



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada
Mestrado Profissional

Laura Paggy Dias de Britto

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM
SERINGAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO APÓS ARMAZENAMENTO
DE PREENCHEDORES E CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE
BIOFILME POR *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS***

Belo Horizonte

2025

Laura Paggy Dias de Britto

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM
SERINGAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO APÓS ARMAZENAMENTO
DE PREENCHEDORES E CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE
BIOFILME POR *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Santiago Martín Lattar.

Belo Horizonte

2025

043

Britto, Laura Paggy Dias de.

Avaliação da contaminação microbiológica em seringas de ácido hialurônico após armazenamento de preenchedores e capacidade de formação de biofilme por *Staphylococcus epidermidis* [manuscrito] / Laura Paggy Dias de Britto. – 2025.

67 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Santiago Martin Lattar.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada.

1. Microbiologia. 2. Ácido Hialurônico. 3. *Staphylococcus epidermidis*. 4. Contaminação de Medicamentos. 5. Biofilmes. I. Lattar, Santiago Martin. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA
MESTRADO PROFISSIONAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

“Avaliação da contaminação microbiológica em seringas de ácido hialurônico após o armazenamento de
preenchedores e capacidade de formação de biofilme por *Staphylococcus epidermidis*”

LAURA PAGGY DIAS DE BRITTO

Nº matricula: 2023661026

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em
MICROBIOLOGIA APLICADA-MESTRADO PROFISSIONAL, área de concentração Microbiologia
Aplicada, linha de pesquisa Diagnóstico Microbiológico e Epidemiologia, como requisito para a obtenção do
grau de MESTRE EM MICROBIOLOGIA.

Aprovada em 26 de março de 2025, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Santiago Martin Lattar, ICB-UFMG - Orientador
Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Minas Gerais

Dra. Jéssica Mabelle
Faculdade de Minas –BH, (FAMINAS-BH)

Dr. Bruno Gatti
Tribunal de Justiça de Minas Gerais, (TJMG)

Belo Horizonte, 26 de março de 2025

Profa. Erna Geessien Kroon
Coordenadora

Belo Horizonte, 27 de março de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Erna Geessien Kroon, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 27/03/2025, às 16:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Santiago Martín Lattar, Professor do Magistério Superior**, em 27/03/2025, às 17:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Gatti Bavuzo Coelho Pereira, Usuário Externo**, em 03/04/2025, às 14:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jessica Mabelle de Souza, Usuária Externa**, em 15/04/2025, às 09:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4082073** e o código CRC **9FBF7C81**.

AGRADECIMENTOS

Os dois anos de mestrado foram intensos, marcados por desafios e inúmeros aprendizados. Equilibrar os estudos, o trabalho e o desenvolvimento da pesquisa demandaram muita dedicação e resiliência. No entanto, ao olhar para trás, vejo que cada esforço valeu a pena, pois esta pesquisa está profundamente alinhada com a prática clínica diária do biomédico esteta. Tenho total convicção de que contribuirá para que os profissionais valorizem uma estética embasada no estudo e na ciência. Apesar dos obstáculos, essa jornada foi extremamente enriquecedora e gratificante, e sou imensamente grata por todas as oportunidades e pelas pessoas incríveis que encontrei ao longo do caminho.

Primeiramente, meu profundo agradecimento ao meu esposo, Breno Moraes, por sempre acreditar em mim, me incentivar e enxergar o meu melhor a cada dia. Sou grata por seu apoio incondicional, por compreender a importância dos meus estudos e por ser minha fonte constante de força e motivação.

Aos meus pais, Sérgio Brito e Margaret Dias, minha eterna gratidão pelo amor, incentivo e confiança. Obrigada por nunca duvidarem da minha capacidade e por me acolherem incondicionalmente, independentemente das circunstâncias. Seu apoio inabalável foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

Ao meu irmão, João Paggy, obrigada por estar sempre presente e por me proporcionar momentos de leveza em meio à rotina intensa. Sua admiração me inspira a ser uma pessoa e profissional melhor a cada dia.

Ao meu orientador, Santiago Lattar, minha mais profunda gratidão por todo apoio, paciência e dedicação durante todas as etapas deste projeto. Obrigada por acreditar no meu potencial, por estar sempre presente e por me proporcionar um crescimento profissional e pessoal inestimável. Também agradeço a professora Erna Kron, por enxergar o potencial de uma simples dúvida sobre minha área de atuação e transformá-la em um projeto de mestrado.

Durante essa caminhada, tive a felicidade de compartilhar momentos enriquecedores no Laboratório de Biologia Celular de Microrganismos e de construir grandes amizades. Um agradecimento especial ao aluno de Iniciação Científica, Diego, por toda ajuda, dedicação e disposição. Sua colaboração foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho, e não há palavras suficientes para expressar minha gratidão.

Aos meus amigos da Biomedicina, obrigada pelas noites de pastel, pelos natais compartilhados, pelas conversas, pelas risadas e pelos desafios enfrentados juntos. Vocês tornaram essa jornada mais leve e especial. Em especial, agradeço ao Gabriel, Hugo, Jonas, Letícia, Mariana, Sara e Tales. São oito anos de amizade e parceria que guardo com imenso carinho e orgulho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste mestrado—sejam técnicos, professores ou colegas de pesquisa—expresso minha mais sincera gratidão. Por fim, meu agradecimento aos membros da banca por aceitarem participar da minha defesa de mestrado, bem como à UFMG e ao ICB por tornarem essa conquista possível.

Com gratidão e carinho,

Laura Paggy

RESUMO

Preenchimentos injetáveis de tecidos moles podem fornecer um componente importante da regeneração facial em termos de reestruturação e restauração de volume sem considerável inconveniente para o paciente e longo tempo de recuperação. Os preenchimentos com gel de ácido hialurônico (AH) são os materiais mais comumente utilizados para propósitos dérmicos a fim de aumentar os tecidos moles devido às suas propriedades e vantagens sobre outros materiais de preenchimento alternativos. Uma das principais desvantagens, ou seja, associada ao uso de preenchedores, é a contaminação e possível infecção que poderia ocorrer devido às propriedades do próprio material, ao uso inadequado do produto ou à falta de condições de esterilização. Normalmente, os injetores durante o procedimento não utilizam toda a seringa de preenchimento de uma só vez, e armazenam o material restante para uso posterior, para completar o tratamento dos pacientes devido ao alto custo associado. No entanto, uma das principais preocupações associadas ao armazenamento do preenchimento a ser reutilizado é a possibilidade de contaminação microbiana. Esta prática não é recomendada pelos fabricantes das cargas, pois a esterilidade dos produtos abertos não é garantida. Experimentos anteriores mostraram que diferentes espécies de bactérias podem crescer em um meio como o ácido hialurônico e desenvolver um biofilme robusto. Os biofilmes podem ser definidos como um aglomerado de células bacterianas embebidas em uma matriz. Uma vez formado o biofilme, não é facilmente penetrável pelo sistema imune inato ou por qualquer antibiótico. A ampicilina é um dos principais agentes antimicrobianos empregados para o tratamento de infecções associadas a biofilmes formados por *Staphylococcus epidermidis* em materiais de preenchimento de AH. A pressão antibiótica geralmente produz a geração de colônias de pequeno tamanho, do inglês *small colony variants* (SCVs) em biofilmes de *S. epidermidis*. As SCVs são caracterizadas como subpopulações de pequeno crescimento de bactérias com características fisiológicas e bioquímicas alteradas. O objetivo deste projeto de pesquisa é isolar e identificar bactérias e fungos em géis de AH e agulhas utilizadas. Também estudaremos **in vitro** a capacidade de *S. epidermidis* formar biofilme em uma superfície de AH além da possibilidade de o tratamento com ampicilina sobre o biofilme, possibilitar a geração de SCVs.

Palavras-chave: Ácido Hialurônico. Contaminação. Biofilmes. *S. epidermidis*.

ABSTRACT

Injectable soft tissue fillers can provide an important component of facial regeneration in terms of restructuring and restoring volume without considerable patient inconvenience and long recovery time. Hyaluronic acid (HA) gel fillers are the most commonly used materials for dermal purposes to augment soft tissue due to their properties and advantages over other alternative fillers. One of the main disadvantages, that is, associated with the use of fillers, is the contamination and possible infection that could occur due to the properties of the material itself, the inappropriate use of the product or the lack of sterilization conditions. Typically, injectors during the procedure do not use up the entire filling syringe at once, and store the remaining material for later use, to complete the treatment of patients due to the high associated cost. However, one of the main concerns associated with storing fillers to be reused is the possibility of microbial contamination. This practice is not recommended by the filler manufacturers, as the sterility of opened products is not guaranteed. Previous experiments have shown that different species of bacteria can grow in a medium like hyaluronic acid and develop a robust biofilm. Biofilms can be defined as an agglomeration of bacterial cells embedded in a matrix. Once the biofilm is formed, it is not easily penetrated by the innate immune system or by any antibiotic. Ampicillin is one of the main antimicrobial agents used for the treatment of infections associated with biofilms formed by *Staphylococcus epidermidis* in HA filling materials. Antibiotic pressure generally produces small colony variants (SCVs) in *S. epidermidis* biofilms. SCVs are characterized as small-growth subpopulations of bacteria with altered physiological and biochemical characteristics. The objective of this research project is to isolate and identify bacteria and fungi in HA gels and used needles. We will also study **in vitro** the ability of *S. epidermidis* to form a biofilm on a HA surface, in addition to the possibility that ampicillin treatment on the biofilm will enable the generation of SCVs.

Keywords: Hyaluronic Acid. Contamination. Biofilms. *S. epidermidis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1 – Fórmula química do ácido Hialurônico	15
Fig. 2 – Formação de biofilme em <i>Staphylococcus epidermidis</i>	18
Fig. 3 – Principais áreas de colonização de <i>S. epidermidis</i>	25
Fig. 4 – Adesão na pele e ligantes.....	26
Fig. 5 – <i>Small colony Variants</i> de <i>S. epidermidis</i> em ágar BHI após 4 dias de incubação a 37°C.....	33
Fig. 6 – Padrão de bandas de identificação das bactérias	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: – Tabela de amostra de preenchimento labial que foi armazenado com a própria agulha de aplicação.....	34
Tabela 2: – Tabela de amostra de preenchimento labial que foi armazenado com a própria tampa que ficou exposta na bancada durante o procedimento.....	35
Tabela 3: – Tabela de amostra de preenchimento labial que foi aberto e transferido para outra seringa e imediatamente fechado com a própria tampa.....	36
Tabela 4: – Tabela de amostra de preenchimento de zigomático e diferentes formas de armazenamento do preenchedor.....	37
Tabela 5: – Tabela de amostra de preenchimento da região nasal e diferentes formas de armazenamento do preenchedor.....	38
Tabela 6: – Tabela de amostra de preenchimento mandibular e diferentes formas de armazenamento do preenchedor.....	39
Tabela 7: – Tabela de amostra de preenchimento da região de maxila e diferentes formas de armazenamento do preenchedor.....	40
Tabela 8: – Tabela de amostra de preenchimento da região do sulco nasogeniano e diferentes formas de armazenamento do preenchedor.....	41
Tabela 9: – Tabela de amostra de preenchimento da região de olheiras e diferentes formas de armazenamento do preenchedor.....	42
Tabela 10: – Tabela 10: Tabela de amostra de preenchimento da região de mento e diferentes formas de armazenamento do preenchedor.....	43
Tabela 11: – Tabela de amostra de preenchimento de diferentes regiões com forma de armazenamento específica e tempo de armazenamento superior a 30 dias.....	44

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Preenchedores armazenados com a agulha de aplicação.....	45
Gráfico 2: Preenchedores armazenados com a tampa do preenchedor que permaneceu na bancada durante todo o procedimento.....	46
Gráfico 3: Preenchedores armazenados com agulha estéril.....	47
Gráfico 4: Preenchedores armazenados que foram abertos apenas para transferência para uma nova seringa e fechados com a tampa imediatamente após a transferência	48
Gráfico 5: Quantificação da densidade celular dos biofilmes de <i>S. epidermidis</i> formado na superfície do ácido hialurônico sob pressão de concentração subinibitórias de ampicilina.....	50
Gráfico 6: Quantificação da densidade celular dos biofilmes de <i>S. epidermidis</i> formado na superfície da placa de polietileno sob pressão de concentração subinibitórias de ampicilina.....	52
Gráfico 7: Frequências de formação de SCV de <i>S. epidermidis</i> em uma superfície de ácido hialurônico sob pressão de concentração subinibitórias de ampicilina.....	54
Gráfico 8: Frequências de formação de SCV de <i>S. epidermidis</i> em uma superfície de polietileno sob pressão de concentração subinibitórias de ampicilina.....	54

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AH – Ácido Hialurônico

FDA – Food and Drug Administration

ASPS – Sociedade Americana de Cirurgias Plásticas

EPS – Poliméricas extracelulares

S. epidermidis – *Staphylococcus epidermidis*

SCVs – *Small Colony Variants*

BHI – *Brain Heart Infusion*

AMP's – peptídeos antimicrobianos

CoNS – Coagulase-negativa

Aap – Proteína associada à acumulação

MSCRAMMs - Componentes de superfícies microbianas que reconhecem moléculas de matriz adesiva.

Atl – Autolisina bifuncional

Embp – Proteína gigante de superfície

GehD – Lipase bifuncional

EPS – Substâncias poliméricas extracelulares

MEC – Matrix extracelular

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PSMs – Phenol-soluble modulins

PIA – Adesina polissacarídica intercelular

PNAG – Poli-N-acetilglicosamina

CIM – Concentração Inibitória Mínima

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	JUSTIFICATIVA.....	19
3.	REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1.1	Aspectos do envelhecimento.....	20
3.1.2	Envelhecimento cutâneo.....	20
3.1.3	Envelhecimento do tecido adiposo.....	21
3.1.4	Envelhecimento dos músculos da face.....	21
3.1.5	Envelhecimento dos ossos da face	22
3.1.6	Estética e envelhecimento	22
3.1.7	Ácido Hialurônico e aplicações	22
3.1.8	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	24
3.1.9	Características gerais	24
3.1.10	Colonização.....	24
3.1.11	Fatores de Virulência	27
3.1.12	Formação de Biofilme	27
3.1.13	Formação de SCVs.....	28
4.	OBJETIVOS	29
4.1.1	Objetivo Geral	29
5.	METODOLOGIA	29
5.1.1	Amostras.....	29
5.1.2	Identificação das amostras.....	30
5.1.3	Formação do biofilme de <i>S. epidermidis</i>	32
5.1.4	Análise da ação da ampicilina sobre o biofilme de <i>S. epidermidis</i> e geração de SCVs.....	32
5.1.5	5.5 Análise estatística.	33
5.1.6	5.6 Critério de exclusão.....	33
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
7.	CONCLUSÃO.....	55

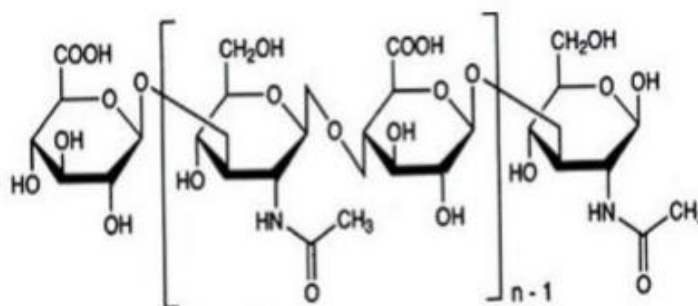
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
----	---------------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento cutâneo pode apresentar diferentes modificações na textura da pele, formação de linhas finas e profundas, vincos, rugas mais pronunciadas, flacidez, perda de gordura, tônus musculares e sustentação óssea. (1) Cada uma dessas modificações estruturais decorrentes do envelhecimento, embora normais, são consideradas inestéticas e, por esse motivo, muitas pessoas buscam alternativas a fim de minimizar, adiar ou retardar esse processo. (2) A partir da busca por alternativas não cirúrgicas, a opção mais aceita pelos pacientes, com melhor custo e menor tempo de recuperação são os preenchedores de AH. (1)

O AH é um polímero encontrado na matriz extracelular de diversos tecidos como a derme, cérebro, cartilagens e tecidos conectivos. Sua molécula é um dissacarídeo glicosaminoglicano composto por unidades D-ácido glucurônico e N-acetil D- glucosamina unidas de forma alternadas por ligações glicosídicas (figura 1). No nosso organismo, grande parte do AH está situada na pele fornecendo volume, sustentação e hidratação. (3)

Figura 1 – Fórmula química do ácido hialurônico.



Fonte: Narins, R. S., & Bowman, P. H. (2005). Injectable skin fillers. *Clinics in plastic surgery*.

O procedimento de preenchimento facial, que utiliza o AH, tem como objetivo suavizar linhas finas, preencher sulcos e depressões, além de promover melhora da projeção, da hidratação e do contorno facial. Atualmente, esse procedimento é considerado padrão ouro na reposição de volume, minimizando assim os sinais do envelhecimento. Entretanto, mesmo sendo considerado um procedimento minimamente invasivo, não é isento de complicações e, por isso, deve ser sempre aplicado por profissionais habilitados e experientes (4).

A aplicação de AH tornou-se um dos procedimentos estéticos mais populares após sua aprovação pelo Food and Drug Administration (FDA) em 2002 (5). Segundo a Sociedade

Americana de Cirurgiões Plásticos (ASPS), em 2012 foram realizados dois milhões de procedimentos com preenchimento de tecidos moles (85% deles usando AH). Já em 2023, os procedimentos não cirúrgicos chegaram a um total de 19,1 milhões. Desses, cerca de 5,5 milhões são procedimentos com AH (30). Este impressionante número mostra a importância dos profissionais habilitados conhecerem os benefícios e os efeitos colaterais decorrentes do gel cosmético de AH (6). Dentre os principais efeitos colaterais descritos na literatura, as complicações mais comuns incluem hematomas, alergias, assimetrias, necrose cutânea e/ou infecções (8).

Atualmente, um novo conceito considera que muitas complicações provenientes do AH são devidas a biofilmes e não a alergias ou outras respostas inflamatórias (10). A contaminação microbiana de AH causada por patógenos bacterianos ou fúngicos é um fator importante de infecções; além disso, o aumento alarmante de espécies resistentes a antimicrobianos, causado pelo uso excessivo de antibióticos, agora representa uma séria ameaça à saúde e a econômica em todo o mundo (9).

A pele é caracterizada como um ambiente dificultoso para a colonização de diferentes microrganismos (31). Sua camada mais externa, a epiderme, contém o extrato córneo onde apresenta baixa disponibilidade de nutrientes e pH, além de possuir alta salinidade e concentrações de ácidos graxos livres e peptídeos antimicrobianos (AMP's) (31,32).

Os estafilococos são colonizadores bacterianos comuns da pele e membranas mucosas de humanos e outros mamíferos (18). *S. epidermidis*, em particular, é a espécie mais frequentemente isolada de epitélio humano, colonizando, predominantemente, as axilas, cabeça e narinas (19). Alterações na abundância de *S. epidermidis* têm sido associadas à algumas doenças de pele, incluindo dermatite atópica, dermatite seborréica, caspa e rosácea (34,35). Essas alterações sugerem um potencial patogênico, ainda que não completamente compreendido, subestimado para o *S. epidermidis* em doenças comuns da pele (35).

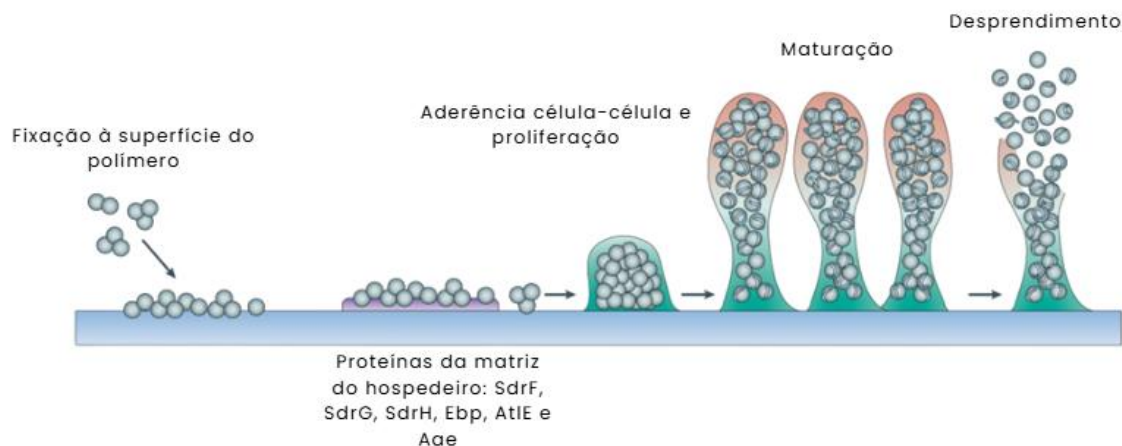
Ademais, evidências recentes sugerem que o comportamento comensal ou patogênico de *S. epidermidis* depende, muitas vezes, do contexto. Análises metagenômicas de 2020 revelaram que os genes de virulência do *S. epidermidis* foram compartilhados de maneira diferente entre os indivíduos e as áreas da pele (30). Essa análise revelou a presença de vários elementos genéticos móveis, como plasmídeos e prófagos, que possuem a capacidade de transferência, facilitando, deste modo, a disseminação de genes, incluindo os de resistência à antibióticos.

A identificação de plasmídeos que contém diversos genes de resistência em vários isolados de *S. epidermidis* indica que a transferência horizontal de genes é um evento que ocorre frequentemente na pele (39). Essa dinâmica genética permite a geração de cepas geneticamente distintas, incluindo a aquisição de resistência à antibióticos e fatores de virulência, mesmo em indivíduos saudáveis, sem sinais de infecção (38,39). As causas suspeitas de infecção por biofilme bacteriano são principalmente causadas por *S. epidermidis*. Foi relatado em estudos anteriores que mesmo uma contaminação muito pequena de AH por bactérias é suficiente para o desenvolvimento de um biofilme (21).

Os biofilmes têm sido definidos como agregados de micro-organismos nos quais as células são frequentemente incorporadas em uma matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que são aderentes umas às outras e/ou uma superfície (11). Todos os organismos superiores, incluindo os humanos, são colonizados por microrganismos que formam biofilmes, os quais podem estar associados a infecções persistentes e contaminações de dispositivos médicos e implantes (12). As infecções associadas ao biofilme são geralmente difíceis de tratar devido à capacidade das bactérias envolvidas em biofilme resistirem a uma ampla variedade de elementos externos, incluindo o tratamento com antibióticos (13). Essa proteção se deve à ação da matriz extracelular do biofilme, que geralmente é composta por EPS (14).

Os antibióticos β -lactâmicos de primeira linha, como a ampicilina, são os medicamentos mais comumente prescritos para infecções bacterianas (15). A ampicilina interage de forma reversível a diversas enzimas da membrana plasmática da bactéria. Essas enzimas desempenham papéis muito importantes na síntese da parede bacteriana e na divisão celular. Ao se ligar a essas enzimas, a ampicilina impede a síntese dessa parede e, conseqüentemente, leva a célula bacteriana à morte (16).

A formação do biofilme prossegue via adesão inicial e subsequente agregação em estruturas multicelulares (Fig. 2); assim, o desenvolvimento de um biofilme requer forças adesivas para a colonização de superfícies e interação de células entre si (22).

Figura 2 – Formação de biofilme em *Staphylococcus epidermidis*

Fonte: Adaptado de MOTTO, M. (2009).

A adesão a superfícies não revestidas ocorre principalmente devido à hidrofobicidade da célula, enquanto proteínas especializadas facilitam a fixação a dispositivos cobertos pela matriz do hospedeiro. Em seguida, exopolissacarídeos, proteínas específicas e outras macromoléculas contribuem para a agregação entre as células. Os processos de maturação, organização e desprendimento do biofilme ainda não são completamente compreendidos, mas acredita-se que envolvam a regulação de peptídeos com propriedades detergentes e a ação de proteases nas camadas externas do biofilme. Além disso, a expressão gênica no biofilme difere significativamente daquela observada em células planctônicas, incluindo a supressão de funções celulares essenciais (42).

A recuperação de *Small Colony Variants* (SCVs) do Português Variantes de Pequenas Colônias de *S. epidermidis* e seu envolvimento em infecções relacionadas a dispositivos médicos internos ganharam destaque na última década (23). Essas variantes frequentemente surgem em infecções bacterianas crônicas, onde a pressão seletiva exercida por fatores ambientais, incluindo antibióticos, induz mutações espontâneas em genes essenciais, levando à diversificação das populações bacterianas. Essas mutações geralmente resultam na formação de SCVs, que apresentam deficiência no transporte de elétrons e maior resistência a antibióticos. Além disso, essa adaptação aumenta a capacidade dessas bactérias de sobreviver e evadir das defesas do hospedeiro (24).

Estudos documentam que o tratamento de biofilmes bacterianos com ampicilina promove a formação de SCVs (25). Essas variantes são caracterizadas como subpopulações bacterianas que formam colônias de pequeno tamanho e possuem características fisiológicas e bioquímicas alteradas, sendo auxotróficas para menadiona, timidina e/ou hemina (26). Devido ao seu metabolismo reduzido, SCVs crescem lentamente em placas de ágar, o que pode dificultar sua detecção em laboratórios de rotina, onde amostras de tecido são comumente

cultivadas por 48 horas. No entanto, sua formação pode ser observada em meios de cultura entre 48 e 72 horas após o isolamento primário (27). Apesar dos avanços nesse campo, ainda há poucas evidências sobre o papel do AH na geração de SCVs de *S. epidermidis*.

Diante do exposto, esse estudo tem como objetivo avaliar a porcentagem de contaminação em seringas de preenchedores dérmicos de AH nos intervalos de 15 e 30 dias após a primeira aplicação no paciente. Além disso, busca-se identificar a presença de bactérias nas seringas, investigar se o AH favorece o desenvolvimento de biofilmes de *S. epidermidis* e analisar se a exposição ao antibiótico ampicilina contribui para a geração de SCVs.

2. JUSTIFICATIVA

O preenchimento facial com AH é uma técnica amplamente utilizada para remodelação e rejuvenescimento da face, envolvendo a injeção de substâncias biocompatíveis em diferentes camadas da pele. Por ser um procedimento minimamente invasivo, com curto tempo de recuperação e baixo índice de efeitos adversos, sua popularidade tem crescido significativamente entre os pacientes.

De acordo com a Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica, o número de procedimentos de harmonização facial aumentou de 72 mil para 256 mil ao ano no Brasil entre 2014 e 2019. Além disso, o preenchimento facial é atualmente o segundo procedimento estético não cirúrgico mais realizado no país, com mais de 1,5 milhão de procedimentos anuais registrados após 2022. Esse crescimento evidencia a necessidade de maior atenção às práticas de armazenamento e manuseio dos produtos utilizados nesses procedimentos, especialmente em relação ao reaproveitamento de sobras de preenchedores armazenados em seringas aplicadoras.

A contaminação microbiana do AH por patógenos bacterianos representa um fator crítico no desenvolvimento de infecções, sendo que muitas complicações associadas ao uso desse preenchedor decorrem da formação de biofilmes e não de reações alérgicas ou inflamatórias. Assim, torna-se essencial investigar e estabelecer protocolos rigorosos para o armazenamento seguro das sobras de AH em seringas, minimizando o risco de contaminação e garantindo a segurança dos pacientes submetidos a esses procedimentos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1.1 Aspectos do envelhecimento

Com o avançar da idade, a pele sofre um processo de envelhecimento que é caracterizado por alterações como flacidez, absorção óssea, atrofia e ptoses. Clinicamente é possível observar o desenvolvimento de rugas estáticas, formação de bolsas periorbitais, adelgaçamento da pele, diminuição do volume labial e falta de sustentação da face como um todo. Entretanto, o envelhecimento facial é um processo fisiológico tridimensional complexo, que não se limita apenas a alterações da derme, abrangendo também modificações nos tecidos ósseo, muscular e adiposo. A aparência envelhecida da face é, portanto, o resultado de um conjunto de alterações específicas que ocorrem de forma contínua e progressiva em cada tecido da região facial (53).

O envelhecimento pode ser classificado em: primário e secundário. O envelhecimento primário, quando relacionado à face, envolve alterações no aspecto da pele, reabsorção óssea, perda de estrutura e dimensão dental. O envelhecimento secundário, por sua vez, é influenciado por fatores externos como: doenças, hábitos deletérios como tabagismo, alcoolismo, exposição solar excessiva e dietas inadequadas, impactando diretamente na saúde e na aparência (54).

3.1.2 Envelhecimento cutâneo

A pele, maior órgão do corpo humano, representa cerca de 16% do peso corporal e desempenha um importante papel na proteção das estruturas internas contra o ambiente externo. Sua estrutura é composta por três camadas distintas: epiderme, derme e hipoderme (tela subcutânea). A camada mais externa é denominada epiderme, é avascular e possui espessura de 75 a 150 micrômetros, sua principal função é a proteção contra agentes externos (55).

A derme é a segunda camada, está presente entre a epiderme e o tecido subcutâneo. Possui tecido conjuntivo denso irregular, rica em fibras de colágeno e elastina, componentes essenciais para a sustentação da pele. Também tem participação nos processos fisiológicos e patológicos cutâneos. Sua espessura varia entre 0,6 milímetros até 3 milímetros a depender da região (56).

A hipoderme, também conhecida como tela subcutânea, é a camada mais profunda. É constituída principalmente por adipócitos e possui diferentes funções como: armazenamento de reservas de energia, proteção contra impactos mecânicos, manutenção da temperatura corporal e modelagem do contorno corporal (56).

O envelhecimento cutâneo é influenciado diretamente por fatores intrínsecos e extrínsecos. Entre os fatores intrínsecos pode-se citar a menopausa, a andropausa e o encurtamento dos telômeros. Já entre os fatores extrínsecos, destaca-se a radiação solar em excesso, onde a exposição a luz ultravioleta de forma excessiva é responsável pela ativação de enzimas que fragmentam as fibras de colágeno e elastina, acelerando o envelhecimento cutâneo. Além disso, hábitos como o tabagismo, o alcoolismo e a exposição à poluição ambiental também contribuem para esse processo (57).

3.1.3 Envelhecimento do tecido adiposo

Na hipoderme, existem duas camadas de tecido adiposo: a camada superficial, encontrada abaixo da derme, e a profunda que se encontra abaixo do tecido muscular. Essas duas camadas apresentam processos de envelhecimento diferentes. A camada superficial possui as características de envelhecimento relacionadas com a gordura corporal de cada indivíduo. No emagrecimento essa gordura é perdida e redistribuída, enquanto que, no aumento de peso, essa gordura facial superficial se torna mais volumosa, diferentemente do compartimento de gordura facial profundo, que não sofre alterações tão significativas decorrentes do volume de gordura geral do indivíduo (53).

3.1.4 Envelhecimento dos músculos da face

Com o avançar da idade, a redução do volume muscular de forma generalizada é esperada, principalmente quando se trata dos músculos da face. Embora haja um consenso de que esses músculos se tornem mais finos e alongados com o tempo, concomitantemente, seu tônus muscular aumenta, reduzindo significativamente a amplitude de movimento. Em geral, a face envelhecida pode ser caracterizada por uma contratura muscular permanente, que acompanha as rugas da pele. Em indivíduos com maior adiposidade cutânea, esses efeitos são menos perceptíveis, uma vez que, a massa de gordura subcutânea estica a pele, atenuando o enrugamento (53).

3.1.5 Envelhecimento dos ossos da face

Com o passar dos anos, uma alteração progressiva na altura facial, pode ser observada, resultante das complexas alterações que afetam tanto os tecidos ósseos, quanto os tecidos moles da face. No que se refere à estrutura óssea, através do envelhecimento é possível perceber que as articulações temporomandibulares demonstram sinais de degeneração, incluindo o achatamento da fossa mandibular. Na maxila, o seio maxilar pode apresentar reabsorção óssea acentuada, o que promove uma retração desse osso, ocasionando em perda de dimensão e volume. A órbita também apresenta absorção óssea, fazendo com que a região da calha lacrimal se torne maior, fazendo com que a pele da pálpebra inferior perca sustentação e transmita sensação de alargamento, favorecendo o aspecto de derretimento facial (58).

3.1.6 Estética e envelhecimento

Nos últimos anos, a busca pela manutenção de uma aparência mais jovem tem se tornado uma grande questão na sociedade contemporânea. O processo natural de envelhecimento da pele vem sendo cada vez mais estudado e avanços tecnológicos, afim de retardar esse processo, estão cada vez mais populares. Essas inovações têm permitido novas perspectivas para atenuar o processo de envelhecimento facial, e os preenchedores dérmicos a base de AH se destacam como uma opção não cirúrgica promissora na reversão dos efeitos do envelhecimento intrínsecos e extrínsecos na pele (57, 59).

3.1.7 Ácido Hialurônico e aplicações

A molécula de AH, é um não sulfatado glicosaminoglicano composto por dissacarídeos poliméricos repetidos de D-ácido glucurônico e N-acetil D- glucosamina unidos de forma alternadas por ligações glicosídicas (47). É um importante componente da matriz extracelular (MEC) de humanos e animais. Além disso, é descrito como “hidratante da natureza”, uma vez que possui característica hidrofílica e pode conter até 10.000 vezes seu peso em água (3).

O AH é produzido em praticamente todos os tipos de células, logo, ele exerce funções fisiológicas bem estabelecidas em vários fluidos e órgãos do corpo humano. Ele também participa de diferentes processos celulares essenciais, como a diferenciação, a proliferação e o desenvolvimento celular. Além disso, também desempenha papéis importantes na

lubrificação de articulações, manutenção do equilíbrio de hidratação dos tecidos, construção da MEC e interações entre algumas moléculas (46, 47).

O AH pode modificar propriedades físicas da MEC como, por exemplo, a viscoelasticidade e a organização entre as fibras de colágeno e elastina. Essa condição se deve ao fato da estrutura do AH ser de uma longa cadeia enrolada de forma aleatória e carregada negativamente, abrangendo um domínio hidrodinâmico das fibras colágenas dentro da MEC (3).

Este polímero possui propriedades muito atraentes, incluindo a biocompatibilidade, não inflamação, não imunogenicidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade (46). Ademais, suas propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes e regeneradoras de tecido são responsáveis para que, comumente, essa biomolécula esteja presente em grande parte dos cosméticos com propriedades hidratantes e antienvelhecimento, além de ser a principal substância dos preenchedores faciais utilizada para restaurar volume e minimizar a aparência de rugas e sulcos (3, 47).

A aplicação de preenchedores dérmicos de AH ocorre por meio de seringas estéreis do produto (3). O procedimento é realizado através do uso de agulhas ou cânulas que são determinados pela reticulação do preenchedor, área de aplicação e profundidade dérmica. A técnica varia entre retro injeções, bolus, mista, entre outras, levando em consideração a viscoelasticidade do produto (48).

A harmonização facial utilizando o AH tem ganhado grande destaque como uma opção não cirúrgica atraente para diversos pacientes. Apesar de não substituir uma cirurgia plástica, o procedimento é mais acessível, permite uma recuperação mais rápida e é menos invasivo, motivo pelo qual o procedimento vem ganhando destaque (48).

Embora esse procedimento seja o mais utilizado na reposição de volume e melhora do contorno facial, é necessária uma investigação acerca das suas complicações. Dentre as reações adversas mais comuns, temos: eritema, edema, infecção, hipersensibilidade aguda, complicações vasculares e necroses. Já as complicações com início tardio, se destacam: nódulos inflamatórios, granulomas, biofilme e migração do produto (4, 49).

3.1.8 *Staphylococcus epidermidis*

3.1.9 Características gerais

Staphylococcus epidermidis é uma espécie de bactéria firmicute, caracterizada por ser coagulase negativa (CoNS) e pertencer ao gênero *Staphylococcus*. É uma bactéria Gram-positiva arranjada em cachos e tétrades, que por muito tempo foi considerada uma espécie comensal, porém sabe-se, hoje, que ela é um patógeno oportunista (17).

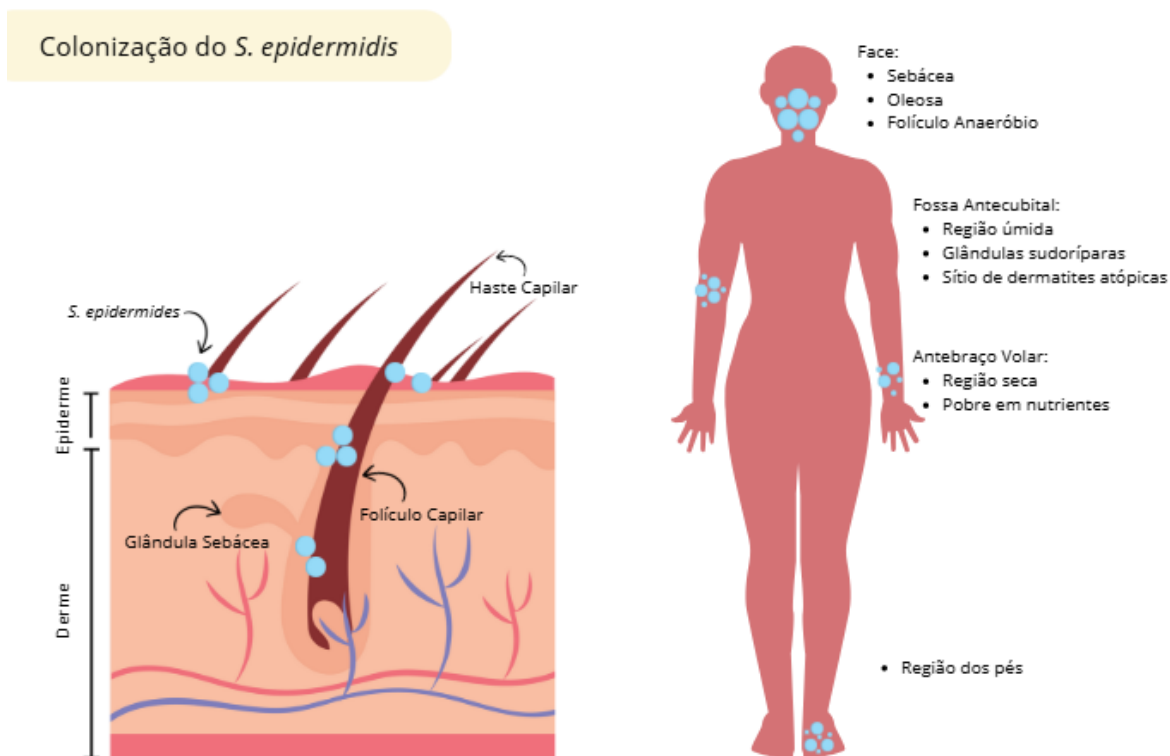
Entre as CoNS, o *S. epidermidis* é responsável pelo maior número de infecções (41). Na maioria das vezes, na microbiologia clínica, as bactérias CoNS não são especificadas, uma vez que, o principal interesse é apenas distinguir entre os *S. aureus* e outros estafilococos. No entanto, através de diferentes relatórios de identificações de espécies, pode-se perceber que a grande maioria das infecções por CoNS não especificadas são derivadas de *S. epidermidis* (31).

O causador mais frequente de infecções em dispositivos médicos permanentes é o *S. epidermidis*. Essas infecções se iniciam com a introdução de bactérias pela pele do paciente ou da equipe de saúde durante a inserção do equipamento. Pelo menos 22% das infecções da corrente sanguínea em pacientes das unidades de terapia intensiva nos EUA são através dessa bactéria. Além da sua abundância na pele, esse alto número se deve, provavelmente, a mecanismos elaborados do *S. epidermidis* em colonizar superfícies (40, 42).

3.1.10 Colonização

A pele humana saudável é colonizada por diferentes espécies de estafilococos CoNS, entretanto, o *S. epidermidis* é o mais abundante entre eles, sendo mais encontrado em regiões úmidas (32). A pele age como uma barreira protetora contra a colonização de microrganismos, mas, em contrapartida, alguns anexos, como o folículo piloso, são mais protegidos da exposição e repletos de líquidos, diferentemente de outras estruturas. Desse modo, a pele pode ser classificada em áreas mais secas (antebraço), úmidas (prega antecubital) ou sebáceas ou oleosas (rosto) (31).

Figura 03 - Principais áreas de colonização de *S. epidermidis*



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025

A evasão das defesas do hospedeiro é um mecanismo que garante a sobrevivência do patógeno. Na pele humana são encontrados alguns mecanismos de defesa limitados, como os AMP's. Entretanto, após a penetração da barreira epitelial, *S. epidermidis* precisa lidar com diferentes mecanismos adicionais de defesa do hospedeiro. Em primeiro lugar, o sistema imunológico inato reage, de forma não específica, a qualquer microrganismo invasor, onde os neutrófilos fagocitam bactérias e utilizam espécies reativas de oxigênio e AMPs (31, 42).

Já a resposta imune específica adquirida possui um papel pouco elucidado quando se trata do *S. epidermidis*. Apesar da produção de anticorpos específicos, o sistema imunológico humano apresenta certa dificuldade em combater infecções de longas duração dessa bactéria.

Isso pode ser devido ao fato que *S. epidermidis* exibir exopolímeros que os protegem dos reconhecimentos dos anticorpos. Além disso, também é discutido que não reagir de forma exacerbada às bactérias colonizadoras seja uma característica evolutiva (42).

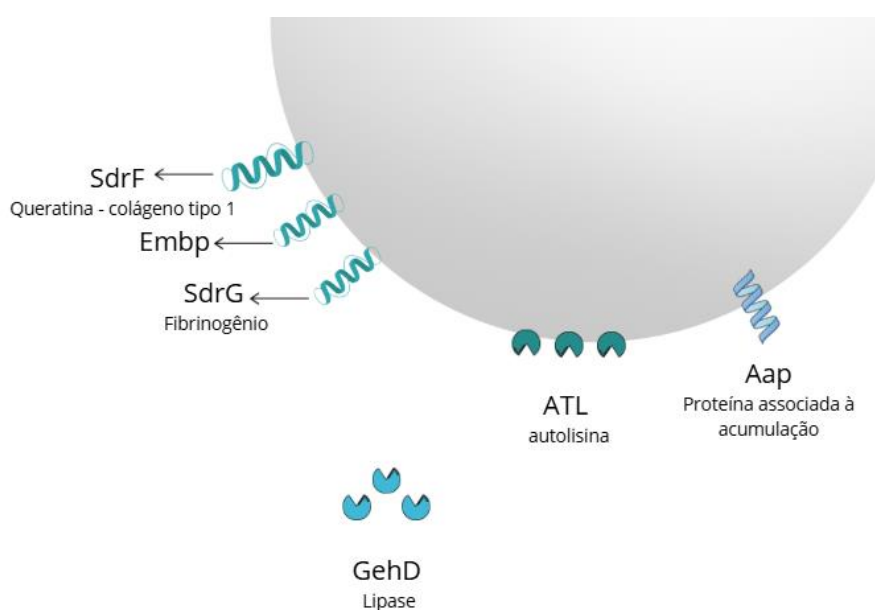
Para que ocorra a colonização da pele humana, *Staphylococcus epidermidis* faz uso de diferentes moléculas de adesão, entre elas, a proteína associada à acumulação (Aap) (31,36).

Essa grande proteína é uma fibrila em forma de bastonete que é ancorada à parede celular e estende-se para fora da célula bacteriana, ligando-se ao extrato córneo da pele. Aap é encontrada em 85-95% de todos os *S. epidermidis*, sugerindo que este é um mecanismo conservado para a adesão (36).

Várias outras proteínas ancoradas na parede celular essenciais para a ligação dos componentes da matriz da pele são expressadas pelo *S. epidermidis* (36). Uma das principais famílias dessas proteínas são as *Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMMs), que são componentes de superfícies microbianas que reconhecem moléculas de matriz adesiva. Essa família inclui as proteínas *Serine-aspartate dipeptide repeat protein F* (SdrF) e *Serine-aspartate dipeptide repeat protein G* (SdrG) que são responsáveis por reconhecer queratina, colágeno do tipo I e fibrinogênio, respectivamente (37).

Além das MSCRAMMs, outras proteínas da parede celular como: autolisina bifuncional (atl), proteína gigante de superfície (Embp) e lipase bifuncional (GehD) contribuem para a adesão bacteriana, fazendo com que ocorra a interação com os componentes da MEC como vitronectina, fibronectina e colágeno, respectivamente. Essa composição de adesinas possibilita que o *S. epidermidis* promova interações complexas com os diversos tecidos da pele, possibilitando sua colonização (36,37).

Figura 04 – Adesão na pele e ligantes



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025

3.1.11 Fatores de Virulência

O arsenal de fatores de virulência do *S. epidermidis* é pequeno quando comparado ao *S. aureus*, entretanto, é composto por fatores que podem possuir um duplo papel, tanto no comensalismo quanto na infecção, incluindo proteases, lipases e Phenol-soluble modulins (PSMs), que são um grupo de peptídeos que desempenha um importante papel na patogênese das infecções estafilocócicas (31).

Sequenciamentos completos do genoma de *S. epidermidis* demonstraram um repertório maior de genes de virulência, ou seja, genes para formação de biofilmes, adesinas, etc, do que previamente estimado. Isso se deve, provavelmente, à flexibilidade genética deste organismo (38).

Muitas evidências atuais sugerem que o comportamento patogênico ou comensal de *S. epidermidis* depende do contexto da infecção. Em 2020, uma análise metagenômica de isolados de pele saudável elucidou que os genes de virulência do *S. epidermidis* são distribuído de forma variável entre os indivíduos e as regiões da pele (31). Ademais, muitos plasmídeos apresentaram diferentes genes de resistência a antibióticos e a prevalência desses plasmídeos foi encontrada em várias regiões diferentes do corpo, o que sugere uma transferência horizontal de genes, representando um reservatório potencial de cepas com fatores de virulência de grande importância ou resistente a antibióticos, mesmo em pele saudável (31, 32) .

3.1.12 Formação de Biofilme

S. epidermidis demonstra uma adaptação significativa em todo o seu genoma ao modo do crescimento em biofilme. Essa adaptação inclui a regulação negativa de processos celulares básicos como a biossíntese de ácidos nucleicos, proteínas e parede celular (31). Logo, essas alterações genéticas podem elucidar a atividade limitada e diminuída de muitos antibióticos que tem como alvo células em crescimento ativo contra o biofilme de *S. epidermidis*, como por exemplo penicilinas, aminoglicosídeos e quinolonas (42,43).

A formação do biofilme se inicia através da adesão e, subsequente, agregação em estruturas multicelulares. Assim, o progresso do biofilme depende da ação das forças coesivas para colonização da superfície e da interação das células entre si mesmas. Já as forças disruptivas são essenciais para a formação de canais preenchidos por fluidos que são responsáveis por

fornecer nutrientes para todas as células do biofilme e promover ao biofilme maduro sua estrutura tridimensional típica. Essas forças disruptivas também estão envolvidas no papel de desprendimento dos agregados celulares do biofilme, o que limita a expansão e pode levar a disseminação da infecção (31, 40).

Diferentes cepas de *S. epidermidis* produzem um homopolímero de poli-N-acetilglicosamina (PNAG), também conhecido como adesina polissacarídica intercelular (PIA), que tem como objetivo envolver e conectar as células de *S. epidermidis* em um biofilme. A produção desse homopolímero é de extrema importância para a formação do biofilme *in vitro* e apresenta um impacto significativo na infecção associada ao biofilme de *S. epidermidis* na maioria dos modelos animais descritos (31).

A biossíntese de PNAG/PIA depende de diferentes influências regulatórias, incluindo reguladores globais de virulência. Embora seja menos compreendido quais sinais ambientais controlam essa expressão, particularmente *in vivo*, a complexidade dessa regulação ressalta a importância do PNAG/PIA para a fisiopatologia de *S. epidermidis* (31, 44).

O conhecimento sobre os mecanismos moleculares e regulação do biofilme em *S. epidermidis* é baseado quase que exclusivamente em pesquisas *in vitro*. A biossíntese PNAG/PIA, SdrF e alguns outros reguladores foram demonstrados usando modelos animais. Ademais, existem evidências indicando que alguns fatores importantes do biofilme são expressados apenas *in vivo*. Logo, são necessárias investigações *in vivo* mais aprofundadas para elucidar os mecanismos da infecção associada ao biofilme de *S. epidermidis*.

3.1.13 Formação de Small Colony Variants (SCVs) do Português Variantes de Pequenas Colônias.

As SCVs são subpopulações bacterianas de crescimento lento, geralmente precisam de 48 a 72 horas para se tornarem viáveis em ágar, que possuem características fisiológicas e bioquímicas alteradas. São colônias pequena e com estabilidade fenotípica variável, frequentemente têm sido correlacionadas com auxotrofismos para menadiona, timidina e/ou hemina. Sua ocorrência muitas vezes está ligada às infecções crônicas, recorrentes ou de longa duração. Acredita-se que essa associação esteja diretamente ligada à capacidade de sobrevivência intracelular das SCVs, que as protege do sistema imunológico do hospedeiro (50).

Uma característica comum e notável das SCVs é a sua associação com o aumento da formação de biofilmes, como demonstrado no estudo com SCVs dependentes de hemina e menadiona (76). Essa característica, juntamente com as demais mencionadas anteriormente, contribui para a redução da virulência das SCVs, mas paradoxalmente aumenta sua capacidade de causar infecções persistentes. Isso ocorre porque as SCVs, ao se encontrarem no interior das células hospedeiras sem desencadear uma resposta imune robusta, atuam como reservatórios para infecções persistentes (52).

As opções para tratamento para infecções causadas por SCVs são limitadas devido às características notáveis das SCVs, como a baixa taxa metabólica, replicação lenta e resistência aos antimicrobianos (52).

4. OBJETIVOS

4.1.1 Objetivo Geral

Determinar se ocorre contaminação microbiológica em seringas de preenchedores dérmicos de AH em intervalos entre 15 e 30 dias após a primeira aplicação no paciente e analisar se o AH possibilita o desenvolvimento de biofilme de *S. epidermidis*.

4.1.2 Objetivo Específico

- Determinar se bactérias ou fungos estão presentes nas seringas com AH após o intervalo entre 15 e 30 dias.
- Estudar se o AH favorece o desenvolvimento de biofilme de *S. epidermidis*.
- Observar se o tratamento de biofilmes com ampicilina favorece a produção de SCVs.

5. METODOLOGIA

5.1.1 Amostras

Um total de 70 amostras de ácido hialurônico foram coletadas em dois momentos distintos: diretamente da seringa antes do uso e entre 15 e 30 dias após a injeção no paciente.

As amostras foram armazenadas dentro da embalagem dos preenchedores, em gavetas, protegidas da luz e da umidade. Além disso, a bancada onde os procedimentos foram realizados foi previamente higienizada seguindo o mesmo protocolo, e a assepsia do paciente também foi devidamente realizada.

Cada uma das amostras foi semeada em caldo *brain heart infusion* (BHI) em condições aeróbicas a 37 °C por 72 h. Logo após, todos os caldos foram misturados em vórtex e 20 µl deles foram cultivados em placas de Petri com ágar sangue (5%) (bactérias), ágar MacConkey (bactérias) e Agar Sabouraud (fungos), em uma cabine de biossegurança e incubados aerobiamente a 37°C por 24-48 h.

5.1.2 Identificação das amostras

Após cultivo, as colônias foram retiradas para que ocorra a identificação morfológica através da técnica de Gram e observação microscópica.

A técnica de coloração de Gram é um método bacterioscópico muito importante realizado na bacteriologia, sendo um recurso auxiliar na classificação de microrganismos através das suas características tintoriais, tamanho, arranjo celular e forma.

Através dessa técnica as bactérias são classificadas em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. No que se refere às características tintoriais, as bactérias Gram-positivas são coradas de roxo e as bactérias Gram-negativas coram-se de rosa.

Após o preparo das amostras, ocorreu a confecção dos esfregaços. Posteriormente, a técnica de coloração de Gram protocolada foi executada unicamente utilizando um mesmo kit de coloração, para evitar variabilidades. Por fim, as lâminas foram analisadas microscopicamente.

A técnica de coloração de Gram respeita um protocolo de ações que a padroniza sendo composto pelos seguintes passos:

- 1) Cobrir o esfregaço com violeta-de-metila e deixar por aproximadamente 15 segundos;
- 2) Adicionar igual quantidade de água sobre a lâmina coberta com violeta-de-metila e deixar agir por mais 45 segundos;
- 3) Escorrer o corante e lavar em um filete de água corrente; cobrir a lâmina com lugol diluído (1/20) e deixar agir por aproximadamente 1 minuto;
- 4) Escorrer o lugol e lavar em um filete de água corrente;

- 5) Adicionar álcool etílico (99,5° GL) sobre a lâmina; descorando-a, até que não desprenda mais corante;
- 6) Lavar em um filete de água corrente;
- 7) Cobrir a lâmina com safranina e deixar agir por aproximadamente 30 segundos;
- 8) Lavar em um filete de água corrente;
- 9) Deixar secar ao ar livre, ou secar suavemente, com o auxílio de um papel de filtro limpo;
- 10) Colocar uma gota de óleo de imersão sobre o esfregão;
- 11) Ler em objetiva de imersão (100 x)

As amostras também foram identificadas por subcultura em ágar seletivo; ágar hipertônico manitol para bactérias do gênero *Staphylococcus*, ágar *Sabouraud* para fungos e ágar *MacConkey* para bastonetes Gram-negativos. Após o isolamento das bactérias e fungos em culturas seletivas, foi realizada a extração do DNA de colônias isoladas usando um kit de extração de DNA genômico (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Para a extração de DNA genômico, utilizou-se o método baseado em fervura após cada amostra estar no mínimo 48 horas em meio líquido. O método consiste na centrifugação das amostras à 13000 rpm por 5 minutos, seguido do descarte do meio. Colocou-se, posteriormente 100 µL de água estéril, passou-as no vórtex e as levou ao banho maria a 100°C por 15 minutos, passou-as no vórtex novamente antes do banho de gelo de 10 minutos. Por fim, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos em 14000 rpm e armazenadas em freezer.

Para a identificação genética dos microrganismos, foram utilizados os seguintes pares de iniciadores: F (kGCGrACGGGTGAGTAA) e R (CGCATTTTCACCGCTA), que amplificam o gene 16S rRNA bacteriano, e F (AATTGACGGAAGGGCACC) e R (TTCCTCGTTGAAGAGCAA), que amplificam o gene 18S rRNA de fungos, seguindo o protocolo de PCR descrito no artigo. (28).

Após a PCR, os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Life Technologies, Inc., USA) por 30 minutos a 100 volts usando buffer TBE 1x ⁽¹⁰⁴⁾. Finalmente, o gel foi corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e observado sob luz UV, o marcador de peso molecular utilizado foi de 100 pb.

5.1.3 Formação do biofilme de *S. epidermidis*.

Uma concentração de 1.10^6 UFC/ml de *S. epidermidis* (ATCC 33591), CIM 60 µg/ml para ampicilina, foram semeadas em placas de 6 poços com 3 ml de BHI e um botão de 0,25 ml AH no centro dos poços, seguindo em partes o protocolo descrito no artigo (29). Para remover as bactérias planctônicas, ocorreu a lavagem dos poços três vezes com PBS 1x. Para separar as bactérias do biofilme, as placas foram submetidas a uma sonicação de 2 s em banho-maria seguido por diluições decimais seriadas em PBS. Posteriormente, alíquotas de 100 µl das diluições (10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶) foram inoculadas em placas de Petri preparadas com meios de cultura e incubadas por 24 h a 37°C. Após crescimento ocorreu a contagem das UFC/ml obtidas em cada placa e foi realizada a interpretação dos resultados. As placas de Petri foram deixadas também por 48h e 72 h a 37°C para obter SCVs.

5.1.4 Análise da ação da ampicilina sobre o biofilme de *S. epidermidis* e geração de SCVs.

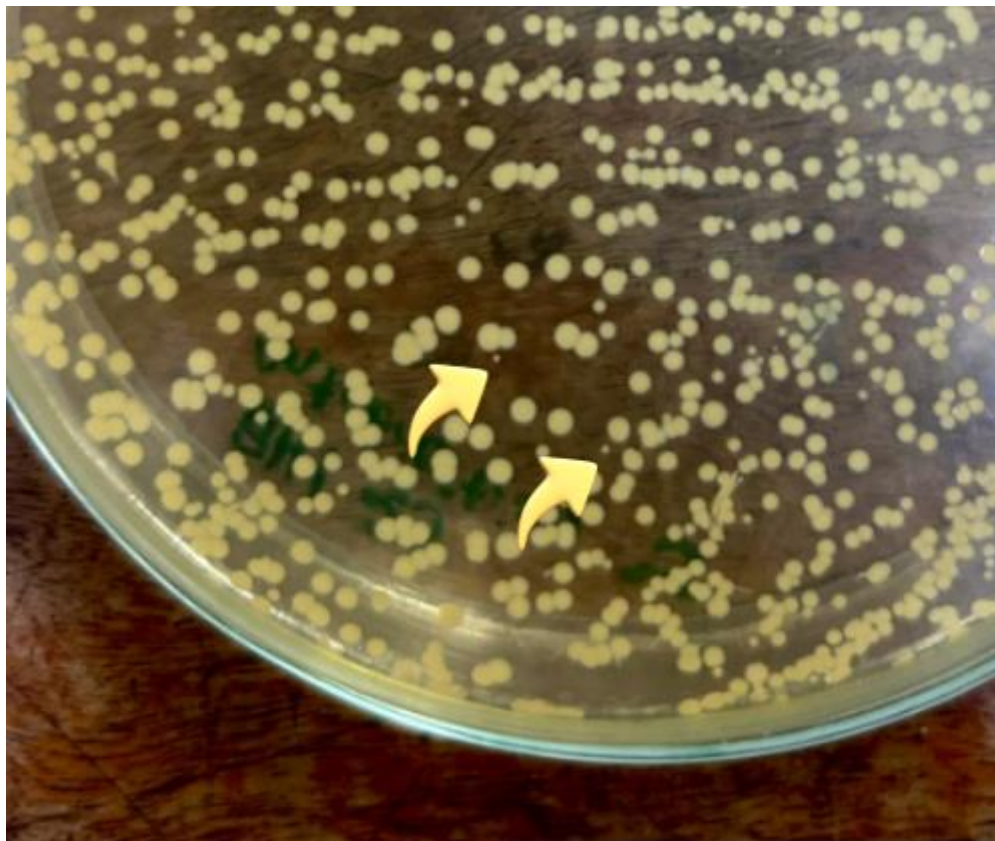
Uma concentração de 1.10^6 UFC/ml de *S. epidermidis* foram semeadas em placas de 6 poços com 3 ml de BHI e um botão de 0,25 ml de AH (20 mg/ml) no centro dos poços, seguindo em partes o protocolo descrito no artigo (29).

As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Em seguida, os poços foram tratados com uma concentração de 50 µg/ml e 25 µg/ml de ampicilina e, mais uma vez, as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C.

Para remover as bactérias planctônicas, ocorreu a lavagem dos poços três vezes com PBS 1x. Para separar as bactérias do biofilme, as placas foram submetidas a uma sonicação de 2 s em banho-maria seguido por diluições decimais seriadas em PBS 1x.

Posteriormente, alíquotas de 100 µl das diluições (10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶) foram inoculadas em placas de Petri preparadas com meios de cultura e incubadas por 24 h a 37°C. Após crescimento ocorreu a contagem das UFC/ml obtidas em cada placa e foi realizada a interpretação dos resultados. As placas de Petri foram deixadas também por 48h e 72 h a 37°C para obter SCVs. prestando atenção especial às diferentes concentrações de antibióticos.

Figura 05 – Small colony Variants de *S. epidermidis* em ágar BHI após 4 dias de incubação a 37°C



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025

5.1.5 5.5 Análise estatística.

Os experimentos ocorreram com três réplicas biológicas independentes. Os dados foram analisados usando o software Graph Pad Prism ver. 9 (Graph Pad, EUA). Os testes de Mann Whitney / Wilcoxon também ocorreram. A significância estatística foi determinada em $p=0,05$.

5.1.6 Critério de exclusão.

Os critérios de exclusão são os seguintes: 1) qualquer infecção da pele, que incluía: infecções bacterianas, virais e fúngicas, ou inflamação, que incluía: eczema, psoríase e rosácea, e 2) qualquer aspiração durante o tempo de injeção.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas apresentadas detalham os resultados obtidos nas análises de amostras de AH, classificando-as de acordo com alguns parâmetros relevantes para a avaliação da segurança do material. As informações contidas nas tabelas abrangem a identificação do tipo de amostra analisada, a concentração de ácido hialurônico do material, a descrição do método utilizado para armazenar as amostras, o tempo pelo qual as amostras foram armazenadas antes da análise, o resultado da análise microbiológica, indicando a presença ou ausência de microrganismos nas amostras, e a caracterização das bactérias encontradas nas amostras contaminadas, utilizando a coloração de Gram para auxiliar na identificação e classificação dos microrganismos. A análise conjunta desses parâmetros permite uma avaliação abrangente da qualidade das amostras de AH, identificando possíveis fatores que possam influenciar a contaminação e auxiliando na definição de boas práticas de armazenamento do produto.

Tabela 1: Tabela de amostra de preenchimento labial que foi armazenado com a própria agulha de aplicação.

TIPO DE AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO	FORMA DE ARMAZENAMENTO	TEMPO DE ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS CONTAMINADAS	GRAM
PREENCHIMENTO LABIAL	20 mg/ml	FECHADO COM A PRÓPRIA AGULHA DE APLICAÇÃO	15 DIAS	SIM	Staphylococcus GRAM +
PREENCHIMENTO LABIAL	20 mg/ml	FECHADO COM A PRÓPRIA AGULHA DE APLICAÇÃO	15 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO LABIAL	23 mg/ml	FECHADO COM A PRÓPRIA AGULHA DE APLICAÇÃO	20 DIAS	SIM	Staphylococcus GRAM +
PREENCHIMENTO LABIAL	23 mg/ml	FECHADO COM A PRÓPRIA AGULHA DE APLICAÇÃO	20 DIAS	SIM	Staphylococcus GRAM +
PREENCHIMENTO LABIAL	25,5 mg/ml	FECHADO COM A PRÓPRIA AGULHA DE APLICAÇÃO	20 DIAS	SIM	BACILOS GRAM +
PREENCHIMENTO LABIAL	23 mg/ml	FECHADO COM A PRÓPRIA AGULHA DE APLICAÇÃO	25 DIAS	SIM	BACILOS GRAM +
PREENCHIMENTO LABIAL	20 mg/ml	FECHADO COM A PRÓPRIA AGULHA DE APLICAÇÃO	30 DIAS	SIM	BACILOS GRAM +

A tabela em análise apresenta os resultados da contaminação de amostras de preenchimento labial armazenadas com a própria agulha de aplicação. Dos sete isolados estudados, seis apresentaram contaminação, o que corresponde a uma taxa de 85,7%. Esse elevado índice de

contaminação sugere uma forte correlação entre o método de armazenamento utilizado e a probabilidade de contaminação das amostras. A prática de armazenar preenchedores labiais com a agulha de aplicação parece ser um fator de risco significativo para a contaminação microbiana, comprometendo a segurança e a qualidade do produto.

Tabela 2: Tabela de amostra de preenchimento labial que foi armazenado com a própria tampa que ficou exposta na bancada durante o procedimento.

TIPO DE AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO	FORMA DE ARMAZENAMENTO	TEMPO DE ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS CONTAMINADAS	GRAM
PREENCHIMENTO LABIAL	20 mg/ml	FECHADO COM A TAMPA QUE FICOU NA BANCADA	15 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO LABIAL	25,5 mg/ml	FECHADO COM A TAMPA QUE FICOU NA BANCADA	20 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO LABIAL	25,5 mg/ml	FECHADO COM A TAMPA QUE FICOU NA BANCADA	25 DIAS	SIM	BACILOS GRAM -
PREENCHIMENTO LABIAL	23 mg/ml	FECHADO COM A TAMPA QUE FICOU NA BANCADA	30 DIAS	SIM	BACILOS GRAM -
PREENCHIMENTO LABIAL	23 mg/ml	FECHADO COM A TAMPA QUE FICOU NA BANCADA	20 DIAS	NÃO	

A tabela em questão apresenta os resultados da contaminação de amostras de preenchimento labial armazenadas com a própria tampa que permaneceu exposta na bancada durante todo o procedimento. Dos cinco isolados analisados, dois apresentaram contaminação, o que representa uma taxa de 40%. Essa taxa de contaminação, embora inferior à observada no armazenamento com a própria agulha do procedimento, sugere que a exposição da tampa na bancada pode ser um fator de risco para a contaminação das amostras. A presença de microrganismos em 40% dessas amostras indica que a tampa, ao entrar em contato com o ambiente da bancada, pode ter sido contaminada e, conseqüentemente, transferido microrganismos para o interior do preenchedor.

Partículas minúsculas, denominadas aerossóis, podem permanecer suspensas no ar por longos períodos antes de se depositarem em superfícies. Esses aerossóis podem conter uma variedade de microrganismos, como bactérias e vírus (73). Um estudo observacional revelou a presença de contaminação ambiental por aerossóis em salas odontológicas. Em todos os 54 casos analisados, houve detecção de contaminação no ambiente de trabalho. A análise de placas de

ágar posicionadas em um raio de 0,75 metros do local de realização dos procedimentos demonstrou o crescimento de microbiota oral, incluindo bactérias não fermentadoras e fungos (75). A fim de minimizar a contaminação por aerossóis, é recomendável que instrumentos e dispositivos não utilizados permanentemente sejam armazenados em compartimentos herméticos, como armários e gavetas. As superfícies expostas devem ser limitadas a áreas planas e de fácil higienização, facilitando a limpeza e a desinfecção (74).

Este estudo corrobora a hipótese de que a contaminação observada nas amostras de preenchimento labial, decorrente do fechamento da seringa com a tampa exposta na bancada, pode ser atribuída à presença de aerossóis contaminados no ambiente.

Tabela 3: Tabela de amostra de preenchimento labial que foi aberto e transferido para outra seringa e imediatamente fechado com a própria tampa.

TIPO DE AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO	FORMA DE ARMAZENAMENTO	TEMPO DE ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS CONTAMINADAS	GRAM
PREENCHIMENTO LABIAL	25,5 mg/ml	PREENCHEDOR QUE FOI ABERTO E TRANSFERIDO PARA OUTRA SERINGA E FECHADO COM A TAMPA	15 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO LABIAL	25,5 mg/ml	PREENCHEDOR QUE FOI ABERTO E TRANSFERIDO PARA OUTRA SERINGA E FECHADO COM A TAMPA	15 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO LABIAL	20 mg/ml	PREENCHEDOR QUE FOI ABERTO E TRANSFERIDO PARA OUTRA SERINGA E FECHADO COM A TAMPA	20 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO LABIAL	20 mg/ml	PREENCHEDOR QUE FOI ABERTO E TRANSFERIDO PARA OUTRA SERINGA E FECHADO COM A TAMPA	20 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO LABIAL	23 mg/ml	PREENCHEDOR QUE FOI ABERTO E TRANSFERIDO PARA OUTRA SERINGA E FECHADO COM A TAMPA	30 DIAS	NÃO	

Esta tabela apresenta os resultados da análise de contaminação de amostras de preenchimento labial que foram abertas, transferidas para uma seringa estéril e imediatamente fechadas com a própria tampa. Nenhuma das cinco amostras analisadas apresentou contaminação. Esse resultado sugere que a técnica de transferência para uma seringa estéril, seguida do fechamento imediato do produto, é eficaz na prevenção da contaminação microbiana. A ausência de contaminação nessas amostras indica que a exposição breve ao ambiente durante a transferência, quando realizada em condições assépticas e seguida de fechamento imediato, não compromete a esterilidade do preenchedor.

Tabela 4: Tabela de amostra de preenchimento de zigomático e diferentes formas de armazenamento do preenchedor.

TIPO DE AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO	FORMA DE ARMAZENAMENTO	TEMPO DE ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS CONTAMINADAS	GRAM
PREENCHIMENTO DE ZIGOMÁTICO	20 mg/ml	FECHADO COM A TAMPA QUE FICOU NA BANCADA	15 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO DE ZIGOMÁTICO	20 mg/ml	FECHADO COM A TAMPA QUE FICOU NA BANCADA	20 DIAS	SIM	BACIOS GRAM +
PREENCHIMENTO DE ZIGOMÁTICO	25 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	25 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO DE ZIGOMÁTICO	25 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	30 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO DE ZIGOMÁTICO	20 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	15 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO DE ZIGOMÁTICO	25 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	15 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO DE ZIGOMÁTICO	20 mg/ml	FECHADO COM A PRÓPRIA AGULHA DE APLICAÇÃO	25 DIAS	SIM	BACIOS GRAM +
PREENCHIMENTO DE ZIGOMÁTICO	25 mg/ml	FECHADO COM A PRÓPRIA AGULHA DE APLICAÇÃO	30 DIAS	SIM	BACIOS GRAM +

A tabela em análise apresenta os resultados da contaminação de amostras de preenchimento da região do osso zigomático, avaliando diferentes formas de armazenamento. Das oito amostras analisadas, três apresentaram contaminação, evidenciando que a contaminação ocorre em diferentes técnicas de armazenamento. Destas, duas amostras foram fechadas com a própria agulha de aplicação e uma com a tampa que ficou exposta na bancada. Esse resultado reforça os dados obtidos nas tabelas anteriores, que indicam que o armazenamento com a agulha de aplicação e a exposição da tampa na bancada são fatores de risco para a contaminação microbiana dos preenchedores.

Tabela 5: Tabela de amostra de preenchimento da região nasal e diferentes formas de armazenamento do preenchedor.

TIPO DE AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO	FORMA DE ARMAZENAMENTO	TEMPO DE ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS CONTAMINADAS	GRAM
PREENCHIMENTO DA REGIÃO NASAL	20 MG/ML	USO DE CÂNULA E FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	15 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO DA REGIÃO NASAL	20 mg/ml	USO DE CÂNULA E FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	25 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO DA REGIÃO NASAL (COLUMELA)	25 mg/ml	FECHADO COM AGULHA DA APLICAÇÃO	30 DIAS	SIM	<i>Staphylococcus</i> GRAM +
PREENCHIMENTO DA REGIÃO NASAL	25 mg/ml	FECHADO COM A TAMPA QUE FICOU NA BANCADA	30 DIAS	NÃO	

Esta tabela apresenta os resultados da análise de contaminação de amostras de preenchimento da região nasal, avaliando diferentes formas de armazenamento. Das quatro amostras analisadas, apenas uma apresentou contaminação, especificamente a amostra fechada com a agulha de aplicação (tabela 5).

A amostra fechada com a tampa que ficou exposta na bancada não apresentou contaminação. Esse resultado, sugere que a contaminação pode estar mais fortemente associada ao uso da agulha de aplicação como método de fechamento, em comparação com a exposição da tampa na bancada.

Tabela 6: Tabela de amostra de preenchimento mandibular e diferentes formas de armazenamento do preenchedor.

TIPO DE AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO	FORMA DE ARMAZENAMENTO	TEMPO DE ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS CONTAMINADAS	GRAM
PREENCHIMENTO MANDIBULAR	25 mg/ml	FECHADO COM A TAMPA QUE FICOU NA BANCADA	15 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO MANDIBULAR	25 mg/ml	FECHADO COM A TAMPA QUE FICOU NA BANCADA	20 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO MANDIBULAR	25 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	25 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO MANDIBULAR	20 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	15 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO MANDIBULAR	20 mg/ml	FECHADO COM A PRÓPRIA AGULHA DE APLICAÇÃO	30 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO MANDIBULAR	20 mg/ml	FECHADO COM A PRÓPRIA AGULHA DE APLICAÇÃO	30 DIAS	SIM	BACILOS GRAM +

A tabela apresenta os resultados da análise de contaminação de amostras de preenchimento mandibular, considerando diferentes métodos de armazenamento. Das seis amostras analisadas, apenas uma apresentou contaminação, a amostra armazenada com a agulha de aplicação do preenchedor (tabela 6). Os resultados negativos de contaminação nas amostras fechadas com a tampa exposta na bancada sugerem que a contaminação ambiental pode ser um fator variável, dependente do grau de exposição e das condições específicas do local. A contaminação da amostra armazenada com a agulha reforça a tendência observada em outras análises, indicando que esse método de armazenamento pode ser um fator de risco mais significativo para a contaminação microbiana dos preenchedores.

Tabela 7: Tabela de amostra de preenchimento da região de maxila e diferentes formas de armazenamento do preenchedor.

TIPO DE AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO	FORMA DE ARMAZENAMENTO	TEMPO DE ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS CONTAMINADAS	GRAM
PREENCHIMENTO MAXILA	20 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	25 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO MAXILA	20 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	15 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO MAXILA	23 mg/ml	FECHADO COM A TAMPÃO QUE FICOU NA BANCADA	30 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO MAXILA	20 mg/ml	FECHADO COM A PRÓPRIA AGULHA DE APLICAÇÃO	30 DIAS	SIM	BACILOS GRAM +
PREENCHIMENTO MAXILA	23 mg/ml	FECHADO COM A PRÓPRIA AGULHA DE APLICAÇÃO	30 DIAS	SIM	BACILOS GRAM +
PREENCHIMENTO MAXILA	23 mg/ml	FECHADO COM A PRÓPRIA AGULHA DE APLICAÇÃO	30 DIAS	SIM	BACILOS GRAM +

A tabela em questão apresenta os resultados da análise de contaminação de amostras de preenchimento da região da maxila, considerando diferentes métodos de armazenamento. Das seis amostras analisadas, três apresentaram contaminação, e todas as amostras contaminadas foram fechadas e armazenadas com a agulha de aplicação (tabela 7). Esse resultado reforça a tendência observada em outras análises, indicando que o armazenamento com a agulha de aplicação é um fator de risco significativo para a contaminação microbiana dos preenchedores. A alta taxa de contaminação (50%) sugere que esse método de armazenamento deve ser evitado, a fim de garantir a segurança e a qualidade do procedimento.

Tabela 8: Tabela de amostra de preenchimento da região do sulco nasogeniano e diferentes formas de armazenamento do preenchedor.

TIPO DE AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO	FORMA DE ARMAZENAMENTO	TEMPO DE ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS CONTAMINADAS	GRAM
PREENCHIMENTO SULCO NASOGENIANO	23 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	15 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO SULCO NASOGENIANO	25 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	20 DIAS	SIM	DIPLOCOCOS GRAM +
PREENCHIMENTO SULCO NASOGENIANO	20 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	25 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO SULCO NASOGENIANO	23 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	25 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO SULCO NASOGENIANO	25 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	30 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO SULCO NASOGENIANO	25 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	30 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO SULCO NASOGENIANO	25 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	15 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO SULCO NASOGENIANO	25 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	20 DIAS	SIM	DIPLOCOCOS GRAM +
PREENCHIMENTO SULCO NASOGENIANO	23 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	20 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO SULCO NASOGENIANO	20 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	25 DIAS	SIM	BACILOS GRAM +
PREENCHIMENTO SULCO NASOGENIANO	23 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	30 DIAS	SIM	<i>Staphylococcus</i> GRAM +
PREENCHIMENTO SULCO NASOGENIANO	20 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	30 DIAS	SIM	DIPLOCOCOS GRAM +

A tabela apresentada demonstra os resultados da análise de contaminação de amostras de preenchimento da região do sulco nasogeniano, considerando diferentes métodos de armazenamento. Das 12 amostras analisadas, cinco apresentaram contaminação. Especificamente, uma amostra fechada com a tampa exposta na bancada, três amostras fechadas com a seringa de aplicação e uma amostra fechada com agulha estéril apresentaram contaminação (tabela 8). A contaminação da amostra fechada com agulha estéril é um achado isolado, não seguindo a tendência geral observada nas outras amostras.

Assim como nas amostras de preenchimento labial, a maioria dos microrganismos encontrados nas amostras contaminadas do sulco nasogeniano foi classificada como Gram-positiva, incluindo algumas espécies de *Staphylococcus*, que são colonizadoras comuns de mucosas. Esses resultados reforçam a importância de técnicas de manipulação assépticas e a necessidade de evitar o armazenamento de preenchedores com a agulha de aplicação, a fim de minimizar o risco de contaminação microbiana.

Tabela 9: Tabela de amostra de preenchimento da região de olheiras e diferentes formas de armazenamento do preenchedor.

TIPO DE AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO	FORMA DE ARMAZENAMENTO	TEMPO DE ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS CONTAMINADAS	GRAM
PREENCHIMENTO DE OLHEIRAS	23 mg/ml	FECHADO COM A TAMPA QUE FICOU NA BANCADA	15 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO DE OLHEIRAS	20 mg/ml	FECHADO COM A TAMPA QUE FICOU NA BANCADA	20 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO DE OLHEIRAS	20 mg/ml	FECHADO COM A TAMPA QUE FICOU NA BANCADA	20 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO DE OLHEIRAS	23 mg/ml	FECHADO COM A TAMPA QUE FICOU NA BANCADA	25 DIAS	SIM	BACIOS GRAM +
PREENCHIMENTO DE OLHEIRAS	20 mg/ml	FECHADO COM A TAMPA QUE FICOU NA BANCADA	30 DIAS	SIM	BACIOS GRAM + E COCOBACIOS
PREENCHIMENTO DE OLHEIRAS	23 mg/ml	FECHADO COM A TAMPA QUE FICOU NA BANCADA	30 DIAS	NÃO	

A tabela em questão apresenta os resultados da análise de contaminação de amostras de preenchimento da região de olheiras, avaliando o armazenamento exclusivo com a tampa exposta na bancada durante todo o procedimento. Das seis amostras analisadas, duas apresentaram contaminação (tabela 9). Esse resultado indica que a exposição da tampa na bancada, durante todo o procedimento, pode levar à contaminação microbiana em um número significativo de amostras (33,3%). A presença de contaminação em duas amostras reforça a necessidade de cuidados rigorosos com a manipulação e o armazenamento de preenchedores.

Tabela 10: Tabela de amostra de preenchimento da região de mento e diferentes formas de armazenamento do preenchedor.

TIPO DE AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO	FORMA DE ARMAZENAMENTO	TEMPO DE ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS CONTAMINADAS	GRAM
PREENCHIMENTO DE MENTO	20 mg/ml	FECHADO COM A PRÓPRIA AGULHA DE APLICAÇÃO	15 DIAS	SIM	BACILOS GRAM +
PREENCHIMENTO DE MENTO	20 mg/ml	FECHADO COM A PRÓPRIA AGULHA DE APLICAÇÃO	15 DIAS	SIM	DIPLOCOCOS GRAM +
PREENCHIMENTO DE MENTO	25 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	20 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO DE MENTO	25 mg/ml	FECHADO COM AGULHA ESTÉRIL	25 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO DE MENTO	20 mg/ml	FECHADO COM A TAMPA QUE FICOU NA BANCADA	25 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO DE MENTO	25 mg/ml	FECHADO COM A TAMPA QUE FICOU NA BANCADA	30 DIAS	NÃO	

Esta tabela apresenta os resultados da análise de contaminação de amostras de preenchimento da região do mento, avaliando diferentes métodos de armazenamento. Das seis amostras analisadas, apenas as que foram fechadas com a própria agulha do procedimento apresentaram contaminação (tabela 10). Esse resultado reforça a tendência observada nas demais análises, indicando que o armazenamento com a agulha de aplicação é um fator de risco significativo para a contaminação microbiana dos preenchedores, independentemente da região facial onde o procedimento é realizado.

Tabela 11: Tabela de amostra de preenchimento de diferentes regiões com forma de armazenamento específica e tempo de armazenamento superior a 30 dias.

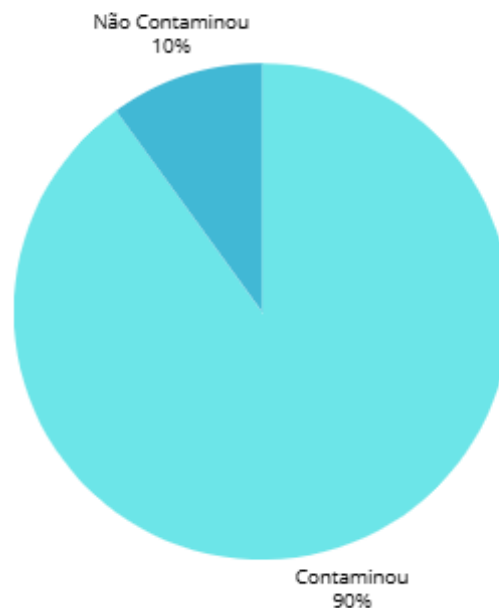
TIPO DE AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO	FORMA DE ARMAZENAMENTO	TEMPO DE ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS CONTAMINADAS	GRAM
PREENCHIMENTO DE LÁBIO	23 mg/ml	PREENCHEDOR QUE FOI ABERTO E TRANSFERIDO PARA OUTRA SERINGA E FECHADO COM A TAMPA	60 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO DE MENTO	20 mg/ml	PREENCHEDOR QUE FOI ABERTO E TRANSFERIDO PARA OUTRA SERINGA E FECHADO COM A TAMPA	60 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO DE OLHEIRA	20 mg/ml	PREENCHEDOR QUE FOI ABERTO E TRANSFERIDO PARA OUTRA SERINGA E FECHADO COM A TAMPA	60 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO DE SULCO NASOGENIANO	25 mg/ml	PREENCHEDOR QUE FOI ABERTO E TRANSFERIDO PARA OUTRA SERINGA E FECHADO COM A TAMPA	90 DIAS	NÃO	
PREENCHIMENTO DE MAXILA	25 mg/ml	PREENCHEDOR QUE FOI ABERTO E TRANSFERIDO PARA OUTRA SERINGA E FECHADO COM A TAMPA	60 DIAS	NÃO	

Esta tabela apresenta os resultados de contaminação de amostras de preenchimento de diferentes regiões faciais, todas submetidas à um método de armazenamento específico, sendo ele a transferência para seringa estéril, fechamento imediato e posterior armazenamento (tabela 11).

Nenhuma das seis amostras analisadas apresentou contaminação. Esse resultado corrobora a eficácia do método de armazenamento de transferência para seringa estéril e fechamento imediato na preservação da esterilidade do preenchedor, mesmo após um período prolongado de armazenamento. A ausência de contaminação em todas as amostras, independentemente da região facial de aplicação e do tempo de armazenamento, reforça a confiabilidade e a segurança desse método como possível prática recomendada para o armazenamento de preenchedores.

Gráfico 1: Preenchedores armazenados com a agulha de aplicação

Preenchedores armazenados com
a agulha de aplicação



O gráfico apresenta um resultado alarmante: 90% dos preenchedores armazenados com a agulha de aplicação sofreram contaminação. Essa constatação levanta sérias preocupações sobre a segurança e a qualidade dos procedimentos estéticos que envolvem o uso de preenchedores, especialmente aqueles que são reaproveitados ou armazenados para uso posterior (gráfico 1).

O resultado de 90% de contaminação em preenchedores armazenados com a agulha de aplicação ganha ainda mais relevância quando analisado à luz de estudos que demonstram a presença de bactérias em biópsias de preenchimentos de tecidos moles, especialmente em pacientes que desenvolveram eventos adversos inflamatórios tardios (10, 65).

Pesquisas recentes, utilizando métodos de detecção de microbiota altamente sensíveis, como o IS-pro, revelaram a presença de bactérias Gram-positivas em biópsias de preenchimentos, sugerindo que a contaminação pode ocorrer durante o procedimento, no momento da injeção inicial. A comparação da microbiota encontrada na pele com a presente nas biópsias descartou a possibilidade de contaminação durante o preparo e coleta das amostras, reforçando a hipótese de que a contaminação bacteriana está diretamente relacionada aos eventos adversos (65).

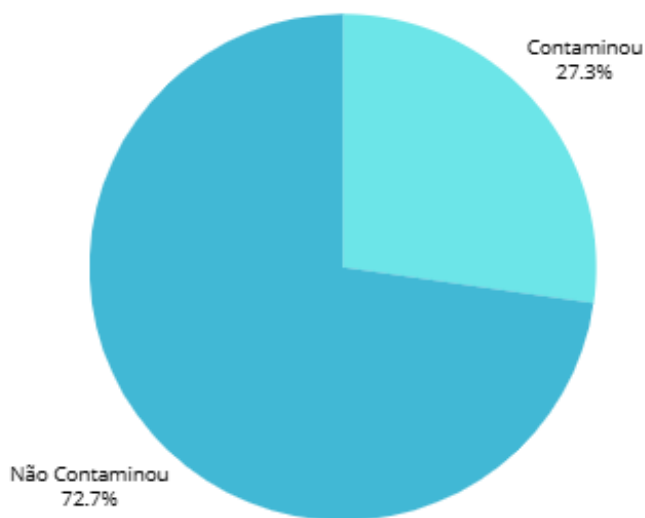
Esses achados corroboram a preocupação com a alta taxa de contaminação observada nos preenchedores armazenados com agulha, indicando que a presença de bactérias pode desempenhar um papel crucial no desenvolvimento de complicações inflamatórias tardias. A

contaminação durante o procedimento ou a bacteremia subsequente podem levar à formação de biofilmes nos preenchedores, desencadeando reações inflamatórias persistentes e de difícil tratamento (65).

Essa alta taxa sugere que a prática de armazenar preenchedores com a agulha de aplicação é um fator de risco significativo para a contaminação. A agulha, por ser um instrumento perfurocortante, pode introduzir microrganismos presentes na pele do paciente ou no ambiente durante o procedimento de aplicação. Esses microrganismos podem se multiplicar no preenchedor armazenado, comprometendo sua esterilidade e aumentando o risco de infecções e outras complicações para o paciente em aplicações subsequentes (66).

Gráfico 2: Preenchedores armazenados com a tampa do preenchedor que permaneceu na bancada durante todo o procedimento

Preenchedores armazenados com a tampa do preenchedor que ficou na bancada

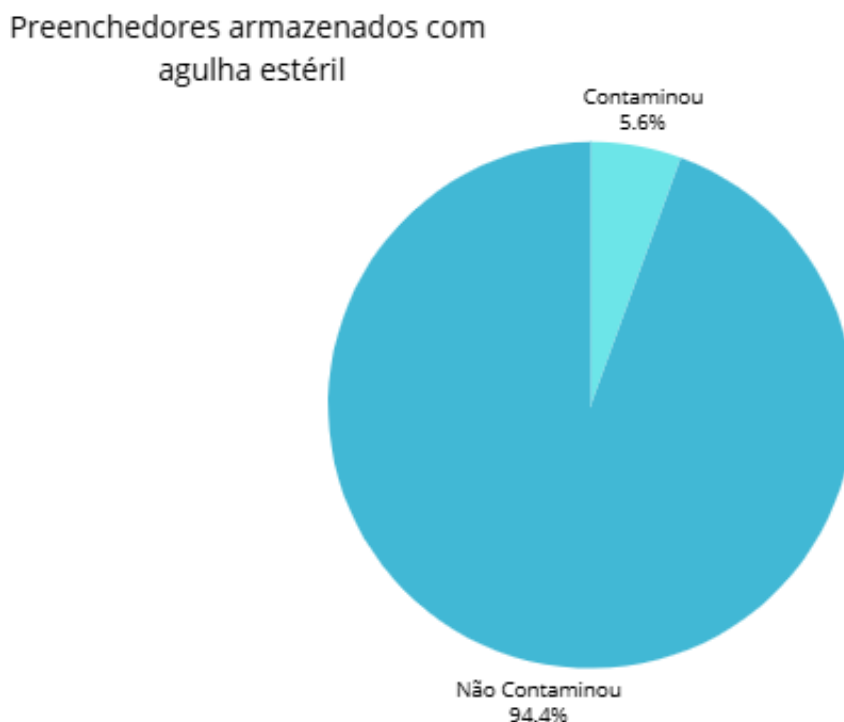


O gráfico apresentado demonstra que 27,3% dos preenchedores armazenados com a tampa que permaneceu exposta na bancada durante o procedimento apresentaram contaminação. Esse resultado, embora não tão alarmante quanto uma contaminação de 90%, ainda indica um risco considerável (gráfico 2).

A contaminação de 27,3% dos preenchedores sugere que a tampa, ao permanecer em contato com o ar e superfícies da bancada, pode ter entrado em contato com microrganismos presentes no ambiente. Esses microrganismos podem ter sido transferidos para o interior do preenchedor

quando a tampa foi recolocada, comprometendo a esterilidade do produto e aumentando o risco de infecções para o paciente em aplicações subsequentes.

Gráfico 3: Preenchedores armazenados com agulha estéril



O gráfico apresentado demonstra um resultado significativo: 94,4% dos preenchedores armazenados com uma agulha nova estéril, aberta somente no momento de fechar a seringa, não apresentaram contaminação (gráfico 3). Esse dado sugere que a utilização de agulhas novas e estéreis, juntamente com a técnica de abertura da agulha apenas no momento do fechamento da seringa, é um fator crucial para a manutenção da esterilidade dos preenchedores e, conseqüentemente, para a segurança dos pacientes.

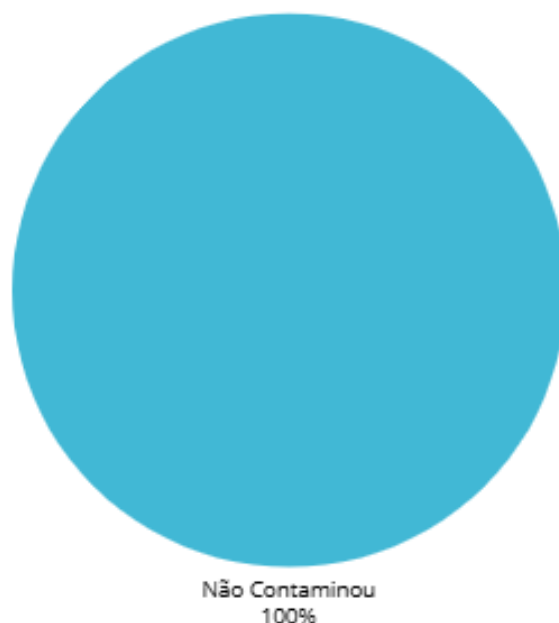
A agulha, por ser um instrumento perfurante, pode ser uma porta de entrada para microrganismos caso não seja estéril ou seja manipulada de forma inadequada. Ao utilizar uma agulha nova e estéril, o risco de contaminação é significativamente reduzido, pois a agulha não teve contato prévio com o ambiente ou com outros materiais que pudessem conter microrganismos.

Essa concordância com a literatura existente, que relata a possibilidade de armazenamento seguro de géis de AH por até dois anos sob condições estéreis, valida a importância de aderir

a protocolos de higiene específicos. Em suma, as evidências demonstram que o armazenamento adequado de preenchedores, seguindo as diretrizes de esterilidade, é fundamental para prevenir a contaminação e garantir a eficácia e segurança dos procedimentos estéticos (60).

Gráfico 4: Preenchedores armazenados que foram abertos apenas para transferência para uma nova seringa e fechados com a tampa imediatamente após a transferência

Preenchedores que foram transferidos para outra seringa e logo foram fechados com a tampa.



O gráfico apresentado evidencia um resultado notável: 100% dos preenchedores que foram abertos apenas para transferência do material para uma nova seringa e fechados com a tampa imediatamente após a transferência, não apresentaram qualquer sinal de contaminação. Esse dado demonstra a eficácia da técnica de transferência e fechamento imediato como medida preventiva fundamental na manutenção da esterilidade dos preenchedores e, conseqüentemente, na segurança dos pacientes (gráfico 4).

A ausência de contaminação em todas as amostras analisadas reforça a importância de protocolos rigorosos de manipulação e armazenamento dos preenchedores. A abertura da seringa apenas no momento da transferência, seguida do fechamento imediato, minimiza a

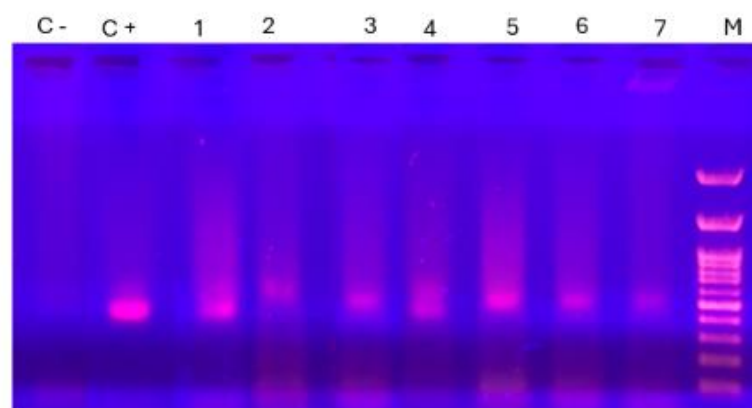
exposição do produto ao ambiente, reduzindo drasticamente o risco de contato com microrganismos presentes no ar ou em superfícies.

Em concordância com a literatura, o estudo mostrou que o AH armazenado após aplicação permanece livre de contaminação bacteriana desde que seu armazenamento seja feito de maneira adequada. Logo, percebe-se que, a forma como a seringa é tampada e armazenada contribui diretamente para a contaminação ou não do gel de AH (60).

Análise molecular

Todos os isolados estudados por PCR foram positivos para a região genômica específica da bactéria. Não foram encontrados isolados positivos para fungos (figura 6).

Figura 6 – Padrão de bandas de identificação das bactérias



Fonte: Produzido pela autora, 2025

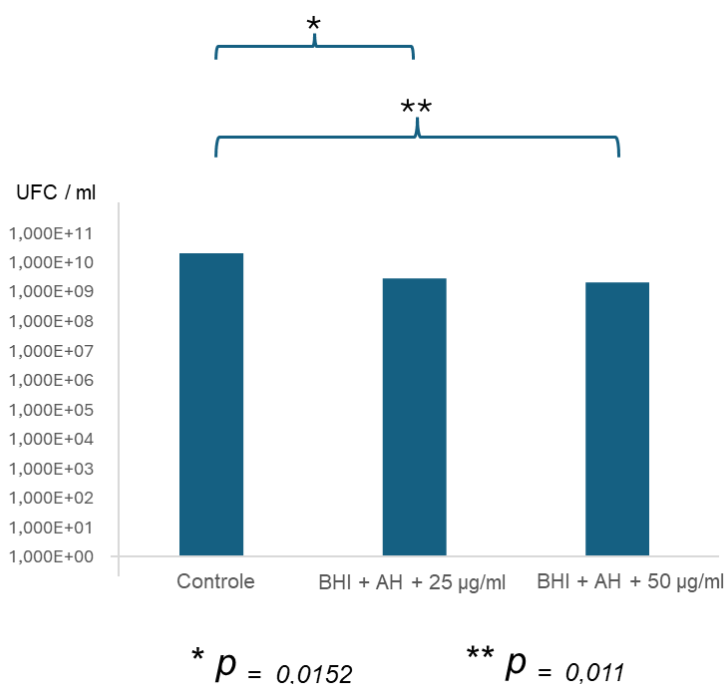
A contaminação de todas as amostras de AH foi investigada por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificar a presença de bactérias e fungos. Os resultados revelaram um cenário específico: a detecção de positividade para a região genômica bacteriana, por meio dos iniciadores F (kGCGrACGGGTGAGTAA) e R (CGCATTTCACCGCTA), que amplificam o gene 16S rRNA, indica uma presença significativa de bactérias nas amostras. Esse achado levanta questões relevantes sobre as condições de armazenamento e manipulação do material, uma vez que a contaminação bacteriana pode comprometer a segurança e a eficácia de procedimentos estéticos. Em contraste, a não detecção de fungos, utilizando os iniciadores F (AATTGACGGAAGGGCACC) e R (TTCCTCGTTGAAGAGCAA), que amplificam o gene 18S rRNA, sugere a ausência de contaminação fúngica detectável pelos métodos empregados.

Os resultados da pesquisa apontam para a necessidade de medidas rigorosas no armazenamento do AH, com o objetivo de minimizar o risco de contaminação bacteriana e garantir a segurança dos procedimentos realizados com esse material.

Estudo da densidade celular de biofilmes de *S. epidermidis* tratados com ampicilina

Os tratamentos com concentrações subinibitórias de ampicilina reduzem a densidade celular do biofilme formado na superfície do AH (gráfico 5). Tratamentos com 25 µg/ml de ampicilina [$2,86 \cdot 10^9$ UFC/ml] reduziram a densidade do biofilme em comparação ao controle [$2,04 \cdot 10^{10}$ UFC/ml] [$p = 0,0152$] e tratamentos com 50 µg/ml de ampicilina [$2,065 \cdot 10^9$ UFC/ml] reduziram a densidade do biofilme em comparação ao controle [$2,04 \cdot 10^{10}$ UFC/ml] [$p = 0,011$].

Gráfico 5: Quantificação da densidade celular dos biofilmes de *S. epidermidis* formado na superfície do ácido hialurônico sob pressão de concentração subinibitórias de ampicilina.



Fonte: Produzido pela autora, 2025

Concentrações subinibitórias de ampicilina reduzem a densidade celular do biofilme de *S. epidermidis* formado na superfície do AH.

Os tratamentos com concentrações subinibitórias de ampicilina reduzem a densidade celular do biofilme formado na superfície de polietileno das placas de 6 poços (gráfico 5). Tratamentos com 25 µg/ml de ampicilina [$1,28 \cdot 10^9$ UFC/ml] reduziram a densidade do biofilme em comparação ao controle [$1,55 \cdot 10^{10}$ UFC/ml] [$p = 0,0132$] e tratamentos com

50 µg/ml de ampicilina [$1,07 \cdot 10^9$ UFC/ml] reduziram a densidade do biofilme em comparação ao controle [$1,55 \cdot 10^{10}$ UFC/ml] [$p = 0,02$].

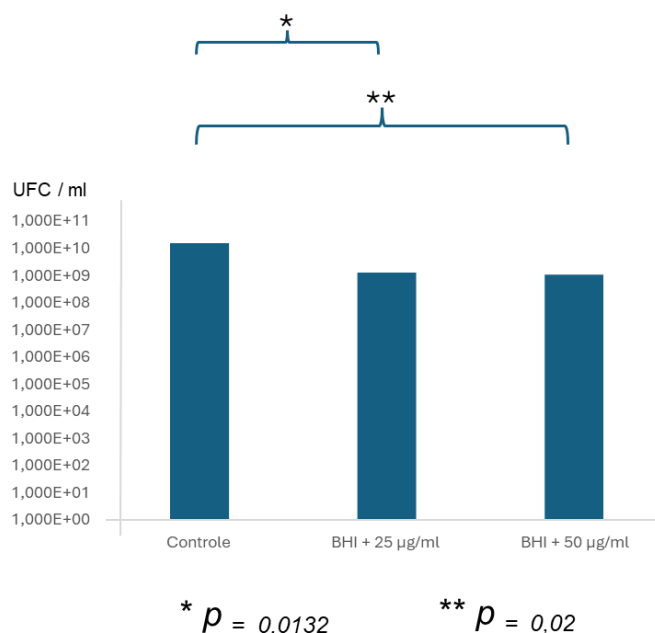
O combate às infecções relacionadas a biofilmes apresenta um grande desafio. Durante o tratamento com antibióticos, é comum que os microrganismos sejam expostos a concentrações subinibitórias (abaixo da Concentração Inibitória Mínima - CIM), uma vez que a CIM máxima geralmente não se mantém por um período prolongado no organismo após a administração. A exposição a concentrações sub-CIM ocorre devido a dosagens insuficientes de antibióticos ou flutuações nas concentrações do medicamento entre as doses (61, 72).

Concentrações submínimas de antibióticos podem induzir alterações na morfologia das células bacterianas, afetar a indução de prófagos, a taxa de crescimento bacteriano, a atividade enzimática e a capacidade de adesão às células hospedeiras. Além disso, estudos têm demonstrado um aumento na formação de biofilmes por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em ambientes com concentrações sub-CIM de antibióticos (72).

A ampicilina, conhecida por sua boa penetração em certas regiões, como o trato biliar e a pele, é utilizada principalmente no tratamento de infecções da vesícula biliar causadas por *Salmonella spp.*. Resultados de estudos recentes mostraram que concentrações de ampicilina correspondentes a 0,125, 0,25 e 0,5 vezes a CIM reduziram a formação de biofilme por essas bactérias em superfícies de poliestireno durante 24 horas de incubação. Observou-se uma diminuição na formação de biofilme em cepas isoladas de pacientes e portadores, concomitante ao aumento do valor da concentração sub-CIM do antibiótico. A redução na formação de biofilme foi observada em 76,1% das cepas isoladas de pacientes e 82,6% das cepas isoladas de portadores (72).

A demonstração de que concentrações sub-CIM de antibióticos podem induzir alterações significativas no comportamento bacteriano, incluindo a modulação da formação de biofilmes, fornece um contexto científico sólido para os achados descritos no gráfico 05. A observação de que a ampicilina, em concentrações subinibitórias, pode reduzir a formação de biofilme em *Salmonella spp.* em superfícies de poliestireno, e a constatação de que essa redução é observada em cepas clínicas, corroboram a hipótese de que a ampicilina pode exercer um efeito semelhante no biofilme de *S. epidermidis* em superfícies de AH. Além disso, a constatação de que concentrações sub-CIM podem afetar a virulência bacteriana reforça a importância de investigar os efeitos dessas concentrações em biofilmes, especialmente em contextos clínicos onde a formação de biofilmes pode levar a infecções persistentes e de difícil tratamento.

Gráfico 6: - Quantificação da densidade celular dos biofilmes de *S. epidermidis* formado na superfície da placa de polietileno sob pressão de concentração subinibitórias de ampicilina.



Fonte: Produzido pela autora, 2025

Uma vez que um biofilme se estabelece, a eliminação deste por meio de antibióticos torna-se um desafio expressivo. Essa dificuldade decorre da baixa eficácia de muitos antibióticos no tratamento de infecções crônicas por estafilococos, agravada pela crescente prevalência de cepas de *Staphylococcus* CoNS multirresistentes, especialmente quando se trata de ambientes hospitalares (61).

A resistência aos antimicrobianos nos biofilmes é um fenômeno multifacetado. A barreira física da matriz do biofilme dificulta a penetração de agentes antimicrobianos, enquanto enzimas presentes no biofilme podem inativá-los. Além disso, as alterações no metabolismo e na expressão genética dos microrganismos dentro do biofilme contribuem para uma menor sensibilidade aos antimicrobianos (61, 62).

Estudos têm evidenciado que a exposição a concentrações subinibitórias de antibióticos pode influenciar a formação de biofilmes e desencadear a expressão de genes associados à resistência bacteriana. Pesquisas de Sato et al. (2018) e Wang et al. (2010) demonstraram que a presença de antimicrobianos em doses subinibitórias pode estimular a formação de biofilmes em diversas espécies bacterianas. Além disso, há evidências de que biofilmes expostos a antibióticos podem apresentar características de maior virulência em comparação com biofilmes não expostos (64).

Estudo da geração de SCVs de *S. epidermidis* no biofilme tratado com concentrações subinibitórias de ampicilina.

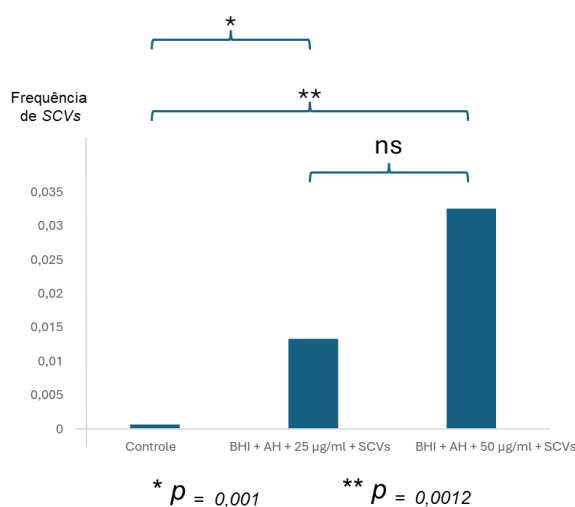
Concentrações subinibitórias de ampicilina estimulam a frequência de geração de SCVs em uma superfície com AH (gráfico 7). Tratamentos com concentrações subinibitórias de ampicilina estimulam a frequência de geração de SCVs; tratamentos com 25 µg/ml de ampicilina [0,0133] aumentam a frequência de formação de SCVs em comparação ao controle [0,00065] [$p = 0,001$].

A presença de um agente antimicrobiano com ação bactericida lenta pode ter provocado alterações no comportamento de crescimento das bactérias, seja através da ativação de mecanismos de adaptação ou pela seleção de microrganismos preexistentes com menor sensibilidade. Em conformidade com a literatura, a observação de colônias com morfologia reduzida e crescimento limitado em variáveis concentrações de antimicrobianos sugere a ocorrência de alterações no padrão de comportamento bacteriano, como um mecanismo de sobrevivência.

Esse padrão, conhecido como Pequenas Variantes de Colônias (SCVs), caracteriza-se por colônias de tamanho diminuto em ágar, menor produção de toxinas, maior expressão de adesinas, crescimento intracelular e resistência a antimicrobianos. A instabilidade dessas colônias permite a reversão ao fenótipo selvagem, proporcionando uma proteção temporária contra a ação bactericida e, potencialmente, favorecendo a persistência da infecção (70, 71) .

Pesquisas recentes demonstram que concentrações de vancomicina próximas a 10 µg/mL, consideradas subterapêuticas, são capazes de induzir alterações fenotípicas adaptativas em bactérias, sem comprometer a viabilidade da população(70, 71). Esse achado corrobora com os resultados do estudo, que, embora investigue outro antimicrobiano, também observou alterações fenotípicas em resposta a concentrações subinibitórias.

Gráfico 7: Frequências de formação de SCV de *S. epidermidis* em uma superfície de ácido hialurônico sob pressão de concentração subinibitórias de ampicilina.

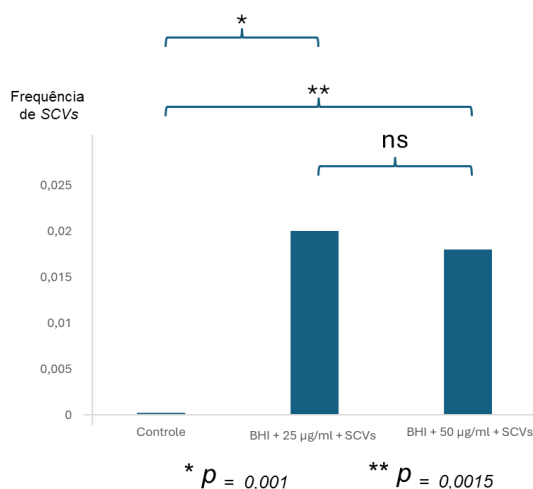


Fonte: Produzido pela autora, 2025

Tratamentos com 50 µg/ml de ampicilina [0,0325] aumentam a frequência de formação de SCVs em comparação ao controle [0,00065] [$p = 0,001$] (gráfico 7).

Concentrações subinibitórias de ampicilina estimulam a frequência de geração de SCVs em uma superfície de polietileno. Tratamentos com 25 µg/ml de ampicilina [0,02] aumentam a frequência de formação de SCVs em comparação ao controle [0,00021] [$p = 0,001$] e tratamentos com 50 µg/ml de ampicilina [0,018] aumentam a frequência de formação de SCVs em comparação ao controle [0,00021] [$p = 0,0015$] (gráfico 8).

Gráfico 8: Frequências de formação de SCV de *S. epidermidis* em uma superfície de polietileno sob pressão de concentração subinibitórias de ampicilina.



Fonte: Produzido pela autora, 2025

A capacidade de adaptação bacteriana a ambientes adversos, como a presença de antibióticos, é um fenômeno complexo. A persistência induzida por drogas, por exemplo, pode ser desencadeada pela exposição a concentrações subinibitórias, ou seja, aquelas que não são suficientes para eliminar completamente a população bacteriana. Da mesma forma, concentrações subterapêuticas, abaixo do nível necessário para erradicar uma infecção, podem selecionar subpopulações bacterianas com alterações fisiológicas temporárias (67, 68).

Ao longo do tempo, o acúmulo de mutações adaptativas pode conferir sobrevivência a um ou mais antibióticos bactericidas, aumentando a tolerância e, conseqüentemente, acelerando o desenvolvimento da resistência. A dificuldade em detectar pequenas porções de células tolerantes pode levar a escolhas terapêuticas inadequadas, resultando na evolução e disseminação de microrganismos com capacidades adaptativas irreversíveis e persistentes (69).

7. CONCLUSÃO

Destaca-se o elevado percentual de contaminação (90%) em preenchedores armazenados com a agulha de aplicação, predominantemente por cocos e bacilos Gram-positivos. Esse achado evidencia a susceptibilidade dos preenchedores à contaminação quando expostos ao ambiente por meio da agulha, reforçando a importância da adoção de práticas rigorosas de assepsia durante o manuseio e armazenamento.

Por outro lado, 100% dos preenchedores abertos exclusivamente para a transferência do material para uma nova seringa e imediatamente fechados com a tampa não apresentaram qualquer sinal de contaminação. Esse achado reforça a eficácia dessa técnica como uma medida fundamental para a manutenção da esterilidade dos preenchedores e a segurança dos pacientes. Além disso, ressalta a importância da adoção de protocolos rigorosos de manipulação e armazenamento, minimizando a exposição do produto ao ambiente e reduzindo significativamente o risco de contato com microrganismos presentes no ar ou em superfícies.

Nosso estudo retrospectivo observacional confirma que boas práticas de armazenamento são essenciais para prevenir a contaminação de preenchedores de ácido hialurônico (AH) por microrganismos, especialmente bactérias Gram-positivas. O AH representa um ambiente propício para o desenvolvimento de biofilmes bacterianos de *Staphylococcus epidermidis*, o que é preocupante, pois essa espécie faz parte da microbiota natural da pele. Além disso, o tratamento com concentrações subinibitórias de ampicilina reduz a densidade celular dos

biofilmes de *S. epidermidis*, mas aumenta a frequência de geração de SCVs, o que pode estar associado à persistência de infecções crônicas.

Diante disso, compreender a interação entre o AH e a microbiota cutânea é essencial para o desenvolvimento de estratégias preventivas mais eficazes, visando minimizar complicações clínicas associadas ao uso de preenchedores dérmicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Gutowski K. A. (2016). Hyaluronic Acid Fillers: Science and Clinical Uses. *Clinics in plastic surgery*, 43(3), 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2016.03.016>
- 2) Narins, R. S., & Bowman, P. H. (2005). Injectable skin fillers. *Clinics in plastic surgery*, 32(2), 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2004.12.002>
- 3) Marinho, A., Nunes, C., & Reis, S. (2021). Hyaluronic Acid: A Key Ingredient in the Therapy of Inflammation. *Biomolecules*, 11(10), 1518. <https://doi.org/10.3390/biom11101518>
- 4) Burdick, J. A., & Prestwich, G. D. (2011). Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 23(12), H41–H56. <https://doi.org/10.1002/adma.201003963>
- 5) Lee, J. W., Kim, B. J., Kim, M. N., & Lee, C. K. (2010). Treatment of acne scars using subdermal minimal surgery technology. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]*, 36(8), 1281–1287. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2010.01623.x>
- 6) Park, T. H., Seo, S. W., Kim, J. K., & Chang, C. H. (2011). Clinical experience with hyaluronic acid-filler complications. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*, 64(7), 892–896. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2011.01.008>
- 7) Funt, D., & Pavicic, T. (2013). Dermal fillers in aesthetics: an overview of adverse events and treatment approaches. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 6, 295–316. <https://doi.org/10.2147/CCID.S50546>
- 8) Fedok F. G. (2008). Advances in minimally invasive facial rejuvenation. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 16(4), 359–368. <https://doi.org/10.1097/MOO.0b013e3283031c7d>
- 9) Marcello, E., Maqbool, M., Nigmatullin, R., Cresswell, M., Jackson, P. R., Basnett, P., Knowles, J. C., Boccaccini, A. R., & Roy, I. (2021). Antibacterial Composite Materials Based on the Combination of Polyhydroxyalkanoates With Selenium and

Strontium Co-substituted Hydroxyapatite for Bone Regeneration. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 647007. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.647007>

10) Dumitrașcu, D. I., & Georgescu, A. V. (2013). The management of biofilm formation after hyaluronic acid gel filler injections: a review. *Clujul medical (1957)*, 86(3), 192–195.

11) Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual review of microbiology*, 56, 187–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>

12) Donlan R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>

13) Anderson, G. G., & O'Toole, G. A. (2008). Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Current topics in microbiology and immunology*, 322, 85–105. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_5

14) Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>

15) Lam, A. K., Panlilio, H., Pusavat, J., Wouters, C. L., Moen, E. L., Neel, A. J., & Rice, C. V. (2020). Low-Molecular-Weight Branched Polyethylenimine Potentiates Ampicillin against MRSA Biofilms. *ACS medicinal chemistry letters*, 11(4), 473–478. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00595>

16) Williamson, R., Hakenbeck, R., & Tomasz, A. (1980). In vivo interaction of beta-lactam antibiotics with the penicillin-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 18(4), 629–637. <https://doi.org/10.1128/AAC.18.4.629>

17) Trabulsi, Luiz Rachid; Alterthum, Flávio. *Microbiologia* 5ª ed. [S.l.]: Atheneu. ISBN 9788573799811.

- 18) Kloos, W.; Schleifer, KH. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. PHA, S.; S, M.; ME, S.; JG, H., editors. Baltimore: Williams & Wilkins; 1986.
- 19) Kloos, W. E., & Musselwhite, M. S. (1975). Distribution and persistence of Staphylococcus and Micrococcus species and other aerobic bacteria on human skin. *Applied microbiology*, 30(3), 381–385. <https://doi.org/10.1128/am.30.3.381-395.1975>
- 20) Otto M. (2013). Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual review of medicine*, 64, 175–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042711-140023>
- 21) Alhede, M., Er, Ö., Eickhardt, S., Kragh, K., Alhede, M., Christensen, L. D., Poulsen, S. S., Givskov, M., Christensen, L. H., Høiby, N., Tvede, M., & Bjarnsholt, T. (2014). Bacterial biofilm formation and treatment in soft tissue fillers. *Pathogens and disease*, 70(3), 339–346. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12139>
- 22) Otto M. (2009). Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen. *Nature reviews. Microbiology*, 7(8), 555–567. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>
- 23) Seifert, H., Oltmanns, D., Becker, K., Wisplinghoff, H., & von Eiff, C. (2005). Staphylococcus lugdunensis pacemaker-related infection. *Emerging infectious diseases*, 11(8), 1283–1286. <https://doi.org/10.3201/eid1108.041177>
- 24) Proctor, R. A., Kahl, B., von Eiff, C., Vaudaux, P. E., Lew, D. P., & Peters, G. (1998). Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 27 Suppl 1, S68–S74. <https://doi.org/10.1086/514906>
- 25) Sulaiman, J. E., & Lam, H. (2020). Proteomic Study of the Survival and Resuscitation Mechanisms of Filamentous Persisters in an Evolved Escherichia coli Population from Cyclic Ampicillin Treatment. *mSystems*, 5(4), e00462-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00462-20>
- 26) Proctor, R. A., von Eiff, C., Kahl, B. C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M., & Peters, G. (2006). Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that

facilitates persistent and recurrent infections. *Nature reviews. Microbiology*, 4(4), 295–305. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1384>

27) Neut, D., van Horn, J. R., van Kooten, T. G., van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. (2003). Detection of biomaterial-associated infections in orthopaedic joint implants. *Clinical orthopaedics and related research*, (413), 261–268. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000073345.50837.84>

28) Gosiewski, T., Jurkiewicz-Badacz, D., Sroka, A., Brzychczy-Włoch, M., & Bulanda, M. (2014). A novel, nested, multiplex, real-time PCR for detection of bacteria and fungi in blood. *BMC microbiology*, 14, 144. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-144>

29) Koibuchi, H., Fujii, Y., Hirai, Y., Mochizuki, T., Masuda, K., Kotani, K., Yamada, T., & Taniguchi, N. (2018). Effect of ultrasonic irradiation on bacterial biofilms. *Journal of medical ultrasonics* (2001), 45(1), 25–29. <https://doi.org/10.1007/s10396-017-0801-x>

30) International Society of Aesthetic Plastic Surgery. Global Survey 2023: Full Report and Press Releases. Disponível em: <https://www.isaps.org/discover/about-isaps/global-statistics/global-survey-2023-full-report-and-press-releases/>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2025.

31) Severn, M. M., & Horswill, A. R. (2023). *Staphylococcus epidermidis* and its dual lifestyle in skin health and infection. *Nat Rev Microbiol*, 21(2), 1 97–111. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00780-3>

32) Chen YE, Fischbach MA & Belkaid Y Skin microbiota–host interactions. *Nature* 533, 427–436 (2018).

33) Grice EA et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* 324, 1190–1192 (2009). [PubMed: 19478181]

34) Oh J et al. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature* 514, 59–64 (2014). [PubMed: 25279917]

- 35) Byrd AL et al. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strain diversity underlying pediatric atopic dermatitis. *Sci. Transl Med* 9, eaa14651 (2017). [PubMed: 28679656]
- 36) Roy P, Horswill AR & Fey PD Glycan-dependent corneocyte adherence of *Staphylococcus epidermidis* mediated by the lectin subdomain of Aap. *mBio* 12, e02908–e02920 (2021).
- 37) Foster TJ The MSCRAMM family of cell-wall-anchored surface proteins of Gram-positive cocci. *Trends Microbiol.* 27, 927–941 (2019). [PubMed: 31375310]
- 38) Argemi X, Hansmann Y, Prola K & Prévost G Coagulase-negative staphylococci pathogenomics. *Int. J. Mol. Sci* 20, 1215 (2019). [PubMed: 30862021]
- 39) Zhou W et al. Host-specific evolutionary and transmission dynamics shape the functional diversification of *Staphylococcus epidermidis* in human skin. *Cell* 180, 454–470.e18 (2020). [PubMed: 32004459]
- 40) O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:49–79. [PubMed: 11018124]
- 41) Uckay I, et al. Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. *Ann Med* 2009;41:109–119. [PubMed: 18720093]
- 42) Motto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis*—o patógeno “accidental”. *Nat Rev Microbiol*, 7(8), 555–567.
- 43) Khardori N, Yassien M, Wilson K. Tolerance of *Staphylococcus epidermidis* grown from indwelling vascular catheters to antimicrobial agents. *J Ind Microbiol* 1995;15:148–151. [PubMed: 8519470]
- 44) Schilcher K & Horswill AR Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 84, e00026–19 (2020). [PubMed: 32792334]

45) Schaeffer CR et al. Versatility of biofilm matrix molecules in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates and importance of polysaccharide intercellular adhesin expression during high shear stress. *mSphere* 1, e00165–16 (2016). [PubMed: 27747298]

46) Alipoor, R., Ayan, M., Hamblin, M.R., Ranjbar, R., & Rashki, S. (2022). Hyaluronic Acid-Based Nanomaterials as a New Approach to the Treatment and Prevention of Bacterial Infections. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.913912>

47) Syed Nasir Abbas Bukhari, Nur Liyana Roswandi, Muhammad Waqas, Haroon Habib, Fahad Hussain, Shahzeb Khan, Muhammad Sohail, Nor Amlizan Ramli, Hnin Ei Thu, Zahid Hussain, Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *Biomac* (2018), doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.188

48) Maia, I. E. F.; Salvi, J. O. O uso do ácido hialurônico na harmonização facial: uma breve revisão. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR*, v. 23, n. 2, p. 135–139, ¹ Jun. 2018. Disponível em: <http://www.mastereditora.com.br/bjscr>. Acesso em: 12 fev. 2025.

49) Parada MB, Cazerta C, Afonso JP, do Nascimento DI. Manejo de complicações de preenchedores dérmicos. *Surg Cosmet Dermatol*. [Internet]. 2016 [Citado 2022 jun. 12]; 8(4):342-51. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/2655/265549460019.pdf>

50) Sander, G.; Börner, T.; Kriegeskorte, A.; von Eiff, C.; Becker, K.; Mahabir, E. Catheter Colonization and Abscess Formation Due to *Staphylococcus epidermidis* with Normal and Small-Colony-Variant Phenotype Is Mouse Strain Dependent. ¹ [Publication of the Periodical]. Cologne, Germany; Münster, Germany.

51) Tuchscher, Lorena; Löffler, Bettina; Proctor, Richard A. Persistence of *Staphylococcus aureus*: Multiple Metabolic Pathways Impact the Expression of Virulence Factors in Small-Colony Variants (SCVs). *Front. Microbiol.*, v. 11, 1028, mai. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01028>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32508801/>. Acesso em: 12 fev. 2025.

52) Kahl, B. et.al. Persistent Infection with Small Colony Variant Strains of *Staphylococcus aureus* in Patients with Cystic Fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 117, n. 4, p. 1023-1029, abr. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1086/515238>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/177/4/1023/928888>. Acesso em: 08 fev. 2025.

53) RADLANSKI, R.J.; WESKER, K.H. *A Face: Atlas ilustrativas de Anatomia*. 2 ed. São Paulo: Quintessência, 2016.

54) Fachine, B. R. A., & Trompieri, N. (2012). O Processo de Envelhecimento: As principais alterações que acontecem com o idoso com o passar dos anos. *Revista Científica Internacional*, 1(7), 106-132. doi:10.6020/1679-9844/2007

55) Domanksy C.R; Borges, L.E. *Manual para prevenção de lesões de pele. Recomendações baseadas em evidências*. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2012

56) Tassinary, João. (2019). Raciocínio clínico aplicado á estética facial. Ed. Estética experts. 32-42 p

57) Gonçalves, P.M.A.; Poncs, M.J. Alguns aspectos da avaliação estética da face. *ACTAS.*, n1, p. 31-42, 1993.

58) Luvizuto, E; Queiroz, T. *Arquitetura Facial*. 1.ed. Nova Odessa-SP: Napoleão, 2019.

59) Neca, C. S. M. et al. O uso de bioestimuladores de colágeno a base de hidroxiapatita de cálcio. **E-Acadêmica**, v. 3, n. 2, p. e7332237-e7332237, 2022.

60) Dairi M, Sawan S, Aref A, Helmi N, Abdulmajed H, Aldigs E. Post-injection syringe bacterial contamination of hyaluronic acid fillers. *J Cosmet Dermatol*. [Internet]. 2025 Fev Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jocd.14340?casa_token=cRpCJ1qs vE8AAAAA%3An_4AfLTHC_EcALxmi9QLYg3UOnpqNtQKj4eG99cRWaZSC8fq8lbfmbBvmrFtK7p-5U0Vu1eBz4v9Uo.

- 61) Ziebuhr, W.; Krimmer, V.; Rachid, S.; Löbner, I.; Götz, F.; Hacker, J.A Novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol. Microbiol.*, v. 32, p. 345-356, 1999.
- 62) Morales, M.; Méndez-Alvarez, S.; Martín-López, J.V.; Marrero, C.; Freytes, C.O. Biofilm: the microbial “bunker” for intravascular catheter-related infection. *Support care cancer*, v. 12, p. 701-707, 2004.
- 63) Sato, Yoshinori. Sub-minimum inhibitory concentrations of colistin and polymyxin B promote *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *PLoS One*. 13 (3), p. 1-18, mar 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194556>.
- 64) Shenkutie, A. M. et al. Effects of Sub-Minimum Inhibitory Concentrations of Imipenem and Colistin on Expression of Biofilm-Specific Antibiotic Resistance and Virulence Genes in *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 1894.
- 65) Decates, T. S. et al. Bacterial Contamination Is Involved in the Etiology of Soft-Tissue Filler, Late-Onset, Inflammatory Adverse Events. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 151, n. 5, p. 971-978, 2023. doi: 10.1097/PRS.00000000000010074.
- 66) Cavallini, M. et al. Hyaluronic Acid Fillers, Needle Contamination by Fastidious Microorganisms, and Risk of Complications. *Dermatologic Surgery*, v. 49, n. 2, p. 161-163, 2023. doi: 10.1097/DSS.00000000000003674.
- 67) Michiels, J.; Fauvart, M. Bacterial persistence: methods and protocols. *Methods Mol. Biol.* v. 1333. p. 83–100, 2016.
- 68) Conlon, B. P. *Staphylococcus aureus* chronic and relapsing infections: Evidence of a role for persister cells. *BioEssays*, v. 36, n. 10, p. 991–996, 2014.
- 69) Levin-Reisman, I. et al. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science*, v. 355, n. 6327, p. 826–830, 2017.

70) Massey, R. C.; Buckling, A.; Peacock, S. J. Phenotypic switching of antibiotic resistance circumvents permanent costs in *Staphylococcus aureus*. *Current Biology*, v. 11, n. 22, p. 1810–1814, 2000

71) Kahl, B. C. Infection, genetics and evolution small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus* – a bacterial survival strategy. *Infection, Genetics And Evolution*, 2013.

72) Białucha, A.; Gospodarek-Komkowska, E.; Kwiecińska-Piróg, J.; Skowron, K. Influence of Selected Factors on Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Strains. *Microorganisms*, ¹ v. 9, n. 1, p. 43, 2021. doi: 10.3390/microorganisms9010043.

73) Manarte-Monteiro, P. et al.; Air quality assesstment during dental practice: Aerosols bacterial counts in a university clinic. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 2013

74) Bracher, L. et al.; Surface microbial contamination in a dental department. A 10-year retrospective analysis. *swiss dental journal*, 2019.

75) Mutters, N. T. et al.; Compliance with infection control practices in a nuniversity hospital dental clinic. *GMS Hygiene and Infection Control*, 2014.

76) PROCTOR R. A.; KRIEGESKORTE A.; KAHL B. C.; BECKER K.; LÖFFLER B.; PETERS G. *Staphylococcus aureus* Small colony variants (SCVs): A Road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v.4, 2014.