

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

Débora Ribeiro dos Santos

**COMPARAÇÃO QUANTO AO PODER INIBITÓRIO DE SOLUÇÕES MULTIUSO PARA LENTES DE
CONTATO EM RELAÇÃO A CEPAS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS* E *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS***

Porto Alegre
2022

Débora Ribeiro dos Santos

**COMPARAÇÃO QUANTO AO PODER INIBITÓRIO DE SOLUÇÕES MULTIUSO PARA LENTES DE
CONTATO EM RELAÇÃO A CEPAS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS* E *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS***

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.

Orientadora Prof Dr^a Gertrudes Corção

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

SANTOS, DÉBORA
COMPARAÇÃO QUANTO AO PODER INIBITÓRIO DE SOLUÇÕES
MULTIUSO PARA LENTES DE CONTATO EM RELAÇÃO A CEPAS DE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA, STAPHYLOCOCCUS AUREUS E
STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS / DÉBORA SANTOS. -- 2022.
42 f.
Orientadora: GERTRUDES CORÇÃO.

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, 2022.

1. lentes de contato. 2. Staphylococcus aureus. 3.
Pseudomonas aeruginosa. 4. biofilme. 5. ceratite
bacteriana. I. CORÇÃO, GERTRUDES, orient. II. Título.

Débora Ribeiro dos Santos

**COMPARAÇÃO QUANTO AO PODER INIBITÓRIO DE SOLUÇÕES MULTIUSO PARA LENTES DE
CONTATO EM RELAÇÃO A CEPAS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS* E *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS***

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: 12 de Maio de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr^a Mercedes Geimba – ICBS UFRGS

MSc. Denise Leal dos Santos – PPG UFRGS

Prof Dr^a Gertrudes Corção – ICBS UFRGS

“Pesquisar é acordar para o mundo.”

Marcelo Lamy

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, aos Orixás e demais energias espirituais positivas que me deram força de vontade, oportunidades e coragem para superar todos os desafios apresentados.

A minha mãe Maria Célia e meu padrasto Valdir, pelo amor, incentivo e confiança em mim depositados, assim como a sustentabilidade financeira no início da graduação, me permitindo chegar a esse momento.

A minha companheira, Liliane, pelos momentos de companheirismo e pela compreensão aos momentos de ausência. Obrigada por compartilhar os inúmeros momentos de ansiedade e estresse, sem você ao meu lado tudo isso seria bem mais difícil.

As minhas irmãs, sobrinhos e cunhados, que sempre acreditaram em mim, me incentivando a cada momento, não permitindo que eu desistisse. O incentivo de vocês me permitiu chegar na conclusão do meu curso e início de uma nova carreira.

As colegas Cínthia, Gabriela, Mila, Natasha, Stefani e Thaisla, companheiras de aula e irmãs na amizade. Juntas compartilhamos o mesmo sonho, de nos tornarmos Biomédicas, formadas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Vocês fizeram parte da minha formação e com certeza vão continuar presente em minha vida. #DAFACULDADEPRAVIDA.

A minha orientadora Gertrudes Corção, pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Otávio Magalhães, oftalmologista do Hospital Banco de Olhos de Porto Alegre, pela parceria, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de fazer minha graduação e utilizar os laboratórios para realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos, pelo apoio, força e assistência inabalável. Vocês também fizeram parte da minha jornada durante este tempo de minha vida, esse TCC também é de vocês.

RESUMO

A ceratite é caracterizada como uma inflamação na córnea, podendo ser recorrente devido a lesões, utilização indevida de lentes de contato, ou ainda, a partir de infecções por vírus, bactérias, fungos ou parasitas. As infecções de origem bacteriana são predominantes em todo mundo, sendo quase sempre muito agressivas quando o tratamento é iniciado tardiamente. As espécies mais comumente isoladas na ceratite bacteriana são: *Staphylococcus epidermidis*; *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Essas bactérias podem contaminar as lentes de contato tanto na forma de células livres quanto na forma de biofilmes. Visando reduzir a contaminação e colonização das bactérias, os usuários de lentes utilizam soluções multiuso na limpeza e desinfecção de suas lentes de contato. Essas soluções são extremamente importantes, pois são compostas por substâncias ativas que devem ser eficazes na inibição do crescimento de patógenos, evitando assim possíveis infecções oculares. O presente estudo buscou comparar os efeitos de cinco soluções multiuso, com diferentes composições químicas, denominadas soluções (A, B, C, D e E), na inibição de cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* em diferentes intervalos de tempo, assim como, avaliar a eficiência destas soluções na remoção e redução de biofilme formados por *S. aureus* e *P. aeruginosa*. As soluções foram incubadas com inóculos das respectivas bactérias nos seguintes intervalos de tempo: 2min, 10min, 30min, 120min, 240min e 360min. Seguida de neutralização e diluição seriada, e semeadura em meio de cultura específico para cada bactéria. A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada após 24h. Para inibição de biofilmes, as lentes de contato com biofilme foram colocadas na presença das soluções multiuso, em microplacas de 6 poços as quais foram incubadas de 4-6 horas. Após esse período de tempo ocorreu a etapa de neutralização e a diluição seriada, seguida da semeadura em meio de cultura específico para cada bactéria. Após incubação por 24h foi realizada a contagem das UFC. Os resultados foram obtidos a partir do método da técnica de comparação visual e avaliação das UFC, seguido da determinação da redução de log. As soluções C e D foram as mais eficientes na inibição de todas as espécies bacterianas testadas na forma livre, reduzindo mais de 4log em comparação ao controle. Para a remoção do biofilme, a solução C foi a mais eficiente das soluções. Os resultados obtidos neste trabalho apresentam relevância para os usuários de lentes de contato, visto que, eles podem optar pelo uso de uma solução multiuso que melhor auxiliará na prevenção de infecções oculares, como a ceratite bacteriana.

Palavras-chave: lentes de contato; *Staphylococcus sp*; *Pseudomonas aeruginosa*; biofilme; ceratite bacteriana.

ABSTRACT

Keratitis is characterized as an inflammation of the cornea, which can recur due to injuries to the cornea, misuse of contact lenses, or from infections by viruses, bacteria, fungi or parasites. Bacterial infections are predominant worldwide, and are almost always very aggressive when treatment is started late. The bacterial species most commonly isolated in bacterial keratitis are: *Staphylococcus epidermidis*; *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. These bacteria can contaminate contact lenses either in cell-free or biofilm form. In order to reduce the contamination and colonization of bacteria, the wearers make use of multipurpose disinfectant solutions for contact lenses. These solutions are extremely important, because they are composed of active substances that must be effective in inhibiting the growth of pathogens, thus preventing possible eye infections. This study sought to compare the effects of five multipurpose disinfectant solutions, formulated by different chemical compositions, called solutions (A, B, C, D and E), in the inhibition of strains of *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* at different time intervals, as well as to evaluate the efficiency of these solutions in the removal and reduction of biofilm formed by *S. aureus* and *P. aeruginosa*. The solutions were incubated with inocula of the respective bacteria at the following time intervals: 2min, 10min, 30min, 120min, 240min, and 360min. Followed by neutralization and serial dilution, and seeding in culture medium specific for each bacterium. Counting of colony forming units (CFU) was performed after 24h. For biofilm inhibition. the contact lenses containing the biofilm were placed in the presence of the contact lens solutions, in 6-well microplates which were incubated for 4-6 hours. After this period of time the neutralization and serial dilution steps took place, followed by seeding in culture medium specific for each bacterium, after incubation for 24 hours the CFU count was performed. The results were obtained from the visual comparison technique method and evaluation of colony forming units, followed by determination of log reduction. Solutions C and D were the most efficient in inhibiting all the bacterial species tested in the free form, reducing more than 4log compared to the control. For biofilm removal, solution C was the most efficient of the solutions. The results obtained in this study are relevant to the wearers contact lens, since they can choose to use a multipurpose solution that will best help prevent eye infections such as bacterial keratitis.

Keywords: Contact lenses; *Staphylococcus sp.*; *Pseudomonas aeruginosa*; biofilms; bacterial keratitis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas de desenvolvimento do biofilme bacteriano.....	13
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA	10
1.1 OLHO HUMANO E CERATITE BACTERIANA.....	10
1.2 BIOFILMES	12
1.3 LC E SOLUÇÕES MULTIUSO	14
1.4 JUSTIFICATIVA	17
1.5 OBJETIVOS	18
1.5.1 Objetivo geral.....	18
1.5.2 Objetivos específicos.....	18
2 ARTIGO CIENTÍFICO.....	19
3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL	39

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

1.1 OLHO HUMANO E CERATITE BACTERIANA

O olho é a estrutura do corpo humano responsável pela visão, e embora, apresente um tamanho relativamente pequeno, possui várias estruturas que associadas formam um complexo que por sua vez irá garantir a captação das imagens de maneira efetiva. Formando as estruturas desse complexo estão: o cristalino, que funciona como uma lente, suprimindo as necessidades solicitadas pela visão; a retina, responsável pela detecção de cores e dos estímulos luminosos; a córnea, atuando como um meio refrator; e uma barreira protetora contra microrganismos; e os nervos ópticos, o meio de transporte das informações entre o cérebro e a retina (SANTOS, V. 2022).

O olho humano pode apresentar problemas que ocorrem a partir do processo natural da vida, como diminuição do potencial visual e até a perda total da visão, devido ao envelhecimento das células ou por distúrbios como: miopia, hipermetropia, astigmatismo, presbiopia; além de doenças provenientes de agentes externos como microrganismos, como é o caso da ceratite bacteriana (TORTORA, G. J. et al., 2017; GRABOWSKI, S. R. et al., 2006).

A ceratite é caracterizada como uma inflamação na córnea, podendo ser recorrente devido a lesões, utilização indevida de lentes de contato (LC), ou ainda, a partir de infecções por vírus, bactérias, fungos ou parasitas (AUSTIN et al., 2017).

As ceratites de ocorrência não infecciosa de etiologia não viral podem estar relacionadas a uma série de fatores de riscos como: lesões e doenças da córnea e pálpebras, cirurgias oculares, enfermidades sistêmicas, assim como o uso de antibióticos e corticóides tópicos usados frequentemente (WHITCHER et al., 2001; GREEN et al., 2008; BHARATHI et al., 2009).

Devido a ceratite infecciosa, grande parte dos transplantes de córnea realizados no Brasil e em outros países em desenvolvimento, acabam resultando em diminuição de visão e cegueira (AMARAL et al., 2005; NEVES et al., 2008).

Segundo dados da literatura, dentre as ceratites infecciosas, as de origens bacteriana são predominantes em todo mundo, seguido das ceratites de origem fúngicas, virais e por protozoários (GREEN et al., 2008; LAVINSKY et al., 2008; ZAUBERMAN et al., 2013).

A ceratite bacteriana está intimamente associada a diminuição visual. A falta de vascularização da córnea acaba ocasionando alterações que irão interferir nos seus mecanismos

de defesa, proporcionando assim, a infecção bacteriana quase sempre muito agressiva quando o tratamento é iniciado tardiamente (KAUFMAN et al., 2000).

O olho pode ser acometido a alterações estruturais e funcionais, tais quais, miopia, hipermetropia, astigmatismo que por sua vez, pode levar a sequelas como: glaucoma secundário, perfuração da córnea, opacificação, entre outros. Todos decorrentes de inflamações persistente, ou ceratite bacteriana (HENRY et al., 2012).

O patógeno nem sempre é identificado nos achados clínicos, no entanto, analisando o histórico do paciente é possível recomendar um tratamento mais específico para determinado patógeno. As colorações de Gram e Ziehl-Neelsen, assim como a inoculação em meios de cultura específicos são essenciais para o diagnóstico microbiológico das ceratites bacterianas (BOURCIER et al., 2003; PASSOS, et al., 2010). As espécies mais comumente isoladas na ceratite bacteriana são: *Staphylococcus epidermidis*; *staphylococcus aureus*, e bacilos gram negativos como *Pseudomonas aeruginosa* (IBRAHIM et al., 2011; ROCHA et al., 2011).

O *S. epidermidis* é uma bactéria Gram positiva caracterizada como um *Staphylococcus* Coagulase Negativa (SCN), pois não produzem toxinas. São os principais colonizadores da microbiota da pele, sendo considerados microrganismos oportunistas por serem capazes de causar doenças em indivíduos imunocomprometidos, mesmo apresentando fatores menores de virulência quando comparado a outros *Staphylococcus*. São responsáveis também por infecções piogênicas em próteses, como, válvulas cardíacas, assim como, pelas endocardites (LEVINSON et al., 2006). Por ser capaz de formar biofilme, acaba dificultando a resposta do sistema imune, impedindo a estimulação de uma resposta anti-inflamatória, aumentando com isso a infecção. A identificação do *S. epidermidis* é caracterizada principalmente pela ausência da coloração amarela no Ágar Sal Manitol após incubação, e pelo resultado negativo da prova de coagulase (CASSETTARI et al., 2005).

O *S. aureus* é uma bactéria Gram positiva pertencente a microbiota humana. Ela pode causar desde infecções simples, como o surgimento de uma simples acne, até infecções mais complexas como uma septicemia. É uma bactéria capaz de resistir ao sistema de defesa do hospedeiro, ocasionando assim a infecção. Os seus fatores de virulência facilitam sua capacidade de colonização e sua patogenicidade, atacando o sistema imune e progredindo com a infecção (CASSETTARI et al., 2005). A formação de abscesso e as infecções piogênicas são lesões típicas ocasionadas por *S. aureus*, devido à grande produção de toxinas e enzimas (LEVINSON et al., 2006). A identificação do *S. aureus* é obtida por meio de semeadura em meio de cultura específico como Ágar Sal Manitol, onde a coloração fica amarelada após 24h

a 37°C ou 72h em temperatura ambiente. O *S. aureus* apresenta coagulase positiva, a prova de coagulase é a mais importante na sua identificação (CASSETTARI et al., 2005).

P. aeruginosa é um bacilo gram-negativo que pode ser isolado de água, solo, plantas, ou vegetais. Não faz parte da microbiota normal humana, no entanto pode colonizar pacientes hospitalizados através de infecções nosocomiais (FONSECA et al., 2006). A sua capacidade de formar biofilmes, assim como sua alta patogenicidade, tornam *P. aeruginosa* responsável pela ceratite bacteriana em pacientes que utilizam lentes de contato (BROOKS et al., 2011). A cultura de *P. aeruginosa* pode ser identificada em geral pelo seu odor frutado de uva e por sua morfologia rugosa. Além das características visuais e sensoriais, testes bioquímicos como catalase e oxidase, assim como crescimento em meio de cultura específico, (Ágar MacConkey), podem ser utilizados para confirmação desta bactéria (RICHARD et al., 2012).

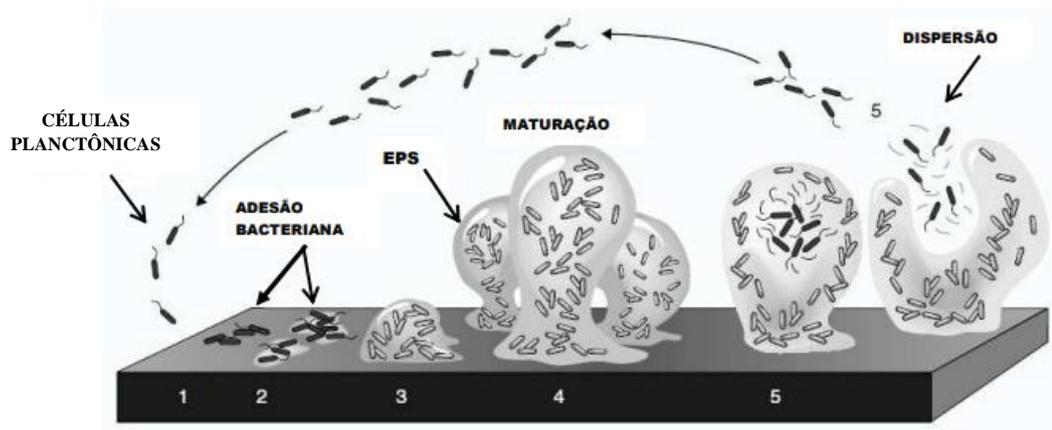
1.2 BIOFILMES

Biofilmes são um conjunto de microrganismos que se fixam a superfícies bióticas ou abióticas, aderidas umas nas outras, envoltas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), representada na estrutura 3D (FRANÇA et al., 2021). Essa condição adquirida por alguns microrganismos lhes conferem uma taxa maior de sobrevivência, uma vez que, nesta conformação usam de estratégias que facilitam adaptações em ambientes hostis (MACIÁ et al., 2014). Fatores como temperatura, pressão, pH, oxigênio e nutrientes são essenciais para o desenvolvimento do biofilme (GOMES, 2011). Na figura 1 pode ser observado os principais estágios da sua formação: adesão ou fixação; maturação em uma estrutura multicelular; e dispersão de células no ambiente circundante (FRANÇA, et al., 2021).

O estágio de adesão ocorre a partir de ligações auxiliadas por pilis e proteínas de superfícies (MACIÁ et al., 2014), mas também pode ocorrer a partir de interações eletrostáticas e forças de Van der Waals (JAMAL et al., 2018). Logo após a adesão à uma superfície, as células bacterianas irão se multiplicar e agregar-se a demais estruturas multicelulares. A produção da matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) determina o estágio de maturação, formando uma estrutura 3D (OTTO, 2009; LE et al., 2014; FRANÇA et al., 2021). Essa matriz é composta por fosfolipídios, ácidos nucléicos, água, proteínas, microrganismos, em especial, bactérias (SUTHERLAND, 2001), e tem por função realizar a manutenção do biofilme, agindo como uma barreira de proteção que impedirá ou retardará a ação de agentes utilizados para atingir a população de bactérias no interior do biofilme (GOMES, 2011). A

dispersão das células, determina a etapa final da formação do biofilme. Após a dispersão, as células invadem a circulação levando a uma infecção disseminada, e posteriormente iniciando um novo ciclo (LE et al., 2014).

Figura 1 Etapas de desenvolvimento do biofilme bacteriano.



Fonte: Adaptado de STOODLEY et al., 2002.

Por estarem menos expostos à resposta do sistema imune, assim como menos suscetíveis a ação de antibióticos, os biofilmes acabam sendo associados a infecções mais persistentes, facilitando a adesão das bactérias em dispositivos médicos implantados como por exemplo cateteres, e adesão a lentes de contatos (CERNOHORSKA et al., 2008). Segundo estudos recentes, as contaminações em LC, principalmente com formação de biofilme, estão associadas a ceratite infecciosa, sendo o grau de severidade da doença relacionado a diversas espécies de bactérias (WILLEY et al., 2012).

A capacidade dos microrganismos de se aderir às LC e formar o biofilme, desempenha um papel extremamente importante no desenvolvimento das infecções oculares. Visando buscar não só o conforto dos usuários, mas também diminuir os riscos dessas infecções associadas, vários tipos de LC, assim como o material com o qual são elaboradas, passaram a ser estudados (RANDLER et al., 2010).

Em um mecanismo da infecção, quando um biofilme é formado ocorre um comportamento diferenciado por parte dos microrganismos. As bactérias presentes na superfície da estrutura vão estar em constante atividade e divisão, visto que essas têm acesso mais abundante aos nutrientes, por outro lado, as bactérias na parte mais interna da estrutura, vão estar no estágio de latência. Isso acaba ocasionando uma heterogeneidade fisiológica no biofilme, que por sua vez vai resultar em diferentes respostas aos antibióticos, levando ao surgimento da resistência bacteriana (MAH, 2012).

1.3 LC E SOLUÇÕES MULTIUSO

A ideia central do desenvolvimento das LC baseia-se em associar uma melhora na qualidade visual com o conforto, visando uma redução das possíveis complicações nesta adaptação. A LC foi descoberta em 1888, e desde então ela vem passando por várias evoluções com o intuito de produzir lentes mais eficientes e confortáveis, que por sua vez acabará proporcionando uma melhor acuidade visual, além de possibilitar uma utilização por muito mais tempo e melhora no processo de adaptação (LEAL et al.,2007). As primeiras LC produzidas eram a base de um material rígido que acabava ocasionando desconforto aos seus usuários, assim como dificultando na adaptação, essas LC ainda são produzidas atualmente. No entanto, com o passar dos anos, passou a desenvolver lentes mais maleáveis, gelatinosas, caracterizadas como lentes de contato de silicone-hidrogel, sendo essas de mais fácil adaptação, e atualmente são as lentes de contato mais prescritas no mundo, totalizando cerca de 50-75% (LEMP; KERN, 2013).

O uso de LC tem sido uma alternativa para não utilização de óculos em algumas situações, como por exemplo, para corrigir erros refrativos mais comuns; e essa alternativa tem aumentado ao longo dos anos, sendo utilizada por várias pessoas, independente de idade, sexo ou classe econômica social (LEITÃO et al.,2009). Atualmente cerca de 2 milhões de usuários, quase 3% da sociedade brasileira utiliza lentes de contato, de acordo com a Sociedade Brasileira de Lentes de contato, Córnea e Refratometria (SOBLEC, 2019).

As LC são utilizadas por motivos estéticos, utilização de LC apenas para mudar a cor dos olhos, e motivos terapêuticos; na terapia são utilizadas em uma vasta gama de doenças relacionadas a superfície ocular. Dentre suas principais funções estão: proteção da córnea, a liberação de medicamentos na superfície ocular, assim como atuar diminuindo o desconforto ocasionado após cirurgias ou transplantes relacionados a córnea. No que diz respeito as contraindicações das lentes de contato para fins terapêuticos, a mais importante está relacionada a infecção ocular, que por sua vez poderá acarretar a elevados riscos de complicações (CORALGHANEM et al., 2008).

A superfície ocular é colonizada por uma vasta comunidade de microrganismos. São eles responsáveis pela integridade e homeostase da superfície ocular, tornando esse ambiente não estéril. Essa microbiota varia de acordo com idade e o sexo (WILLCOX, 2013). Sendo assim, a utilização de LC pode acabar interferindo nesta microbiota, e conseqüentemente, aumentar os riscos associados a infecções (SHIN et al., 2016). A higiene e manutenção, assim como o armazenamento das LC podem ser feitas utilizando soluções multiuso formuladas para

sua limpeza e desinfecção. No entanto, hábitos incorretos de higiene, manipulação inadequada, ou até mesmo dormir com as LC são fatores que irão favorecer a contaminação e colonização por microrganismos não somente as LC como também nos estojos de armazenamento (WU et al., 2010b).

As soluções multiuso são de extrema importância, isto por são formuladas visando garantir a manutenção das LC a partir da sua limpeza e lubrificação (LEMP e KERN, 2013). Além disto, elas são compostas por substâncias ativas que devem ser eficazes na inibição do crescimento de patógenos, evitando assim possíveis infecções oculares aos seus usuários. Frequentemente os patógenos mais associados a essas infecções oculares são: *P. aeruginosa* e *S. aureus* (MEHDI et al., 2011).

Para que as soluções multiuso possam ser eficientes, elas devem conter diferentes classes de componentes em sua composição, onde cada um desempenhará sua função específica. Dentre estas classes estão: os surfactantes, os desinfetantes, os preservantes, os agentes quelantes, os estabilizadores (solução tampão), os agentes de tonicidade, os agentes umectantes, as enzimas, e os agentes iônicos. Os surfactantes atuam na limpeza das LC; os desinfetantes tem ação antimicrobiana, atuando na inibição dos microrganismos da superfície das lentes; os preservantes evitam a proliferação de microrganismos após a abertura do frasco; os agentes quelantes vão atuar reduzindo o acúmulo de cálcio na superfície da LC; a solução tampão atuará mantendo o pH da solução multiuso; os agentes umectantes atuam diminuindo a tensão superficial entre o olho e a lente, permitindo um uso mais confortável; a utilização de enzimas visa diminuir a incidência de depósito proteico, através da atividade proteolítica; e os agentes iônicos atuam prevenindo os depósitos (MOREIRA et al., 2004).

As soluções multiuso devem apresentar um potencial controle contra os microrganismos, no entanto, elas não devem ser tóxicas à superfície ocular. Sendo assim, são utilizados na sua composição: Timerosal, substância derivada do mercúrio, associada ao EDTA tornando-se eficaz contra bactérias Gram negativas e fungos; Clorhexidina, é uma biguanida muito eficaz na eliminação de bactérias Gram positivas; Ácido ascórbico, quando associado ao EDTA torna-se um agente antimicrobiano mais eficiente; EDTA (etilenediaminotetra-acetato ou edetático dissódico) é um agente quelante que potencializa a ação de antimicrobianos catiônicos, sendo muito efetivo contra *Pseudomonas sp*; Álcool isopropílico apresenta alta eficácia antimicrobiana; Polyquad[®] (poly-quaternium -1) 0,001% é um composto quaternário que possui alto peso molecular, evitando a absorção nos poros das LC hidrofílicas e são efetivos contra microrganismos; Dymed[®] (poliaminopropil biguanida) 0,00005% são polímeros

formados por biguanidas repetidas, separadas por uma cadeia carbônica contendo seis carbonos, atuam desintegrando os microrganismos (MOREIRA et al., 2004).

Tais soluções podem conter ainda o PHMB (polihaxametileno de biguanida), uma polihexanida fortemente eficiente na ação antibacteriana. Seu mecanismo de ação baseia-se em interações eletrostáticas a partir de cargas elétricas distribuídas na parede celular bacteriana, ocasionando a perda de suas funções. Ela tem a capacidade de eliminar seletivamente microrganismos sem afetar os tecidos, uma vez que, influencia muito pouco nos lipídeos presentes nas membranas celulares; sendo considerado muito eficaz para limpeza e tratamento de tecidos, atuando também na descontaminação, desinfecção e descolonização de microrganismos (SANTOS; SILVA, 2011).

Durante anos o PHMB tem sido estudado como agente principal nas formulações desinfetantes, principalmente no controle de microrganismos patógenos como *Escherichia Coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, isso por que, seu amplo espectro antimicrobiano previne uma ampla gama de infecções (HANSZMAN, 2012). É eficaz tanto para eliminação de bactérias Gram positivas quanto para Gram negativas, além de apresentar baixa toxicidade (CORAL-GHANEM et al., 2005).

As soluções multiuso visam proporcionar um aumento na vida útil das LC. No entanto, quando manipuladas de forma anti-higiênica pelos usuários, elas podem se tornar um reservatório de microrganismos, contribuindo para o surgimento das infecções oculares. Bactérias como *P. aeruginosa* e *S. aureus* apresentam diversos fatores de virulência, especialmente a formação de biofilmes (ARTINI et al., 2015). Quando aderidos as LC ou nos estojos de armazenamento, os biofilmes aumentam de 10 a 1000 vezes sua resistência aos antimicrobianos (JOYCE et al., 2014), aumentando ainda mais o risco de infecções.

A eficácia da ação microbiana das soluções multiuso pode apresentar diferença de acordo com a espécie de microrganismo. Logo, uma solução multiuso pode ser muito eficaz contra a bactéria *Pseudomonas*, e apresentar baixa eficácia contra um *Staphylococcus*, por isto vai depender da composição de cada solução multiuso (CORAL-GHANEM et al., 2005).

1.4 JUSTIFICATIVA

Considerando que a ceratite bacteriana é importante causa de déficit visual, que sua principal causa de desenvolvimento está associada a utilização intensiva de LC, assim como a má utilização e manipulação delas, e sabendo ainda que as LC são fontes de substrato para formação de biofilme, torna-se necessário a realização de uma análise visando comparar a ação de inibição das soluções multiuso para LC contra microrganismos patogênicos, buscando assim, avaliar as melhores escolhas para prevenção da ceratite bacteriana.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Este trabalho tem por objetivo analisar e comparar a ação de inibição das soluções multiuso para LC contra microrganismos patogênicos na forma planctônica, assim como, na inibição do crescimento na forma de biofilmes aderidos às LC.

1.5.2 Objetivos específicos

1 - Avaliar a capacidade inibitória das soluções multiuso testadas, nas suas concentrações de uso em cepas de *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* e *S. aureus*, pela exposição em diferentes tempos, neutralização e contagem de UFC/mL.

2 - Avaliar a capacidade inibitórias das soluções multiuso testadas, nas suas concentrações de uso em cepas de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, na forma de biofilme em LC, pela exposição em diferentes tempos, neutralização e contagem de UFC/mL.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

COMPARAÇÃO DE SOLUÇÕES MULTIUSO PARA LENTES DE CONTATO NA INIBIÇÃO DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E *STAPHYLOCOCCUS* *EPIDERMIDIS*

Débora Ribeiro¹, Gertrudes Corção¹

¹ 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

INTRODUÇÃO

Caracterizada como uma inflamação na córnea, a ceratite pode ser de origem infecciosa ou não infecciosa. As ceratites de origem bacteriana são as mais comuns; dentre os patógenos mais associados estão: *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de *Staphylococcus Coagulase Negativa* (CNS), *Staphylococcus epidermidis*. Além da infecção na forma planctônica, essas bactérias podem colonizar na forma de biofilme. As soluções multiuso foram desenvolvidas para limpeza e desinfecção de lentes de contato (LC) e estojos de armazenamento.

MÉTODOS

Cinco soluções para lentes de contato multifuncionais (MPS) de diferentes formulações disponíveis comercialmente, foram testadas quanto ao seu efeito antimicrobiano, em bactérias das espécies *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. epidermidis*. As soluções foram incubadas com inóculos em diferentes intervalos de tempo, seguida de neutralização, diluição seriada, e semeadura. A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada após 24h. Para inibição de biofilmes das cepas de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, as LC hidrogel foram colocadas na presença das soluções MPS e incubadas de 4-6 horas. Após esse período ocorreu a neutralização e diluição seriada, seguida da semeadura. Após 24h foi realizada a contagem das UFC.

RESULTADOS

Das cinco soluções MPS testadas, as soluções C e D foram as mais eficazes na inibição bacteriana. A solução C foi a mais eficaz, na inibição do biofilme.

CONCLUSÃO

As MPS apresentam variações na sua eficácia de inibição quanto a espécie bacteriana. As soluções C e D por serem mais complexas em sua formulação, foram as mais eficazes na inibição bacteriana.

PALAVRAS-CHAVE: lentes de contato; *Staphylococcus sp*; *Pseudomonas aeruginosa*; biofilme; ceratite bacteriana.

INTRODUÇÃO

Embora apresente tamanho relativamente pequeno, o olho humano possui uma enorme funcionalidade, sendo o responsável pela visão humana¹. Assim como os demais órgãos humanos, os olhos podem apresentar problemas, seja a partir do processo natural da vida, através de patologias e distúrbios provenientes de agentes externos, ou a partir da ação de microrganismos².

Caracterizada como uma inflamação na córnea, a ceratite pode ser de origem infecciosa ou não infecciosa³. Podem ocorrer a partir de fatores de riscos como lesão, doença da córnea, cirurgias oculares, enfermidades sistêmicas⁴, e também através de infecções virais, bacterianas, fúngicas ou parasitológicas⁵. As ceratites de origem bacteriana são as mais comuns; dentre os patógenos mais associados estão: *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, tendo incidência também do *Staphylococcus Coagulase Negativa* (CNS), e *S. epidermidis*⁶.

O uso indevido e de maneira incorreta de lentes de contato (LC) pode levar ao desenvolvimento da ceratite bacteriana⁷. Grande parte se dá devido a fatores humanos envolvidos na manipulação e cuidados das lentes de contato, assim como o material das mesmas⁸. Além da infecção na forma planctônica (livre), essas bactérias podem colonizar como biofilme⁹, ou seja, uma população de microrganismos aderidas a superfície da lente, envolvidas por uma matriz extracelular autogerada¹⁰. Dentro desta matriz as bactérias desenvolvem fenótipos distintos, que por sua vez, serão mais resistentes quando comparadas as bactérias de

vida livre. Os biofilmes podem colonizar tanto as LC quanto os estojos que armazenam as soluções multiusos para manutenção das mesmas¹¹.

Visando garantir o uso seguro das LC, procurando evitar a colonização e proliferação de bactérias, os usuários fazem uso das soluções multiuso para a desinfecção de LC e estojos de armazenamento. Para que essas soluções multiuso sejam eficientes, elas contêm diferentes classes de componentes em sua composição, onde cada um desempenhará uma função específica¹². Dentre eles encontra-se a Hidrocloro-poli-hexametileno-biguanida (PHMB), fortemente eficiente na ação antibacteriana. Essas soluções são utilizadas para conservar as LC no estojo, e para sua limpeza e manutenção. A utilização diária das LC é recomendada e prescrita pelos oftalmologistas¹³. Entretanto, pode acabar ocorrendo resistência bacteriana à ação dessas soluções multiuso¹⁴, quando manuseadas incorretamente, comprometendo a capacidade de inibição dessas soluções na ação contra bactérias.

Portanto este estudo tem por objetivo analisar e comparar a ação de inibição das soluções multiuso para LC contra microrganismos patogênicos na forma livre e em biofilme, buscando assim, avaliar as melhores escolhas para prevenção da ceratite bacteriana.

MÉTODOS

As cinco soluções de lentes de contato multifuncionais (MPS) disponíveis comercialmente (denominadas A, B, C, D e E) foram testadas quanto ao seu efeito antimicrobiano, no período de julho a dezembro de 2021. Este é um estudo prospectivo, experimental e comparativo. Os isolados foram compostos por dois gêneros de bactérias, divididos nos seguintes grupos: Grupo 1: três cepas de *P. aeruginosa*, sendo uma oriunda de raspado de córnea, e duas de suabe nasal de felinos; Grupo 2: duas cepas de *S. aureus*, oriundas da pele; Grupo 3: duas cepas de *S. epidermidis*, oriundas da pele.

Cinco soluções multifuncionais com diferentes composições para o cuidado de LC disponíveis comercialmente nos mercados brasileiros, a saber, Bio Soak® (Teuto), ClearLens® (Optolentes), Opti-Free Replenish® (Alcon), Renu Fresh® e UltraSept® (Kley-Hertz) foram avaliadas quanto sua eficácia antimicrobiana *in vitro* (Tabela 1). Todas dentro do prazo de validade, conforme o fabricante. Para o controle do experimento foi utilizado solução salina 0,9% estéril.

Tabela 1 Composição das Soluções Desinfetantes Multiuso para Lentes de Contato

Composição	Solução A	Solução B	Solução C	Solução D	Solução E
Polihexametileno Biguanida	0,00025%	0,0005%	-	-	0,0003%
miristamidopropildimetilamina	-	-	+	-	-
0,0006%					
poliquaternário-1	-	-	+	-	-
0,001%					
poloxamina 1%	-	-	+	+	+
poliaminopropilbiguanida	-	-	+	-	-
0,0001%;					
EDTA	+	+	+	+	+
Borato de Sódio	+	-	-	+	-
Cloreto de Sódio	+	-	+	+	+
Ácido Bórico	-	-	+	+	-
Citrato	-	-	+	-	+

Para o preparo do inóculo bacteriano, uma suspensão em salina estéril foi realizada para cada uma das sete bactérias, com turbidez equivalente à 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC / ml). Posteriormente, 0,5mL desta suspensão foi adicionado a 1,5mL de Caldo BHI, formando uma solução (1: 3) e após, uma diluição desta a 1:10 foi preparada. O teste de inibição foi realizado com 950ul das MPS (A, B, C, D, E e Solução controle) e 50ul da suspensão 1:10, resultando aproximadamente $1,25 \times 10^6$ UFC/ml.

Um microtubo para cada uma das cinco soluções foi preparado, rotulados como solução A, B, C, D, E e C+ para o controle. Estes microtubos foram incubados a 35°C dentro do intervalo de tempo de exposição: 0 min, 10 min, 30 min, 120 min, 240 min e 360 min.

Após incubação, as suspensões passaram pela etapa de neutralização, onde 100ul de cada suspensão foi transferida para um microtubo devidamente identificado, contendo 900ul de caldo neutralizante Dey-Engley, para dar início a uma diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-6} . Para o controle foi realizada a diluição de 10^{-1} a 10^{-10} . As diluições foram incubadas por 25-30min a temperatura ambiente.

Após a etapa da neutralização, cada diluição foi semeada em placas de ágar com meio de cultura específicos para cada bactéria, sendo utilizado o ágar MacConkey para *Pseudomonas*, e ágar Sal Manitol para *Staphylococcus*. Foi realizada a semeadura em gota, duas gotas (25ul) de cada diluição foram depositadas sobre o ágar. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, seguido pela contagem de colônias e média para cada solução por intervalo

de tempo. Após a contagem das UFC, foi determinada a redução logarítmica do crescimento em cada solução pela seguinte equação:

$$\text{log de redução: } \log_{10} (\text{UFC ml inicial}) - \log_{10} (\text{UFC ml final}).$$

O presente estudo para critério de avaliação, estabelece que as MPS testados deve reduzir 3log ou mais, das colônias bacterianas em comparação ao controle.

Para a ação das MPS na inibição do biofilme bacteriano formado nas LC, inicialmente elas foram lavadas com tampão salino-fosfato (PBS), em seguida foram submersas em 4ml de suspensão (aproximadamente $0,5 \times 10^8$ UFC/ml) de células bacterianas das cepas *P. aeruginosa* e *S. aureus*, em microplacas de 6 poços. As microplacas foram incubadas por 120min a 37°C para permitir a adesão das células à superfície da LC, concluindo a fase de aderência.

Após esse período, cada LC foi transferida para microtubos com 2ml de PBS, para simular a etapa de lavagem. Após a lavagem foram transferidas para novos microtubos com 2ml de Caldo Trypticaseína de Soja (TSB), e incubadas a 37°C por 24 horas, para fase de bioformação.

Posteriormente, as LC foram lavadas com PBS por aproximadamente 5 segundos. Logo após, foram colocadas em placas de 6 poços contendo 4ml de cada uma das MPS e da solução controle (4ml de PBS). As placas foram incubadas por 4-6 horas, tempo indicado pelo fabricante, a temperatura ambiente. Transcorrido esse tempo, as LC foram lavadas com Tampão Salina Fosfato (PBS) e transferidas para microtubos contendo 1ml de PBS. Os microtubos foram agitados no vórtex pausadamente por 2 vezes, com um resfriamento de 30s no gelo entre as agitações. Após isso, 100ul da suspensão bacteriana resultante da exposição cada uma das soluções MPS e do controle foram adicionados separadamente a 900ul do caldo neutralizante Dey-Engley. Após incubação por 15 min a temperatura ambiente foi realizada a diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-6} .

De cada diluição seriada foi realizada a semeadura em gota (25ul), em duplicata, em ágar Müeller-Hinton. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e após isso, realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/ml). Após a contagem das UFC, também foi determinada a redução logarítmica do crescimento em cada solução.

RESULTADOS

A eficiência das cinco soluções multiuso testadas em *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, e os valores da inibição do crescimento bacteriano, analisados em log de base 10 são mostrados nas tabelas de 2, 3 e 4 respectivamente. Foi possível observar uma diferença relativamente significativa entre os resultados das soluções, nos diferentes intervalos de tempo (2min, 10min, 30min, 120min, 240min e 360min). As soluções C e D foram consideradas mais eficientes na inibição das três espécies de bactérias testadas. As soluções A e E apresentaram resultados diferentes, de acordo com a bactéria testada: a solução A foi mais eficaz na inibição de *P. aeruginosa*, enquanto a solução E inibiu melhor as espécies *S. aureus* e *S. epidermidis*. A solução B foi a menos eficiente, em comparação as soluções testadas, reduzindo menos de 3 log nos intervalos de tempo propostos.

Para este grupo de bactérias, a solução C foi a mais eficiente, visto que, a inibição do crescimento bacteriano ocorreu a partir do primeiro intervalo de tempo (2min); seguido das soluções A e D que reduziram mais de 2 logs em comparação ao controle, já nos dois primeiros intervalos de tempo. A solução E reduziu 5 logs ao final do intervalo de tempo (360min); a solução B foi a menos eficiente, visto que, foi a que apresentou menor redução do log bacteriano, apresentando baixa eficácia em todos os intervalos de tempo. Pode-se observar quanto a eficiência que: Solução C > Solução A > Solução D > Solução E, Solução B menos eficiente para as soluções multiuso testadas.

Tabela 2 Ação das Soluções Desinfetantes na inibição de cepas de *P. aeruginosa*.

Tempo	Solução Controle	Solução A	Solução B	Solução C	Solução D	Solução E
Raspado de córnea						
2 minutos	5,20E+04	2,60E+02	7,80E+04	0,00E+00	1,20E+02	5,00E+04
10 minutos	5,00E+04	0,00E+00	1,30E+05	0,00E+00	0,00E+00	4,00E+04
30 minutos	5,60E+04	0,00E+00	8,20E+04	0,00E+00	0,00E+00	5,80E+03
120 minutos	6,00E+04	0,00E+00	7,40E+04	0,00E+00	0,00E+00	3,80E+02
240 minutos	2,80E+06	0,00E+00	1,20E+05	0,00E+00	0,00E+00	8,00E+01
360 minutos	9,60E+06	0,00E+00	1,10E+05	0,00E+00	0,00E+00	6,00E+01
Suabe Nasal Felino						
2 minutos	9,20E+08	1,80E+02	5,40E+06	0,00E+00	1,80E+02	5,40E+06
10 minutos	1,10E+09	0,00E+00	5,00E+06	0,00E+00	8,00E+02	2,00E+05
30 minutos	2,80E+09	0,00E+00	4,40E+05	0,00E+00	0,00E+00	7,60E+04
120 minutos	5,40E+09	0,00E+00	5,40E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
240 minutos	4,00E+10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
360 minutos	9,4E+11	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Suabe Nasal Felino						
2 minutos	1,30E+05	0,00E+00	6,20E+06	0,00E+00	0,00E+00	2,80E+06
10 minutos	9,80E+04	0,00E+00	3,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	6,20E+03
30 minutos	3,00E+05	0,00E+00	2,60E+05	0,00E+00	0,00E+00	4,20E+03
120 minutos	2,40E+06	0,00E+00	3,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	1,60E+02
240 minutos	6,60E+06	0,00E+00	2,20E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
360 minutos	4,60E+07	0,00E+00	2,20E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Neste grupo de bactérias, a solução C foi a mais eficiente, visto que, a inibição do crescimento bacteriano ocorreu a partir do primeiro intervalo de tempo (2min); seguido das soluções A e D que reduziram mais de 2 logs em comparação ao controle, já nos dois primeiros intervalos de tempo. A solução E reduziu 5 logs ao final do intervalo de tempo (360min); a solução B menos eficiente, visto que, foi a que apresentou menor redução do log bacteriano, apresentando baixa eficácia em todos os intervalos de tempo. Pode-se observar quanto a eficiência que: Solução C > Solução A > Solução D > Solução E, Solução B menos eficiente para as soluções multiuso testadas.

Tabela 3 Ação das Soluções Desinfetantes na inibição de cepas de *S. aureus*.

Tempo	Solução Controle	Solução A	Solução B	Solução C	Solução D	Solução E
2 minutos	4,00E+05	3,50E+05	2,40E+06	8,40E+04	1,90E+04	4,60E+05
10 minutos	4,00E+05	2,40E+05	9,80E+05	7,40E+04	2,20E+03	4,20E+05
30 minutos	5,40E+05	6,20E+05	6,80E+05	8,00E+03	0,00E+00	1,30E+04
120 minutos	1,10E+06	1,70E+04	7,80E+05	0,00E+00	0,00E+00	4,60E+02
240 minutos	7,80E+06	5,20E+03	5,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
360 minutos	2,80E+07	0,00E+00	3,60E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2 minutos	1,60E+05	2,00E+05	2,60E+05	2,40E+05	2,40E+06	6,20E+05
10 minutos	5,20E+05	1,70E+04	5,00E+05	1,20E+04	5,40E+02	5,80E+05
30 minutos	5,40E+05	4,60E+04	6,40E+05	3,20E+03	0,00E+00	5,40E+05
120 minutos	9,60E+05	1,30E+04	4,60E+05	4,00E+02	0,00E+00	3,20E+03
240 minutos	4,80E+06	4,60E+02	4,60E+05	0,00E+00	0,00E+00	1,00E+03
360 minutos	4,60E+07	0,00E+00	3,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

No grupo 2 (*S. aureus*), a solução D foi a mais eficiente, visto que, a inibição bacteriana ocorreu a partir do segundo intervalo de tempo (10min); seguido da solução C que reduziu mais de 3 logs bacteriano comparados ao controle, no terceiro intervalo de tempo (30min). As soluções A e E reduziram mais de 3 logs a partir do quarto intervalo de tempo (120min). A solução B foi menos eficiente para este grupo de bactérias, reduzindo menos de 3 logs até o final do intervalo de tempo. Pode-se observar quanto a eficiência que: Solução D > Solução C > Solução A e E, Solução B menos eficiente para as soluções multiuso testadas.

No grupo 3 (*S. epidermidis*), as soluções D e C foram as mais eficientes, visto que, a inibição bacteriana ocorreu a partir do segundo intervalo de tempo (10min); seguido da solução E que iniciou a inibição a partir do terceiro intervalo de tempo (30min), e a solução A, a partir do quarto intervalo de tempo (120min). A solução B foi ineficiente para este grupo de bactérias, reduzindo 1 log após 120 minutos do intervalo de tempo.

Solução D e C > Solução E > Solução A, Solução B menos eficiente para as soluções multiuso testadas.

Tabela 4 Ação das Soluções Desinfetantes na inibição de cepas de *S. epidermidis*.

Tempo	Solução Controle	Solução A	Solução B	Solução C	Solução D	Solução E
2 minutos	4,40E+04	8,80E+03	4,00E+04	0,00E+00	0,00E+00	6,00E+03
10 minutos	2,60E+04	6,40E+03	4,20E+04	0,00E+00	0,00E+00	3,00E+02
30 minutos	4,60E+04	0,00E+00	3,20E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
120 minutos	3,60E+05	0,00E+00	2,80E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
240 minutos	2,60E+05	0,00E+00	4,40E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
360 minutos	3,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2 minutos	3,20E+04	7,60E+05	8,20E+04	2,60E+02	4,40E+02	4,80E+05
10 minutos	4,60E+04	2,60E+04	7,20E+04	0,00E+00	0,00E+00	8,20E+04
30 minutos	8,80E+04	3,60E+03	8,40E+04	0,00E+00	0,00E+00	4,80E+04
120 minutos	1,30E+05	5,20E+02	4,60E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
240 minutos	2,80E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
360 minutos	6,60E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

O resultado da análise da inibição bacteriana na forma de biofilme pode ser observado na tabela 5. Neste teste as cinco soluções foram testadas para inibição de biofilmes de *P. aeruginosa* e *S. aureus*; a solução mais eficaz para este teste foi a solução C, reduzindo significativamente as espécies testadas. A solução E foi ineficiente na inibição do crescimento na forma de biofilme, para as duas cepas bacterianas testadas. Pode-se dizer que quanto a inibição de biofilmes o comportamento das soluções foi para *P. aeruginosa*: Solução C > Solução A, Solução B e Solução D. Solução E menos eficiente. E para *S. aureus*: Solução C > Solução A, Solução D > Solução B. Solução E menos eficiente.

Tabela 5 Ação das Soluções Desinfetantes na inibição de biofilme das cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*

Bactéria	Controle	Solução A	Solução B	Solução C	Solução D	Solução E
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,00E+06	2,60E+02	1,60E+05	0,00E+00	2,80E+02	1,00E+06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,20E+04	1,20E+05	3,20E+05	1,00E+03	4,00E+04	3,20E+05

DISCUSSÃO

A ceratite bacteriana está intimamente associada a diminuição visual, é quase sempre decorrente do uso indevido ou incorreto de LC. Hábitos incorretos de higiene, manipulação inadequada, ou até mesmo dormir com as lentes são fatores de risco à contaminação e colonização por microrganismos nas LC e nos estojos de armazenamento¹⁵.

As *P. aeruginosa* está associada com a ceratite microbiana grave, sendo um patógeno com alta relevância clínica¹⁶. Seguida da espécie *S. aureus*, são os patógenos mais incidentes nas infecções oculares associadas aos usuários de LC¹⁷. As infecções decorrentes dos *S. aureus* podem ser provocadas a partir da invasão aos tecidos ou através dos fatores de virulências expressos pela mesma¹⁸. Já as infecções decorrentes de *P. aeruginosa*, podem estar relacionadas tanto ao seu perfil de virulências quanto a sua capacidade de colonizar as superfícies das LC, principalmente sob ação de algum processo inflamatório dos olhos¹⁹.

Por serem facilmente suscetíveis à contaminação bacteriana, as LC necessitam de manutenção com soluções desinfetantes multiuso eficazes para reduzir a proliferação bacteriana. Neste estudo foram testadas cinco soluções multiuso para LC, com composições químicas distintas. A base da composição química dessas soluções é a biguanida, composto que consegue romper as membranas celulares das bactérias através de interações eletrostáticas, devido a locais ativos altamente carregados em sua estrutura, sendo assim, muito eficaz contra uma ampla gama de microrganismos²⁰. Dos compostos aditivos três se repetiram nas soluções C e D: Edatato dissódico (EDTA), ácido bórico e cloreto de sódio; o borato de sódio foi comum apenas nas soluções A e D.

O presente estudo foi realizado seguindo o tempo mínimo de 360 minutos de exposição das MPS, conforme recomendações da maioria das soluções desinfetantes multiuso. Segundo Rosenthal (2000), as principais características das soluções multiuso para LC são: atividade desinfetante de amplo espectro, capacidade de armazenamento de longo prazo e procedimentos de desinfecção fáceis e simples. Sendo assim, estas soluções foram testadas verificando a sua eficiência²¹.

As soluções C e D foram as mais eficientes para as três espécies de bactérias, apresentando uma redução maior que 4 log. Estes resultados são semelhantes aos resultados do estudo de Rosenthal (1995)²². As soluções C e D apresentaram quase 100% de eficiência contra as *P. aeruginosa*. Como essas bactérias são gram negativas, a biguanida, um composto

sabidamente catiônico, é atraído para superfície bacteriana negativamente carregada provocando a ruptura da parede celular, permitindo a ação na membrana citoplasmática, levando a ruptura da mesma²³. Além da biguanida, o poliquaternário-1 presente na solução C, é um potente biocida contra um amplo espectro de patógenos. Dos componentes aditivos, três se repetiram nestas soluções: Edatato dissódico (EDTA), ácido bórico e cloreto de sódio. A ação sinérgica desses ingredientes, associados a biguanida, contribuem potencialmente para inibição bacteriana, potencializando assim, o resultado observado destas soluções.

A solução A também apresentou maior inibição contra as *P. aeruginosa*, visto que, ela possui uma maior porcentagem de biguanida na sua composição, quando comparada às demais soluções testadas.

A solução E apresentou resultados semelhantes na inibição das três espécies testadas. A solução B foi ineficiente no teste com as três espécies bacterianas, visto que, não conseguiu uma inibição maior que 3 log em nenhuma das espécies, dentro do intervalo de tempo proposto, possivelmente sua menor complexidade na formulação química, quando comparada as demais soluções testadas, tenha contribuído para o presente resultado. No entanto, este é o primeiro teste destas três soluções (A, B e E) descrito, não sendo encontrados estudos prévios na literatura, para possíveis comparações.

As LC convencionais, rígidas ou gelatinosas, vão apresentar maior capacidade de adesão bacteriana, de acordo com o material ao qual foram feitas. As gelatinosas, feitas especialmente de hidroxietilmetacrilato (HEMA) são as mais propícias à formação de biofilmes, aumentando assim o risco de desenvolvimento de infecções oculares, assim como, a ceratite bacteriana²⁴. Estudos mostraram que a formação de biofilmes nos estojos de armazenamento de LC, acabam contribuindo para a contaminação e formação de novo biofilme nas LC²⁵. O presente estudo testou duas cepas bacterianas, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, quanto a sua capacidade de adesão na superfície das LC de silicone hidrogel.

A bactéria *S. aureus* apresentou maior adesão em comparação a *P. aeruginosa*. Esse desempenho está relacionado a presença de adesinas, assim como, proteínas de ligação presentes em *S. aureus*²⁶. Embora tenha apresentado um potencial de adesão menor em relação ao *S. aureus*, *P. aeruginosa* por sua capacidade de formar biofilme, é uma das bactérias mais associadas as infecções da córneas, em usuários de LC²⁷. Por isso, é necessário a utilização de soluções multiuso que também sejam eficientes na remoção de biofilmes. O presente estudo

testou a ação das soluções desinfetantes multiuso, na inibição dessas bactérias na forma de biofilmes.

Na remoção do biofilme, a solução C foi a mais eficiente contra ambas espécies bacteriana, apresentando maior potencial de inibição contra *S. aureus*, onde foi observado uma redução maior que 4 log em comparação ao controle. O fato desta solução ter uma composição mais complexa, como a presença do poliquaternário-1, um potente biocida com elevado nível de atividade contra um amplo espectro de patógenos, contribuiu para o resultado obtido. A solução E foi a menos eficaz neste tratamento, no entanto, não foram encontrados na literatura estudos prévios a respeito desta solução, assim como das soluções A e B, utilizadas na inibição das bactérias testadas, na forma de biofilmes.

Dentro dos intervalos de tempo analisados foi possível observar uma menor redução das células em biofilme quando comparadas com as células na forma livre, para todas as soluções testadas. Tendo em vista que algumas destas soluções inibiram o crescimento das células na forma livre, no primeiro intervalo de tempo (2 minutos), para inibição das células na forma de biofilme, possivelmente sejam necessários tempos maiores de exposição além do recomendado pelos fabricantes, de 240min – 360min.

Analisando a tabela 5, é possível observar que o biofilme formado por *P. aeruginosa* é mais resistente à ação das soluções desinfetantes multiuso, isto porque além dos inúmeros mecanismos de defesa presentes nesta bactéria, ela pode ainda sobreviver a exposição de enzimas presentes nestas soluções, facilitando assim sua adaptação e sobrevivência²⁸.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente estudo foi possível observar que as soluções desinfetantes multiuso para LC com formulações mais complexas apresentaram mais eficácia na inibição das bactérias testadas. Assim como, variações na eficácia de algumas soluções para uma espécie específica de bactéria e bactérias na forma de biofilme serem mais resistentes a ação dos desinfetantes, seria necessário um tempo maior de exposição.

REFERÊNCIAS

1. SANTOS, VANESSA DOS. "Olhos humanos"; **Brasil Escola**. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/biologia/olhos-humanos.htm>. Acesso em 18 de março de 2022).
2. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12a. ed. Porto Alegre: Artmed; 2017.
3. AUSTIN, A.; LIETMAN, T.; ROSE-NUSSBAUMER, J.; **Update on the Management of Infectious Keratitis**. **Ophthalmology**. Vol 124. 11 ed; 1678-1689, 2017).
4. BHARATHI, M. J.; RAMAKRISHNAN, R.; MEENAKSHI, R.; SHIVAKUMAR, C.; RAJ, D. L. **Analysis of the risk factors predisposing to fungal, bacterial & Acanthamoeba Keratitis in south India**. *Indian J. Med Resp.* p. 749-757-2009.
5. GREEN, M., APEL, A.; STAPLETON, F. **Risk Factors and Causative Organisms in Microbial Keratitis**. *Cornea*. V. 27, nº.1, p. 22-27, 2008.
6. M. AMIRI, M. MOHAMMADINIA, M. TABATABAEE et. Al. **“Comparative efficacies of contact lens disinfecting solutions against *Pseudomonas aeruginosa*”**, *Optometria Clínica e Experimental*, vol. 94, nº 4, pp. 348-351, 2011.
7. SHIN, H., PRICE, K., ALBERT, L., DODICK, J., PARK, L., DOMINGUEZ-BELLO, M.G. **Changes in the eye microbiota associated with contact lens wearing**. *M Bio*. v. 7, n. 2, p. e00198. doi: 10.1128/mBio.00198-16, 2016.
8. MILLER MJ, AHEARN DG. **Adesão de *Pseudomonas aeruginosa* a lentes de contato hidrofílicas e outros substratos**. *J Clin Microbiol*. 1987; 25 (8): 1392–1397. doi: 10.1128 / jcm.25.8.1392-1397.1987
9. CHENG KH, LEUNG SL, HOEKMAN HW, BEEKHUIS WH, MULDER PGH, GEERARDS AJM et al., (1999) **Incidence of contact-lens-associated microbial keratitis and its related morbidity**. *Lancet* 354 (9174): 181-185.

10. VU B, CHEN M, CRAWFORD RJ, IVANOVA EP (2009) **Bacterial extracellular polissacarídeos envolvidos na formação de biofilme.** *Moléculas* 13 14 (7): 2535–2554.
11. HENRIQUES, M.; SOUSA, C.; LIRA, M.; ELISABETE, M.; OLIVEIRA, R.; AZEVEDO, J. (2005). **Adhesion of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis to silicone-hydrogel contact lenses.** *Optom Vis Sci*, 82, 446-50.
12. MOREIRA SMB, MOREIRA H, MOREIRA LB. **Adaptação de lentes de contato em crianças.** In: Moreira SMB, Moreira H, Moreira LB. *Lentes de contato*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2004. p.299-304
13. EFRON N, MORGAN PB, WOODS CA, CONSORTIUM TICLPS. **Uma pesquisa internacional sobre a prescrição diária de lentes de contato descartáveis.** *Clin Exp Optom*. 2013; 96: 58–64.
14. RUSSEL AD. **Resistência bacteriana aos desinfetantes: conhecimentos atuais e problemas futuros.** *J Hos Infec*. 1999; 43: S57 – S68
15. WU, Y., CARNT, N., WILLCOX, M., STAPLETON, F. **Contact lenses and lenses storage cases cleaning instructions: who advice should we follow?** *Eye Contact Lens*. v. 36, n. 2, p. 68-72, 2010b.
16. OLIVIER, J.C., BREDARIOLLI, P.A.P., LEANDRO, F.B., FERREIRA, C.B.R.J., VEIGA, S.M.A.M., DIAS, A.L.T. **Ozone against Pseudomonas aeruginosa biofilms in contact lenses storage cases.** *Rev Inst Med Trop São Paulo*. v. 61, p. e23, <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946201961023>, 2019.
17. KEAY, L.; EDWARDS, K.; NADUVILATH, T. **Factors Affecting the Morbidity of Contact Lens-Related Microbial Keratitis: A Population Study.** *16. Investigative Ophthalmology & Visual Science*. V.47, nº 10, p.4302-4308, 2006.
18. SANTOS, A. L. S., GALDINO, A. C. M., MELLO, T. P., RAMOS, L. S., BRANQUINHA, M. H., BOLOGNESE, A. M., COLUMBANO NETO, J., AND ROUDBARY, M. **What are the advantages of iving in a community? A microbial biofilm perspective! Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 113, p. 1-7. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760180212>, 2018.

19. PATEL, N.B., HINOJOSA, H.A., ZHU, M., ROBERTSON, D.M. **Acceleration of the formation of biofilms on contact lens surfaces in the presence of neutrophil-derived cellular debris is conserved across multiple genera.** *Molec Vis.* v. 24, p. 94-104, 2018.
20. K. MANUJ, C. GUNDERSON, J. TROUPE e M. HUBER, "E fficacy of contact lens disinfecting solutions against *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*," **Olho e lentes de contato: ciência e prática clínica**, vol. 32, não. 4, pp. 216–218, 2006.
21. ROSENTHAL, RA.; McANALLY, C.; McNAMEE, LS.; BUCK, SL.; SCHLITZER, RL.; STONE, RP. (2000) **Broad spectrum antimicrobial activity of a new multi-purpose disinfecting solution.** *CLAO J* 26(3):120–126.
22. ROSENTHAL, RA.; STEIN, J.; McANALLY, C.; SCHLECH, B. (1995) **A comparative study of the microbiologic effectiveness of chemical disinfectans and peroxide- neutralizer systems.** *CLAOJ* 21:99–110.
23. FRANZIN, M., **Biguanida Polimérica Versatilidade e Diversificação em um só Produto**; disponível em; acesso em 11/03/2022.
24. ÉLDER MJ, STAPLETON F, EVANS E, DART JK **Biofilm-related infections in ophthalmology.** *Eye (Lond)*. 1995; 9 (1): 102–109. doi: 10.1038 / eye.1995.16.
25. MCLAUGHLIN-BOLARCE, L.; STAPLETON, F.; MATHESON, M.; DART, JK. **Bacterial biofilm on contact lenses and lens storage cases in wearers with microbial keratitis.** *J Appl Microbiol*. 1998;84(5):827-38.
26. DUTTA, D; COLE, N; WILLCOX, M., **Factors influenciando a adesão bacteriana às lentes de contato.** *Mol Vis*. 2012; 18: 14–21.
27. ONURGAD, F.; OZKAN, S.; OZGEN, S.; OLMUS, H.; ABBASOGLU, U. (2011). **Candida albicans and Pseudomonas aeruginosa** adhesion on Soft Contact Lenses. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 249, 559-64.
28. RANDLER, C.; MATTHES, R.; McBAIN, A.; GIESE, B.; FRAUNHOLZ, M.; SIETMANN, R.; KOHLMANN, T.; HUBNER, N.; KRAMER, A. (2010). **A three-phase in-vitro system for studyng Pseudomonas aeruginosa adhesion and biofilm formation upon hydrogel contact lenses.** *BMC Microbiology*, 10, 282.

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir do presente estudo foi possível analisar a eficácia da ação de cinco soluções desinfetantes multiuso para LC, na inibição de três diferentes espécies bacterianas. De acordo com os resultados obtidos, as soluções C e D foram as mais eficazes para inibição das bactérias testadas, na sua forma planctônica; no entanto, para inibição de biofilmes, a solução C foi a mais eficaz. Levando em consideração que as espécies de bactérias testadas neste estudo são as mais associadas a infecções oculares, desde as mais leves até as mais graves, é importante a formulação de soluções com alto nível potencializador na redução da proliferação microbiana nas LC, visando assim, diminuir o número de infecções oculares de origem bacteriana.

Como perspectivas desde estudo está a pesquisa da comparação dessas soluções, em espécies bacterianas apenas de isolados clínicos, visto que, novas variações poderão ser observadas. Analisar a formação do biofilme nas lentes de contato por microscopia eletrônica, assim como testar a inibição dos mesmos em diferentes intervalos de tempo. E fazer uma análise na formulação dessas soluções desinfetantes multiuso, visando a fabricação de uma que seja eficaz para inibição de todas as espécies em questão.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, C.D.; DUARTE, J.Y.; SILVA, P.L.; VALBUENA, R.; CUNHA, F. **Indications for penetrating keratoplasty in Pernambuco.** Arquivos Brasileiros de Oftalmologia. V. 68, n. 5, p. 635-637, 2005.
- ARTINI, M.; CELLINI, A.; SCOARUGHI, G. L.; PAPA, R.; TILOTTA, M.; PALMA, S.; SELAN, L. **Avaliação de soluções multiuso para lentes de contato no desenvolvimento de biofilme bacteriano.** Eye contact lens. 41 (3): 177-182, 2015.
- AUSTIN, A.; LIETMAN, T.; ROSE-NUSSBAUMER, J.; **Update on the Management of Infectious Keratitis.** Ophthalmology. Vol 124. 11 ed; 1678-1689, 2017.
- BHARATHI, M. J.; RAMAKRISHNAN, R.; MEENAKSHI, R.; SHIVAKUMAR, C.; RAJ, D. L. **Analysis of the risk factors predisposing to fungal, bacterial & Acanthamoeba Keratitis in south India.** Indian J. Med Resp. p. 749-757-2009.
- BOUCIER, T.; THOMAS, F.; BORDERIE, V.; CHAUMEIL, C.; LAROCHE, L. **Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological. review of 300 cases.** Br J Ophthalmol. V, 87, p. 834-838, 2003.
- BROOKS, G. F. et al. **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg.** 25. ed. São Paulo: Artmed, 2011.
- CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. **Staphylococcus aureus bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality?** Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 9, n. 1, p.70-76. 2005.
- CERNOHORSKA, L. & VOTOVA, M. **Antibiotic synergy against biofilm-forming Pseudomonas aeruginosa.** Folia Microbiol, 53, 57-60, 2008.
- CORAL-GHANEM, C.; CORAL-GHANEM, V.; CORAL-GHANEM, R. (2008). **Lentes de contacto terapêuticas e as vantagens dos materiais de alto Dk.** Arq Bras Oftalmol, 71, 19-22. 2011.
- CORAL-GHANEM, C.; STEIN, H. A.; FREEMAN, M. I. **In: Coral-Ghanem C, Stein HA, Freeman MI. Lentes de contato do básico ao avançado.** 2a ed. Joinville: Soluções e Informática. p.18-46, 2005.
- FONSECA, A. P.; SOUZA, J. C.; TENREIRO, R. **Pseudomonas aeruginosa as a nosocomial pathogen: Epidemiology, virulence, biofilm formation and antimicrobial therapy.** In: Pandalai SG, editor. Recent Research Developments in Microbiology. Kerala, India: Research Signpost; Volume 10: 97-132, 2006.

FRANÇA, A. **Virulence Factors in Coagulase-Negative Staphylococci**. *Pathogens*, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 170, 2021.

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

GREEN, M., APEL, A.; STAPLETON, F. **Risk Factors and Causative Organisms in Microbial Keratitis**. *Cornea*. V. 27, n.º.1, p. 22-27, 2008.

HANSZMAN, G.C. **O uso de polihexametileno biguanida em lesões cutâneas no atendimento pré-hospitalar: um ensaio clínico de enfermagem sobre prevenção de infecções**. 97f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2012.

HENRY, C.H.; FLYNN JR, H.W.; MILLER, D.; FORSTER, R.K.; ALFONSO, E.C. **Infectious keratitis progressing to endophthalmitis: a 15-years-study of microbiology, associated factors, and clinical outcomes**. *Ophthalmology*. V. 119, n.12, p. 2443-2449, 2012.

IBRAHIM, M.M.; VANINI, R.; IBRAHIM, F.M.; MARTINS, W.P.; CARVALHO, R.T.; CASTRO, R.S.; ROCHA, E.M. **Epidemiology and medical prediction of microbial keratitis in southeast Brazil**. *Arq. Bras. Oftalmol*. V. 74, n.1, p. 7-12, 2011.

JAMAL, M. et al. **Bacterial biofilm and associated infections**. *Journal of the Chinese Medical Association*, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 7–11, 2018.

JOYCE, E.; AL-HASHIMI, A.; MASON, T.J. **Assessing the effect of different ultrasonic frequencies on bacterial viability using flow cytometry**. *J Appl Microbiol*. v. 110, p. 862-870, 2011.

KAUFMAN, H.E.; BARRON, B.E.; MCDONALD, M.B.; KAUFMAN, S.C. Bacterial keratitis. In: **B.A. Barron, & C.H. Dohlman, companion. Handbook to the Cornea. Boston (Mass): Butterworth-Heinemann**. P. 91-141, 2000.

LAVINSKY, F.; AVNI-ZAUBERMAN, N.; BAREQUET, I. **Clinical characteristics and outcomes of patients admitted with presumed microbial keratitis to a tertiary medical center in Israel**. *Arq. Bras. Oftalmol*. V.76, n.3, p. 175-179, 2013.

LE, K. Y. et al. **Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring**. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, [s. l.], v. 4, 2014.

Disponível em: [https://www.ncbi.nlm-nih.ez45.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC4244807/](https://www.ncbi.nlm.nih.ez45.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC4244807/). Acesso em: 24 mar.

LEAL, F.; LIPENER, C.; CHALITA, M.; URAS, R.; CAMPOS, M.; HOFLING-LIMA, A. **Lente de contato de material híbrido em pacientes com ceratocone e astigmatismo miópico composto**. *Arq Bras Oftalmol*, 70,247-54, 2007.

LEITÃO, P.; FERREIRA, J.; MEDEIROS, M.; AMARAL, A.; GONÇALVES, C.; SERÔDIO, I. **Estudo da Distribuição de Factores de Risco para o desenvolvimento de Doença Ocular Aguda em Portadores de Lentes de contacto.** *Oftalmologia*, 33, 109-115, 2009.

LEMP, J., KERN, J.R. **Results from a global survey of contact lens-wearer satisfaction with OPTI-FREE® PureMoist® Multi-Purpose Disinfecting Solution.** *Clin Optmetry*. v. 5, n. 1, p. 39-46, 2013.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia.** 7. ed. São Paulo: Artmed, 2006.

MAHEDI, A. MOHAMMADINIA, M. TABATABAEE et. Al. **“Comparative efficacies of contact lens disinfecting solutions against *Pseudomonas aeruginosa*”, *Optometria Clínica e Experimental***, vol. 94, nº 4, pp. 348-351, 2011.

MACIÁ, M. D.; ROJO-MOLINERO, E.; OLIVER, A. **Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria.** *Clinical Microbiology and Infection*, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 981–990, 2014.

MAH, T.F. **Biofilm-specific antibiotic resistance.** *Future Microbiol*, 7(9), pp. 1061-1072, 2012.

McLAUGHLIN-BURLACE, L., STAPLETON, F., MATRHESON, M., DARK, J.K. **Bacterial biofilm on contact lenses and lens storage cases in wearers with microbial keratitis.** *J Appl Microbiol*. v. 84, p. 827-838, 1998.

MOREIRA SMB, MOREIRA H, MOREIRA LB. **Adaptação de lentes de contato em crianças.** In: Moreira SMB, Moreira H, Moreira LB. *Lentes de contato*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica; p.299-304, 2004.

MORIYAMA, A.S.; HOFLING-LIMA, A.L. **Contact Lens – associated microbial keratitis.** *Arq. Bras. Oftalmol*. 2008.

NEVES, R.C.; BOTEON, J.; SANTIAGO, A.P. **Indicações de transplantes de córnea no Hospital São Geraldo da Universidade Federal de Minas Gerais.** *Bras. Oftalmol*. V.69, n.2, p. 84-88, 2010.

OTTO, M. **Staphylococcus epidermidis – the “accidental” pathogen.** *Nature reviews. Microbiology*, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 555–567, 2009.

RANDLER, C.; MATTHES, R.; McBAIN, A.; GIESE, B.; FRAUNHOLZ, M.; SIETMANN, R.; KOHLMANN, T.; HUBNER, N.; KRAMER, A. **A three-phase in-vitro system for studying *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation upon hydrogel contact lenses.** *BMC Microbiology*, 10, 282. 2010.

SANTOS, E.J.F; SILVA, MANCGMM. **Tratamento de feridas colonizadas/infetadas com utilização de polihexanida.** Rev. Enf. Ref., Coimbra, v. serIII, n. 4, p. 135-142, jul. 2011.

SANTOS, VANESSA DOS. **"Olhos humanos"; Brasil Escola.** Disponível em:
<https://brasilecola.uol.com.br/biologia/olhos-humanos.htm>. Acesso em: 18 mar de 2022.

SHIN, H.; PRICE, K.; ALBERT, L.; DODICK, J.; PARK, L.; DOMINGUEZ-BELLO, M.G. **Changes in the eye microbiota associated with contact lens wearing.** M Bio. v. 7, n. 2, p. e00198. doi: 10.1128/mBio.00198-16, 2016.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. **Biofilms as complex differentiated communities.** Annu. Rev. Microbiol. 56: 187-209, 2002.

SUTHERLAND, I. W. **The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment.** Trends in Microbiology, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 222–227, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 12a. ed. Porto Alegre: Artmed; 2017.

WHITCHER, J.P.; SRINIVASAN, M.; UPADHYAY, M.P. **Cegueira corneal: Uma perspectiva global.** Boletim da Organização Mundial da Saúde, 79, 214-221, 2001.

WILCOX, M.D. **Characterization of the normal microbiota of the ocular surface.** Exp Eye Res v. 117, n. 1, p. 99-105, 2013.

WILEY, L.; BRIDGE, D.R.; WILEY, L.A.; ODOM, J.V.; ELLIOTT, T.; OLSON, J.C. **Bacterial Biofilm Diversity in Contact Lens-Related Disease: Emerging role of Achromobacter, Stenotrophomonas, and Delftia.** Investigative Ophthalmology & Visual Science, 53, 3896-3905, 2012.

WU, Y., CARNT, N., WILLCOX, M., STAPLETON, F. **Contact lenses and lenses storage cases cleaning instructions: who advice should we follow?** Eye Contact Lens. v. 36, n. 2, p. 68-72, 2010b.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL

Artigos principais: manuscritos de artigos principais devem relatar pesquisas originais, não publicadas anteriormente ou em consideração para publicação em outro lugar. Os artigos principais têm um limite de 3.500 palavras (excluindo resumo, título, referências e ilustrações). Os manuscritos devem incluir um resumo estruturado de no máximo 250 palavras, organizado nos seguintes títulos: Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões. O texto do manuscrito deve ser organizado nas seguintes seções: título, título corrente, resumo estruturado, palavras-chave (três a seis), texto do manuscrito (introdução, métodos, resultados e discussão), agradecimentos, declaração de conflito de interesses, suporte financeiro, referências, e legendas de figuras. São permitidas cinco ilustrações (tabelas e figuras) no total. O manuscrito deve ser preparado em um software de processamento de texto e salvo como um arquivo .doc ou .docx. A fonte preferida é Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento duplo ao longo do texto, legendas das figuras e referências, com margens de no mínimo 3 cm. Organize o manuscrito nas seguintes seções: Carta de Apresentação (dirigida ao Editor-Chefe), Página de Título, incluindo Título do Manuscrito, Título corrido, Resumo, Palavras-chave, seguido de Texto do Manuscrito, Declaração de Conflito de Interesse, Agradecimentos, Suporte Financeiro, Referências e legendas das figuras. Carta de apresentação, página de rosto, agradecimentos e suporte financeiro devem ser fornecidos como documentos separados. As abreviaturas devem ser usadas com moderação.

Modelo de Manuscrito O manuscrito deve ser preparado em um software de processamento de texto e salvo como um arquivo .doc ou .docx. A fonte preferida é Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento duplo ao longo do texto, legendas das figuras e referências, com margens de no mínimo 3 cm. Organize o manuscrito nas seguintes seções: Carta de Apresentação (dirigida ao Editor-Chefe), Página de Título, incluindo Título do Manuscrito, Título corrido, Resumo, Palavras-chave, seguido de Texto do Manuscrito, Declaração de Conflito de Interesse, Agradecimentos, Suporte Financeiro, Referências e legendas das figuras. Carta de apresentação, página de rosto, agradecimentos e suporte financeiro devem ser fornecidos como documentos separados. As abreviaturas devem ser usadas com moderação.

Página de rosto: a página de rosto deve incluir os nomes dos autores em ordem direta e sem abreviaturas, juntamente com as afiliações institucionais na seguinte seqüência: instituição do autor, departamento, cidade, estado e país. Para autores brasileiros, por favor, não traduza os

nomes de instituições. Deve ser especificado o endereço completo do autor para correspondência, incluindo telefone e e-mail. O número de autores e co-autores por artigo deve ser limitado de acordo com o número de autores que contribuíram para o manuscrito. Exceto para estudos multicêntricos nacionais e internacionais, serão permitidos até 20 autores e coautores. Os demais nomes dos autores serão publicados em nota de rodapé. Forneça o número ORCID do autor para correspondência e de todos os coautores. Potenciais revisores: os autores devem fornecer nomes e informações de contato (endereço de e-mail e afiliações institucionais) de três potenciais revisores imparciais, de uma instituição diferente da dos autores.

Título: o título deve ser o mais conciso, claro e informativo possível. Não deve conter abreviações e não deve exceder 250 caracteres. **Título de corrida:** O título de corrida pode incluir até 100 caracteres. **Resumo estruturado:** O resumo estruturado deve resumir os resultados obtidos e as principais conclusões de forma que um leitor ainda não familiarizado com o tema específico do artigo possa compreender as implicações do artigo. O resumo não deve ultrapassar 250 palavras e deve ser estruturado com os seguintes títulos: Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões. O uso de abreviações deve ser evitado.

Palavras-chave: três a seis palavras-chave devem ser listadas imediatamente abaixo do resumo estruturado (Exemplo: Tuberculose. Atenção primária à saúde. Estrutura dos serviços.). Visite o site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> para referência. **Introdução:** a introdução do artigo deve ser breve e indicar os objetivos para os quais o estudo foi realizado. Estudos anteriores devem ser citados apenas quando essenciais. **Métodos:** Os métodos usados no estudo devem ser claros e suficientemente detalhados, para que os leitores e revisores possam entender exatamente o que foi feito e permitir a replicação do estudo por outros. As técnicas padrão precisam apenas ser referenciadas.

Ética: Se o trabalho envolver seres humanos, o autor deve indicar que os procedimentos seguidos estavam de acordo com os padrões éticos do comitê responsável pela experimentação humana (institucional, regional ou nacional) e de acordo com os princípios da Declaração de Helsinque, 1964, conforme revisado em 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000. Para experimentos com animais, o autor deve indicar se um guia do conselho nacional de pesquisa para experimentação com animais ou qualquer lei sobre o cuidado e uso de animais de laboratório foi cumprido. O número de aprovação deve ser enviado ao periódico. No caso de pesquisas em seres humanos, os autores devem incluir na seção de métodos (subseção de considerações éticas), a declaração de que o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional. **Ensaio clínico:** No caso de ensaios clínicos, o manuscrito deve ser acompanhado do número de registro e órgão de registro do ensaio clínico (plataforma REBEC).

Resultados: a seção de resultados deve ser um relato conciso e impessoal das novas informações (todas as descobertas positivas e negativas relevantes) reveladas pelo estudo. Evite repetir no texto os dados apresentados nas tabelas ou ilustrações e use o tempo passado para escrever os resultados.

Discussão: A seção de discussão deve ser limitada ao significado das novas informações e bem discutida, considerando a relevância clínica, pontos fortes e limitações do estudo. Não inclua uma revisão geral do tópico. Mantenha a discussão concisa e relevante. As principais conclusões devem ser apresentadas como último parágrafo da seção de discussão.

Agradecimentos: Quaisquer agradecimentos devem ser curtos, concisos e restritos aos que sejam necessários e não atendam aos critérios de autoria. No caso de instituições patrocinadoras, não use siglas. **Conflito de interesse:** Todos os autores são obrigados a divulgar qualquer tipo de conflito de interesse durante o desenvolvimento do estudo.

Apoio financeiro: Liste todo o apoio financeiro recebido de agências, instituições e outras organizações que financiaram parte ou a totalidade da pesquisa. **Referências:** Somente as referências citadas no texto devem ser incluídas na lista ao final do manuscrito. As referências devem ser numeradas consecutivamente em ordem progressiva em algarismos arábicos conforme aparecem no texto. A lista de referências deve ser formatada de acordo com o estilo Vancouver. Todos os autores, até seis, devem ser listados. Para sete ou mais autores, liste os primeiros seis, seguidos de “et al.” Digite a lista de referências em uma página separada no final do manuscrito, usando espaçamento duplo.

Referências numeradas a comunicações pessoais, dados não publicados ou manuscritos “em preparação” ou “submetidos para publicação” não devem ser listados entre as referências. Artigos aceitos para publicação devem ser referidos como “no prelo” e a carta de aceitação da revista deve ser fornecida. Tal material pode ser incorporado em local apropriado no texto de acordo com os seguintes exemplos: (AB Figueiredo: Comunicação Pessoal, 1980), (CD Dias, EF Oliveira: Dados não publicados). As citações no texto devem ser indicadas usando os números de referência apropriados como sobrescritos para a palavra correspondente, separados por vírgula ou hífen, por exemplo, Mundo^{1,2}, Vida^{30,42,44-50}. As referências no final do manuscrito devem seguir o sistema usado em ‘requisitos uniformes para manuscritos submetidos a periódicos biomédicos’ (para obter mais informações, visite <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>). Os títulos dos periódicos referenciados devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus (para mais informações, visite <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>). A responsabilidade pelas citações bibliográficas no texto e na lista de referências é inteiramente dos autores.

