

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Micaela do Canto Canabarro

**ANÁLISE DA FORMAÇÃO E DA SUSCEPTIBILIDADE A  
ANTIMICROBIANOS DE BIOFILMES DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE  
PELES HUMANAS PARA USO EM ENXERTOS ALÓGENOS**

Porto Alegre

2017

Micaela do Canto Canabarro

**ANÁLISE DA FORMAÇÃO E DA SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS  
DE BIOFILMES DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE PELES HUMANAS PARA USO  
EM ENXERTOS ALÓGENOS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Área de habilitação: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup> Gertrudes Corção

Co-orientador: Ma. Karine Lena Meneghetti

Porto Alegre

2017

Micaela do Canto Canabarro

**ANÁLISE DA FORMAÇÃO E DA SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS  
DE BIOFILMES DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE PELES HUMANAS PARA USO  
EM ENXERTOS ALÓGENOS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr<sup>a</sup> Leticia Muner Otton - UFRGS

---

Prof. Dr<sup>o</sup> Alexandre José Macedo - Fac Farmácia, UFRGS

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Gertrudes Corção - ICBS, UFRGS

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gertrudes Corção, pela oportunidade e confiança depositada em mim durante os anos de iniciação científica.

À minha co-orientadora, M<sup>a</sup> Karine Lena Meneghetti, que se tornou uma grande parceira, agradeço pelos ensinamentos, confiança e apoio incansável desde o primeiro dia em que cheguei ao laboratório. Sou muito honrada por fazer parte dessa etapa essencial do projeto.

Aos colegas de laboratórios, especialmente Letícia Otton, Magda Chaves, Thaís Hain e Jéssica de Souza, pelos momentos de aprendizado e auxílio durante a elaboração desse trabalho, mas também de diversão, tornando as horas de bancada mais leves.

Aos meus amigos da vida toda, Mariana, Sahil, Luiz Felipe e Stéfano, pela amizade durante todos esses anos e compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus presentes da biomedicina, Luana, Tailene e, principalmente, Betina que me acompanhou desde o primeiro dia e foi essencial ao longo desses anos. À Juliana que graças à troca para o curso de farmácia deixou de ser colega para se tornar uma grande amiga. A todas, muito obrigada pela amizade e apoio sempre!

Aos meus pais, Heloisa e Miguel, por todo amor, cuidado e dedicação de sempre e pela compreensão e apoio incansável durante os momentos mais delicados ao longo do curso. Vocês são essenciais e não há palavras pra descrever o quão importantes são para mim.

Ao meu namorado, Matheus, por ter sido impecável durante esse período, me dando sempre todo suporte e amor necessário para tornar essa etapa mais leve. Muito obrigada pelo auxílio, compreensão e parceria sempre!

## RESUMO

Peles alógenas humanas são utilizadas como curativos biológicos temporários em feridas severas, levando à cicatrização precoce da lesão e redução da taxa de mortalidade desses pacientes. Aloenxertos, entretanto, enfrentam problema de limitada disponibilidade de doador cadáver e de presença de potenciais patógenos no tecido. Além disso, os pacientes receptores tendem a estar imunodeprimidos e, dessa forma, as peles alógenas devem passar por um tratamento antimicrobiano a fim de evitar a transmissão desses patógenos. O tratamento realizado atualmente não tem se mostrado efetivo, existindo uma elevada taxa de descarte por contaminação bacteriana nas peles alógenas. Diversos bancos de pele enfrentam o problema de descarte por contaminação bacteriana e não existe uma padronização do tratamento a ser realizado. Estudos mostram que as bactérias são suscetíveis aos antimicrobianos utilizados, entretanto essas não estão sendo eliminadas das peles alógenas. Fatores como a formação de biofilme podem estar levando ao aumento da tolerância aos antimicrobianos, uma vez que bactérias nesse estado apresentam de 10 a 1000 vezes mais tolerância aos antimicrobianos em relação ao estado planctônico. O presente trabalho buscou verificar se a formação de biofilme por bactérias isoladas de peles alógenas reduz a susceptibilidade a antimicrobianos interferindo na eficiência dos processos já estabelecidos para tratamento antimicrobiano do Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – RS. Através do método de cristal violeta foi possível observar que, dentre as 216 bactérias isoladas de peles alógenas analisadas, 204 (94,45%) foram formadoras de biofilme em algum grau de aderência e 12 (5,55%) não foram produtoras de biofilme. Dentre as formadoras de biofilme, 117 (54,17%) produziram biofilme fortemente aderente. Os valores de concentração inibitória mínima (MIC) variaram de <1 a 128 µg/mL para o antimicrobiano penicilina, de <1 a 4 µg/mL para tetraciclina e de <1 a 8 µg/mL para gentamicina dentre os 12 isolados bacterianos analisados. Os resultados obtidos para MBIC mostraram um aumento de pelo menos 512 vezes em relação ao MIC para todos os antimicrobianos testados, assim como aconteceu entre os valores de MBEC e MBIC. Esses resultados corroboram com a hipótese de que a formação de biofilme seja um dos fatores que possa estar aumentando a tolerância antimicrobiana desses micro-organismos. Dessa forma, a elaboração de tratamentos para bancos de pele deve levar em consideração a presença de bactérias no estado de biofilme e utilizar metodologias adequadas à sua eliminação.

Palavras-chave: Biofilme. Banco de pele. Resazurina. MBIC. MBEC.

## ABSTRACT

Human skin allografts are used as temporary biological coverage on severe wounds, leading to early lesion healing and reduction of mortality of these patients, among other benefits. Allografts, however, face a problem of limited availability of cadaveric donors and the presence of potential pathogens in the tissue. Receptor patients tend to be immunodepressed, thus allograft skin should undergoes antimicrobial treatment in order to avoid the transmission of these pathogens. The current treatment has not been shown to be effective, and there is a high discard rate due to bacterial contamination in these allograft skins. Several skin banks face the problem of disposal by bacterial contamination and there is no standardization of the treatment to be performed. Studies show that bacteria are susceptible to the antimicrobials used; however they are not being eliminated from allograft skin. Factors such as biofilm formation may be leading to an increased antimicrobial tolerance, since bacteria in this state have 100 to 1000 times greater antimicrobial tolerance than planktonic state. The present work aimed to investigate if the biofilm formation by bacteria isolated from allograft skins reduces the antimicrobial susceptibility, interfering in the efficiency in the processes already established as antimicrobial treatment of Skin Bank Dr. Roberto Corrêa Chem from Hospital Complex Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – RS. Through the violet crystal method it was possible to observe that among 216 bacteria isolated from allergic skin analyzed, 204 (94.45%) formed a biofilm in some degree of adhesion and 12 (5.55%) were not biofilm producers. Among the bacteria able to produce biofilm, 117 (54.17%) produced a strongly adherent biofilm. Minimum inhibitory concentration (MIC) values ranged from <1 to 128 µg/mL for antimicrobial penicillin, <1 to 4 µg/mL for tetracycline and <1 to 16 µg/mL for gentamicin amidst 12 bacterial isolates. The results obtained for MBIC showed an increase of at least 512 times in comparison to MIC for all the antimicrobials tested, as well as between MBEC and MBIC values. These results corroborate with the hypothesis that biofilm formation is one of the factors that are increasing the antimicrobial tolerance of microorganisms. Therefore, an elaboration of treatments for skin banks should take into account the presence of bacteria in the biofilm state and use appropriate methodologies for their elimination.

Keywords: Biofilm. Skin bank. Resazurin. MBIC. MBEC.

## CIP - Catalogação na Publicação

Canabarro, Micaela do Canto

Análise da formação e da susceptibilidade a antimicrobianos de biofilmes de bactérias isoladas de peles humanas para uso em enxertos alógenos / Micaela do Canto Canabarro. -- 2017.

54 f.

Orientadora: Gertrudes Corção.

Coorientadora: Karine Lena Meneghetti.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Biofilme. 2. Banco de pele. 3. Resazurina. 4. MBIC. 5. MBEC. I. Corção, Gertrudes, orient. II. Meneghetti, Karine Lena, coorient. III. Título.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação dos estágios de formação do biofilme.....	13
Figura 2 – Representação esquemática da conversão por oxiredução do corante resazurina para resofurina por células metabolicamente ativas.....	17



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA</b> .....	<b>10</b>
1.1. ALOENXERTO DE PELE E BANCO DE PELE.....	10
1.2. BIOFILMES .....	13
1.3. GÊNEROS BACTERIANOS .....	17
1.4. METODOLOGIAS DE ANÁLISE DO BIOFILME .....	18
1.4.1. Quantificação da biomassa do biofilme .....	18
1.4.2. Atividade metabólica do biofilme.....	18
1.5. JUSTIFICATIVA.....	21
1.6. OBJETIVOS .....	22
1.6.1. Objetivo geral.....	22
1.6.2. Objetivos específicos .....	22
<b>2 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>23</b>
<b>3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>
<b>ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA “BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY”</b> .....	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

### 1.1. ALOENXERTO DE PELE E BANCO DE PELE

Enxertos de peles alógenas humanas são realizados em todo o mundo (Johnston *et al.*, 2016) para promover o fechamento temporário de feridas crônicas e de queimaduras de segundo e terceiro grau (Pirnay *et al.*, 2012). Dessa forma, o aloenxerto de pele tem grande importância no tratamento de pacientes queimados, uma vez que leva a cicatrização precoce de lesões, reduzindo a incidência de sepse e as taxas de mortalidade, sendo capaz de salvar a vida desses pacientes (Obeng *et al.*, 2001; Pianigiani *et al.*, 2010). O uso de peles alógenas humanas na enxertia apresenta vantagens mecânicas, fisiológicas e psicológicas (Obeng *et al.*, 2001). Ao atuar como uma barreira mecânica e biológica (Pirnay *et al.*, 2012), leva a redução da perda de água, eletrólitos, proteínas e calor através da ferida (Obeng *et al.*, 2001; Pianigiani *et al.*, 2010; Pirnay *et al.*, 2012). Promove também uma menor taxa de infecção e menor frequência da troca de curativos, bem como analgesia (Pianigiani *et al.*, 2010; Pirnay *et al.*, 2012), melhorando, inclusive, o bem-estar psicológico do paciente receptor (Obeng *et al.*, 2001).

O aloenxerto de pele humana é frequentemente obtido de doadores mortos (Pirnay *et al.*, 2012), sendo que no Brasil é exclusivamente realizado dessa forma (Brasil, 2016). Mostra-se como uma forma economicamente mais viável quando comparado as outras fontes de enxertos de pele, como o uso de aloenxerto amniótico, xenoenxerto de suínos, de produtos cultivados ou outros curativos biológicos, quanto a disponibilidade, facilidade de uso, durabilidade do tecido, velocidade de aderência e potencial de antigenicidade. Seu uso, contudo, apresenta obstáculos que limitam a sua disponibilidade, como a falta de doador cadáver e a presença de potenciais patógenos no tecido (Obeng *et al.*, 2001).

Tendo em vista que os pacientes receptores, como queimados, tendem a estar com depressão imunológica, é preciso ter cuidado com a possibilidade de transmissão de agentes infecciosos viáveis através de aloenxerto de pele (Obeng *et al.*, 2001; Pianigiani *et al.*, 2010). Como consequência disso, peles alógenas humanas são sempre armazenadas em bancos de pele a fim de garantir um maior controle de qualidade e segurança (Pirnay *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2016). Normas e diretrizes na aquisição e no uso de pele de doador cadáver são estabelecidas por legislações internacionais, como Food and Drug Administration (FDA) e American Association of Tissue Banks (AATB), e nacionais, como Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Mathur *et al.*, 2006; Passos, 2011).

Amostras do tecido devem ser obtidas, antes e após qualquer processamento, para pesquisa de patógenos aeróbios, anaeróbios e fungos em exames microbiológicos (Passos, 2011).

O principal motivo de descartes em banco de tecidos é a contaminação bacteriana (Obeng *et al.*, 2001; Pianigiani *et al.*, 2010; Pirnay *et al.*, 2012; Matioski *et al.*, 2015; Gaucher *et al.*, 2016). A fonte da contaminação, todavia, é diversa, podendo ser endógena, ou seja, da microbiota do doador (Pitt *et al.*, 2014), ou exógena, originada do ambiente mortuário, da equipe de recuperação do tecido (Pitt *et al.*, 2014); ou do ambiente cirúrgico que possui microbiota própria (Silva *et al.*, 2002). Dados da literatura mostram bactérias do gênero *Staphylococcus* e *Bacillus sp.* como as mais frequentes em tecidos de doadores (Ibrahim *et al.*, 2004) e a presença de *Staphylococcus sp.* e *Micrococcus sp.* em salas de cirurgia de hospitais de Uberlândia/Minas Gerais (Silva *et al.*, 2002). No caso de doadores que permaneceram por tempo prolongado hospitalizados, os micro-organismos, como bactérias e/ou fungos, presentes no ambiente hospitalar podem colonizar a pele do doador (Mathur *et al.*, 2006). Somado a isso, existe ainda a contaminação como consequência da excessiva manipulação, uma vez que a pele é o último tecido a ser retirado do doador cadáver (Passos, 2011).

Na ausência de tratamento microbiológico validado pelo banco de pele, o tecido com presença de micro-organismos patogênicos e virulentos deve ser descartado, uma vez que existem estruturas celulares ou substâncias produzidas que atuam como fatores de virulência, por exemplo, exotoxinas produzidas por bactérias Gram positivas e negativas e liberadas nos locais onde os micro-organismos são encontrados (Vicentino *et al.*, 2009). No caso de bactérias saprófitas, mesmo não tendo sua virulência esclarecida, podem se tornar agentes infecciosos de acordo com a utilização clínica da pele e o estado imunológico do receptor.

Tendo em vista a relevância da análise microbiológica, foi criada uma lista de micro-organismos aceitáveis e não aceitáveis durante a triagem inicial de processamento de peles alógenas para enxerto nos bancos de pele (tabela 1) (Vicentino *et al.*, 2009; Passos, 2011). Caso sejam encontrados micro-organismos classificados como aceitáveis, o tecido seguirá para a próxima fase do processamento, recebendo tratamento antimicrobiano a fim de eliminar os micro-organismos presentes e torná-la própria para enxertia. Entretanto, se forem detectados nessa etapa micro-organismos considerados não aceitáveis, o tecido deverá ser imediatamente descartado (Passos, 2011). Mathur e colaboradores (2006) propõem que peles alógenas com contaminação bacteriana e fúngica possam ser tratadas com antimicrobianos e assim evitar-se-ia o descarte. A combinação dos antimicrobianos estreptomicina e penicilina é sugerida com maior frequência pela literatura e utilizada em bancos de pele (Mathur *et al.*, 2006), sendo possível realizar a associação com anfotericina B para o controle da

contaminação fúngica (Mathur *et al.*, 2006; Pirnay *et al.*, 2012). Obeng e colaboradores (2001) relatou descarte de 4,9% de amostras de pele alógena devido à contaminação microbiana, enquanto que no estudo de Pianigiani *et al.* (2010) a taxa de descarte de 8,5% foi reduzida para 1,2% através do uso de antimicrobianos determinados através de antibiograma.

**Tabela 1. Microrganismos descritos como aceitáveis e não aceitáveis durante o processamento inicial em banco de pele.**

<b>Micro-organismos Aceitáveis</b>	<b>Micro-organismos Não Aceitáveis</b>
<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa	Bacilos Gram-negativos aeróbicos ou anaeróbicos
<i>Propionibacterium</i> sp.	Cocos Gram-negativos
<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Clostridium</i> sp.
<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>Bacillus anthracis</i>
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Streptococcus pyogenes</i> beta hemolítico
<i>Streptococcus</i> alfa hemolíticos	<i>Staphylococcus aureus</i>
Cocos Gram-positivos anaeróbicos	<i>Enterococcus</i> sp.
<i>Bacillus</i> sp. (não <i>B. anthracis</i> )	Fungos filamentosos
	Leveduras

O Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem foi inaugurado em 2005, sendo até o ano de 2012 o único banco de pele em funcionamento no Brasil (Silveira *et al.*, 2013). Felizmente atualmente já existem mais três bancos de pele no Brasil, situados nas cidades de Curitiba, Rio de Janeiro e São Paulo.

Durante a etapa de processamento inicial no banco de pele em questão, quando detectados micro-organismos classificados como não aceitáveis, a pele é imediatamente descartada (Vicentino *et al.*, 2009; Pirnay *et al.*, 2012). Caso sejam encontrados micro-organismos aceitáveis é realizado um primeiro ciclo de tratamento utilizando-se os antimicrobianos estreptomicina (200 mg/mL) e penicilina (1000 U/mL). Posteriormente a esse tratamento é realizada novamente a análise microbiológica e, caso ainda assim seja detectada a presença de micro-organismos, o tecido segue para um segundo ciclo de tratamento com o antimicrobiano vancomicina (50 mg/mL). Entretanto, algumas amostras de peles alógenas com micro-organismos aceitáveis, mesmo após os tratamentos antimicrobianos, continuam apresentando contaminação bacteriana.

Durante o período de fevereiro de 2008 a julho de 2010 foram realizados 35 procedimentos de colheita, sendo as doações divididas em 108 lotes, dos quais 22 (20,04%) foram descartados e os 86 lotes restantes, forneceram um total de aproximadamente 47.756,1 cm<sup>2</sup> de tecido viável para transplante. O Banco de Pele do Complexo Hospitalar Santa Casa, ainda enfrenta dificuldades em decorrência do pequeno número de doadores (Minuzzi Filho *et al.*, 2010). Tendo em vista a baixa frequência de doações e a necessidade de aproveitamento máximo da pele captada, existe uma grande preocupação com os descartes devido à contaminação microbiana persistente após o tratamento realizado pelo Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem (Martins *et al.*, 2012) e uma necessidade de busca por metodologias capazes de reduzir essa taxa de descarte.

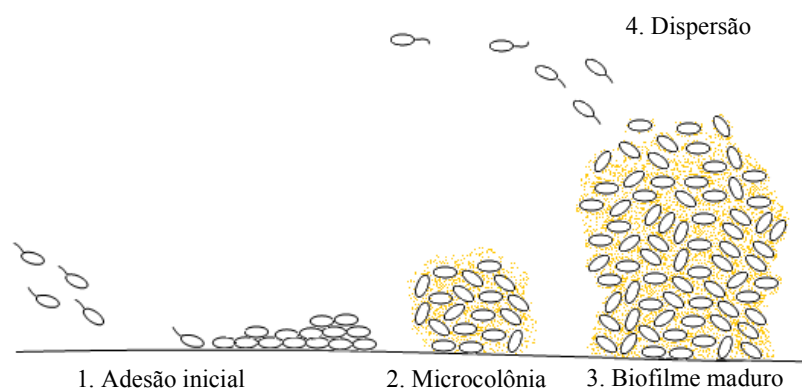
## 1.2. BIOFILMES

Um dos fatores que pode estar levando a persistência da contaminação bacteriana é a disposição das bactérias sobre a pele alógena na forma de biofilme. Estudos anteriores relataram a presença de biofilme sobre outros tipos de enxertos, como vasculares (Russu *et al.*, 2011) e ósseos (Trampuz e Zimmerli, 2006). Somado a isso, várias bactérias isoladas de peles alógenas descritas em diferentes trabalhos (Mathur *et al.*, 2006; Pianigiani *et al.*, 2010; Pirnay *et al.*, 2012) são formadoras de biofilme como *S. epidermidis* (Suzuki *et al.*, 2005), *S. aureus* (Clauss *et al.*, 2013) e *Bacillus* sp. (Tran *et al.*, 2010; Cairns *et al.*, 2014).

Biofilmes são comunidades de micro-organismos organizados em uma estrutura complexa de multicamadas, onde existem canais e pilares internos para nutrição e comunicação por *quorum sensing*. As células estão embebidas em uma matriz de substâncias extracelulares poliméricas (EPS), a qual auxilia na adesão em superfícies bióticas e abióticas (Donlan e Costerton, 2002; Mathur *et al.*, 2006; Welch *et al.*, 2012; Macià *et al.*, 2014; Olsen, 2015). A composição do biofilme será dependente de fatores ambientais, como temperatura, pH, pressão, nutrientes e oxigênio (Gomes, 2011). Entretanto, mesmo que a composição do biofilme não seja uniforme, a matriz extracelular é basicamente formada por água (90 a 99%), micro-organismos (2 a 5%), principalmente bactérias, e produtos de excreção (EPS) (1 a 2%), tais como polissacarídeos, proteínas, fosfolípidos, ácido nucléico e outras substâncias poliméricas hidratadas (Sutherland, 2001).

A formação do biofilme acontece como forma de estratégia adaptativa à sobrevivência em ambientes hostis (Marcinkiewicz *et al.*, 2013; Macià *et al.*, 2014) e acontece em,

basicamente, 4 estágios a partir de sinais extracelulares ambientais e/ou de origem bacteriana (auto-sinalizadores) (Moreira, 2013; Omar *et al.*, 2017) (Figura 1). No primeiro estágio, as bactérias no estado planctônico irão realizar a adesão inicial à superfície, sendo esse um processo reversível. No segundo estágio, acontece a adesão irreversível a partir do desenvolvimento rápido de uma microcolônia e da produção de matriz exopolimérica. Nesse estágio as bactérias começam a expressar o fenótipo de biofilme, apresentando maior tolerância ao tratamento antimicrobiano e à imunidade do hospedeiro. As bactérias iniciam a liberação de moléculas do *quorum sensing* que a partir de uma dada concentração de células alcançando um nível crítico e alterando a expressão de genes específicos a fim de auxiliar na formação do biofilme maduro (estágio 3). A partir desse terceiro estágio, com o biofilme bem estabelecido e maduro na superfície, inicia o quarto estágio com a dispersão de células planctônicas desse biofilme para colonização de outras superfícies, bem como início de novo ciclo (Stoodley *et al.*, 2002; Gomes, 2011; Omar *et al.*, 2017).



**Figura 1. Representação dos estágios de formação do biofilme. (1) adesão inicial, (2) microcolônia, (3) biofilme maduro e (4) dispersão de células planctônicas. Autoria própria.**

Bactérias no estado de biofilme apresentam maior tolerância aos antimicrobianos convencionais (Del Pozo e Patel, 2007), sendo de 100 a 1000 vezes mais tolerantes quando comparadas ao estado planctônico (Mah e O'toole, 2001; Welch *et al.*, 2012; Marcinkiewicz *et al.*, 2013; Macià *et al.*, 2014; Omar *et al.*, 2017). Os mecanismos genéticos clássicos de resistência para bactérias planctônicas não são os mesmos responsáveis pela tolerância em biofilmes, sendo no biofilme mais determinada por peculiaridades do desenvolvimento e estrutura do biofilme. Nesse caso não existe apenas um único mecanismo responsável pela tolerância a antimicrobianos, mas sim uma combinação de fatores que juntos causam elevada tolerância desse estado bacteriano (Del Pozo e Patel, 2007). Dentre os múltiplos fatores, pode-se destacar (1) a presença de uma matriz extracelular com cargas negativamente carregadas,

DNA extracelular e enzimas quelantes, (2) presença de gradientes de concentração de nutrientes e oxigênio, levando a presença de células em diversos estados fisiológicos, (3) fácil transferência de genes de resistência, (4) aumento da expressão de bombas de efluxo e (5) presença de células *persisters* (Høiby *et al.*, 2011; Welch *et al.*, 2012; Moreira, 2013; Olsen, 2015; Omar *et al.*, 2017).

A matriz extracelular do biofilme tem como função servir de estrutura e promover a proteção das células do biofilme. Sua composição consiste em polissacarídeos extracelulares, DNA extracelular (DNAe), proteínas e lipídeos. A presença de exopolissacarídeos e DNAe carregados negativamente na matriz irá provocar a ligação de compostos carregados positivamente que tentem penetrar o biofilme. Dessa forma, antimicrobianos com carga positiva, como aminoglicosídeos, terão uma penetração mais lenta no biofilme, enquanto que antimicrobianos relativamente não carregados, como beta-lactâmicos, não terão dificuldade na penetração quanto a isso (Olsen, 2015; Venkatesan *et al.*, 2015).

A estrutura do biofilme leva a formação de gradientes de substâncias disponíveis no seu interior. Dessa forma, células em diferentes estágios fisiológicos serão encontradas. As células da porção mais externa do biofilme terão maior acesso a nutrientes e oxigênio em comparação com células da porção mais interna, onde existe limitação da disponibilidade de nutrientes e oxigênio. Consequentemente, células do interior do biofilme serão anaeróbicas e deficientes de nutriente, possuindo uma taxa de crescimento mais lenta que células da porção externa (Macià *et al.*, 2014). Essas diferentes condições criam, então, nichos de acordo com as regiões do biofilme em que as células estão localizadas (Moreira, 2013) e torna a resposta aos antimicrobianos não uniforme dentro do biofilme (Mah e O'toole, 2001). Alguns antimicrobianos não são ativos em condições anaeróbicas (Macià *et al.*, 2014) ou são direcionados a processos de bactérias em crescimento, como replicação, transcrição, tradução e síntese proteica (Ciofu *et al.*, 2017). Poderá existir, portanto, aumento da tolerância antimicrobiana em bactérias com baixa atividade metabólica na porção anaeróbica do biofilme (Mah e O'toole, 2001; Olsen, 2015). Em contrapartida, as células da porção mais externa do biofilme possuem menor proteção da matriz extracelular e de enzimas capazes de inativar determinados antimicrobianos (Mah e O'toole, 2001).

As células "*persisters*" são uma subpopulação de bactérias com crescimento lento ou ausente que possuem menor suscetibilidade a ação de antimicrobianos devido à reduzida taxa de metabolismo (Olsen, 2015; Fisher *et al.*, 2017). Quando no estado planctônico, podem ser eliminadas pela resposta imune do hospedeiro, contudo quando presentes em biofilme estarão protegidas pela presença da matriz extracelular, uma vez que comumente se localizam na

porção interior do biofilme (Del Pozo e Patel, 2007; Macià *et al.*, 2014). Ao longo dos últimos anos, cada vez mais estudos têm se destacado como sendo um dos principais fatores para a maior tolerância dos biofilmes aos antimicrobianos. Isso se deve ao fato de que após a utilização de terapia antimicrobiana as células suscetíveis serão erradicadas, enquanto que as células *persisters* irão sobreviver, podendo recolonizar o ambiente e reconstituir o biofilme (Del Pozo e Patel, 2007; Olsen, 2015).

Embora grande parte dos mecanismos de tolerância de biofilmes seja baseada em características específicas dessa conformação bacteriana, mecanismos clássicos de mutação ocorrem em resposta a situações de estresse e possuem importante papel na tolerância do biofilme (Macià *et al.*, 2014; Olsen, 2015). Ademais, devido à estrutura do biofilme, as células estão situadas muito próximas umas das outras, facilitando, assim, a transferência horizontal de genes (Olsen, 2015). Estudos mostraram que a mutagênese é intrinsecamente aumentada em biofilmes (Macià *et al.*, 2014) e que o mecanismo de conjugação ocorre em níveis superior em células no estado de biofilme em comparação com o estado planctônico (Xavier *et al.*). Dentre as alterações promovidas pelo processo de mutação relacionada ao aumento da tolerância bacteriana estão o aumento da expressão de bombas de efluxo e da expressão de enzimas modificadoras e a redução da permeabilidade das células por alterações na membrana externa (Mah e O'toole, 2001; Olsen, 2015). Somado a isso, os antimicrobianos utilizados atualmente foram desenvolvidos para bactérias planctônicas, dessa forma quando no estado de biofilme não serão efetivas. Portanto, mesmo que os antimicrobianos atuem sobre bactérias planctônicas dispersadas do biofilme, não irão atuar sobre as bactérias embebidas na matriz extracelular do biofilme, causando recorrência da infecção (Moreira, 2013; Venkatesan *et al.*, 2015).

Para a análise microbiológica de biofilme em dispositivos médicos é necessário o uso de agitação e/ou sonicação a fim de realizar o desprendimento do biofilme e liberação para o meio de cultura. Na ausência da realização desse processo, o biofilme permanece aderido e, conseqüentemente, pode não haver crescimento bacteriano nos meios de cultivo ou ainda o crescimento que houver não ser representativo de todos os microrganismos presentes na amostra (Trampuz e Zimmerli, 2006; Monsen *et al.*, 2009; Portillo *et al.*, 2013). A análise microbiológica das amostras de peles alógenas realizada pelos bancos de pele ocorre na forma estática, sem pré-agitação ou sonicação prévia ao cultivo em meios de cultura sólidos. Dessa forma, caso os micro-organismos estejam na forma de biofilme, a metodologia atualmente utilizada não é adequada para detectá-los.



### 1.3. GÊNEROS BACTERIANOS

Os isolados bacterianos utilizados neste trabalho foram isoladas em estudo anterior a partir de peles alógenas já descartadas por contaminação pelo Banco de Pele Drº Roberto Corrêa Chem do Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – RS. Tendo em vista que o presente trabalho buscou avaliar a influência da formação de biofilme no tratamento atualmente realizado atualmente no Banco de Pele, foram incluídas nesse estudo todas as espécies encontradas a partir do isolamento das peles alógenas, sendo elas dos gêneros *Staphylococcus* e *Bacillus*.

Sabe-se que, com exceção às espécies *S. aureus* e *B. cereus*, as demais espécies utilizadas no trabalho são consideradas pouco patogênicas (Gaucher *et al.*, 2016), entretanto como se trata de peles para utilização em aloenxertos em pacientes com a imunidade debilitada essas espécies bacterianas apresentam risco, podendo causar infecções nesses pacientes, e por isso devem ser eliminadas das peles alógenas.

O gênero *Bacillus* é altamente resistente às condições ambientais adversas e a agentes químicos uma vez que são capazes de formar esporos e assim sobrevivem por longos períodos (Brown, 2000). Além disso, possuem propriedades de virulência que as tornam patógenos oportunistas de humanos (Celandroni *et al.*, 2016) Essas bactérias são encontradas em diversos ambientes e, principalmente, já foram descritas como presentes na superfície da pele de indivíduos saudáveis (Tarale, Gawande and Jambhulkar, 2015).

Quanto às espécies de *Staphylococcus*, a grande maioria é considerada parte da microbiota normal da pele, todavia algumas espécies como *S. epidermidis* estão associadas à infecção oportunista, sendo essa espécie particularmente associada a infecções em dispositivos médicos devido a sua capacidade de formação de biofilme (Von Eiff *et al.*, 2006).

As espécies *B. cereus* (Ribeiro *et al.*, 2010; Tatu *et al.*, 2016), *B. subtilis* (Saleh *et al.*, 2014), *B. pumilus* (Tena *et al.*, 2007), *B. licheniformis* (Yuste *et al.*, 2016), *S. aureus* (Lacey, Geoghegan and McLoughlin, 2016), *S. epidermidis* (Von Eiff *et al.*, 2006), *S. capitis* (Petti *et al.*, 2008) já foram descritas como causadoras de infecções diretamente na pele, em feridas abertas ou ainda penetrando em lesões cutâneas e atingindo a circulação sanguínea.

## 1.4. METODOLOGIAS DE ANÁLISE DO BIOFILME

Ao longo dos anos, muitos métodos de análise de biofilme foram desenvolvidos, entretanto cada um deles possui uma determinada finalidade. Dessa forma, é necessário avaliar qual o objetivo do experimento para então optar pelo método mais adequado. Peeters *et al.* (2008) realizou a classificação em três classes de métodos: (1) avaliação da biomassa do biofilme, ou seja, células vivas, células mortas e matriz do biofilme através de corantes como o cristal violeta ou Syto9; (2) avaliação da matriz do biofilme, utilizando substâncias específicas para a coloração dessa porção do biofilme, como o 1-9 dimetil-azul de metileno (DMMB); e (3) avaliação da atividade metabólica do biofilme através de ensaios metabólicos, realizando uma distinção entre células viáveis e não viáveis através do uso de corantes como os sais de tetrazolina (XTT, MTT) ou resazurina (Pettit *et al.*, 2005; Peeters *et al.*, 2008; Moreira, 2013).

### 1.4.1. Quantificação da biomassa do biofilme

Para realizar a detecção e a quantificação da formação de biofilme pelas bactérias em análise foi utilizado o método de cristal violeta, sendo considerado padrão ouro (Christensen *et al.*, 1985) para tal função. Esse corante básico irá se ligar às moléculas da superfície carregadas negativamente e aos polissacarídeos da matriz extracelular do biofilme (Peeters *et al.*, 2008; Bockstael *et al.*, 2009). Dessa forma, o corante não é capaz de diferenciar entre células viáveis ou não viáveis, uma vez que realiza a coloração de ambas as células, juntamente com a matriz extracelular do biofilme. Apesar disso, é um método fácil, rápido, com reprodutibilidade e adequado para a análise quantitativa da formação de biofilme (Macià *et al.*, 2014).

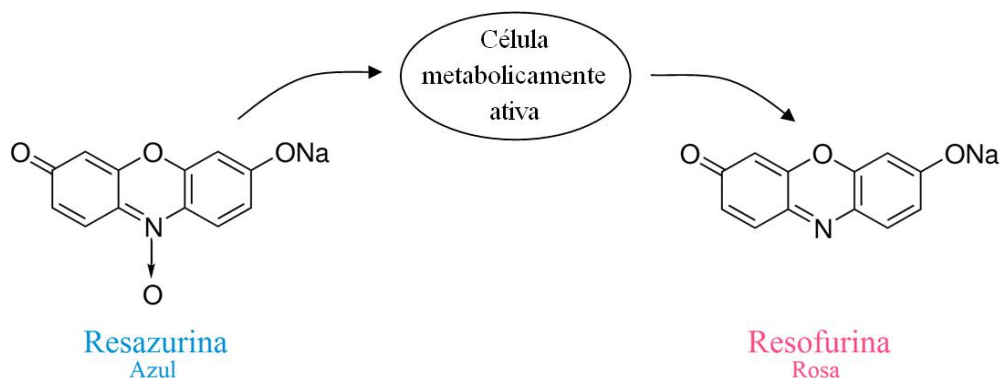
### 1.4.2. Atividade metabólica do biofilme

Como mencionado anteriormente, a técnica utilizando o corante cristal violeta não é capaz de diferenciar entre células viáveis e não viáveis. Dessa forma, para a análise da susceptibilidade do biofilme a antimicrobianos, ou seja, avaliar a capacidade dos antimicrobianos inibirem o biofilme já formado torna-se necessária a análise de viabilidade do biofilme, realizado por ensaios metabólicos. Tendo isso em vista, foi realizado o ensaio metabólico com corante resazurina para a quantificação da viabilidade dos micro-organismos do biofilme após o tratamento com antimicrobianos. Esse tipo de técnica avalia indiretamente

a viabilidade celular, uma vez que detecta a formação de produtos intermediários pelas bactérias presentes no biofilme (Gomes, 2011).

O corante resazurina, também chamado de Alamar Blue (O'Brien *et al.*, 2000; Gomes, 2011; Johnston *et al.*, 2016), possui coloração azul escuro e, ao ser reduzido por FMNH<sub>2</sub>, FADH<sub>2</sub>, NADH, NADPH e citocromo através da transferência de elétrons, forma a resofurina, fluorescente e rosa. Posteriormente a resofurina é reduzida a hidroresofurina, a qual é não fluorescente e incolor (O'Brien *et al.*, 2000; Pettit *et al.*, 2005; Mariscal *et al.*, 2009; Pettit *et al.*, 2009; Gomes, 2011; Bonnier *et al.*, 2015).

O crescimento celular irá manter o meio reduzido (rosa e fluorescente), enquanto que a inibição do crescimento celular mantém o meio oxidado (azul e não fluorescente) Dessa forma, esse é um ensaio fluorimétrico e colorimétrico, uma vez que tanto a fluorescência quanto a coloração são alteradas em função da redução química no meio de cultura na presença de células viáveis (Pettit *et al.*, 2009). Sendo assim, mensurar a fluorescência ou a absorbância do corante resazurina resulta na quantificação da viabilidade do biofilme (Gomes, 2011), fornecendo uma estimativa do efeito dos antimicrobianos sobre as células do biofilme (Bockstael *et al.*, 2009). Os resultados podem ser coletados a olho nu ou, para aumentar a sensibilidade, através de espectrômetros de fluorescência ou de absorbância (Pettit *et al.*, 2009).



**Figura 2. Representação esquemática da conversão por oxiredução do corante resazurina para resofurina por células metabolicamente ativas. Autoria própria.**

Esse corante é solúvel em água, portanto, diferente dos outros métodos, não são necessárias as etapas de lavagem, fixação e extração, sendo muito mais simples. A grande vantagem desse método em comparação com os outros métodos, como XTT, é a sua ausência de toxicidade, tanto para o investigador, quanto para as células de interesse. Dessa forma, possui maior segurança de trabalho, maior facilidade de eliminação, menor interferência sobre

o metabolismo normal das células em análise e permite realizar o plaqueamento diretamente após a leitura da absorbância ou fluorescência (Pettit *et al.*, 2005; Bockstael *et al.*, 2009; Pettit *et al.*, 2009). Somado a isso, a resazurina é estável, permitindo longos períodos de incubação e estudos cinéticos, reprodutível e com excelente correlação com outros métodos de suscetibilidade de biofilmes, como XTT e CFU/mL (Pettit *et al.*, 2009).

## 1.5. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a permanência da contaminação bacteriana em peles alógenas após o tratamento antimicrobiano ter sido realizado, é de suma importância avaliar a participação do biofilme nesse processo, uma vez que estudos mostram bactérias na forma de biofilme como mais tolerantes aos tratamentos antimicrobianos. Ademais, o tratamento realizado atualmente utiliza coquetéis de antimicrobianos cujos alvos não são células dispostas na forma séssil. As amostras de peles alógenas, portanto, podem estar contaminadas com bactérias formadoras de biofilme, explicando a dificuldade de o tratamento antimicrobiano eliminar esta contaminação. Esse trabalho apresenta maior relevância devido à ausência de estudos na literatura que avaliem a formação de biofilme em peles alógenas e a importância desse fator na persistência da contaminação bacteriana nestes tecidos.

## 1.6. OBJETIVOS

### 1.6.1. Objetivo geral

Verificar se a formação de biofilme por bactérias isoladas de peles alógenas reduz a susceptibilidade a antimicrobianos interferindo na eficiência dos processos já estabelecidos para tratamento antimicrobiano do Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – RS

### 1.6.2. Objetivos específicos

Detectar e quantificar a formação de biofilme quanto à biomassa por bactérias isoladas de peles alógenas já descartadas por contaminação bacteriana pelo Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – RS

Determinar a concentração inibitória mínima (MIC), a concentração inibitória mínima do biofilme (MBIC) e a concentração mínima de erradicação do biofilme (MBEC) de bactérias isoladas de peles alógenas frente aos antimicrobianos gentamicina, penicilina e tetraciclina *in vitro*;

Comparar viabilidade das bactérias em análise entre o estado planctônico e o estado de biofilme, diante do tratamento com os antimicrobianos gentamicina, penicilina e tetraciclina;

## 2. ARTIGO CIENTÍFICO

Microbiologia Clínica

### SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS EM BIOFILME ISOLADAS DE PELES HUMANAS PARA ALOENXERTO

Micaela do Canto Canabarro<sup>1</sup>, Karine Lena Meneghetti<sup>1</sup>, Gertrudes Corção<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmento Leite 500, 90050-170, Porto Alegre, Brasil.

#### RESUMO

Os bancos de pele enfrentam um grave problema devido ao elevado número de descartes de peles alógenas humanas devido à persistência de contaminação antimicrobiana após tratamento antimicrobiano. Fatores como a formação de biofilme por esses micro-organismos podem estar contribuindo para a persistência bacteriana após tratamento. O presente estudo analisou isolados bacterianos de amostras de pele de doador cadáver já descartadas pelo Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem do hospital Santa Casa de Porto Alegre – RS quanto a capacidade de formação de biofilme e susceptibilidade aos antimicrobianos penicilina, tetraciclina e gentamicina através dos métodos de quantificação da biomassa por cristal violeta e determinação da concentração inibitória mínima (MIC), concentração mínima inibitória do biofilme (MBIC) e concentração mínima de erradicação do biofilme (MBEC) pelo método de microdiluição em caldo com corante resazurina. Os resultados obtidos mostram 94,45% dos isolados como formadores de biofilme em diferentes graus de aderência. Foi observado um aumento do MBIC em relação ao MIC e do MBEC em relação ao MBIC de pelo menos 512 vezes. Esses resultados apontam a formação de biofilme como um fator que leva ao aumento da tolerância aos antimicrobianos. Dessa forma os novos tratamentos em bancos de pele devem levar em consideração a presença de bactérias com a capacidade de formação de biofilme.

Palavras-chave: Biofilme, banco de pele, resazurina, MBIC, MBEC.

## 29 INTRODUÇÃO

30 Peles alógenas humanas são utilizadas em todo o mundo para a realização de enxertos  
31 principalmente em pacientes queimados.<sup>1</sup> Elas promovem o fechamento temporário de feridas  
32 crônicas e de queimaduras de segundo e terceiro grau.<sup>2-4</sup> O aloenxerto de pele irá formar uma  
33 barreira mecânica e biológica, atuando na cicatrização precoce de lesões, redução da perda de  
34 água, eletrólitos, proteínas e calor, bem como menor taxa de infecção e troca de curativos.<sup>3,5,6</sup>

35 Sua utilização, todavia, possui limitações devido à falta de doadores cadáveres e  
36 presença de potenciais patógenos no tecido<sup>5</sup> como bactérias de origem endógena (microbiota  
37 própria do doador) ou exógena (ambiente mortuário, equipe de recuperação do tecido<sup>7</sup> ou  
38 ambiente cirúrgico<sup>8</sup>).

39 No intuito de evitar a transmissão desses patógenos através da pele para o paciente  
40 receptor,<sup>5,6</sup> as peles são armazenadas em bancos de pele, onde passam por uma série de  
41 exames microbiológicos a fim de manter maior controle de qualidade e de segurança.<sup>2,3</sup> Até o  
42 momento, não existe padronização entre os bancos de pele na metodologia de  
43 descontaminação das peles alógenas humanas quanto aos antimicrobianos incluídos nos  
44 coquetéis e quanto às doses a serem utilizadas.<sup>1,9</sup> O Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem  
45 do Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, da mesma forma que  
46 outros bancos de pele,<sup>3,4,10</sup> enfrenta o grave problema do elevado número de descartes devido  
47 a persistência da contaminação bacteriana. Estudos anteriores, todavia, apontam que as  
48 bactérias são suscetíveis aos antimicrobianos utilizados no tratamento pelos bancos de pele.  
49 Sendo assim, outros fatores, que não a resistência desses isolados bacterianos aos  
50 antimicrobianos, podem estar influenciando na persistência desses micro-organismos após o  
51 tratamento antimicrobiano.

52 Sabe-se que bactérias no estado de biofilme apresentam uma maior tolerância aos  
53 antimicrobianos, sendo de 10 a 1000 vezes mais tolerantes que bactérias no estado  
54 planctônico.<sup>11-16</sup> Os mecanismos de tolerância do biofilme envolvem peculiaridades do seu



55 próprio desenvolvimento e estrutura, como a presença de uma matriz extracelular com carga  
56 negativa, formação de gradientes de concentração de nutrientes e oxigênio no seu interior,  
57 maior facilidade na transferência de genes de resistência, aumento na expressão de bombas de  
58 efluxo e presença de células *persisters*.<sup>12,13,17,18</sup> Somado a isso, os antimicrobianos utilizados  
59 atualmente foram desenvolvidos para atuar sobre células no estado planctônico, ou seja, não  
60 foram desenvolvidos para atuar sobre a arquitetura do biofilme e por isso não são efetivos  
61 sobre células nesse estado.<sup>19</sup>

62 A presença de biofilme em outros tipos de enxertos, como vasculares<sup>20</sup> e ósseos  
63<sup>21</sup> já foi descrita em estudos anteriores. Além disso, os gêneros *Staphylococcus* e *Bacillus*,  
64 mais prevalentes em peles alógenas,<sup>3,6,22</sup> apresentam espécies formadoras de biofilmes.<sup>23-26</sup>  
65 Não existem, contudo, estudos que avaliem a formação de biofilme por bactérias isoladas  
66 diretamente de peles alógenas humanas.

67 Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo Verificar se a formação  
68 de biofilme por bactérias isoladas de peles alógenas reduz a susceptibilidade a  
69 antimicrobianos interferindo na eficiência dos processos já estabelecidos para tratamento  
70 antimicrobiano do Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem do Hospital Santa Casa de  
71 Misericórdia de Porto Alegre – RS

72

## 73 **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 74 **ASPECTOS ÉTICOS**

75

76 Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade da Santa  
77 Casa de Misericórdia de Porto Alegre (CEP/ISCOMPA) (protocolo CAAE  
78 45100215.1.0000.5335, parecer 1.092.445) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da  
79 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEP/UFRGS) (protocolo CAAE  
80 36949514.8.0000.5347, parecer 936.163). A remoção e doação da pele dos doadores foram

81 autorizadas por parentes próximos dos doadores. A requisição destes tecidos para pesquisa foi  
82 solicitada e autorizada pela chefia responsável do Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem do  
83 Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

#### 84 ISOLADOS BACTERIANOS

85

86 Os isolados de *Staphylococcus* sp. (n=103) e *Bacillus* sp. (n=113) utilizados nesse  
87 trabalho foram isolados em estudo prévio (dados não publicados) a partir de 21 amostras de  
88 pele de doador cadáver disponibilizadas pelo Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem do  
89 hospital Santa Casa de Porto Alegre – RS, descartadas na triagem inicial e/ou pós-  
90 processamento por cultura positiva com microrganismos não aceitáveis e/ou pela persistência  
91 de contaminação do tecido por bactérias saprófitas após primeiro tratamento com penicilina e  
92 estreptomicina e segundo tratamento com vancomicina. Dentre os 103 isolados de  
93 *Staphylococcus* sp. e 113 isolados de *Bacillus* sp. utilizados neste trabalho, 2 (1,94%) isolados  
94 de *Staphylococcus* e 33 (29,20%) isolados de *Bacillus* não puderam ser identificados a nível  
95 de espécie em estudo prévio através da metodologia de *Matrix Assisted Laser Desorption*  
96 *Ionization – Time of Flight* (Microflex Biotyper 4.0, Bruker) devido ao *score* obtido abaixo do  
97 ponto de corte de confiabilidade (2.0) e também devido a possível ausência de espectro dos  
98 isolados não identificados nos software do equipamento.

#### 99 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA DO BIOFILME

100

101 A detecção e quantificação da biomassa do biofilme foi realizada de acordo com o  
102 método Stepanovic *et al* (2000)<sup>27</sup> modificado.

103 Foram avaliados 216 isolados bacterianos, os quais foram previamente semeados em  
104 ágar tripton de soja (TSA) e incubados a 37°C durante 24 horas. A partir do TSA, os  
105 isolados foram ajustados a turbidez 0,5 da escala de Mc Farland em salina 0,9% estéril. Em  
106 seguida, 20 µL destas suspensões foram adicionadas em octoplicata juntamente com 180 µL

107 de caldo soja tripticaseína (TSB) em placas de cultura de tecidos de poliestireno de 96 poços e  
108 fundo plano, sendo então incubadas a 37°C por 24 horas. No controle positivo foi adicionado  
109 20 µL da suspensão de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) em salina e 180 µL de  
110 caldo TSB, enquanto que no controle negativo adicionou-se 200 µL de caldo TSB. Os poços  
111 foram aspirados e lavados três vezes com 300 µL de solução salina estéril. As placas foram  
112 levemente agitadas, a fim de remover todas as bactérias não aderentes. As células que  
113 permanecerem aderidas ao fundo do poço e às paredes da placa foram fixadas com 200 µL de  
114 metanol 99%. Após 15 minutos, as placas foram esvaziadas e deixadas secar para posterior  
115 coloração dos poços com 200 µL do corante cristal violeta a 2% por 5 minutos. O excesso de  
116 corante foi retirado com lavagem dos poços com água corrente. Após deixar secar as placas, o  
117 corante foi solubilizado com 160 µL de etanol a 100%. Ao final, realizou-se a leitura da  
118 densidade óptica (OD) de cada poço em espectrofotômetro em comprimento de onda de 570  
119 nm.

120 Os isolados foram classificados em 4 categorias de acordo com os valores de OD dos  
121 biofilmes bacterianos. A OD ponto de corte ( $OD_c$ ) para o teste é definido como três desvios  
122 padrão acima da média da OD do controle negativo cujo poço da placa conterá apenas o caldo  
123 TSB. A classificação foi interpretada da seguinte maneira:  $OD \leq OD_c$  não aderente;  $OD C <$   
124  $OD \leq 2 \times OD_c$  fracamente aderente;  $2 \times ODC < OD < 4 \leq OD_c$  moderadamente aderente;  $4 \times$   
125  $ODC < OD$  fortemente aderente.

126 A classificação dos isolados, obtida através desse método, foi utilizada como forma de  
127 seleção dos isolados a serem analisados quanto à viabilidade celular no estado planctônico e  
128 de biofilme, sendo selecionadas bactérias formadoras de biofilme em diferentes níveis de  
129 aderência.

130 DETERMINAÇÃO DE VIABILIDADE DE BACTÉRIAS EM ESTADO PLANCTÔNICO  
131 FRENTE A ANTIMICROBIANOS

132

133 Foram selecionados 12 isolados bacterianos (6 *Staphylococcus* sp. e 6 *Bacillus* sp.)  
134 com diferentes perfis de susceptibilidade a antimicrobianos (analisados em estudo prévio) que  
135 incluem as três classificações de formação de biofilme e a variedade de espécies presentes nas  
136 peles alógenas para análise quanto viabilidade no estado planctônico através da determinação  
137 da concentração inibitória mínima (MIC) frente aos antimicrobianos gentamicina, tetraciclina  
138 e penicilina por microdiluição em caldo de acordo com as normas do CLSI (2015)<sup>28</sup> para  
139 *Staphylococcus* sp. e do CLSI-M45 (2010)<sup>29</sup> para *Bacillus* sp., em conjunto com utilização do  
140 corante resazurina, de acordo com Pettit *et al* (2005)<sup>30</sup> modificado.

141 Os antimicrobianos tetraciclina e gentamicina mostraram, em estudo anterior ( dados  
142 não publicados), serem efetivos sobre todas as bactérias isoladas de peles alógenas em análise,  
143 permitindo então a comparação quanto à tolerância entre células no estado planctônico e em  
144 biofilme e, além disso, sendo promissores antimicrobianos para utilização no Banco de Pele  
145 Dr. Roberto Corrêa Chem. A penicilina por sua vez é um dos antimicrobianos mais utilizado  
146 entre os bancos de pele<sup>9</sup> e foi utilizada a fim de comparação com o tratamento já realizado no  
147 banco de pele.

148 Os antimicrobianos gentamicina, tetraciclina e penicilina foram diluídos em série em  
149 caldo Mueller Hinton cátion-ajustado (CMHII) a partir da concentração 512 a 1 ug/mL.  
150 Utilizando placas de cultura de tecidos de poliestireno de 96 poços e fundo plano foi  
151 adicionado 100 µL de CMHII com antimicrobiano de cada concentração e 5 µL da diluição  
152 do isolado. Após incubação de 24h a 35°C, foram adicionados 10,5 µL (10% do volume total)  
153 do corante resazurina 20 µM, filtrado previamente com filtro 0,22 µm, e a placa foi incubada  
154 a 37°C durante o tempo específico para cada isolado determinado por padronização (dados  
155 não mostrados). Em seguida foi realizada a leitura visual da placa e leitura da absorbância nos  
156 comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm. A diferença percentual na redução do corante

157 entre o poço tratado e o controle positivo não tratado foi utilizada para determinar a MIC,  
 158 definida como a menor concentração do antimicrobiano onde houve inibição  $\geq$  a 80% da  
 159 atividade metabólica do poço teste em relação ao controle positivo não tratado e determinada  
 160 através da fórmula a seguir:

161

$$162 \frac{(\varepsilon_{ox})\lambda_2 A \lambda_1 - (\varepsilon_{ox})\lambda_1 A \lambda_2 \text{ do poço teste tratado}}{(\varepsilon_{ox})\lambda_2 A^o \lambda_1 - (\varepsilon_{ox})\lambda_1 A^o \lambda_2 \text{ do controle positivo não tratado}} \times 100$$

163 Onde  $\varepsilon_{ox}$  = coeficiente de extinção molar da forma oxidada do corante resazurina; A =  
 164 absorvância dos poços de teste;  $A^o$  = absorvância do poço do controle positivo não tratado;  
 165  $\lambda_1 = 570\text{nm}$ ;  $\lambda_2 = 600\text{ nm}$ .

166 No controle positivo não tratado foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de CMHII sem antimicrobiano  
 167 e 5  $\mu\text{L}$  da diluição do isolado em salina. No controle negativo, por sua vez, adicionou-se 105  
 168  $\mu\text{L}$  de CMHII com antimicrobiano em cada uma das diluições a fim de detectar possível  
 169 interação entre o antimicrobiano e o corante, produzindo falsos positivos. No controle de  
 170 esterilidade foi adicionado 105  $\mu\text{L}$  de CMHII. Em todos os controles foi adicionado 10,5  $\mu\text{L}$   
 171 do corante resazurina. A determinação do MIC foi realizada em triplicata para todos os  
 172 isolados em análise.

#### 173 DETERMINAÇÃO DE VIABILIDADE DE BACTÉRIAS NA FORMA DE BIOFILME 174 FRENTE A ANTIMICROBIANOS

175

176 A determinação da viabilidade dos isolados na forma de biofilme foi realizada de  
 177 acordo com o método de Pettit *et al* (2005)<sup>30</sup> e Flemming *et al* (2009)<sup>31</sup>, com modificações.  
 178 Realizou-se a determinação da concentração mínima inibitória do biofilme (MBIC) pelo  
 179 método de microdiluição em caldo em conjunto com o corante resazurina e concentração  
 180 mínima de erradicação do biofilme (MBEC) pelo método de plaqueamento. Nessa análise  
 181 foram utilizados os mesmos isolados bacterianos avaliados quanto à viabilidade no estado

182 planctônico frente aos mesmos antimicrobianos, sendo eles penicilina, tetraciclina e  
183 gentamicina.

184 Os isolados bacterianos foram semeados em TSA e incubados a 37°C durante 24  
185 horas. A partir do TSA, os isolados foram ajustados quanto a turbidez 6 da escala de Mc  
186 Farland (aproximadamente  $1,8 \times 10^9$  unidades formadoras de colônia (UFC)/mL), utilizando-  
187 se caldo TSB. Em placas de cultura de tecidos de poliestireno de 96 poços e fundo plano foi  
188 adicionado em cada poço 200 µL de caldo TSB na presença do isolado em análise e incubado  
189 por 24h a 37°C com o propósito de formar o biofilme. No controle positivo foi adicionado  
190 200µL de caldo TSB com o isolado em análise sem tratamento, enquanto que no controle  
191 negativo e de esterilidade foi adicionada a mesma quantidade apenas de caldo TSB.

192 Após a incubação, realizou-se a lavagem três vezes com 200 µL de salina estéril 0,9%,  
193 a fim de retirar as células planctônicas presentes no caldo de incubação e permanecer apenas  
194 os micro-organismos aderidos à placa, e se deixou a placa secar. Então, foi adicionado 200 µL  
195 de CMHII com os antimicrobiano gentamicina, tetraciclina e penicilina nas concentrações de  
196 512 a 1 ug/mL, separadamente. O controle positivo continha 200 µL de CMHII sem  
197 antimicrobiano. O controle negativo, por sua vez, possuía 200 µL de CMHII com  
198 antimicrobiano em cada uma das diluições a fim de detectar possível interação entre o  
199 antimicrobiano e o corante. No controle de esterilidade foi adicionado apenas 200 µL de  
200 CMHII.

201 Posteriormente a incubação de 24h a 35°C, adicionou-se 20 µL (10% do volume total)  
202 do corante resazurina 20µM filtrado em todos os poços e incubou-se por 1h a 37°C. Após, foi  
203 realizada a leitura tanto visual da placa, como por absorvância nos comprimentos de onda de  
204 570 nm e 600 nm. A diferença percentual na redução do corante entre o poço tratado e o  
205 controle positivo não tratado foi determinada através da fórmula descrita anteriormente e  
206 utilizada a fim de determinar o MBIC. O MBIC foi considerado como a menor concentração

207 do antimicrobiano onde houve inibição  $\geq$  a 80% da atividade metabólica do poço teste em  
208 relação ao controle positivo.

209 Em seguida, os poços com coloração azul (indicando ausência de viabilidade celular)  
210 foram raspados e se transferiu diretamente do poço para placa de ágar padrão para contagem  
211 (PCA) 100  $\mu$ L, uma vez que o corante resazurina não é tóxico e permite o plaqueamento  
212 diretamente do poço após a leitura.<sup>32</sup> Após a incubação de 24h a 37°C, realizou-se a análise da  
213 concentração mínima de erradicação do biofilme (MBEC), ou seja, concentração mínima do  
214 antimicrobiano na qual há ausência de crescimento (0 CFU/ml) na placa de ágar PCA,  
215 representando ausência de novo crescimento do biofilme e podendo ser comparado com  
216 ausência da capacidade de nova colonização do biofilme quando no hospedeiro.<sup>14</sup> As análises  
217 de MBIC e do MBEC foram realizadas em triplicata para todos os isolados em análise.

## 218 ANÁLISE ESTATÍSTICA

219

220 Para avaliação de associação entre as variáveis foi utilizado o coeficiente de correlação  
221 de Pearson através do *software* Sigma Plot (13.0). Diferenças foram consideradas  
222 estatisticamente significativas quando a *P* foi menor que 0,05 ( $P < 0,05$ ).

## 223 RESULTADOS

### 224 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA DO BIOFILME

225

226 A classificação dos isolados analisados quanto ao nível de formação de biofilme está  
227 apresentada na tabela 1. Dentre as 216 bactérias isoladas de peles alógenas analisadas, 204  
228 (94,45%) foram formadoras de biofilme em algum grau de aderência e apenas 12 (5,55%) não  
229 produziram biofilme. Foram classificadas como produtoras de biofilme fortemente aderentes  
230 117 (54,17%) dos isolados produtores de biofilme, moderadamente aderente 13 (6,02%) e  
231 fracamente aderentes 74 (34,26%). Dentre as bactérias fortemente aderentes ganham destaque  
232 o gênero *Bacillus* com 31 (26,50%) isolados e a espécie *S. epidermidis* com 24 (20,51%).

233 Quanto as moderadamente aderentes, as mesmas bactérias se destacam, com 2 (15,4%)  
 234 isolados do gênero *Bacillus* sp. e 5 (38,46%) da espécie *S. epidermidis*. No caso da produção  
 235 de biofilme com fraca aderência sobressai a espécie *B. cereus* com 44 (59,46%). Apenas a  
 236 espécie *B. cereus* e as espécies *S. aureus* e *S. haemolyticus* apresentaram isolados não  
 237 produtores de biofilme com 9 (75%), 2 (16,67%) e 1(8,33%) isolados respectivamente dentre  
 238 os isolados não produtores de biofilme.

239

240 Tabela 1. Classificação dos isolados bacterianos analisados quanto ao grau de formação de biofilme.

Identificação Isolado n(%)	Fortemente Aderente n(%)	Moderadamente Aderente n(%)	Fracamente Aderente n(%)	Não Produtor de Biofilme n(%)
<i>S. epidermidis</i> (n: 42)	24 (20,51%)	5 (38,46%)	13 (17,58%)	0
<i>S. aureus</i> (n: 19)	16 (13,67)	1 (7,69%)	0 (0%)	2 (16,67)
<i>S. haemolyticus</i> (n: 13)	9 (7,7%)	0 (0%)	3 (4,05%)	1 (8,33%)
<i>S. lugdunensis</i> (n: 13)	1 (0,85%)	1 (7,69%)	11 (14,86%)	0
<i>S. capitis</i> (n: 12)	11 (9,40%)	1 (7,69%)	0 (0%)	0
<i>S. saprophyticus</i> (n: 2)	2 (1,71%)	0 (0%)	0 (0%)	0
<i>Staphylococcus</i> sp. (n: 2)	2 (1,71%)	0 (0%)	0 (0%)	0
<i>B. cereus</i> (n: 54)	0 (0%)	1 (7,69%)	44 (59,46%)	9 (75%)
<i>B. subtilis</i> (n: 17)	15 (12,82%)	1 (7,69%)	1 (1,35%)	0
<i>B. vallismortis</i> (n: 4)	2 (1,71%)	1 (7,69%)	1 (1,35%)	0
<i>B. licheniformis</i> (n: 4)	4 (3,42%)	0 (0%)	0 (0%)	0
<i>B. pumilus</i> (n:1)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,35%)	0 (0%)
<i>Bacillus</i> sp. (n:33)	31 (26,5%)	2 (15,4%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Total (n: 216)</b>	<b>117 (54,17%)</b>	<b>13 (6,02%)</b>	<b>74 (34,26%)</b>	<b>12 (5,55%)</b>



241

242 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE (MIC, MBIC E MBEC) PARA 12 ISOLADOS  
243 BACTERIANOS APÓS TRATAMENTO ANTIMICROBIANO

244

245 Os valores de MIC variaram de <1 a 128 µg/mL para o antimicrobiano penicilina, de  
246 <1 a 4 µg/mL para tetraciclina e de <1 a 8 µg/mL para gentamicina dentre os isolados  
247 analisadas. Para o antimicrobiano penicilina foram observados valores com maiores variações  
248 e bastantes elevados em comparação aos demais antimicrobianos, destacando-se os isolados  
249 *B. cereus* 794 fracamente e moderadamente aderente (128 µg/mL), *S. aureus* 2542 fracamente  
250 aderente (64 µg/mL), *S. lugdunensis* 3242 moderadamente aderente e *S. capitis* 1482  
251 fortemente aderente (32 µg/mL) com os valores mais elevados ao comparar com os demais  
252 isolados. No caso do antimicrobiano tetraciclina, dois isolados de *B. subtilis* 312 e 36102  
253 ambos fortemente aderentes apresentaram valor de MIC mais elevados (4 µg/mL) e, quanto à  
254 gentamicina, apenas um isolado apresentou valor elevado de MIC, *S. capitis* 1482 fortemente  
255 aderente (8 µg/mL), ambos em comparação aos demais isolados (Tabela 2).

256 Apesar de não ter sido observado para todos os isolados, os três antimicrobianos  
257 testados apresentaram um aumento do MBIC de pelo menos 512 vezes em relação ao MIC.  
258 Os valores de MBIC para o antimicrobiano penicilina variaram de 64 a >512 µg/mL, sendo de  
259 quatro a pelo menos 512 vezes maior em relação ao MIC do mesmo antimicrobiano. Para o  
260 antimicrobiano tetraciclina, houve uma variação do MBIC de 1 a > 512 µg/mL e um aumento  
261 de uma a pelo menos 512 vezes em relação ao MIC desse agente. No caso da gentamicina,  
262 também houve uma variação de <1 a >512 µg/mL no valor de MBIC, entretanto alguns  
263 isolados (*S. lugdunensis* 3242 moderadamente aderente e ambos *B. subtilis* 3122 e 36102  
264 fortemente aderentes) não apresentaram variação entre os valores de MIC e MBIC, enquanto  
265 outros (*S. haemolyticus* 1562 e *S. aureus* 2542 fracamente aderentes, *B. subtilis* 1672  
266 moderadamente aderente e *S. saprophyticus* 1872 fortemente aderente) apresentaram aumento

267 de pelo menos 512 vezes do MBIC em relação ao MIC. Os isolados de *B. pumilus* 2312  
 268 fracamente aderente e *B. subtilis* 36102 fortemente aderente apresentaram os menores valores  
 269 de MBIC (64 µg/mL) para o antimicrobiano penicilina, sendo ele o menor dentre os demais  
 270 para esse antimicrobiano. Quanto aos outros dois antimicrobianos, houve grande variação  
 271 para os valores de MBIC entre as diferentes espécies analisadas.

272

273 **Tabela 2. Resultados obtidos a partir da determinação do MIC, MBIC e MBEC para 12 isolados bacterianos**  
 274 **analisados utilizando os antimicrobianos penicilina, tetraciclina e gentamicina.**

CV	Identificação	PENILICINA			TETRACICLINA			GENTAMICINA		
		MIC	MBIC	MBEC	MIC	MBIC	MBEC	MIC	MBIC	MBEC
Fracamente Aderente	<i>S. haemolyticus</i> 1562	<1	>512	>512	<1	>512	>512	<1	>512	>512
	<i>S. aureus</i> 2542	64	>512	>512	<1	32	256	<1	>512	>512
	<i>B. cereus</i> 794	128	>512	>512	<1	4	256	<1	16	>512
	<i>B. pumilus</i> 2312	<1	64	64	<1	1	512	<1	1	256
Moderadamente Aderente	<i>S. epidermidis</i> 27134	16	>512	>512	<1	2	256	<1	1	>512
	<i>S. lugdunensis</i> 3242	32	>512	>512	1	2	64	1	1	>512
	<i>B. cereus</i> 842	128	>512	>512	<1	1	128	<1	2	>512
	<i>B. subtilis</i> 1672	4	>512	>512	1	>512	512	1	>512	128
Fortemente Aderente	<i>S. capitis</i> 1482	32	>512	>512	<1	>512	256	8	>512	>512
	<i>S. saprophyticus</i> 1872	<1	>512	>512	<1	>512	256	<1	>512	>512
	<i>B. subtilis</i> 3122	<1	256	>512	4	32	>512	<1	<1	128
	<i>B. subtilis</i> 36102	<1	64	64	4	8	32	<1	<1	64

275 **Legenda: CV = classificação do isolado quanto ao nível de aderência; Valores expressos em µg/mL.**

276

277 Os valores de MBEC também apresentaram um aumento de pelo menos 512 vezes em  
 278 relação ao MBIC para os antimicrobianos tetraciclina e gentamicina. Para o antimicrobiano  
 279 penicilina, o MBEC variou da mesma forma que os valores do MBIC, de 64 a >512 µg/mL, e  
 280 dessa forma não houve variação entre eles. O menor valor de MBEC para o antimicrobiano  
 281 penicilina foi apresentados pelas espécies *B. pumilus* 2312 fracamente aderente e *B. subtilis*

282 1672 moderadamente aderente (64 µg/mL). Para o antimicrobiano tetraciclina, os valores de  
283 MBEC encontrados estão entre 32 e >512 µg/mL. Os isolados *S. haemolyticus* 1562  
284 fracamente aderente não apresentou variação entre os valores de MBIC e de MBEC, enquanto  
285 para os demais houve um aumento de 4 a pelo menos 512 vezes do MBEC em relação ao  
286 MBIC. Para tetraciclina, as espécies *S. lugdunensis* 3242 moderadamente aderente (64  
287 µg/mL) e *B. subtilis* 3122 fortemente aderente (32 µg/mL) ganharam destaque pelo reduzido  
288 valor de MBEC em comparação os demais isolados. Quanto à gentamicina houve variação de  
289 64 a >512 µg/mL dentre os isolados analisados, sendo o MBEC de 32 a pelo menos 512 vezes  
290 maior que o MBIC para todos os isolados, exceto isolados de *Staphylococcus* fracamente e  
291 fortemente aderentes que apresentaram valores iguais de MIC e MBIC. O isolado de *B.*  
292 *subtilis* 36102 fortemente aderente destacou-se devido ao menor valor de MBEC para esse  
293 antimicrobiano (64 µg/mL).

294 Os isolados do gênero *Staphylococcus* fortemente aderentes e o de *B. subtilis* 1672  
295 moderadamente aderente apresentaram valores de MBEC menores em relação aos valores de  
296 MBIC para os antimicrobianos tetraciclina e/ou gentamicina. Os isolados de *Staphylococcus*  
297 fortemente aderentes apresentaram MBIC de >512 µg/mL e MBEC 256 µg/mL para  
298 tetraciclina. O isolado *B. subtilis* 1672 moderadamente aderente exibiu MBIC de >512 µg/mL  
299 e MBEC de 512 para tetraciclina e para gentamicina >512 µg/mL e 128 µg/mL de MBIC e  
300 MBEC, respectivamente.

301 Não foi observada correlação entre a biomassa quantificada por cristal violeta e a  
302 atividade metabólica avaliada pelo corante resazurina para os antimicrobianos penicilina (P =  
303 0,668), tetraciclina (P = 0,102) e gentamicina (P = 0,275).

304

305 **DISCUSSÃO**

306

307 Os bancos de pele enfrentam um grave problema com o alto número de descartes  
308 realizados principalmente devido à presença de contaminação bacteriana em peles alógenas  
309 humanas para enxertia.<sup>33</sup> Essas peles, muitas vezes, mesmo após a realização de tratamento  
310 antimicrobiano, continuam apresentando contaminação bacteriana.<sup>3,4,10</sup> Sabe-se que bactérias  
311 no estado de biofilme são mais tolerantes aos antimicrobianos quando comparadas ao estado  
312 planctônico<sup>11-16</sup>, entretanto até o momento existem apenas estudos que mostram a presença de  
313 algumas espécies de bactérias em peles alógenas humanas<sup>3,6,22</sup> e outros estudos<sup>23-26</sup> que  
314 mostram essas espécies como formadoras de biofilmes. Não existe, contudo, estudos que  
315 tenham realizado a avaliação da formação de biofilme por bactérias isoladas diretamente de  
316 peles alógenas humanas para transplante e é nesse cenário que está o presente trabalho.

317 Através do método de coloração por Cristal Violeta foi possível determinar e  
318 quantificar a formação de biofilme por bactérias isoladas de peles alógenas humanas. Os  
319 resultados mostram que grande parte (94,45%) das bactérias isoladas de diferentes espécies  
320 são formadoras de biofilme em diferentes graus de aderência e apenas uma pequena porção  
321 (5,55%) não formou biofilme. Ademais, dentre as formadoras de biofilme, a maioria (54,17%)  
322 foi fortemente aderente. Esses dados são de suma importância, uma vez que estão de acordo  
323 com a nossa hipótese de que o biofilme seja um dos fatores para a persistência de  
324 contaminação bacteriana nos bancos de pele, mesmo após os tratamentos aplicados.

325 A fim de avaliar a diferença entre a concentração inibitória mínima no estado  
326 planctônico (MIC) e no estado de biofilme (MBIC), foi realizado o método de microdiluição  
327 em caldo com o corante resazurina para viabilidade celular. Apesar de não ter sido observado  
328 para todos os isolados, algumas células bacterianas analisadas na forma de biofilme  
329 apresentaram um aumento na concentração inibitória mínima dos antimicrobianos de pelo

330 menos 512 vezes em relação ao seu estado planctônico para todos os antimicrobianos para  
331 todos os antimicrobianos.

332 Tendo em vista que algumas espécies de *Staphylococcus* (*S. haemolyticus* 1562 e  
333 *S. aureus* 2542 fracamente aderentes; *S. capitis* 1482 e *S. saprophyticus* 1872 fortemente  
334 aderentes) apresentaram MIC <1 µg/mL em conjunto com MBIC >512 µg/mL para alguns  
335 dos antimicrobianos testados, a relação entre o MIC e MBIC poderá ser ainda maior que 512  
336 vezes ao testar concentrações inferiores a 1 µg/mL e superiores a 512 µg/mL. Da mesma  
337 maneira, os isolados analisados (*S. lugdunensis* 3242 moderadamente aderente e espécies de  
338 *Bacillus* fortemente aderentes) que apresentaram valores iguais de MIC e MBIC de <1 µg/mL  
339 e, portanto, não apresentaram aumento do MBIC em relação ao MIC, ao serem testados em  
340 concentrações inferiores a 1 µg/mL poderão exibir aumento nessa relação.

341 Os resultados do presente trabalho estão de acordo com estudos anteriores da literatura  
342 que destacam o aumento da tolerância das células quando em biofilme, causando a  
343 necessidade de utilização de maiores concentrações de antimicrobiano para eliminação dessas  
344 bactérias. Oliver *et al* (2016)<sup>34</sup> observou aumento do MBIC em duas diluições em relação ao  
345 MIC. Pettit *et al* (2005)<sup>30</sup> relatou MBIC superior ao MIC em pelo menos sete vezes. Pettit *et*  
346 *al* (2009)<sup>35</sup> obteve um aumento na relação MBIC/MIC de no mínimo cinco vezes. Mottola *et*  
347 *al* (2016)<sup>36</sup> encontrou valores de MBIC muito mais elevados do que o respectivo MIC, sendo  
348 de duas e cinco mil vezes maior para o antimicrobiano gentamicina, e valores de MBEC de  
349 pelo menos duas vezes maiores que os valores de MBIC.

350 A partir dos valores de MIC encontrados no presente estudo, foi possível observar que  
351 as células bacterianas no estado planctônico são mais suscetíveis aos antimicrobianos  
352 tetraciclina e gentamicina, quando em comparação ao antimicrobiano penicilina, uma vez que  
353 as concentrações necessárias para causar inibição do crescimento bacteriano foram maiores  
354 para esse antimicrobiano.

355 Para a realização da enxertia a pele alógena deverá estar estéril posto que os pacientes  
356 receptores com frequência estão imunodeprimidos.<sup>6</sup> Assim sendo, é de suma importância  
357 determinar a concentração mínima de erradicação do biofilme (MBEC), a qual representa a  
358 ausência da capacidade de nova colonização do biofilme.

359 Para um mesmo isolado bacteriano analisado, as concentrações de MBEC foram de  
360 maneira geral superiores às de MBIC para o respectivo antimicrobiano. Uma das possíveis  
361 causas é a formação de esporos pelas bactérias do gênero *Bacillus*, aos quais terapias  
362 antimicrobianas não são efetivas em eliminar e ao realizar o plaqueamento para análise do  
363 MBEC poderá ocorrer o processo de germinação, levando a formação de novas colônias.<sup>37</sup>  
364 Outro fator contribuinte pode ser a presença de células *persisters*, as quais possuem  
365 crescimento lento ou ausente e, conseqüentemente, menor suscetibilidade a ação de  
366 antimicrobianos.<sup>18,38</sup> Células suscetíveis aos antimicrobianos após a utilização de terapia  
367 antimicrobiana serão eliminadas, enquanto que as células *persisters* irão sobreviver e alterar  
368 seu fenótipo, recolonizando o ambiente.<sup>11,18</sup>

369 A partir dos resultados obtidos para MBEC é possível observar a necessidade de  
370 concentrações mais elevadas para o antimicrobiano penicilina causar erradicação das células  
371 bacterianas no estado de biofilme em comparação aos outros dois antimicrobianos analisados.  
372 Isso pode ser devido à resistência aumentada das células no estado planctônico, observado  
373 pelos valores elevados de MIC obtidos, ou em virtude da presença de enzimas  $\beta$ -lactamases  
374 na matriz do biofilme que aumentam a tolerância do biofilme aos antimicrobianos  $\beta$ -  
375 lactâmicos através da inativação desses agentes ao penetrar no biofilme.<sup>15,18</sup> Esse resultado é  
376 extremamente importante uma vez que a penicilina é um dos antimicrobianos utilizados no  
377 Banco de Pele em questão, na concentração de 625  $\mu\text{g/mL}$  juntamente com estreptomicina  
378 (200mg/mL) e resultados de MBEC mostraram que apenas dois isolados não apresentaram  
379 MBEC de  $>512 \mu\text{g/mL}$  para a penicilina. O antimicrobiano estreptomicina não atua sozinho,

380 sendo necessária a utilização em conjunto com outro antimicrobiano, no caso do Banco de  
381 Pele aplica-se penicilina. Entretanto, visto que a penicilina não está sendo efetiva, a  
382 estreptomicina também não será capaz de agir. Pode-se inferir, portanto, que o tratamento  
383 atualmente realizado pelo Banco de Pele não está sendo efetivo sobre as bactérias no estado  
384 de biofilme.

385 Tendo em vista que o MBEC analisa a erradicação do biofilme, onde há ausência de  
386 novo crescimento, e o MBIC, a inibição  $\geq$  a 80% na atividade metabólica celular, os valores  
387 de MBEC deverão ser superiores aos de MBIC. Todavia, os isolados de *Staphylococcus*  
388 fortemente aderente para a tetraciclina e de *B. subtilis* 1672 moderadamente aderente para  
389 tetraciclina e gentamicina apresentaram valores de MBIC superiores aos do MBEC.  
390 Antimicrobianos carregados positivamente, como aminoglicosídeos e tetraciclina, poderão se  
391 ligar à matriz negativa do biofilme e, no momento do plaqueamento para análise do MBEC,  
392 serem levados juntamente com as células bacterianas do biofilme, inibindo o novo  
393 crescimento em ágar PCA. A fim de evitar esse problema, é possível realizar uma lavagem  
394 previamente ao plaqueamento em ágar PCA.

395 A ausência de correlação entre o nível de aderência do biofilme quantificado por  
396 cristal violeta e a viabilidade celular após terapia antimicrobiana já foi descrita em alguns  
397 estudos.<sup>39,40</sup> Outro estudo, todavia, encontrou correlação entre essas variáveis e mencionou a  
398 diferença no modo de classificação como possível causa da discrepância.<sup>31</sup>

399 Poucos autores abordam a possível existência de biofilme em peles alógenas. Tendo  
400 isso em vista, o planejamento dos tratamentos atualmente realizados tem como base a  
401 existência apenas de células no estado planctônico, não levando em consideração mecanismos  
402 de erradicação de células no estado de biofilme. Como pode ser observado através dos  
403 resultados de viabilidade celular deste trabalho, a determinação do MIC não é uma  
404 metodologia adequada para elaboração de tratamento quando na presença de biofilme em

405 peles alógenas humanas. Dessa forma, os tratamentos para peles alógenas humanas a serem  
 406 utilizados em bancos de peles devem ser elaborados tendo em vista a presença de bactérias  
 407 formadoras de biofilme e assim determinar concentrações de antimicrobianos adequadas e/ou  
 408 a implantação de técnicas e agentes, como sonicação e ácido peracético<sup>1</sup>, já conhecidas por  
 409 serem efetivas sobre esse estado bacteriano.

410 Diante do exposto, é de suma importância que mais estudos avaliem a formação de  
 411 biofilme por bactérias isoladas diretamente de peles alógenas e que novos tratamentos sejam  
 412 elaborados já pensando na erradicação de bactérias no estado de biofilme.

### 413 REFERÊNCIAS

- 414 1. Johnston C, Callum J, Mohr J, *et al.* Disinfection of human skin allografts in tissue  
 415 banking: a systematic review report. *Cell Tissue Bank.* 2016;17(4):585-592.
- 416 2. Singh R, Singh D, Singh A. Radiation sterilization of tissue allografts: A review.  
 417 *World J Radiol.* 2016;8(4):355-369.
- 418 3. Pirnay JP, Verween G, Pascual B, *et al.* Evaluation of a microbiological screening and  
 419 acceptance procedure for cryopreserved skin allografts based on 14 day cultures. *Cell*  
 420 *Tissue Bank.* 2012;13(2):287-295.
- 421 4. Gaucher S, Khaznadar Z, Gourevitch JC, Jarraya M. Skin donors and human skin  
 422 allografts: evaluation of an 11-year practice and discard in a referral tissue bank. *Cell*  
 423 *Tissue Bank.* 2016;17(1):11-19.
- 424 5. Obeng MK, McCauley RL, Barnett JR, Hegggers JP, Sheridan K, Schutzler SS.  
 425 Cadaveric allograft discards as a result of positive skin cultures. *Burns.*  
 426 2001;27(3):267-271.
- 427 6. Pianigiani E, Ierardi F, Cuciti C, Brignali S, Oggioni M, Fimiani M. Processing  
 428 efficacy in relation to microbial contamination of skin allografts from 723 donors.  
 429 *Burns.* 2010;36(3):347-351.
- 430 7. Eastlund T. Bacterial infection transmitted by human tissue allograft transplantation.  
 431 *Cell Tissue Bank.* 2006;7(3):147-166.
- 432 8. Silva CRM, Borges ML, Watanabe CM, Diogo Filho A, Gontijo Filho PP. Centros  
 433 cirúrgicos e microflora ambiental nas salas de cirurgia dos hospitais de Uberlândia,  
 434 Minas Gerais. *Bioscience Journal.* 2002;14.
- 435 9. Pitt TL, Tidey K, Roy A, Ancliff S, Lomas R, McDonald CP. Activity of four  
 436 antimicrobial cocktails for tissue allograft decontamination against bacteria and  
 437 *Candida* spp. of known susceptibility at different temperatures. *Cell Tissue Bank.*  
 438 2014;15(1):119-125.
- 439 10. Rooney P, Eagle M, Hogg P, Lomas R, Kearney J. Sterilisation of skin allograft with  
 440 gamma irradiation. *Burns.* 2008;34(5):664-673.
- 441 11. del Pozo JL, Patel R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections.  
 442 *Clin Pharmacol Ther.* 2007;82(2):204-209.
- 443 12. Omar A, Wright JB, Schultz G, Burrell R, Nadworny P. Microbial Biofilms and  
 444 Chronic Wounds. *Microorganisms.* 2017;5(1).
- 445 13. Welch K, Cai Y, Strømme M. A method for quantitative determination of biofilm  
 446 viability. *J Funct Biomater.* 2012;3(2):418-431.



- 447 14. Macià MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in  
448 biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(10):981-990.
- 449 15. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents.  
450 *Trends Microbiol.* 2001;9(1):34-39.
- 451 16. Marcinkiewicz J, Strus M, Pasich E. Antibiotic resistance: a "dark side" of  
452 biofilm-associated chronic infections. *Pol Arch Med Wewn.* 2013;123(6):309-313.
- 453 17. Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, *et al.* The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J*  
454 *Oral Sci.* 2011;3(2):55-65.
- 455 18. Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol*  
456 *Infect Dis.* 2015;34(5):877-886.
- 457 19. Venkatesan N, Perumal G, Doble M. Bacterial resistance in biofilm-associated  
458 bacteria. *Future Microbiol.* 2015;10(11):1743-1750.
- 459 20. Russu E, Mureşan A, Grigorescu B. Vascular graft infections management. *Clin*  
460 *Manage.* 2011.
- 461 21. Trampuz A, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of infections associated with  
462 fracture-fixation devices. *Injury.* 2006;37 Suppl 2:S59-66.
- 463 22. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm  
464 formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different  
465 screening methods. *Indian J Med Microbiol.* 2006;24(1):25-29.
- 466 23. Suzuki T, Kawamura Y, Uno T, Ohashi Y, Ezaki T. Prevalence of *Staphylococcus*  
467 *epidermidis* strains with biofilm-forming ability in isolates from conjunctiva and facial  
468 skin. *Am J Ophthalmol.* 2005;140(5):844-850.
- 469 24. Clauss M, Tabin UF, Bizzini A, Trampuz A, Ilchmann T. Biofilm formation by  
470 *staphylococci* on fresh, fresh-frozen and processed human and bovine bone grafts. *Eur*  
471 *Cell Mater.* 2013;25:159-166.
- 472 25. Cairns LS, Hogley L, Stanley-Wall NR. Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: new  
473 insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Mol Microbiol.*  
474 2014;93(4):587-598.
- 475 26. Tran SL, Guillemet E, Gohar M, Lereclus D, Ramarao N. CwpFM (EntFM) is a  
476 *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation,  
477 and virulence. *J Bacteriol.* 2010;192(10):2638-2642.
- 478 27. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified  
479 microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. *J*  
480 *Microbiol Methods.* 2000;40(2):175-179.
- 481 28. Clinical, (CLSI) aLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing  
482 - Twenty-Fifth Informational Supplement M100-S25. In. Wayne, PA, USA2015.
- 483 29. Clinical, (CLSI) aLSI. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility  
484 Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. In. Second Edition M45-A2  
485 ed. USA2010.
- 486 30. Pettit RK, Weber CA, Kean MJ, *et al.* Microplate Alamar blue assay for  
487 *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob Agents*  
488 *Chemother.* 2005;49(7):2612-2617.
- 489 31. Flemming K, Klingenberg C, Cavanagh JP, *et al.* High in vitro antimicrobial activity  
490 of synthetic antimicrobial peptidomimetics against *staphylococcal* biofilms. *J*  
491 *Antimicrob Chemother.* 2009;63(1):136-145.
- 492 32. Bockstael K, Geukens N, Van Mellaert L, Herdewijn P, Anné J, Van Aerschot A.  
493 Evaluation of the type I signal peptidase as antibacterial target for biofilm-associated  
494 infections of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology.* 2009;155(Pt 11):3719-3729.

- 495 33. Matioski AR, Pereira da Silva CRGB, Silva-Cunha DR, Calomeno LHA, Bonato FT,  
496 Nigro MVA. First-year experience of a new skin bank in Brazil *Plastic and Aesthetic*  
497 *Research*. 2015;2(6):6.
- 498 34. Ciofu O, Rojo-Molinero E, Macià MD, Oliver A. Antibiotic treatment of biofilm  
499 infections. *APMIS*. 2017;125(4):304-319.
- 500 35. Pettit RK, Weber CA, Pettit GR. Application of a high throughput Alamar blue  
501 biofilm susceptibility assay to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Ann Clin Microbiol*  
502 *Antimicrob*. 2009;8:28.
- 503 36. Mottola C, Matias CS, Mendes JJ, *et al*. Susceptibility patterns of *Staphylococcus*  
504 *aureus* biofilms in diabetic foot infections. *BMC Microbiol*. 2016;16(1):119.
- 505 37. Setlow P. Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know.  
506 *J Bacteriol*. 2014;196(7):1297-1305.
- 507 38. Fisher RA, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat*  
508 *Rev Microbiol*. 2017.
- 509 39. Knobloch JK, Von Osten H, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Minimal attachment  
510 killing (MAK): a versatile method for susceptibility testing of attached biofilm-  
511 positive and -negative *Staphylococcus epidermidis*. *Med Microbiol Immunol*.  
512 2002;191(2):107-114.
- 513 40. Labthavikul P, Petersen PJ, Bradford PA. In vitro activity of tigecycline against  
514 *Staphylococcus epidermidis* growing in an adherent-cell biofilm model. *Antimicrob*  
515 *Agents Chemother*. 2003;47(12):3967-3969.
- 516 41. Pibalpakdee P, Wongratanacheewin S, Taweechaisupapong S, Niumsup PR. Diffusion  
517 and activity of antibiotics against *Burkholderia pseudomallei* biofilms. *Int J*  
518 *Antimicrob Agents*. 2012;39(4):356-359.
- 519 42. Sawasdidoln C, Taweechaisupapong S, Sermswan RW, Tattawasart U, Tungpradabkul  
520 S, Wongratanacheewin S. Growing *Burkholderia pseudomallei* in biofilm stimulating  
521 conditions significantly induces antimicrobial resistance. *PLoS One*. 2010;5(2):e9196.
- 522 43. Toté K, Berghe DV, Deschacht M, de Wit K, Maes L, Cos P. Inhibitory efficacy of  
523 various antibiotics on matrix and viable mass of *Staphylococcus aureus*  
524 and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33(6):525-531.

### 3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos estão de acordo com a hipótese inicial de que a formação de biofilme provoca um aumento da tolerância bacteriana aos antimicrobianos utilizados no tratamento do banco de pele.

A maioria dos isolados analisados foi formadora de biofilme em diferentes níveis de aderência. Os valores de MIC para o antimicrobiano penicilina, utilizado atualmente no coquetel do Banco de Pele de origem dos isolados analisados, foram superiores aos demais antimicrobianos analisados. Os valores de MBIC apresentaram-se muito superiores aos valores de MIC para todos os antimicrobianos analisados. Os valores de MBEC também foram superiores aos valores de MBIC.

Como perspectiva desse trabalho está a realização de uma etapa de lavagem previamente ao plaqueamento na metodologia do MBEC. Tendo em vista que a aderência do biofilme varia de acordo com a superfície de adesão, os resultados desse trabalho serão utilizados para a realização de testes com antimicrobianos sobre peles alógenas humanas, mimetizando os procedimentos realizados pelo banco de pele. Além disso, novas metodologias visando atingir células bacterianas no estado de biofilme, como ácido peracético e sonicação, serão testadas buscando possível implementação de novo tratamento no Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem.

## REFERÊNCIAS

BOCKSTAEL, K. *et al.* Evaluation of the type I signal peptidase as antibacterial target for biofilm-associated infections of *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 11, p. 3719-29, Nov 2009. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19696105> >.

BONNIER, F. *et al.* Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models. **Toxicol In Vitro**, v. 29, n. 1, p. 124-31, Feb 2015. ISSN 1879-3177. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25300790> >.

BRASIL. Governo Federal. Informe-se sobre o processo de doação de órgãos e tecidos. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2009/11/informe-se-sobre-o-processo-de-doacao-de-orgaos-e-tecidos>>. Acesso em 20 de março de 2017.

BROWN, K. L. Control of bacterial spores. **Br Med Bull**, v. 56, n. 1, p. 158-71, 2000. ISSN 0007-1420. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10885113> >.

CAIRNS, L. S.; HOBLEY, L.; STANLEY-WALL, N. R. Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. **Mol Microbiol**, v. 93, n. 4, p. 587-98, Aug 2014. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24988880> >.

CELANDRONI, F. *et al.* Identification and Pathogenic Potential of Clinical Bacillus and Paenibacillus Isolates. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0152831, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27031639> >.

CHRISTENSEN, G. D. *et al.* Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices. **J Clin Microbiol**, v. 22, n. 6, p. 996-1006, Dec 1985. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3905855> >.

CIOFU, O. *et al.* Antibiotic treatment of biofilm infections. **APMIS**, v. 125, n. 4, p. 304-319, Apr 2017. ISSN 1600-0463. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28407419> >.

CLAUSS, M. *et al.* Biofilm formation by *staphylococci* on fresh, fresh-frozen and processed human and bovine bone grafts. **Eur Cell Mater**, v. 25, p. 159-66, Jan 2013. ISSN 1473-2262. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23361610> >.

DEL POZO, J. L.; PATEL, R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. **Clin Pharmacol Ther**, v. 82, n. 2, p. 204-9, Aug 2007. ISSN 0009-9236. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17538551> >.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 2, p. 167-93, Apr 2002. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932229> >.

FISHER, R. A.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Persistent bacterial infections and persister cells. **Nat Rev Microbiol**, May 2017. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28529326> >.

GAUCHER, S. *et al.* Skin donors and human skin allografts: evaluation of an 11-year practice and discard in a referral tissue bank. **Cell Tissue Bank**, v. 17, n. 1, p. 11-9, Mar 2016. ISSN 1573-6814. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26275343> >.

GOMES, L. C. **Optimization of cultivation conditions for *E. coli* biofilm formation in microtiter plates** 2011. 99 Department of Chemical Engineering, Porto University Porto.

HØIBY, N. *et al.* The clinical impact of bacterial biofilms. **Int J Oral Sci**, v. 3, n. 2, p. 55-65, Apr 2011. ISSN 1674-2818. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21485309> >.

IBRAHIM, T. *et al.* Cadaveric allograft microbiology. **Int Orthop**, v. 28, n. 5, p. 315-8, Oct 2004. ISSN 0341-2695. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15480661> >.

JOHNSTON, C. *et al.* Disinfection of human skin allografts in tissue banking: a systematic review report. **Cell Tissue Bank**, v. 17, n. 4, p. 585-592, Dec 2016. ISSN 1573-6814. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27522193> >.

LACEY, K. A.; GEOGHEGAN, J. A.; MCLOUGHLIN, R. M. The Role of *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in Skin Infection and Their Potential as Vaccine Antigens. **Pathogens**, v. 5, n. 1, Feb 2016. ISSN 2076-0817. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26901227> >.

MACIÀ, M. D.; ROJO-MOLINERO, E.; OLIVER, A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 10, p. 981-90, Oct 2014. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24766583> >.

MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 1, p. 34-9, Jan 2001. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11166241> >.

MARCINKIEWICZ, J.; STRUS, M.; PASICH, E. Antibiotic resistance: a "dark side" of biofilm-associated chronic infections. **Pol Arch Med Wewn**, v. 123, n. 6, p. 309-13, 2013. ISSN 1897-9483. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23828150> >.

MARISCAL, A. *et al.* Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 82, n. 4, p. 773-83, Mar 2009. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19198831> >.

MARTINS, A. L. M. *et al.* Estatísticas do Banco de Pele do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre: anos de 2009-2012. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, p. 1, 2012.

MATHUR, T. *et al.* Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. **Indian J Med Microbiol**, v. 24, n. 1, p. 25-9, Jan 2006. ISSN 0255-0857. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16505551> >.

MATIOSKI, A. R. *et al.* First-year experience of a new skin bank in Brazil. **Plastic and Aesthetic Research**, v. 2, n. 6, p. 6, 2015.

MINUZZI FILHO, A. C. S. *et al.* Estatísticas do Banco de Pele do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, anos de 2008-2010. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, Porto Alegre, p. 1, 2010.

MONSEN, T. *et al.* In vitro effect of ultrasound on bacteria and suggested protocol for sonication and diagnosis of prosthetic infections. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 8, p. 2496-501, Aug 2009. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19535525> >.

MOREIRA, C. A. **ESTUDO DE SENSIBILIDADE DO BIOFILME DE *Burkholderia pseudomallei* A ANTIBIÓTICOS DE USO CLÍNICO E FARNESOL** Estudo de sensibilidade do biofilme de *Burkholderia pseudomallei* a antibióticos de uso clínico e farnesol. 2013a. 115 DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL, Ceará.

O'BRIEN, J. *et al.* Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 17, p. 5421-6, Sep 2000. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10951200> >.

OBENG, M. K. *et al.* Cadaveric allograft discards as a result of positive skin cultures. **Burns**, v. 27, n. 3, p. 267-71, May 2001. ISSN 0305-4179. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11311520> >.

OLSEN, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 34, n. 5, p. 877-86, May 2015. ISSN 1435-4373. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25630538> >.

OMAR, A. *et al.* Microbial Biofilms and Chronic Wounds. **Microorganisms**, v. 5, n. 1, Mar 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28272369> >.

PASSOS, P. R. M. **Controle microbiológico de tecido humanos utilizados para transplantes**. 2011. 62 Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **J Microbiol Methods**, v. 72, n. 2, p. 157-65, Feb 2008. ISSN 0167-7012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18155789> >.

PETTIT, R. K. *et al.* Microplate Alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 7, p. 2612-7, Jul 2005. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980327> >.

PETTIT, R. K.; WEBER, C. A.; PETTIT, G. R. Application of a high throughput Alamar blue biofilm susceptibility assay to *Staphylococcus aureus* biofilms. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 8, p. 28, Oct 2009. ISSN 1476-0711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19860905> >.

PIANIGIANI, E. *et al.* Processing efficacy in relation to microbial contamination of skin allografts from 723 donors. **Burns**, v. 36, n. 3, p. 347-51, May 2010. ISSN 1879-1409. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19616385> >.

PIRNAY, J. P. *et al.* Evaluation of a microbiological screening and acceptance procedure for cryopreserved skin allografts based on 14 day cultures. **Cell Tissue Bank**, v. 13, n. 2, p. 287-95, Jun 2012. ISSN 1573-6814. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21505962> >.

PITT, T. L. *et al.* Activity of four antimicrobial cocktails for tissue allograft decontamination against bacteria and *Candida* spp. of known susceptibility at different temperatures. **Cell Tissue Bank**, v. 15, n. 1, p. 119-25, Mar 2014. ISSN 1573-6814. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23765096> >.

PORTILLO, M. E. *et al.* Sonication versus vortexing of implants for diagnosis of prosthetic joint infection. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 2, p. 591-4, Feb 2013. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23135938> >.

RIBEIRO, N. F. *et al.* Burn wounds infected by contaminated water: case reports, review of the literature and recommendations for treatment. **Burns**, v. 36, n. 1, p. 9-22, Feb 2010. ISSN 1879-1409. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501977> >.

RUSSU, E. *et al.* Vascular graft infections management. **Clin Manage** (2011) 3:16-19. Disponível em: < <http://journal.managementinhealth.com/index.php/rms/article/viewFile/197/562> >.

SILVA, C. R. M. *et al.* **Centros cirúrgicos e microflora ambiental nas salas de cirurgia dos hospitais de Uberlândia, Minas Gerais.** *Bioscience Journal*. Uberlândia: 14 p. 2002.

SILVEIRA, D. P. M. *et al.* Banco de Pele de Porto Alegre: produtividade e perfil dos doadores. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, p. 1, 2013.

SINGH, R.; SINGH, D.; SINGH, A. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. **World J Radiol**, v. 8, n. 4, p. 355-69, Apr 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27158422> >.



STOODLEY, P. *et al.* Biofilms as complex differentiated communities. **Annu Rev Microbiol**, v. 56, p. 187-209, 2002. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12142477> >.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 5, p. 222-7, May 2001. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11336839> >.

SUZUKI, T. *et al.* Prevalence of *Staphylococcus epidermidis* strains with biofilm-forming ability in isolates from conjunctiva and facial skin. **Am J Ophthalmol**, v. 140, n. 5, p. 844-850, Nov 2005. ISSN 0002-9394. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16310462> >.

TARALE, P.; GAWANDE, S.; JAMBHULKAR, V. Antibiotic susceptibility profile of bacilli isolated from the skin of healthy humans. **Braz J Microbiol**, v. 46, n. 4, p. 1111-8, 2015 Oct-Dec 2015. ISSN 1678-4405. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26691469> >.

TATU, A. L. *et al.* *Bacillus cereus* strain isolated from *Demodex folliculorum* in patients with topical steroid-induced rosaceiform facial dermatitis. **An Bras Dermatol**, v. 91, n. 5, p. 676-678, 2016 Sep-Oct 2016. ISSN 1806-4841. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27828651> >.

TENA, D. *et al.* Cutaneous infection due to *Bacillus pumilus*: report of 3 cases. **Clin Infect Dis**, v. 44, n. 4, p. e40-2, Feb 2007. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17243047> >.

TRAMPUZ, A.; ZIMMERLI, W. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. **Injury**, v. 37 Suppl 2, p. S59-66, May 2006. ISSN 0020-1383. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16651073> >.

TRAN, S. L. *et al.* CwpFM (EntFM) is a *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation, and virulence. **J Bacteriol**, v. 192, n. 10, p. 2638-42, May 2010. ISSN 1098-5530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20233921> >.

VENKATESAN, N.; PERUMAL, G.; DOBLE, M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. **Future Microbiol**, v. 10, n. 11, p. 1743-50, 2015. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26517598> >.

VICENTINO, W. *et al.* Guidelines to implement quality management systems in microbiology laboratories for tissue banking. **Transplant Proc**, v. 41, n. 8, p. 3481-4, Oct 2009. ISSN 1873-2623. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19857776> >.

VON EIFF, C. *et al.* Emerging Staphylococcus species as new pathogens in implant infections. **Int J Artif Organs**, v. 29, n. 4, p. 360-7, Apr 2006. ISSN 0391-3988. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16705604> >.

WELCH, K.; CAI, Y.; STRØMME, M. A method for quantitative determination of biofilm viability. **J Funct Biomater**, v. 3, n. 2, p. 418-31, Jun 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24955541> >.

XAVIER, J. B. *et al.* **Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes.** Boletim de Biotecnologia: 12 p.

YUSTE, J. R. *et al.* Bacillus licheniformis as a cause of a deep skin abscess in a 5-year-old girl: An exceptional case following a plant thorn injury. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 49, n. 5, p. 819-821, Oct 2016. ISSN 1995-9133. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25446038> >.

## ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA “BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY”



# BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY



## GUIDELINES TO AUTHORS

### SCOPE OF THE JOURNAL

Brazilian Journal of Microbiology, published by the Brazilian Society of Microbiology, publishes original research papers and reviews, covering all aspects of Microbiology. The publication fee for this journal is **USD 300** for non-Brazilian citizens, and, **R\$ 840,00** for Brazilian citizens.

The following categories of papers are acceptable for publication in Brazilian Journal of Microbiology:

- **Research paper:** the research paper reports results of original research, which has not been published elsewhere.
- **Short Communication:** a Short Communication is new and significant findings. Submit form is the same way as research paper. They receive the same review, they are not published more rapidly than research paper.
- **Short-review:** Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest (ONLY BY INVITATION).
- **Letter to the editor:** Letters to the Editor are intended only for comments on final, typeset articles published in the journal (manuscripts posted online are not accepted) and must cite published references to support the writer's argument.

Your manuscript must be written clearly, in **comprehensible English**.

The text submitted for publication has to be English reviewed before **submission**. **To submit the manuscript, you must attach the issued certificate in supplementary files.**

### SECTIONS

#### *Biotechnology and Industrial Microbiology*

##### **Bacterial Fermentation**

- biosynthesis and bioconversion of natural products, including antibiotics, xenobiotics, and macromolecules produced by bacteria.
- molecular aspects of bacterial biotechnology

##### **Fungal Fermentation**

- biosynthesis and bioconversion of natural products, including antibiotics, xenobiotics, and macromolecules produced by fungi
- molecular aspects of fungal biotechnology

#### *Food Microbiology*

##### **Technology**

- applications of microorganisms (bacteria and fungi) for food production

##### **Safety and Quality**

- food borne diseases
- food spoilage
- microbial ecology in foods

#### *Clinical Microbiology*

##### **Bacteria, Fungi, and Virus**

- Laboratory diagnosis of human infections and the role of the laboratory in both the management of infectious diseases and the elucidation of the epidemiology of infections.
- Microbial resistance and mechanisms of antimicrobial agents.

#### *Environmental Microbiology*

##### **Microbial Ecology**

- ecology of natural microbial assemblages, microbial diversity of natural environments such as water, soil, sediments and higher organisms
- microbial interactions
- environmental aspects of public health
- biodegradation
- bioremediation

#### *Bacterial and Fungal Molecular Pathogenesis*

- Genetic, biochemical, and structural basis of bacterial and fungal pathogenesis

#### *Bacterial and Fungal Physiology*

- Biochemistry, biophysics, metabolism, cell structure, stress response, growth, differentiation, and other related process of bacteria and fungi

#### *Veterinary Microbiology*

- control and/or treatment of animals
- animal pathogen diagnostics
- veterinary or zoonotic pathogens

### SUBMISSION OF A MANUSCRIPT

Submission of a manuscript to Brazilian Journal of Microbiology is understood to imply that it has not

## GUIDELINES TO AUTHORS

---

previously been published (except in an abstract form) and that it is not being considered for publication elsewhere.

Upon receipt of a manuscript all authors will receive an electronic message acknowledging the receipt.

Responsibility for the accuracy of the manuscript content lies entirely with the authors.

### PUBLICATION OF A MANUSCRIPT

Manuscripts are accepted for publication after having been critically reviewed by at least two referees, indicated by the Editors.

The suggestions and recommendations of the reviewers and Editors will be forwarded electronically to the corresponding author, who should return the reviewed manuscript to the Editors within the stipulated date, via online system. Whenever applicable, the corresponding author should explain or comment each modification introduced in the text.

The corresponding author will receive an electronic message whenever the manuscript moves from one status to the next.

Membership in Brazilian Society for Microbiology is not a pre requisite for submission of a manuscript for publication.

Nonmember scientists from Brazil and other countries are invited to submit papers for analysis.

### ETHICS

When the study, described in the manuscript, is related to experiments carried out with human beings and/or animals, author(s) must inform, within the text, if the research project has been approved by the Research Ethics Committee of their institution, according to the Declaration of Helsinki ([http://www.fcm.unicamp.br/fcm/sites/default/files/declaracao\\_de\\_helsinki.pdf](http://www.fcm.unicamp.br/fcm/sites/default/files/declaracao_de_helsinki.pdf)). Experimental studies involving animals should follow the guidelines established by the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>) (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D. C. 1996), and the *Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)* (Ethical Principles for Animal Experimentation of the Brazilian College of Animal Experimentation - [http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID\\_CONTEUDO=65](http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=65)).

### PREPARATION OF A MANUSCRIPT

The manuscript should be submitted as **one single WORD file**. This single file should include: the whole text, figures, tables, etc. Only manuscripts written in English will be considered.

For **research papers**, the **WORD** file should contain:

- Title (100 characters)
- Running title (40 characters)
- Authors and Affiliations
- Abstract (up to 200 words)
- Three to five key-words
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgements (optional)
- References

For **short communications**, the **WORD** file should contain:

- Title
- Running title
- Authors and Affiliations
- Abstract (up to 50 words)
- Three to five key-words
- Text not divided in topics
- Acknowledgements (optional)
- References

For **short-review**, the **WORD** file should contain:

- Title (100 characters)
- Running title (40 characters)
- Authors and Affiliations
- Abstract (up to 200 words)
- Three to five key-words
- Text
- Acknowledgements (optional)
- References

For **Letter to the Editor** the **WORD** file should contain:

- Title (100 characters)
- Running title (40 characters)
- Authors and Affiliations
- Text (no more than 500 words and must be typed double-spaced)
- References

Author affiliations should be presented in decreasing hierarchical order (e.g. Harvard University, Harvard Business School, Boston, USA) and should be written as established in its own language (e.g. Université Paris-Sorbonne; Harvard University, Universidade de São Paulo).

All manuscripts should be typed double-spaced with 3 cm margins and pages should be numbered sequentially. The lines in each page of the manuscript should be numbered too. The Editors recommend that a manuscript should be critically read by someone fluent in English before submission.

Manuscripts written in poor English will not be accepted.

*Research papers* and *short-review* consist of 20 pages, including references, tables and figures.

Abbreviations of terms and symbols should follow the recommendations of IUPAC-IUB Commission

(*Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections*) and the units are to be used according to SI (*International Systems of Units*).

### Suggested Reviewers

Authors may submit suggestions of reviewers to evaluate the manuscripts. The following information must be provided: reviewer name, e-mail address, and the home institution.

### Use of plant extracts in microbiological experiments

Articles that present studies with plant extracts, or other complex substances, will be accepted only after identification of compounds.

## ORGANIZATION

The full **Title** of the article should be as brief as possible, not exceed 100 characters including spaces, should not contain abbreviations, and be truly indicative of the subject of the paper. Authors should suggest a **Running title** that appears in the page header which should not exceed 40 characters, including spaces.

Expressions like "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, should be avoided. Care should be exercised in preparing the title since it is used in literature retrieval systems.

The **Abstract** should summarize the basic content of the paper. The abstract should be meaningful without reference to the text. An abstract should not contain references, tables or unusual abbreviations. Abstracts are reprinted by abstracting journals and therefore will be read by persons who do not have access to the entire paper.

The **Introduction** should provide the reader with sufficient information so that the results reported in the paper can be properly evaluated without referring to the literature. However, the introduction should not be an extensive review of the literature. The introduction should also give the rationale for and objectives of the study that is being reported.

The **Materials and Methods** section should provide enough information for other investigators to repeat the experiments.

Repetition of details of procedures which have already been published elsewhere should be avoided. If a published method is modified, such modification(s) must be described in the paper. Sources of reagents, culture media and equipment (company, city, state, country) should be mentioned in the text. Names that are registered trade marks should be so indicated. Subheading often makes this section easier to read and understand.

The **Results** section should, by means of text, tables and/or figures, give the results of the experiments, extensive interpretation of results has to be avoided but do so in the *Discussion* section. Tables and figures should be numbered using Arabic numerals. All tables and figures must be mentioned in the text.

The approximate location of tables and figures in the text should be indicated.

The **Discussion** section should discuss the results in relation to the literature cited.

**In-text citations:** Indicate references by (consecutive) superscript arabic numerals in the order in which they appear in the text. The numerals are to be used outside periods and commas, inside colons and semicolons. For further detail and examples you are referred to the *AMA Manual of Style, A Guide for Authors and Editors*, Ninth Edition, ISBN 0-683-40206-4, copies of which may be ordered from Lippincott Williams & Wilkins (<http://www.lww.com/index.html>).

**Data references:** This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. This identifier will not appear in your published article. [dataset] 5. Oguro M, Imahiro, S Saito, S Nakashizuka, T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley. Data, v1; 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>

**Reference list:** Number the references in the list in the order in which they appear in the text.

General rules from the 10th edition

- Items are listed numerically in the order they are cited in the text
- Include up to 6 authors
- For more than six, provide the names of the first three authors and then add et al

Examples:

1. Paivio A, Jansen B, Becker LJ. Comparisons through the mind's eye. *Cognition*. 1975;37(2): 635-647.
2. Yuen AWC. Lamotrigine: a review of antiepileptic efficacy. *Epilepsia*. 1994;35(suppl 5):S33-S36.
3. Glaser R, Bond L, eds. Testing: concepts and research. *Am Psychol*. 1981;36 [special issue].
4. Yasuda N, Takagi S-i, Toriumi A. Spectral shape analysis of infrared absorption of thermally grown silicon dioxide films. *Appl Surf Sci*. 1997;117-118(June (II)):216-220.
5. Assink EHM, Verloop N. Het aanleren van deel-geheel relaties [Teaching part-whole relations]. *Pedagogische Studiën*. 1977;54:130-142 [in Dutch].
6. H1 Collaboration. *Nucl Phys B*. 1997;504:3.
7. Weikert S, Freyer D, Weih D, et al. Rapid Ca<sup>2+</sup>-dependent NO-production from central nervous system cells in culture measured by NO-nitrite/ozone chemoluminescence. *Brain Res*. 1997;748: 1-11.
8. VanDecar JC, Russo RM, James DE, Ambeh WB, Franke M. Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *J Geophys Res*. 2003;108:2043. doi:10.1029/2001J B000884.

## GUIDELINES TO AUTHORS

9. Strunk Jr W, White EB. *The Elements of Style*. 3rd ed. New York: MacMillan; 1979 [chapter 4].
10. *College Bound Seniors*. Princeton, NJ: College Board Publications; 1979.
11. Luria AR. *The Mind of a Mnemonist* [Solotarof L, Trans.]. New York: Avon Books; 1969 [Original work published 1965].
12. Letheridge S, Cannon CR, eds. *Bilingual Education: Teaching English as a Second Language*. New York: Praeger; 1980.
13. Chaddock TE. Gastric emptying of a nutritionally balanced liquid diet. In: Daniel EE, ed. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Gastrointestinal Motility*. Vancouver, British Columbia, Canada: Mitchell Press; 1974:83-92.
14. Adams MJ, Briscoe BE, Sinha SK. Interface friction and energy dissipation in soft solid processing applications. In: Dowson D, Taylor CM, Childs THC, Godet M, Dalmas G, eds. *Dissipative Processes in Tribology*. Amsterdam: Elsevier; 1994:223-234. Dowson D, ed. *Tribology Series*; vol. 27.
15. Wilson JG, Fraser FC, eds. *Handbook of Teratology*. Vols 1-4. New York: Plenum Press; 1977-1978.
16. Sluzki CE, Beavin J. Symmetry and complementarity. In: Watzlawick P, Weakland JH, eds. *The Interactional View*. New York: Norton; 1977:71-87. Reprinted from: *Acta Psiquiatr Psicol Am Lat*. 1965;11:321-330.
17. Yu F, Wu X-S. *Phys Rev Lett*. 1992;68:2996. Available from: hep-th/9112009.
18. Dougllis F, Ball Th. Tracking and viewing changes on the web. In: *Proc. 1996 USENIX Technical Conference*; 1996.
19. See the references in: Buchdahl HA. *The Concepts of Classical Thermodynamics*. First published by Cambridge University Press; 1966. Also available electronically as *The Concepts of Classical Thermodynamics* [Last updated 1999]. This reference discusses the basic concepts in a very thorough manner. Its literature list is a main entry point into the discipline.
20. Cancer Research UK. *Cancer statistics reports for the UK*; 2003 Accessed 13.03.03.

**ACKNOWLEDGMENTS:** This section is optional. It acknowledges financial and personal assistance.

**TABLES:** should be inserted in the text according to which they are cited, and numbered sequentially in Arabic number. The title of a table should be placed in the top of it and should be brief but fully descriptive of the information contained. Headings and subheadings should be concise with columns and rows of data carefully centered below them. Should be of sufficient quality to ensure good reproduction. Please, open the following link to see the requirements to obtain the adequate resolution. ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html))

**FIGURES:** should be inserted in the text according to which they are cited, and numbered sequentially in

Arabic number. Data presented in the tables should not be repeated in the figures. The legend of the figures should be placed at their bottom. Should be of sufficient quality to ensure good reproduction. Please, open the following link to see the requirements to obtain the adequate resolution. ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html))

**PHOTOGRAPHS:** Should be of sufficient quality to ensure good reproduction. Please, open the following link to see the requirements to obtain the adequate resolution. ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html))

## CONFLICTS OF INTEREST

It is Brazilian Journal of Microbiology policy that everyone involved in the publication process (authors, reviewers, editorial board members, and editorial staff) must be free from conflicts of interest that could adversely influence their judgment, objectivity or loyalty to the article and assignments. The BJM recognizes that any potential conflict of interest raised must be disclosed promptly to Editor. Conflicts of interest in publishing can be defined as conditions in which an individual holds conflicting or competing interests that could bias editorial decisions. Conflicts of interest may be only potential or perceived, or they may be factual. Personal, political, financial, academic, or religious considerations can affect objectivity in numerous ways.

## AUTHORS' COPYRIGHT

Upon receipt of the galley proofs for approval, authors of approved manuscripts should fax or email the Author's Copyright Statement to the BJM (55-11-3037-7095, [bjm@sbmicrobiologia.org.br](mailto:bjm@sbmicrobiologia.org.br)). The statement (see text below) must be signed by at least one of the authors (who agrees to inform the other authors, if any).

## TRANSFER OF AUTHORS' COPYRIGHT

"The undersigned author(s) state(s) that the article being submitted is original, does not infringe copyright laws or any other third-party property rights, has not been previously published, and is not being considered for publication elsewhere. The author(s) confirm(s) that the final version of the manuscript has been reviewed and approved by all authors. All manuscripts published become the permanent property of the Brazilian Journal of Microbiology and can not be published without authorization in writing from its Editors."