÁLISES QUANTITATIVAS								ANÁLISES QUALITATIVAS				
	Mononucleados	Polimorfonucleados	Fibroblastos	Vasos sanguíneos	Mastócitos	Células gigantes	Colágeno (%)	Área necrótica	Infiltrado inflamatório	Extravasamento de hemáceas			
ANIMAL 1 (7 DIAS)	GAR1 1a	23	12	139	11	1	0	73,17	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR1 1b	35	18	133	12	1	0	81,98	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR1 1c	11	39	103	11	7	0	54,30	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR1 1d	16	15	168	23	1	0	65,60	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR1 1f	12	10	169	12	3	0	61,53	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR1 2a	7	6	166	10	1	0	78,83	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR1 2c	8	4	174	4	3	0	54,49	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR1 2f	20	5	209	14	1	0	67,74	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR1 2g	11	5	171	2	0	0	74,17	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR1 2h	4	4	276	1	1	0	66,88	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
ANIMAL 2 (7 DIAS)	GAR2 1b	7	8	172	10	0	0	40,20	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR2 1c	9	10	232	33	1	0	63,17	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR2 1d	18	10	312	15	0	0	80,56	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	
	GAR2 1e	12	5	364	24	0	0	71,01	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	
	GAR2 1f	21	6	359	15	0	0	84,07	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	
	GAR2 2a	52	1	269	19	0	0	86,97	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR2 2b	85	1	311	11	0	0	71,90	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR2 2c	46	1	256	8	0	0	45,68	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR2 2g	6	1	153	7	0	0	48,37	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR2 2h	89	1	276	12	0	0	56,77	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
ANIMAL 3 (7 DIAS)	GAR3 1a	12	2	307	14	0	0	71,16	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR3 1b	20	15	395	14	0	0	66,60	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR3 1c	13	10	419	11	0	0	83,50	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR3 1d	20	4	408	15	0	0	49,57	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR3 1h	21	9	300	14	6	0	57,13	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR3 2a	26	1	257	12	0	0	70,78	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	
	GAR3 2b	26	8	229	5	0	0	86,32	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	
	GAR3 2c	39	4	333	20	0	0	44,80	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR3 2e	26	6	205	5	0	0	80,69	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR3 2h	15	6	350	18	0	0	76,39	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
MÉDIA	23,67	7,57	253,83	12,73	0,87	0	67,14	100% AUSENTE	100% AUSENTE	83,4% AUSENTE			
DESVIO PADRÃO	20,75	7,48	89,24	6,74	1,74	0	13,40	0% PRESENTE	0% PRESENTE	16,6% PRESENTE			
ANIMAL 4 (21 DIAS)	GAR4 1a	3	1	293	13	0	0	68,81	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR4 1c	6	3	229	11	0	0	73,96	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR4 1e	3	2	227	18	2	0	67,06	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR4 1g	2	0	267	20	1	0	70,80	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR4 1h	9	3	205	22	0	0	71,55	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR4 2a	0	1	120	5	1	0	80,52	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR4 2b	6	2	130	0	0	0	70,50	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR4 2c	0	3	149	2	2	0	94,36	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR4 2d	1	1	158	2	3	0	79,85	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR4 2e	3	0	141	1	10	0	94,36	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
ANIMAL 5 (21 DIAS)	GAR5 1a	3	2	182	10	0	0	37,01	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR5 1b	3	2	144	3	0	0	41,65	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR5 1c	4	2	195	22	0	0	50,17	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR5 1d	2	4	141	8	2	0	37,47	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR5 1h	4	4	143	7	0	0	32,83	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR5 2a	17	10	172	21	3	0	49,22	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR5 2b	13	8	167	15	1	0	57,40	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR5 2c	9	5	245	24	0	0	62,03	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR5 2e	10	7	232	16	4	0	68,00	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR5 2h	17	9	184	18	3	0	49,98	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
ANIMAL 6 (21 DIAS)	GAR6 1a	5	1	318	5	2	0	95,76	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR6 1b	20	6	362	6	3	0	94,67	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR6 1d	6	3	310	9	1	0	94,71	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR6 1e	3	2	228	15	0	0	79,52	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GAR6 1h	3	1	333	9	2	0	93,30	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MÉDIA	6,08	3,28	211,00	11,28	1,60	0	68,62	100% AUSENTE	100% AUSENTE	100% AUSENTE			
DESVIO PADRÃO	5,48	2,76	69,82	7,44	2,16	0	20,08	0% PRESENTE	0% PRESENTE	0% PRESENTE			

\*Animal 6: Captura de imagens microscópicas prejudicada pela má qualidade da lâmina tecidual.

## ANEXO H

Tabela com os parâmetros histopatológicos obtidos após avaliação microscópica do tecido ao redor dos fragmentos de catéter venoso central implantados nos animais de experimentação durante o ensaio de biocompatibilidade tecidual (7 e 21 dias) - GRUPO 2 (CVC-R1).

ENSAIO DE TOXICIDADE TECIDUAL												
		ANÁLISES QUANTITATIVAS							ANÁLISES QUALITATIVAS			
GRUPO B - CR1	Mononucleados	Polimorfonucleados	Fibroblastos	Vasos sanguíneos	Mastócitos	Células gigantes	Colágeno (%)		Área necrótica	Infiltrado inflamatório	Extravasamento de hemáceas	
ANIMAL 1 (7 DIAS)	GBR1 1a	6	6	203	10	4	0	77,29	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR1 1b	9	4	223	16	1	0	84,56	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR1 1f	16	6	184	6	3	0	75,14	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR1 1g	10	10	244	18	6	0	70,33	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR1 1h	5	7	263	11	15	0	80,61	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR1 2a	0	0	193	7	0	0	66,62	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR1 2b	0	0	109	1	0	0	72,61	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR1 2c	3	0	206	11	0	0	73,58	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR1 2e	5	0	248	18	1	0	68,52	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR1 2h	12	0	194	5	0	0	63,72	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
ANIMAL 2 (7 DIAS)	GBR2 1a	3	6	111	7	3	0	53,21	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR2 1b	8	7	150	1	1	0	52,15	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR2 1e	16	17	226	16	7	0	56,48	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR2 1f	27	9	294	24	9	0	59,90	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR2 1g	24	4	312	17	10	0	53,97	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR2 2a	13	8	167	9	0	0	63,57	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR2 2c	6	4	167	13	1	0	35,51	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR2 2d	22	9	340	43	1	0	65,45	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR2 2e	16	7	221	25	0	0	39,42	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR2 2g	5	1	135	6	2	0	63,58	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
ANIMAL 3 (7 DIAS)	GBR3 1c	26	7	355	23	1	0	73,86	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	
	GBR3 1d	26	3	388	12	1	0	69,28	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR3 1e	22	2	381	21	1	0	55,77	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR3 1g	15	4	329	26	4	0	61,06	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR3 1h	15	7	296	19	5	0	54,30	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR3 2a	18	5	239	15	3	0	71,88	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR3 2b	15	1	183	5	4	0	74,15	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR3 2c	13	4	254	9	0	0	68,95	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR3 2e	19	2	262	9	2	0	60,90	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR3 2f	18	4	323	11	2	0	66,94	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
MÉDIA	13,10	4,80	240,00	13,80	2,90	0	64,44	100% AUSENTE	100% AUSENTE	96,7% AUSENTE		
DESVIO PADRÃO	7,92	3,79	76,57	8,83	3,52	0	11,11	0% PRESENTE	0% PRESENTE	3,3% PRESENTE		
ANIMAL 4 (21 DIAS)	GBR4 1a	14	6	185	12	0	0	62,21	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR4 1b	13	4	173	15	0	0	60,83	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR4 1d	14	7	176	10	0	0	59,39	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR4 1e	17	2	182	11	0	0	73,30	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR4 1f	10	2	213	12	0	0	62,32	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR4 2a	24	3	326	11	0	0	80,18	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR4 2c	33	2	398	19	0	0	84,59	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR4 2d	11	2	220	9	1	0	88,39	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR4 2e	5	0	179	4	1	0	80,08	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR4 2g	10	2	187	18	0	0	78,48	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
ANIMAL 5 (21 DIAS)	GBR5 1a	8	1	108	10	0	0	52,97	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR5 1b	7	2	200	14	1	0	69,14	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR5 1d	1	0	173	7	0	0	67,85	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	
	GBR5 1e	5	0	160	4	0	0	61,30	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR5 1g	17	3	238	23	6	0	60,53	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR5 2a	5	1	200	8	0	0	62,61	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR5 2b	5	1	220	6	0	0	80,79	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR5 2c	9	3	229	14	0	0	81,23	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR5 2f	8	1	223	11	0	0	75,34	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR5 2h	2	2	246	5	0	0	77,62	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
ANIMAL 6 (21 DIAS)	GBR6 1c	20	4	369	26	0	0	86,18	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	
	GBR6 1d	39	7	318	17	0	0	72,48	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	
	GBR6 1e	6	2	362	9	0	0	84,55	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GBR6 1f	18	6	331	7	0	0	77,11	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	
	GBR6 1h	11	1	434	26	0	0	90,63	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MÉDIA	12,48	2,56	242	12,32	0,36	0	73,20	100% AUSENTE	100% AUSENTE	84% AUSENTE		
DESVIO PADRÃO	9,12	2,06	84,36	6,28	1,22	0	10,60	0% PRESENTE	0% PRESENTE	16% PRESENTE		

\*Animal 6: Captura de imagens microscópicas prejudicada pela má qualidade da lâmina tecidual.

## ANEXO I

Tabela com os parâmetros histopatológicos obtidos após avaliação microscópica do tecido ao redor dos fragmentos de catéter venoso central implantados nos animais de experimentação durante o ensaio de biocompatibilidade tecidual (7 e 21 dias) - GRUPO 3 (CVC-R2).

ENSAIO DE TOXICIDADE TECIDUAL												
GRUPO C - CR2	ANÁLISES QUANTITATIVAS							ANÁLISES QUALITATIVAS				
	Mononucleados	Polimorfonucleados	Fibroblastos	Vasos sanguíneos	Mastócitos	Células gigantes	Colágeno (%)	Área necrótica	Infiltrado inflamatório	Extravasamento de hemáceas		
ANIMAL 1 (7 DIAS)	GCR1 1a	5	7	337	3	0	0	74,00	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR1 1b	15	14	360	5	0	0	88,00	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR1 1d	13	8	258	3	0	0	78,70	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR1 1f	19	2	443	16	0	0	83,00	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR1 1h	9	7	385	5	0	0	69,70	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	
	GCR1 2a	58	7	468	31	0	0	91,80	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	
	GCR1 2b	57	4	516	25	0	0	88,20	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	
	GCR1 2e	21	6	528	13	0	0	68,60	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR1 2f	48	9	475	8	0	0	89,90	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	
	GCR1 2g	45	1	482	11	1	0	87,80	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR2 1a	38	5	391	22	0	0	89,90	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR2 1b	38	7	369	18	0	0	84,20	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
ANIMAL 2 (7 DIAS)	GCR2 1c	59	6	443	50	0	0	93,80	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR2 1f	56	3	395	8	0	0	77,90	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR2 1h	53	2	463	14	0	0	60,80	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR2 2a	9	4	424	15	0	0	96,20	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR2 2b	23	6	347	17	0	0	93,00	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	
	GCR2 2f	24	2	456	28	0	0	79,70	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR2 2g	9	3	457	18	0	0	85,00	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR2 2h	33	3	491	30	0	0	92,30	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR3 1b	18	3	159	7	0	0	38,20	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR3 1e	17	5	339	16	1	0	44,40	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR3 1f	59	10	394	9	9	0	50,70	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	
	GCR3 1g	15	15	205	0	0	0	49,50	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
ANIMAL 3 (7 DIAS)	GCR3 1h	12	8	209	8	1	0	79,80	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR3 2a	56	25	483	10	0	0	82,70	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR3 2b	56	29	368	4	0	0	57,90	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	
	GCR3 2d	77	3	551	20	0	0	82,60	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	
	GCR3 2g	17	8	413	13	0	0	70,20	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR3 2h	24	3	440	22	4	0	49,20	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	<b>MÉDIA</b>	<b>32,77</b>	<b>7,17</b>	<b>401,63</b>	<b>14,97</b>	<b>0,53</b>	<b>0</b>	<b>75,92</b>	<b>100% AUSENTE</b>	<b>100% AUSENTE</b>	<b>73,4% AUSENTE</b>	
	<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>20,54</b>	<b>6,36</b>	<b>96,19</b>	<b>10,59</b>	<b>1,78</b>	<b>0</b>	<b>16,45</b>	<b>0% PRESENTE</b>	<b>0% PRESENTE</b>	<b>26,6% PRESENTE</b>	
	ANIMAL 4 (21 DIAS)	GCR4 1a	12	6	159	3	0	0	66,30	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
		GCR4 1b	8	12	218	9	0	0	55,60	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
		GCR4 1c	5	8	104	4	0	0	61,60	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
		GCR4 1d	12	2	245	18	11	0	41,90	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
GCR4 1e		9	6	227	11	12	0	72,10	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
GCR4 2a		8	2	187	15	0	0	36,90	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
GCR4 2b		13	2	335	40	0	0	59,50	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
GCR4 2c		7	0	199	21	0	0	51,20	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
GCR4 2f		7	1	94	5	2	0	61,40	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
GCR4 2h		1	2	231	25	0	0	69,50	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ANIMAL 5 (21 DIAS)	GCR5 2b	6	2	168	3	2	0	71,90	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR5 2c	18	2	237	10	2	0	66,20	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR5 2e	6	0	248	11	6	0	59,20	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR5 2f	15	1	214	16	7	0	69,50	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR5 2g	30	3	249	9	0	0	71,80	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR6 1a	16	2	335	42	0	0	83,80	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR6 1b	13	5	365	40	2	0	85,50	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR6 1d	8	5	403	37	8	0	95,60	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR6 1e	8	11	329	18	1	0	81,40	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR6 1h	1	0	99	10	9	0	46,90	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR6 2a	6	0	286	18	0	0	86,80	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR6 2b	9	0	220	5	0	0	73,00	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
ANIMAL 6 (21 DIAS)	GCR6 2c	13	0	216	7	0	0	82,50	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR6 2e	14	4	281	21	2	0	65,00	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	GCR6 2h	14	1	392	33	0	0	75,90	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	
	<b>MÉDIA</b>	<b>10,36</b>	<b>3,08</b>	<b>241,64</b>	<b>17,24</b>	<b>2,56</b>	<b>0</b>	<b>67,64</b>	<b>100% AUSENTE</b>	<b>100% AUSENTE</b>	<b>100% AUSENTE</b>	
	<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>5,99</b>	<b>3,35</b>	<b>85,02</b>	<b>12,40</b>	<b>3,83</b>	<b>0</b>	<b>14,40</b>	<b>0% PRESENTE</b>	<b>0% PRESENTE</b>	<b>0% PRESENTE</b>	

\*Animal 5: Captura de imagens microscópicas prejudicada pela má qualidade da lâmina tecidual.

## ANEXO J

Tabela com os parâmetros histopatológicos obtidos após avaliação microscópica do tecido ao redor dos fragmentos de catéter venoso central implantados nos animais de experimentação durante o ensaio de biocompatibilidade tecidual (7 e 21 dias) - GRUPO 4 (CONTROLE).

ENSAIO DE TOXICIDADE TECIDUAL												
GRUPO D - CONTROLE	ANÁLISES QUANTITATIVAS							ANÁLISES QUALITATIVAS				
	Mononucleados	Polimorfonucleados	Fibroblastos	Vasos sanguíneos	Mastócitos	Células gigantes	Colágeno (%)	Área necrótica	Infiltrado inflamatório	Extravasamento de hemáceas		
ANIMAL 1 (7 DIAS)	GDR1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GDR1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GDR1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GDR1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GDR1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ANIMAL 2 (7 DIAS)	GDR2a	1	0	162	2	0	0	68,66	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR2b	4	0	186	0	0	0	76,85	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR2c	10	2	187	17	0	0	59,46	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR2e	4	0	150	0	0	0	65,60	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR2h	12	2	160	2	0	0	60,50	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
ANIMAL 3 (7 DIAS)	GDR3c	0	0	110	3	0	0	49,35	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR3e	1	0	112	0	0	0	61,07	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR3f	2	0	125	4	0	0	52,67	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR3g	0	0	146	0	0	0	64,17	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR3h	1	0	161	1	0	0	64,57	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
ANIMAL 4 (7 DIAS)	GDR4a	7	0	194	10	0	0	60,09	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR4b	16	0	168	7	0	0	44,36	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR4c	11	2	190	12	0	0	41,23	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR4d	14	4	209	10	0	0	55,43	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR4e	6	3	220	14	0	0	60,15	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
ANIMAL 5 (7 DIAS)	GDR5a	5	3	136	5	0	0	41,13	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR5b	11	1	204	15	0	0	46,92	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR5c	5	0	132	6	0	0	64,17	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR5d	5	0	164	3	0	0	61,96	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR5g	3	0	236	9	0	0	59,68	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	MÉDIA	5,90	0,85	167,60	6,00	0,00	0	57,90	100% AUSENTE	100% AUSENTE	100% AUSENTE	100% AUSENTE
	DESVIO PADRÃO	4,87	1,31	35,38	5,47	0,00	0	9,39	0% PRESENTE	0% PRESENTE	0% PRESENTE	0% PRESENTE
ANIMAL 6 (21 DIAS)	GDR6a	4	0	110	0	0	0	70,56	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR6b	6	1	183	13	3	0	48,58	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR6e	10	1	210	19	2	0	57,70	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR6f	1	0	136	6	0	0	25,17	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR6g	0	0	84	0	0	0	21,60	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
ANIMAL 7 (21 DIAS)	GDR7b	1	0	91	3	0	0	25,40	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR7c	3	0	124	6	0	0	28,17	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR7d	0	0	113	2	0	0	55,66	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR7f	2	0	128	12	0	0	24,90	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR7g	4	0	102	2	1	0	34,45	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
ANIMAL 8 (21 DIAS)	GDR8b	1	0	171	6	0	0	79,20	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR8c	4	0	103	2	0	0	72,72	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR8d	0	0	208	27	3	0	78,38	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR8e	2	2	184	5	2	0	82,10	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR8h	2	1	186	3	0	0	59,04	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
ANIMAL 9 (21 DIAS)	GDR9b	4	2	149	11	0	0	47,67	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR9c	3	0	214	19	1	0	67,82	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR9d	5	0	188	14	1	0	73,64	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR9e	2	2	184	13	0	0	67,93	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR9f	1	1	176	6	0	0	66,62	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
ANIMAL 10 (21 DIAS)	GDR10a	2	0	193	5	2	0	76,84	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR10b	2	0	188	8	0	0	73,65	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR10c	4	2	215	9	0	0	49,19	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR10d	4	2	230	21	3	0	72,47	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	GDR10h	6	2	228	8	0	0	65,09	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
	MÉDIA	2,92	0,64	163,92	8,8	0,72	0	56,98	100% AUSENTE	100% AUSENTE	100% AUSENTE	100% AUSENTE
	DESVIO PADRÃO	2,29	0,86	45,71	7,04	1,10	0	19,85	0% PRESENTE	0% PRESENTE	0% PRESENTE	0% PRESENTE

\*GDR1: óbito durante experimento por causa não determinada.



## ANEXO M

Artigo a ser submetido para publicação.

### AN EFFECTIVE AND BIOCOMPATIBLE ANTI-BIOFILM COATING FOR CENTRAL VENOUS CATHETER

Annelisa Farah da Silva<sup>1</sup>, Aline Siqueira Ferreira<sup>1</sup>, Fernanda Aparecida Oliveira Alves<sup>1</sup>, Bruna Martinho de Azevedo<sup>2</sup>, Liza Porcaro Bretas<sup>1</sup>, Rogerio Estevam Farias<sup>3</sup>, Murilo Gomes Oliveira<sup>2</sup>, Nádía Rezende Barbosa Raposo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Center of Research and Innovation in Health Sciences (NUPICS), School of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora - Juiz de Fora, MG, Brazil.

<sup>2</sup> Maurílio Baldi Laboratory, University Hospital, Federal University of Juiz de Fora - Juiz de Fora, MG, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Morphology/Histology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora - Juiz de Fora, MG, Brazil.

#### ABSTRACT

**Objectives:** To investigate the *in vitro* and *in vivo* efficacy and the tissue reaction of an anti-biofilm coating formulation composed by an anti-adherent substance – xylitol and antimicrobial substances – triclosan and polyhexamethylene biguanide (PHMB), in alcoholic vehicle.

**Methods:** The antimicrobial activity against six microorganisms frequently involved in episodes of catheter-related bloodstream infections (CRBSIs) was analyzed by means of turbidimetric method. The scanning electron microscopy (SEM) was used to evaluate the anti-adherent property of central venous catheter (CVC) fragments, impregnated with anti-biofilm coating (I-CVC) in comparison with non-coated CVC fragments (NC-CVC). Two *in vivo* assays using subcutaneous implantation of NC-CVC and I-CVC in the dorsal area of rats were performed. The first one comprised hematological and microbiological (hemoculture and colonization of external and internal surface of CVC fragments) analysis. The second one comprised the evaluation of a tissue response by examining the inflammatory reactions after 7 and 21 days.

**Results:** The anti-biofilm formulation presented antimicrobial activity against all tested strains. A biofilm disaggregation with significant reduction of microorganism's adherence in I-CVC fragments was observed for one Gram-positive, one Gram-negative and one yeast strain, in anti-adherent assay. *In vivo* efficacy results demonstrated a reduction in the colonization by *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mainly in an external surface of I-CVC in comparison with NC-CVC. All animals presented a negative hemoculture (without microbial growth). No significant tissue reaction was observed, which demonstrated that the anti-biofilm formulation could be considered biocompatible.

**Conclusions:** The use of I-CVC could decrease the probability of development of localized or systemic infections. The biofilm disaggregation observed is important for the effectiveness of antimicrobial therapies.

**Key-words:** Anti-biofilm coating. Bacterial adhesion. Catheter-related bloodstream infections. Central venous catheter.

## INTRODUCTION

Catheters are quickly colonized with microorganisms due to the ability of the bacteria to organize themselves into matrix-enclosed aggregates or microcolonies, also termed biofilms (BURMØLLE et al., 2010; HANDRUP et al., 2012). Device-associated biofilms are responsible for about 85% of catheter-related bloodstream infections (CRBSIs) in intensive-care units (DONELLI, 2006; VENKATESH et al., 2009), which are difficult to eradicate due to the fact that antibiotic penetration through all layers of the biofilm is difficult, making them ineffective (CHAUHAN et al., 2012; DWYER, 2008; GIACOMETTI et al., 2006; HANDRUP et al., 2012). The typical organisms involved in such infections include *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and coagulase-negative *Staphylococcus* (DWYER, 2008).

It is estimated that 150 million intravascular devices are used in the USA per year, out of which 5 million are central venous catheters (CVCs) (FRANCOLINI; DONELLI, 2010; WORTHINGTON; ELLIOTT, 2005). CVC biofilms are responsible for between 200,000 and 400,000 cases of nosocomial bacteremia annually in the USA – 80,000 in intensive care units alone, with an estimated cost ranging between \$296 million and \$2.3 billion (RAAD et al., 2008;

WORTHINGTON; ELLIOTT, 2005).

In recent decades, the continual increase in the use of CVCs has been associated with early (localized trauma, hematoma, vessel perforation) or late onset complications (thrombosis and, more commonly, infections). The infections can be local or systemic (DONELLI, 2006; WORTHINGTON; ELLIOTT, 2005).

Antiseptic and antibiotic-coated CVCs have been investigated to reduce the incidence of CRBSIs (COBRADO et al., 2012; DWYER, 2008). However, these coatings have not demonstrated enough clinical efficiency to be considered definitive for use as substitutes for conventional catheters (DONELLI, 2006). On the other hand, a number of anti-biofilm strategies have recently emerged from *in vitro* studies (CHAUHAN et al., 2012; COENYE; NELIS, 2010; FRANCOLINI; DONELLI, 2010; SIMÕES, 2011). Two main strategies have been employed for the prevention of CRBSIs. One of them consists of the development of biomaterials with anti-adhesive properties by using physico-chemical methods and the other one is the incorporation of coating biomaterials, which significantly reduces the microbial adherence (CHIFIRIUC et al., 2012).

The emergence of alarming levels of antibiotic resistance urged us to look at alternative strategies for the prevention of CRBSIs (RAAD et al., 2008; VENKATESH et al., 2009). Xylitol, a five-carbon polyalcohol, has been studied due to its anti-adherent propriety against some microorganisms (AMMONS et al., 2009; SAJJAN et al., 2004; SILVA et al., 2011; SOUSA et al., 2011). Moreover, there is a plenty of studies with 2,4,4' trichloro-2'-hydroxydiphenyl (triclosan) and polyhexamethylene biguanide (PHMB) – used as antiseptic for various applications in medicine – that proved their broad spectrum of antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria and *Candida albicans* (BUTCHER, 2012; LUBARSKY et al., 2012; WELK et al., 2005). However, those three substances have not yet been studied together for preventing biofilms.

Thus, the purpose of this study was to investigate the *in vitro* and *in vivo* efficacy as well as the tissue reaction of an innovative anti-biofilm formulation composed by xylitol, triclosan and PHMB in alcoholic vehicle, as a new option for CVC coating.

## MATERIAL AND METHODS

### Anti-biofilm formulation

The formulation of interest in this study, which was proposed for use as a CVC coating, was composed of 3.0% silicone, 5.0% xylitol and 10.0% pre-formulated antimicrobial solution (0.15% triclosan, 0.2% PHMB, 0.3% benzalkonium chloride, 1.0% volatile silicone, 0.1% essence, 8.25% distilled water and 90.0% ethyl alcohol) in sufficient quantity of Genesolv®.

### Antimicrobial activity assay

The antimicrobial efficacy of the anti-biofilm formulation was evaluated *in vitro* against some microorganisms frequently involved in CRBSIs episodes. Three strains from the American Type Culture Collection (ATCC) (*Candida albicans* ATCC 10231, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) and three clinical strains – isolated from hospitalized patients by the Clinical Analysis Laboratory of the University Hospital of the Federal University of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil (*Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) were used.

The antimicrobial activity was determined by means of turbidimetric method, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was established. A microbial suspension of each strain was prepared with sterile saline (sodium chloride - NaCl 9.0 g/L), for 25% transmittance ( $\lambda=580\text{nm}$ ). The standardized microbial suspension was submitted to serial dilution with sterile saline and incubated in appropriate agar. After the incubation period (24 hours at 37°C for bacteria / 48 hours at 25°C for yeast), the colony-forming units (CFU's) were counted in order to obtain  $2 \times 10^3$  CFU/mL concentration in each microplate well (adapted from USP, 1985; NCCLS, 2003).

For the negative control, 100  $\mu\text{L}$  of sterile broth was used, while, for the positive control, 100  $\mu\text{L}$  of inoculated broth was employed. Mueller Hinton Broth (MHB) was employed as the culture medium for bacterial strains and Sabouraud Dextrose Broth (SDB) for yeast, except for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 for which Tryptone Soy Broth (TSB) was used. In order to prepare the test-groups, 100  $\mu\text{L}$  of inoculated broth and 100  $\mu\text{L}$  of different concentrations from the test-formulation (400; 600; 1,000; 1,500; 2,000; 4,000; 20,000; 40,000 and 200,000

mg/L) were used. As reference drugs, chloramphenicol (0.025; 0.25; 2.5; 25 and 250 mg/L) was used for bacterial strains and nystatin (0.2; 2; 20; 200 and 2000 U/mL) for *Candida albicans* ATCC 10231. The microplate was incubated in the time-temperature conditions described above.

After the incubation period, the MIC was determined by observing the turbidity of the microplate wells. The antimicrobial activity was defined as bactericidal/fungicidal or bacteriostatic/fungistatic after inoculation with 20  $\mu$ L of the contents of wells not presenting turbidity in 4 mL of sterile culture medium. All procedures were performed in triplicate.

For the antimicrobial activity assay, a formulation without both silicone and Genesolv® was used since these substances were employed in anti-biofilm formulation only as incorporation vehicle and carrier solvent, respectively.

### **Anti-adherent activity assay**

A microbial suspension of each strain was prepared as described above – for the antimicrobial activity assay (adapted from USP, 1985; NCCLS, 2003) – in order to obtain  $10^8$  CFU/mL in each tube. One Gram-positive strain (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), one Gram-negative strain (clinical *Escherichia coli*) and one yeast strain (*Candida albicans* ATCC 10231) were tested. For the negative control, 1.5 mL of sterile TSB (bacteria) or SDB (yeast) were used. For the positive control, 1.5 mL of inoculated broth, 5% glucose and a sterile non-coated CVC fragment (1cm) were employed. In order to evaluate the *in vitro* anti-adherent efficacy of the anti-biofilm formulation, the test-groups were prepared with 1.5 mL of inoculated broth, 5% glucose and a sterile CVC fragment (1cm) impregnated with such formulation. Before the anti-adherent assay, sterile CVC fragments were immersed in the anti-biofilm formulation for 1 min and then kept in sterile plates until completely dry. All these systems were incubated at 37°C for 24 h (bacteria) and 25°C for 72 h (yeast) under agitation (100 rpm) and air circulation (adapted from FERREIRA et al., 2009; SILVA et al., 2010; SOUSA et al., 2011).

The CVC fragments were removed and individually kept in tubes. Then, 10.0 mL of 0.1M phosphate buffer pH 7.4 were added to the tubes, which were sonicated (5 min) at  $40 \pm 6$  kHz. After sonication, the CVC fragments were fixated with 2.5% glutaraldehyde for 24 h and then washed (two times) with 0.1M

phosphate buffer pH 7.4, dehydrated with increasing concentrations of ethanol (50 to 100%) – with an interval of 20 minutes between each exchange – and dried at room temperature. Finally, the slides were metalized with 2 nm of gold for two minutes, and subsequently analyzed by scanning electron microscopy (SEM) (adapted from FERREIRA et al., 2009; SILVA et al., 2010; SOUSA et al., 2011).

For the anti-adherent assay, a formulation without silicone was used due to the fact that it blurs the visualization of catheter fragments by SEM.

### ***In vivo* assays**

All procedures were approved by the local ethics committee (Ethical Committee for Animal Research – CEEA/UFJF) for animal experimentation (protocol n° 037/2011) and were in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

The animals were individually kept in appropriate cages, at a controlled temperature ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and humidity (65 to 75%) in the room and at light-dark cycle of 12 hours with water and food *ad libitum*.

### ***Efficacy evaluation***

The bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was used in the efficacy evaluation. Sterile CVC fragments (2.5cm) were previously immersed in the anti-biofilm formulation, proposed for usage as CVCs coating for 1 min and kept in sterile plates until completely dry. On the first day, non-coated CVC fragments (NC-CVC) and CVC fragments impregnated with such formulation (I-CVC) were immersed in individual tubes containing 5.0 mL of a microbial suspension of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ( $10^8$  CFU/mL) and 5% glucose, for 30 min. After this period, the fragments were removed and kept in sterile plates until completely dry.

*Wistar* rats (n=29, female, 150 to 200g) were randomized into 5 groups. Groups A and B comprised relative-control groups, Groups C and D were experimental groups and Group E was an absolute-control group. Group A consisted of 5 animals with NC-CVC insertion and Group B comprised 5 animals with I-CVC insertion, both without previous immersion of CVC fragments into the microbial suspension. Group C consisted of 7 animals with NC-CVC insertion and Group D comprised 7 animals with I-CVC insertion, both with previous immersion

of CVC fragments into the microbial suspension. Group E was composed of 5 unmanipulated animals. On the first day, the animals were anesthetized with ketamine and xylazine (90 mg/kg and 10 mg/kg, respectively, via the intraperitoneal route) (HAJIGHAHRAMANI; VESAL, 2007) and subjected to hair removal on the dorsal area, followed by disinfection with 2% degerming chlorhexidine followed by 0.5% alcoholic chlorhexidine. CVC fragments were inserted in each surgery hole. At the end of 7 days, the animals were euthanized by anesthetic overdose (adapted from KOCKRO et al., 2000).

Macroscopic analysis (weight gain, feed intake, presence of edema, erythema, discharge and fever) were performed during the 7 days of the experiment. Blood samples were obtained in order to conduct hematological (completed hemogram) and microbiological (hemoculture) analysis. For the hemocultures, 500  $\mu$ L of total blood was inserted in 4.5 mL of Brain Heart Infusion (BHI). The CVC fragments were removed and submitted to microbiological analysis: a) for the evaluation of external surface contamination, the scrolling of fragment CVC in Petri dishes containing blood agar was conducted; and, b) for the evaluation of internal surface contamination, 1 mL of thioglycollate medium was injected into the CVC fragment and collected into a tube containing 4 mL of the same cultivation media. The Petri dishes and tubes were incubated at 37°C for 24 h and, after this period, the bacterial growth was assessed. The hemoculture and the internal surface contamination were evaluated by the presence or absence of cultivation media turbidity. The external surface contamination was evaluated based on the following scale: counting the number of CFU's until 100 colonies, + = 100 to 300 colonies, ++ = more than 300 colonies, +++ = uncountable colonies and ++++ = confluent colonies (adapted from KOCKRO et al., 2000). The microorganisms detected were subsequently identified by the Clinical Analysis Laboratory of the University Hospital of the Federal University of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

#### *Tissue reaction evaluation*

For the tissue reaction assay (7 and 21 days), sterile CVC fragments (1cm) were previously immersed in the anti-biofilm formulation, proposed for usage as CVC coating, for 1 min and kept in sterile plates until completely dry.

*Wistar* rats (n=22, female, 150 to 200g) were randomized into 3 groups.

Group 1 consisted of 6 animals with NC-CVC insertion; Group 2 comprised 6 animals with I-CVC insertion; and Group 3 (control-group) was composed of 10 unmanipulated animals. On the first day, the animals were anesthetized with ketamine and xylazine (90 mg/kg and 10 mg/kg, respectively, via the intraperitoneal route) (HAJIGHAHRAMANI; VESAL, 2007) and subjected to hair removal on the dorsal area, followed by disinfection with 2% degerming chlorhexidine and then by 0.5% alcoholic chlorhexidine. Two incisions (one on the right and one on the left) were made in each animal – 2 implanted CVC fragments were inserted in each animal. At the end of 7 days, half the animals of each group were euthanized by anesthetic overdose. The other half was euthanized at the end of 21 days (adapted from SILVA et al., 2009).

Macroscopic analysis (weight gain, feed intake, presence of edema, erythema, discharge and fever) was performed during the 7 days of the experiment. Blood samples were obtained in order to conduct hematological analysis (completed hemogram). The samples of the skin surrounding the CVC fragment implant were removed and fixed in 10% buffered formalin for a minimum of 24 hours. Sections (4  $\mu$ m thick) were cut and stained with hematoxylin and eosin for histopathologic analysis. Five aleatory fields were counted out of each sample in order to obtain an average of all group counting at the end. Mononuclear cells, polymorphonuclear cells, fibroblasts, blood vessels, mast cells, collagen area and extracellular matrix area were quantitatively analyzed, while the presence of giant cells, necrotic area and inflammatory infiltration were qualitatively analyzed (adapted from SILVA et al., 2009).

### **Statistical analysis**

A descriptive analysis for weight gain, feed intake, hematological parameters and quantitative histopathologic parameters of *in vivo* assays, was performed. The difference in significance between the result averages among the study groups was obtained by ANOVA, followed by Tukey *post hoc* test. Student's t-test for paired samples was used in *in vivo* tissue reaction assay for the comparison of parameters between 7 and 21 days. The Statistical Software Package for the Social Sciences (SPSS) 14.0 was used. The limit of significance was  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Antimicrobial activity assay

The anti-biofilm formulation presented antimicrobial activity against all tested strains. Results are shown in Table 1.

**Table 1.** Antimicrobial activity and minimum inhibitory concentration (MIC) of the anti-biofilm formulation against some of microorganisms frequently involved in CRBSIs episodes.

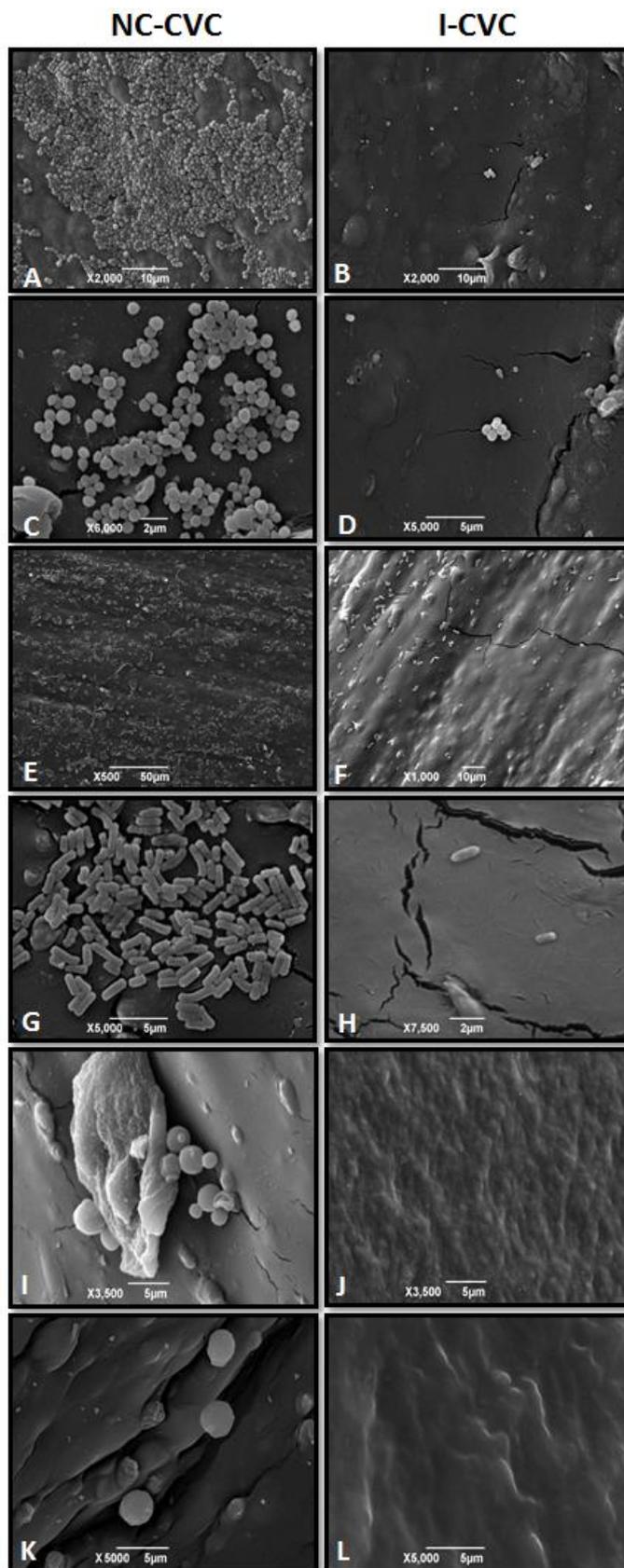
MICROORGANISMS	ANTI-BIOFILM FORMULATION <sup>1</sup>		REFERENCE DRUGS Chloramphenicol / Nystatin <sup>*2</sup>	
	Bactericidal / Fungicidal* activity (mg/L)	Bacteriostatic / Fungistatic* activity (mg/L)	Bactericidal / Fungicidal* activity (mg/L or **U/L)	Bacteriostatic / Fungistatic* activity (mg/L)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231*	MIC = 20,000	-	MIC = 2,000**	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	MIC = 20,000	-	MIC = 250	MIC = 2.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	MIC = 1,000	MIC = 400	MIC = 0.25	-
clinical	MIC = 2,000	MIC = 400	-	MIC = 0.25
<i>Acinetobacter baumannii</i> clinical	MIC = 20,000	MIC = 2,000	-	MIC = 250
<i>Escherichia coli</i> clinical	MIC = 40,000	-	-	MIC = 250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				

\* for yeast strain

- formulation (or drug reference) did not show bactericidal/fungicidal (or bacteriostatic/fungistatic) activity against specific microorganism.

### Anti-adherent activity assay

Regarding *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and clinical *Escherichia coli* strains, a biofilm formation on the NC-CVC fragment surface was observed, while for *Candida albicans* ATCC 10231 strain, only isolated UFC's were attached. For all microorganisms tested, a biofilm disaggregation with significant reduction in microorganisms adherence was noted in I-CVC fragments. SEM photomicrographies are shown in Figure 1.



**Figure 1.** SEM photomicrographies of external surface of CVC fragment in anti-adherent test: A–D: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, E–H: clinical *Escherichia coli*, and I–L: *Candida albicans* ATCC 10231. Bar represents 2 µm (C and H), 5 µm (D, G, I, J, K and L), 10 µm (A, B and F) and 50 µm (E).

## ***In vivo* assays**

### *Efficacy evaluation*

During the 7 days of the experiment, weight gain and feed intake were statistically similar between the experimental and control groups (Table 2). None of the animals showed edema around the CVC fragment implant. Only one animal from Group A (NC-CVC) and one animal from Group C (NC-CVC previously contaminated) presented fever, with signs of tremor and secretion around the implant, being that the fever of the Group C animal lasted 5 days. By a comparative analysis among groups, it was observed that the erythema around the CVC fragment implant of the Group C animals was more pronounced and enduring than that of Group A, B and D animals.

None of the animals showed systemic blood contamination, since all hemocultures were negative. Table 2 presents the results of weight gain, feed intake and hematological analysis and Table 3 shows the results of the microbiological analysis of the external and internal surfaces of the CVC fragment introduced.

**Table 2.** Weight gain, feed intake and hematological parameters of the animals studied in *in vivo* efficacy assay:

PARAMETERS	GROUP A	GROUP B	GROUP C	GROUP D	GROUP E
Weight gain (%)	5.5 ± 9	7.3 ± 2.2	-0.2 ± 10.7	10.2 ± 5.6	6.8 ± 1.8
Feed intake / day (g)	19.2 ± 6	21.9 ± 2.7	17 ± 7	20.7 ± 2	21.1 ± 2.8
Red blood cells (millions/mm <sup>3</sup> )	7.7 ± 1.3	7.5 ± 1.5	6.3 ± 0.8 <sup>a</sup>	8.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	7.1 ± 1.3
Hemoglobin (g/dL)	14.5 ± 2.4	14.1 ± 2.8	11.9 ± 1.3 <sup>b</sup>	15.8 ± 1.4 <sup>b</sup>	14.5 ± 2.7
Hematocrit (%)	44.2 ± 7.8	42.5 ± 8.2	35.9 ± 4.2 <sup>c</sup>	46.6 ± 4 <sup>c</sup>	41.5 ± 7.7
Global leukometry (x1000/mm <sup>3</sup> )	9.9 ± 2.5	8.1 ± 3.1	6.9 ± 2.5	9 ± 3.1	7.3 ± 1.8
Neutrophil (%)	39 ± 19	29 ± 10	25 ± 5	23 ± 6	24 ± 5
Lymphocyte (%)	52 ± 17	67 ± 11	69 ± 8	72 ± 7	70 ± 5
Monocyte (%)	6 ± 5	2 ± 2	4 ± 3	3 ± 2	3 ± 2
Eosinophil (%)	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 2	2 ± 1	3 ± 1
Basophil (%)	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Platelet (x1000/mm <sup>3</sup> )	788 ± 466	864 ± 136	913 ± 300	1092 ± 187	837 ± 151

Means followed by the same letters differ by ANOVA followed by Tukey *post hoc* test (<sup>a</sup>p=0.029, <sup>b</sup>p=0.020 and <sup>c</sup>p=0.037). Group A: NC-CVC (relative-control groups), Group B: I-CVC (relative-control groups), Group C: NC-CVC previously contaminated, Group D: I-CVC previously contaminated, Group E: absolute-control group.

**Table 3.** Results of microbiological analysis of CVC fragments in external and internal surfaces realized in *in vivo* efficacy assay: detection and identification of microorganisms.

GROUPS	CVC FRAGMENT EXTERNAL SURFACE	CVC FRAGMENT INTERNAL SURFACE
<b>Group A</b>	20% <i>Staphylococcus aureus</i> (+)	20% <i>Citrobacter</i> sp + <i>Enterococcus faecalis</i>
NC-CVC	20% <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (++++) 60% negative	80% negative
<b>Group B</b>	100% negative	40% <i>Staphylococcus aureus</i>
I-CVC		60% negative
<b>Group C</b>	28.6% <i>Staphylococcus aureus</i> (<100 colonies)	
NC-CVC previously contaminated	14.3% <i>Staphylococcus aureus</i> (+) 42.8% <i>Staphylococcus aureus</i> (+++) 14.3% <i>Staphylococcus aureus</i> (++++)	85.7% <i>Staphylococcus aureus</i> 14.3% <i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Klebsiella</i> sp
<b>Group D</b>		57.1% <i>Staphylococcus aureus</i>
I-CVC previously contaminated	85.7% <i>Staphylococcus aureus</i> (<100 colonies) 14.3% <i>Staphylococcus aureus</i> (+)	14.3% <i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Klebsiella</i> sp 28.6% negative

Results expressed as percentage of animals per group.

Negative = without microbial growth.

Until 100 colonies = number of CFU's; + = 100 to 300 colonies; ++ = more than 300 colonies; +++ = uncountable colonies and ++++ = confluent colonies

### *Tissue reaction evaluation*

Weight gain and feed intake were statistically similar between the experimental and control groups during the entire experiment (21 days) (Table 4). During the first 7 days, none of the animals showed edema and secretion around the CVC fragment implant, nor presented signs of fever. By a comparative analysis between groups, it was observed that the erythema around the CVC fragment implant of the Group 2 (I-CVC) animals was more pronounced than that

of the Group 1 (NC-CVC) animals. After the 7<sup>th</sup> day and until the 21<sup>st</sup> day – the last day of the experiment - the intensity of the erythema around the CVC fragment implant became similar in both groups. The Group 1 (NC-CVC) animals also presented secretion and the Group 2 (I-CVC) animals also presented edema around the insertion. None of the animals presented signs of fever.

Results of weight gain, feed intake and hematological analysis are shown in Table 4, while results of histopathologic parameters are shown in Table 5.

**Table 4.** Weight gain, feed intake and hematological parameters of animals studied in *in vivo* tissue reaction assay:

PARAMETERS	7 DAYS			21 DAYS		
	GROUP 1	GROUP 2	GROUP 3	GROUP 1	GROUP 2	GROUP 3
Weight gain (%)	6 ± 4.8	4.2 ± 4.6	10 ± 2.4	23.1 ± 2.5	23.7 ± 6.9	23.2 ± 6.7
Feed intake / day (g)	16 ± 2.9	11.9 ± 7.3	18.1 ± 1.3	20.5 ± 2.3	20.7 ± 0.5	19.1 ± 2.4
Red blood cells (millions/mm <sup>3</sup> )	8.1 ± 0.5	7.1 ± 0.1 <sup>a*</sup>	8.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	7.9 ± 0.8	8.3 ± 0.4 <sup>*</sup>	7.4 ± 0.5
Hemoglobin (g/dL)	15.2 ± 0.2	14.1 ± 0.6	15.2 ± 0.7	14.9 ± 0.9	15.1 ± 0.7	13.8 ± 1.0
Hematocrit (%)	44.2 ± 1.8	40.4 ± 0.9	43.8 ± 1.9	44.1 ± 3.6	45 ± 2.7	41 ± 3.1
Global leukometry (x1000/mm <sup>3</sup> )	6.1 ± 1.6	5.8 ± 2.7	6.4 ± 2.9	6.6 ± 3.8	6.8 ± 2.1	6.1 ± 1.4
Neutrophil (%)	29 ± 9	27 ± 6	19 ± 9	28 ± 13 <sup>d</sup>	27 ± 2 <sup>e</sup>	15 ± 2 <sup>d,e</sup>
Lymphocyte (%)	66 ± 10	67 ± 8	77 ± 10	64 ± 9 <sup>†</sup>	68 ± 3	77 ± 3 <sup>†</sup>
Monocyte (%)	3 ± 3	5 ± 4	2 ± 1 <sup>#</sup>	5 ± 1	3 ± 1	5 ± 4 <sup>#</sup>
Eosinophil (%)	2 ± 1	2 ± 1	3 ± 2	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 2
Basophil (%)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0
Platelet (x1000/mm <sup>3</sup> )	999 ± 74 <sup>b,c</sup>	499 ± 42 <sup>b</sup>	624 ± 183 <sup>c</sup>	744 ± 257	915 ± 19	827 ± 152

Means followed by the same letters differ by ANOVA followed by Tukey *post hoc* test (<sup>a</sup>p=0.050, <sup>b</sup>p=0.016, <sup>c</sup>p=0.027, <sup>d</sup>p=0.043, <sup>e</sup>p=0.037 and <sup>†</sup>p=0.019). Means followed by the same symbols differ by Student's t-test for paired samples (comparison between parameters of 7 and 21 days) (<sup>\*</sup>p=0.030 and <sup>#</sup>p=0.015). Group 1: NC-CVC, Group 2: I-CVC, Group 3: control-group.

**Table 5.** Results of histopathologic parameters of tissue around the implanted CVC fragments realized in *in vivo* tissue reaction assay:

PARAMETERS	7 DAYS			21 DAYS		
	GROUP 1	GROUP 2	GROUP 3	GROUP 1	GROUP 2	GROUP 3
Mononuclear cells	23.7 ± 20.8 <sup>a*</sup>	13.1 ± 7.9	5.9 ± 4.9 <sup>a¶</sup>	6.1 ± 5.5 <sup>i*</sup>	12.5 ± 9.1 <sup>ij</sup>	2.9 ± 2.3 <sup>j¶</sup>
Polymorphonuclear cells	7.6 ± 7.5 <sup>b#</sup>	4.8 ± 3.8 <sup>Δ</sup>	0.9 ± 1.3 <sup>b</sup>	3.3 ± 2.8 <sup>k#</sup>	2.6 ± 2.1 <sup>lΔ</sup>	0.6 ± 0.9 <sup>k,l</sup>
Fibroblasts	253.8 ± 89.2 <sup>c</sup>	240 ± 76.6 <sup>d</sup>	167.6 ± 35.4 <sup>c,d</sup>	211 ± 69.8	242 ± 84.4 <sup>m</sup>	163.9 ± 45.7 <sup>m</sup>
Blood vessels	12.7 ± 6.7 <sup>e</sup>	13.8 ± 8.8 <sup>f</sup>	6 ± 5.5 <sup>e,f</sup>	11.3 ± 7.4	12.3 ± 6.3	8.8 ± 7
Mast cells	0.9 ± 1.7 <sup>g</sup>	2.9 ± 3.5 <sup>g,h</sup> <sup>ψ</sup>	0 ± 0 <sup>h</sup> <sup>§</sup>	1.6 ± 2.2	0.4 ± 1.2 <sup>ψ</sup>	0.7 ± 1.1 <sup>§</sup>
Collagen area (%)	67.1 ± 13.4	64.4 ± 11.1 <sup>+</sup>	57.9 ± 9.4	68.6 ± 20.1	73.2 ± 10.6 <sup>n+</sup>	57 ± 19.9 <sup>n</sup>
Extracellular matrix area (%)	32.8 ± 13.6	35.6 ± 11.2 <sup>⊗</sup>	42.1 ± 9.4	31.3 ± 20.1	26.8 ± 10.6 <sup>o</sup> <sup>⊗</sup>	43 ± 19.9 <sup>o</sup>
Giant cells	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Necrotic area (%)	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Inflammatory Infiltration (%)	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent

Means followed by the same letters differ by ANOVA followed by Tukey *post hoc* test (<sup>a</sup>p=0.001, <sup>b</sup>p<0.001, <sup>c</sup>p=0.002, <sup>d</sup>p=0.013, <sup>e</sup>p=0.031, <sup>f</sup>p=0.009, <sup>g</sup>p=0.004, <sup>h</sup>p<0.001, <sup>i</sup>p=0.002, <sup>j</sup>p<0.001, <sup>k</sup>p=0.001, <sup>l</sup>p=0.033, <sup>m</sup>p=0.002, <sup>n</sup>p=0.005 and <sup>o</sup>p=0.005). Means followed by the same symbols differ by Student's t-test for paired samples (comparison between parameters of 7 and 21 days) (\*p<0.001, #p=0.017, Δp=0.014, ψp=0.001, +p=0.009, ⊗p=0.009, ¶p=0.007 and §p=0.012). Group 1: NC-CVC, Group 2: I-CVC, Group 3: control-group.

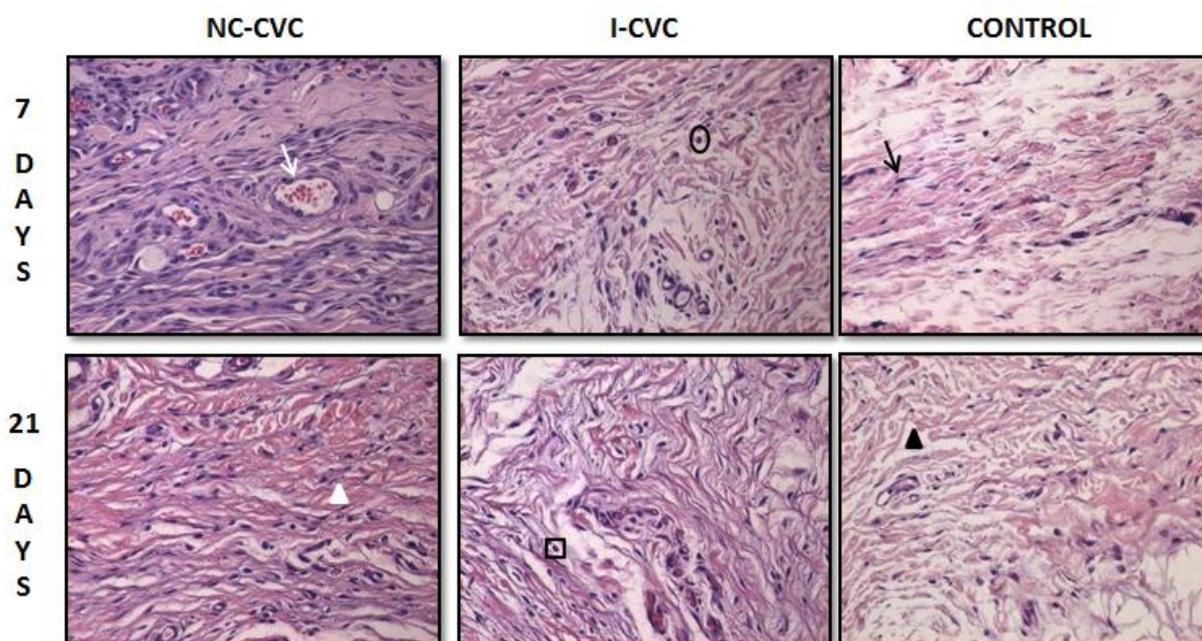
At day 7 of the assay, there was a higher number of inflammatory cells in Group 1 (NC-CVC) compared to Group 3 (control) (p=0.001 and p<0.001 for mononuclear and polymorphonuclear cells, respectively). Compared to control (Group 3), both Group 1 (NC-CVC) and Group 2 (I-CVC) showed a greater number of fibroblasts (p=0.002 and p=0.013, respectively) and blood vessels (p=0.031 and p=0.009, respectively). Group 2 also presented a higher number of mast cells compared to Group 1 (p=0.004) and the control-group (p<0.001).

At day 21 of the assay, Group 2 presented more mononuclear cells than Group 1 (p=0.002) and the control-group (p<0.001). However, both experimental-groups even showed a greater number of polymorphonuclear cells compared with the control-group (p=0.001 and p=0.033 respectively for Groups 1 and 2). Group 2 also presented a higher number of fibroblasts and collagen area (p=0.002 and p=0.005) and a lower extracellular matrix area (p=0.005) in relation to Group 3.

The blood vessel and mast cell counts were statistically similar between the groups.

From days 7 to 21, the polymorphonuclear cell ( $p=0.014$ ) and mast cell ( $p=0.001$ ) counts decreased for Group 2. There was an increase in collagen area and a reduction of extracellular matrix area ( $p=0.009$  for both). None of the groups presented giant cells, necrotic area and inflammatory infiltration.

Comparing Group 1 (conventional CVC) with Group 2 (innovative CVC), few differences were observed: on the first 7 days, only the mast cell count was statistically different ( $p=0.004$ ) and on the 21<sup>st</sup> day the statistical difference was only observed in the mononuclear cell count ( $p=0.002$ ). All other inflammatory parameters analyzed were similar. Representative images of rat tissues are demonstrated in Figure 2.



**Figure 2.** Representative image of rat tissues: NC-CVC images showed more pronounced inflammatory process compared to I-CVC and control images, both for 7 and 21 days. Different symbols identify the main cells: black square = mononuclear cells, black circle = polymorphonuclear cells, black arrow = fibroblasts, white arrow = blood vessel, black triangle = extracellular matrix area and white triangle = collagen area. Magnification: 40X.

## DISCUSSION

The anti-biofilm formulation showed significant antimicrobial activity since it presented bactericidal/fungicidal MIC against all tested strains. Triclosan and

PHMB were included in the coating formulation due to its already well-known broad-spectrum antibacterial/antifungal and favourable safety profile (BUTCHER, 2012; GAO; CRANSTON, 2010; LEAPER et al., 2011; LUBARSKY et al., 2012; WELK et al., 2005). Such agents are widely used for the prevention and therapy of bacterial infections, especially for the antiseptic of mucous membranes and wounds (KOBURGER et al., 2010).

Triclosan was originally introduced as a non-specific biocide but it has been shown to affect bacterial membranes as a consequence of the specific inhibition of the fatty acid biosynthesis (LUBARSKY et al., 2012). PHMB has been shown to interact with membrane phospholipids and to impair the integrity of the outer membrane of Gram-negative bacteria (MAILLARD, 2002). It is polymeric and potent with large spectral activity against bacteria but with low toxicity to eukaryotic organisms (GAO; CRANSTON, 2010).

The biofilm disaggregation proven by the SEM images can be explained due to the presence of xylitol in the coating formulation. There are several studies on the anti-adherent property of xylitol conducted with Gram-positive bacteria (RUIZ et al., 2011; TAPIAINEN et al. 2004), Gram-negative bacteria (AMMONS et al.; SILVA et al. 2011) and yeasts (ICHIKAWA et al., 2008). Kurola and colleagues (2011) verified that xylitol was effective in controlling the biofilm formation of twenty *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from children's mouth and inhibited the expression of a gene involved in the biofilm formation. Sousa et al. (2011) showed that 0.5, 2.5 and 5.0% xylitol inhibited significantly the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* strains (ATCC 9027 and clinic) both by counting the number of colony-forming units released from specimen-test and by scanning electron microscopy microphotographies. One of the strains of our study – *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 – was also assessed by Ferreira and colleagues (2009) who observed, through SEM photomicrographies, that 1, 5 and 10% xylitol demonstrated the anti-adherent property against such strain.

The prevention of biofilm formation is relevant since the eradication of microorganisms, arranged in biofilm form, is difficult due to the inherent tolerance to host defenses and antibiotic therapies. In addition, biofilms facilitate the spread of antibiotic resistance by promoting horizontal gene transfer (FUX et al., 2005). According to Giacometti and colleagues (2006), the microorganism's resistance in biofilm formation often leads to the failure of conventional antibiotic therapy and

the consequent necessity of removing the infected devices.

Regarding the *in vivo* efficacy test, statistical difference in the red series (red blood cells, hemoglobin and hematocrit) of groups C (NC-CVC) and D (I-CVC) was observed. However, both groups were statistically similar to relative controls (with insertion of uncontaminated CVC fragments) and absolute controls, which eliminates the importance of this finding for the present study. The hemoculture results showed no episodes of bloodstream infection in any group, which indicates no case of generalized infection. This result is relevant since hemoculture is the method commonly employed, causing bacteremia and sepsis (STOJANOVIC et al., 2006). Crump e Collignon (2000) suggested that nearly all catheters placed for longer periods (usually more than 8 days) will present microorganisms embedded in a biofilm which will proliferate to sufficient numbers for systemic sepsis to result. The occurrence and rate of this proliferation depend on microbial virulence factors, host factors and characteristics of the catheter. The Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-Related Infections (O'GRADY et al., 2002) suggests an increased risk for CRBSI after 5 to 7 days, but indicates that catheter replacement at scheduled time intervals is an ineffective method to reduce infection rates. Because of that, we choose a period of 7 days for bacteremia evaluation and suggested the use of potentially anti-biofilm impregnated catheters as an efficient alternative to prevent CRBSI episodes.

Microbiological analysis of internal and external surface of the CVC fragments showed a decrease in the I-CVC colonization. Moreover, the absence of biofilm formation in the I-CVC was observed by SEM, which demonstrates the coating advantage. Even few adhered colonies will still cause some kind of infection in the patient, which will probably be local since, until the 7th day the hemoculture was negative. This infection would be easily combated by host defenses or by an appropriate antibiotic therapy, if necessary. Moreover, the colonization by exogenous microorganisms observed to be more pronounced in Group A (NC-CVC) compared to Group B (I-CVC) is another factor which indicates the anti-biofilm coating efficacy. The use of I-CVC would control the number of infections in the hospital environment and also contribute to effective treatment thereof.

Kockro and colleagues (2000) utilized SEM and microbiological culture to investigate how surface colonization, by *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984

and clinical *Staphylococcus aureus*, is prevented by rifampin-impregnated silicone catheter. The SEM demonstrated that, in contrast to the unloaded catheters tested as control, initial bacterial adherence on impregnated catheter surface was reduced to a few single cells, which did not show visible signs of proliferation. Although rifampin incorporation into silicone polymers was not able to prevent initial bacterial adhesion completely, subsequent colonization could be prevented. The same result was found in our study: the significant decrease in microbial adherence – demonstrated by SEM images and by external surface of I-CVC analysis (*in vivo* efficacy assay) – together with the biofilm disaggregation could prevent the colonization continuity and increase the catheterization and the effectiveness of parallel therapies.

Regarding the *in vivo* tissue reaction assay, it was observed that, after 21 days, the neutrophil counting was higher in NC-CVC and I-CVC groups ( $p=0.043$  and  $p=0.037$  respectively) compared to control (Group 3), and the lymphocyte count was lower in NC-CVC group ( $p=0.019$ ). Cases of neutrophilia are caused by bacterial infections or inflammation conditions, since neutrophils are the first body defense cells to arrive in inflamed areas (MUNFORD; PUGIN, 2001). However, this parameter should not be considered isolated as a sign of tissue reaction. We have to consider that, the neutrophil and lymphocyte counts of the I-CVC group, in comparison with the NC-CVC group – the conventional CVC currently used – were statistically similar, as well as all other inflammatory parameters. Statistical difference between those groups was only observed for mast cells (7 days) and mononuclear cells (21 day). Thus, we can consider the anti-biofilm formulation as being biocompatible.

Muller and Kramer (2008) studied the microbicidal activity and the cytotoxic effect of twelve antibacterial agents and suggested PHMB as one of the most suitable biocompatible agents. Triclosan has been shown to be a safe antibacterial agent in terms of systemic toxicity and has a low potential for allergic reactions (LEAPER et al., 2011). Concerning other types of coated CVC, the study by Oda and colleagues (1997) reported a case of anaphylactic shock which occurred during the placement of a chlorhexidine and silver sulfadiazine coated CVC. They suggested that a small amount of chlorhexidine released from the catheter could be the cause of such shock.

Raad and colleagues (2008) compared catheters impregnated with a)

minocycline and rifampicin, b) silver-platinum and carbon and c) chlorhexidine and silver sulfadiazine, with non-coated catheters, using an *in vitro* established biofilm colonization model. Catheters impregnated with minocycline and rifampicin demonstrated superior anti-adherence activity and more prolonged antimicrobial durability, against multidrug-resistant bacteria (*Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria), when compared with other anti-infective catheters.

Impregnated catheters with antimicrobial or antiseptic agents can potentially decrease the risk for CRBSI and hospital costs (O'GRADY et al., 2002). However, according to Cobrado and colleagues (2012), catheters impregnated with chlorhexidine and silver sulfadiazine appear to be effective in reducing colonization and infection, but hypersensitivity reactions have been documented; silver-impregnated catheters are not associated with a lower rate of colonization and; despite catheters coated with minocycline and rifampicin significantly decreasing the incidence of CRBSIs, some concern may still exist regarding the development of antimicrobial resistance.

We presented a new option for CVC coating since some impregnated catheters, although efficient, have already showed hypersensitivity reactions (chlorhexidine and silver sulfadiazine catheters) (ODA et al., 1997) or antimicrobial resistance (minocycline and rifampicin catheters) (GILBERT and HARDEN, 2008). In the present study, besides two potent antimicrobial agents - important to increase the spectrum and durability of action and to avoid resistance cases— an anti-adherent substance also was used. Both activities act synergistically preventing biofilm formation and vascular catheter infections.

## **CONCLUSION**

The anti-biofilm formulation proposed for use as a device coating seems to play an important role in the prevention of CVC related infections. The biofilm disaggregation increases the effectiveness of an adjuvant antimicrobial therapy, if necessary, since the drug is able to fight planktonic microorganisms.

Besides being efficient, the anti-biofilm formulation could be considered biocompatible, thus feasible for therapeutic use in clinics and hospitals. Future studies should focus on improving the *in vivo* antimicrobial efficacy through testing different concentrations of active substances. Clinical studies should also be conducted.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank all the colleagues from NIQUA/NUPICS (UFJF) and from Laboratório Maurílio Baldi, (HU/UFJF) who contributed to this work. The authors were provided with grants by CAPES and II PIBITI/CNPq/UFJF.

## REFERENCES

- Ammons MC, Ward LS, Fisher ST, Wolcott RD, James GA. *In vitro* susceptibility of established biofilms composed of a clinical wound isolate of *Pseudomonas aeruginosa* treated with lactoferrin and xylitol. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2009; **33**(3): 230-6.
- Burmølle M, Thomsen TR, Fazli M, Dige I, Christensen L, Homøe P, Tvede M, Nyvad B, Tolker-Nielsen T, Givskov M, Moser C, Kirketerp-Møller K, Johansen HK, Høiby N, Jensen PØ, Sørensen SJ, Bjarnsholt T. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2010; **59**(3): 324-36.
- Butcher M. PHMB: an effective antimicrobial in wound bioburden management. *Br. J. Nurs.* 2012; **21**(12): S16, S18-21.
- Chauhan A, Lebeaux D, Decante B, Kriegel I, Escande MC, Ghigo JM, Beloin C. A rat model of central venous catheter to study establishment of long-term bacterial biofilm and related acute and chronic infections. *PLoS One* 2012; **7**(5): e37281.
- Chifiriuc C, Grumezescu V, Grumezescu AM, Saviuc C, Lazăr V, Andronescu E. Hybrid magnetite nanoparticles/Rosmarinus officinalis essential oil nanobiosystem with anti-biofilm activity. *Nanoscale Res. Lett.* 2012; **7**: 209.
- Cobrado L, Silva-Dias A, Azevedo MM, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. *In vivo* anti-biofilm effect of cerium, chitosan and hamamelitannin against usual agents of catheter-related bloodstream infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012. doi:10.1093/jac/dks376 [Epub ahead of print]
- Coenye T, Nelis HJ. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 2010; **83**(2): 89-105.
- Crump JA, Collignon PJ. Intravascular catheter-associated infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2000; **19**(1): 1-8.
- Donelli G. Vascular catheter-related infection and sepsis. *Surg Infect (Larchmt)* 2006; **7**(2): S25-7.
- Dwyer A. Surface-treated catheters-a review. *Semin. Dial.* 2008; **21**(6): 542-6.

- Ferreira AS, Barbosa NR, Rodrigues Jr D, Silva SS. *In vitro* mechanism of xylitol action against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. In: Mendez-Vilas A, ed. Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Seville: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, 2009; 505-9.
- Francolini I, Donelli G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2010; **59**(3): 227-38.
- Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 2005; **13**(1): 34-40.
- Gao Y, Cranston R. An effective antimicrobial treatment for wool using polyhexamethylene biguanide as the biocide, part 1: biocide uptake and antimicrobial activity. *J. Appl. Polym. Sci.* 2010; **117**(5): 3075–82.
- Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Orlando F, Silvestri C, Renzone G, Testa I, Mocchegiani F, Della Vittoria A, Saba V, Scaloni A, Scalise G. Distinctin improves the efficacies of glycopeptides and betalactams against staphylococcal biofilm in an experimental model of central venous catheter infection. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2007; **81**(1): 233-9.
- Gilbert RE, Harden M. Effectiveness of impregnated central venous catheters for catheter related blood stream infection: a systematic review. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008; **21**(3): 235-45.
- Hajjigharamani S, Vesal N. Evaluation of several drug combinations for intraperitoneal anaesthesia in adult male rats. *Iran. J. Vet. Res.* 2007; **8**(2):106-15.
- Handrup MM, Fursted K, Funch P, Møller JK, Schrøder H. Biofilm formation in long-term central venous catheters in children with cancer: a randomized controlled open-labelled trial of taurolidine versus heparin. *APMIS* 2012; **120**(10): 794-801.
- Ichikawa T, Yano Y, Fujita Y, Kashiwabara T, Nagao K. The enhancement effect of three sugar alcohols on the fungicidal effect of benzethonium chloride toward *Candida albicans*. *J. Dent.* 2008; **36**(11): 965-8.
- Koburger T, Hübner NO, Braun M, Siebert J, Kramer A. Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; **65**(8): 1712-9.
- Kockro RA, Hampf JA, Jansen B, Peters G, Scheihing M, Giacomelli R, Kunze S, Aschoff A. Use of scanning electron microscopy to investigate the prophylactic efficacy of rifampin-impregnated CSF shunt catheters. *J. Med. Microbiol.* 2000; **49**(5): 441-50.

- Kurola P, Tapiainen T, Sevander J, Kaijalainen T, Leinonen M, Uhari M, Saukkoriipi A. Effect of xylitol and other carbon sources on *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and gene expression *in vitro*. *APMIS* 2011; **119**(2): 135-42.
- Leaper D, Assadian O, Hubner NO, McBain A, Barbolt T, Rothenburger S, Wilson P. Antimicrobial sutures and prevention of surgical site infection: assessment of the safety of the antiseptic triclosan. *Int. Wound. J.* 2011; **8**(6): 556-66.
- Lubarsky HV, Gerbersdorf SU, Hubas C, Behrens S, Ricciardi F, Paterson DM. Impairment of the bacterial biofilm stability by triclosan. *PLoS One* 2012; **7**(4): e31183.
- Maillard JY. Bacterial target sites for biocide action. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* 2002; **92**(31): 16S-27S.
- Muller G, Kramer A. Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008; **61**(6):1281-7.
- Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **163**(2): 316-21.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically—Sixth Edition: Approved Standard M7-A6*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2003.
- Oda T, Hamasaki J, Kanda N, Mikami K. Anaphylactic shock induced by an antiseptic-coated central venous [correction of nervous] catheter. *Anesthesiology* 1997; **87**(5): 1242-4.
- O'Grady NP, Alexander M, Dellinger EP, Gerberding JL, Heard SO, Maki DG, Masur H, McCormick RD, Mermel LA, Pearson ML, Raad II, Randolph A, Weinstein RA. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Pediatrics* 2002; **110**(5): e51
- Raad I, Reitzel R, Jiang Y, Chemaly RF, Dvorak T, Hachem R. Anti-adherence activity and antimicrobial durability of anti-infective-coated catheters against multidrug-resistant bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008; **62**(4): 746-50.
- Ruiz V, Rodriguez-Cerrato V, Huelves L, Prado GD, Naves P, Ponte C, Soriano F. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to polystyrene plates and epithelial cells and the antiadhesive potential of albumin and xylitol. *Pediatr. Res.* 2011; **69**(1): 23-7.
- Sajjan U, Moreira J, Liu M, Humar A, Chaparro C, Forstner J, Keshayjee S. A novel model to study bacterial adherence to the transplanted airway: inhibition of *Bukholderia cepacia* adherence to human airway by dextran and xylitol. *J. Heart Lung Transplant.* 2004; **23**(12): 1382-91.

Silva RA, Assed S, Nelson-Filho P, Silva LA, Consolaro A. Subcutaneous tissue response of isogenic mice to calcium hydroxide-based pastes with chlorhexidine. *Braz. Dent. J.* 2009; **20**(2): 99-106.

Silva AF, Silva SS, Oliveira MG, Raposo NRB. Inibição *in vitro* da aderência de enteropatógenos pelo xilitol. *R. Ci. Med. Biol.* 2010; **9**(1): 46-53.

Silva AF, Suzuki EY, Ferreira AS, Oliveira MG, Silva SS, Raposo NRB. *In vitro* inhibition of adhesion of *Escherichia coli* strains by xylitol. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2011; **54**(2): 235-41.

Simões M. Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. *Curr. Med. Chem.* 2011; **18**(14): 2129-45.

Souza LP, Silva AF, Calil NO, Oliveira MG, Silva SS, Raposo NRB. *In vitro* inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion by xylitol. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2011; **54**(5): 877-84.

Stojanovic P, Kocic B, Djordjević–Stankovic D, Randjelovic G, Dinic M. Importance of hemoculture in diagnosis of bacteremia and sepsis. *Acta Medica Medianae* 2006; **5**(1): 37-43.

Tapiainen T, Sormunen R, Kaijalainen T, Kontiokari TO, Ikaheimo I, Uhari M. Ultrastructure of *Streptococcus pneumoniae* after exposure to xylitol. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004; **54**(1): 225-8.

USP – The United States Pharmacopeia. 1985. USP XXI, 16 th edition.

Venkatesh M, Rong L, Raad I, Versalovic J. Novel synergistic anti-biofilm combinations for salvage of infected catheters. *J. Med. Microbiol.* 2009; **58**(7): 936-44.

Welk A, Splieth CH, Schmidt-Martens G, Schwahn Ch, Kocher T, Kramer A, Rosin M. The effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse compared with a triclosan rinse and a chlorhexidine rinse on bacterial counts and 4-day plaque re-growth. *J. Clin. Periodontol.* 2005; **32**(5): 499-505.

Worthington T, Elliott TS. Diagnosis of central venous catheter related infection in adult patients. *J. Infect.* 2005; **51**(4): 267-80.

## ANEXO N

Outras produções científicas

### ARTIGOS PUBLICADOS

SOUSA, L.P.; **SILVA, A.F.**; CALIL, N.O.; OLIVEIRA, M.G.; SILVA, S.S.; RAPOSO, N.R.B. *In vitro* inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion by xylitol. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 54, n. 5, p. 877-884, 2011.

GIRARDI, J.M.; **SILVA, A.F.**; ANDRADE, F.C.; RODRIGUES, V.B.; RAPOSO, N.R.B. Sub-otimização terapêutica da dislipidemia em portadores de aterosclerose coronariana significativa. HU Revista, v. 37, n. 2, p. 181-189, 2011.

OLIVEIRA, A.C.A.; **SILVA, A.F.**; RAPOSO, N.R.B.; CHICOUREL, E.L. Consumo de frutas e hortaliças por estudantes do curso de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora. HU Revista, v. 37, n. 3, p. 377-385, 2012.

OLIVEIRA, V.; **SILVA, A.F.**; MURATORI, L.G.; RIBEIRO, L.C.; CHICOUREL, E.L. Práticas alimentares de crianças atendidas pelo Serviço de Atenção ao Desnutrido do município de Juiz de Fora – MG. Revista de APS, v. 15, n. 1, p. 55-66, 2012.

CALIL, N.O.; CARVALHO, G.S.G.; **SILVA, A.F.**; SILVA, A.D.; RAPOSO, N.R.B. Antioxidant activity of synthetic resveratrol analogs: a structure-activity insight. Letters in Drug Design & Discovery, v. 9, n. 7, p. 676-679, 2012.

BRETAS, L.P.; ALFENAS, C.F.; **SILVA, A.F.**; CHAVES, M.G.A.M.; CAMPOS, C.N. *In vitro* diffusion of hydroxyl ions from medicaments pastes based on calcium hydroxide. Dental Press Endodontics, v. 2, n. 3, p. 36-41, 2012.

LIMA, L.L.; LIMA, R.M.; **SILVA, A.F.**; CARMO, A.M.R.; SILVA, A.D.; RAPOSO, N.R.B. Azastilbene analogs as tyrosinase inhibitors: new molecules with depigmenting potential. The Scientific World Journal, v. 2013, ID 274643, 2013.

GONÇALVES, K.M.; SOLDATI, P.P.; **SILVA, A.F.**; VENÂNCIO, R.P.; CHAVES, M.G.A.M.; RAPOSO, N.R.B. Biological activities of *Solanum sessiliflorum* Dunal. Bioscience Journal, v. 29, n. 4, p. 1028-1037, 2013.

### ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

**SILVA, A.F.**; ABREU, C.R.O.; BARBOSA, E.M.S.; RAPOSO, N.R.B.; CHICOUREL, E.L. Problemas relacionados aos medicamentos em idosos fragilizados da Zona da Mata Mineira, Brasil. Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia.

### ARTIGOS SUBMETIDOS

FERREIRA, A.S.; **SILVA, A.F.**; RAPOSO, N.R.B.; SILVA, S.S. Bypassing microbial resistance: xylitol controls microorganisms growth by means of its anti-adherence property. Current Pharmaceutical Biotechnology.

RAPOSO, N.R.B.; **SILVA, A.F.**; POLONINI, H.C.; CARMO, A.M.R. Antioxidant Plants from Brazil. Capítulo de Livro - CABI Publisher UK.

### CAPÍTULO DE LIVRO

**SILVA, A.F.**; FERREIRA, A.S.; SILVA, S.S.; RAPOSO, N.R.B. Medical Applications of Xylitol: An Appraisal. In SILVA, S.S.; CHANDEL, A.K. (Ed.). D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization. ISBN: 978-3-642-31886-3. Berlim: Springer Verlag, 1ª Ed., capítulo 15, p. 325-342, 2012.

### PATENTE DEPOSITADA

SILVA, A.D.; SANTOS, J.A.; **SILVA, A.F.**; RAPOSO, N.R.B. Bioisósteros do Resveratrol Bioconjugados com Esteróides, Antioxidantes. **Finalidade:** Bioisósteros com potencial para serem utilizados em preparações e composições farmacêuticas e em encapsulações com lipossomas - para aumento da biodisponibilidade -, como antioxidante, no campo de cosméticos, cosmecêuticos, conservantes, alimentício e nutrição, todos para o segmento humano e/ou veterinário. 2012 – Depósito de Pedido de Patente no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) em 31/05/2012 - PI020120049285 / BR 10 2012 013083 1.

### RESUMOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

FONSECA, Z.R.Q.; SOLDATI, P.P.; GONÇALVES, K.M.; VENÂNCIO, R.P.; **SILVA, A.F.**; RAPOSO, N.R.B. Depigmenting and wound healing activities of aqueous extract of *Solanum sessiliflorum* Dunal. XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE – Pôster e Resumo publicado em anais de congressos – 24 a 27 de agosto de 2011 – Rio de Janeiro (RJ).

SOLDATI, P.P.; **SILVA, A.F.**; GONÇALVES, K.M.; RAPOSO, N.R.B. Antimicrobial and antioxidant activity of ethanol extract from *Bidens pilosa* leaves. XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE – Pôster e

Resumo publicado em anais de congressos – 24 a 27 de agosto de 2011 – Rio de Janeiro (RJ).

FOCHAT, R.C.; NICOLAU, R.D.S.; **SILVA, A.F.**; RAPOSO, N.R.B. Antimicrobial activity of *Alpinia speciosa* (K. Schum.) extracts on different bacterial species. XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE – Pôster e Resumo publicado em anais de congressos – 24 a 27 de agosto de 2011 – Rio de Janeiro (RJ).

BRETAS, L.P.; **SILVA, A.F.**; RAPOSO, N.R.B.; CAMPOS, C.N. Atividade antimicrobiana de componentes convencionais e fitoterápicos de pastas medicamentosas à base de hidróxido de cálcio. 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica – SBPqO – Pôster e Resumo publicado em anais de congressos – 3 a 6 de setembro de 2011 – Águas de Lindóia (SP).

SOUZA, L.P.; **SILVA, A.F.**; CALIL, N.O.; SUZUKI, E.Y.; SILVA, S.S.; RAPOSO, N.R.B. *In vitro* inhibition of clinical *Pseudomonas aeruginosa* adhesion by xylitol. II International Symposium on Pharmaceutical Sciences – Pôster e Resumo publicado em anais de congressos – 3 a 5 de novembro de 2011 – Natal (RN).

BAHIA, E.A.R.; FRANCO, D.C.Z.; SUZUKI, E.Y.; **SILVA, A.F.**; ROCHA, P.R.; BAPTISTA, E.B. Análise microbiológica da água de minas de Matias Barbosa – MG. Simpósio Farmacêutico – Ensino, Pesquisa e Inovação – Pôster e Resumo publicado em anais de congressos – 30 de outubro a 3 de novembro de 2011 – Juiz de Fora (MG).

BRETAS, L.P.; **SILVA, A.F.**; RAPOSO, N.R.B.; AARESTRUP, B.J.V; CAMPOS, C.N. Reação Tecidual de Pasta Inovadora à Base de *Aloe vera*. Jornada de Investigación Odontológica “Premio Hatton” – International Association Dental Research (IADR) e Asociación de Investigación Odontológica del Perú (AIOP) – Pôster – 15 de setembro de 2012 – Lima (Peru).

ALVES, F.A.O.; **SILVA, A.F.**; LIMA, R.M.; OLIVEIRA, M.G.; SILVA, S.S.; RAPOSO, N.R.B. *In vitro* inhibition of clinical *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium adhesion by xylitol. 5th International Symposium of Post-Graduation and Research (V SINPOSPq) – Pôster e Resumo publicado em anais de congressos – 12 a 14 de setembro de 2012 – Ribeirão Preto (SP).

ROCHA, P.R.; TEIXEIRA, R.S.; ALVES, F.A.O.; **SILVA, A.F.**; PEREIRA, T.V.; RAPOSO, N.R.B. Antioxidant and depigmenting activities of five vegetable oils from species of the Brazilian Amazon Biome. 5th International Symposium of Post-Graduation and Research (V SINPOSPq) – Pôster e Resumo publicado em anais de congressos – 12 a 14 de setembro de 2012 – Ribeirão Preto (SP).

BRETAS, L.P.; **SILVA, A.F.**; RAPOSO, N.R.B.; FERREIRA, A.S.; CAMPOS, C.N. Antimicrobial activity of endodontic pastes based on calcium hydroxide and different active substances. XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM) – Pôster e Resumo publicado em anais de congressos – 28 de outubro a 1 de novembro de 2012 – Santos (SP).

**SILVA, A.F.**; LIMA, L.L.; LIMA, R.M.; CHAVES, M.G.A.M.; SILVA, A.D.; RAPOSO, N.R.B. Inhibitory effects of resveratrol analogs on tyrosinase activity: molecules with potential for depigmenting treatments. 14th Tetrahedron Symposium - Challenges in Organic & Bioorganic Chemistry – Pôster – 25 a 28 de junho de 2013 – Viena (Áustria).

## PRÊMIOS

Finalista (1º Lugar Etapa Boticário Challenge) do Idea to Product 2011 Latin America Competition (I2P) - Fundação Getúlio Vargas (FGV) - Centro de Empreendedorismo e Novos Negócios - São Paulo (Brasil). Projeto: BIODERM – Antifúngico contra dermatofitoses em animais. 2011

Finalista (2º Lugar Final - 1nd Runner Up) do Idea to Product 2011 Latin America Competition (I2P) - Fundação Getúlio Vargas (FGV) - Centro de Empreendedorismo e Novos Negócios - São Paulo (Brasil). Projeto: BIODERM – Antifúngico contra dermatofitoses em animais. 2011

Finalista (3º Lugar The Life Science Championship - Second Runner Up) do Idea to Product 2011 Global Competition (I2P) - Kungliga Tekniska Högskolan (KTH) - Royal Institute of Technology - Estocolmo (Suécia). Projeto: BIODERM – Antifúngico contra dermatofitoses em animais. 2011