

**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**THAISA ROSA DE JESUS**

**BIOFILMES MICROBIANOS: IMPACTOS NA SAÚDE  
PÚBLICA E ESTRATÉGIAS DE CONTROLES.**

BAURU  
2014

**THAISA ROSA DE JESUS**

**BIOFILMES MICROBIANOS: IMPACTOS NA SAÚDE  
PÚBLICA E ESTRATÉGIAS DE CONROLE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Geisiany Maria de Queiroz.

BAURU  
2014

Jesus, Thaisa Rosa de.

J587b

Biofilmes microbianos: impactos na saúde pública e estratégias de controle / Thaisa Rosa de Jesus. -- 2014.

35f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Geisiany Maria de Queiroz.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Biofilmes microbianos.2. Impactos negativos.3. Saúde.4. Dispositivos médicos.5. Estratégias de controle. I. Queiroz, Geisiany Maria de. II. Título.

**THAISA ROSA DE JESUS**

**BIOFILMES MICROBIANOS: IMPACTOS NA SAÚDE PÚBLICA E  
ESTRATÉGIAS DE CONROLE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob orientação da Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Geisiany Maria de Queiroz.

Banca examinadora:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Geisiany Maria de Queiroz  
Universidade do Sagrado Coração

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vanessa Sato  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cynthia Barbosa Rustiguel  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP)

Bauru, 01 de Dezembro de 2014

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus por ter me dado forças para alcançar meu sonho.

À todos os professores por todos os ensinamentos e experiências transmitidas, em especial, à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Geisiany Maria de Queiroz por contribuir diretamente para minha formação acadêmica, me orientando na confecção deste estudo.

À Universidade do Sagrado Coração por me proporcionar uma formação completa que me permitirá alcançar grandes realizações profissionais.

À minha mãe que sempre me apoiou nos momentos de maior desespero, por me acalmar e entender minhas ausências.

Ao meu pai por ter proporcionado a oportunidade de me graduar em uma instituição de ensino renomada.

Às amigas de faculdade: Beatriz, Lívia, Thais, Maria Luisa; por terem me auxiliado nas dificuldades e pela companhia nos momentos de estudos e diversão.

À amiga Nayara pela disposição em me ajudar na redação deste trabalho. E à amiga Isabela pelo auxílio na redação do resumo em língua estrangeira.

Ao meu terapeuta Francisco Romão por ter me auxiliado a aperfeiçoar minhas habilidades de escrita e por me direcionar ao meu objetivo principal.

"Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça."  
(Cora Coralina)

## RESUMO

As células microbianas podem ser encontradas na forma planctônica ou sésil. Aquelas classificadas como planctônicas estão livres e as sésseis estão agrupadas, constituindo os biofilmes. Biofilmes podem ser formados por diferentes micro-organismos dentre os que possuem importância clínica destacam-se: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. A capacidade de formar biofilmes por parte desses e de outros micro-organismos leva a impactos negativos na saúde humana, pois as infecções por biofilmes são extremamente difíceis de serem tratadas, devido à resistência e proteção que a estrutura do biofilme proporciona aos micro-organismos. O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão da literatura científica com a finalidade de destacar diferentes aspectos da formação de biofilmes microbianos, seus impactos negativos na saúde pública e verificar quais as opções disponíveis para o seu controle. Realizou-se revisão da literatura científica abordando a questão da formação de biofilmes microbianos. Foram utilizados dados disponíveis nos bancos eletrônicos. A preocupação com a formação de biofilmes na área da saúde tem estimulado a realização de inúmeros estudos e pesquisas que buscam novas estratégias que sejam capazes de combater essas infecções de maneira eficiente. Neste contexto, acredita-se que os estudos sobre a formação e resistência de biofilmes, bem como, aqueles que procuram por novas opções terapêuticas, possam contribuir diretamente para a melhoria do acúmulo de biofilmes em dispositivos biomédicos, que é considerado um grande problema em saúde pública.

**Palavras-chave:** Biofilmes microbianos. Impactos negativos. Saúde. Dispositivos biomédicos. Estratégias de controle.

## ABSTRACT

Microbial cells can be found in planktonic or sessile form. The ones classified as plankton are free and the sessil are grouped, forming biofilms. Biofilms can be formed by different micro-organisms, among which has clinical relevance are: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosas* and *Candida albicans*. The ability to form biofilms by these and other micro-organisms takes negative impacts on human health, because biofilm infections are extremely difficult to be treated, due to the resistance and protection the biofilm structure provides to microorganisms. Our aim to do a review of the scientific literature in order to highlight different aspects of the microbial biofilms formation, its negative impacts on public health and check what the available options for its control are. A scientific literature review was held to discuss the microbial biofilms formation. Data available in electronic banks was used. The concern with the biofilms formation in health care has stimulated numerous studies and surveys that seek new strategies which can be capable to combat this infection in an efficient way. In this context, we believe the studies about biofilm formation and resistance, as well as the ones that look for new therapeutic options, could directly contribute to the improvement of the biofilm accumulate on biomedical devices, which is considered a principal problem in public health.

**Keywords:** Microbial biofilms. Negative Impacts. Health. Biomedical devices. Control strategies.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Etapas de desenvolvimento do biofilme .....	10
<b>Figura 2:</b> Biofilme formado por <i>L. reuteri</i> nas células do trato gastrointestinal, observado por microscopia confocal .....	14
<b>Figura 3:</b> Biofilme de <i>S. aureus</i> em dispositivo hospitalar, observado por microscopia eletrônica de varredura .....	16
<b>Figura 4:</b> Biofilme de <i>E. coli</i> em superfície de polímero, observado por microscopia eletrônica de varredura .....	16
<b>Figura 5:</b> Biofilme de <i>L. monocytogenes</i> em equipamento industrial, observado por microscopia eletrônica .....	17
<b>Figura 6:</b> Biofilme de <i>B. cereus</i> em superfície de aço inoxidável, observado por microscopia de eletrônica de varredura.....	18
<b>Figura 7:</b> Biofilme de <i>P. aeruginosas</i> em dispositivo médico, microscopia eletrônica de varredura.....	19
<b>Figura 8:</b> Biofilme de <i>C. albicans</i> em discos de polimetilmetacrilato, observado por microscopia eletrônica .....	20
<b>Figura 9:</b> Biofilme aderido à prótese de silicone, microscopia eletrônica de varredura.....	22

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	10
2 OBJETIVO .....	13
3 METODOLOGIA .....	14
4 DESENVOLVIMENTO .....	15
4.1 BIOFILMES .....	15
4.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
4.1.2 <i>Escherichia coli</i> .....	17
4.1.3 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	18
4.1.4 <i>Bacillus cereus</i> .....	19
4.1.5 <i>Pseudomonas aeruginosas</i> .....	19
4.1.6 <i>Candida albicans</i> .....	20
4.2 IMPACTOS NA SAÚDE PÚBLICA.....	23
4.3 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE .....	25
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	28
6 CONCLUSÃO .....	29
REFERÊNCIAS .....	30

## 1 INTRODUÇÃO

As células microbianas podem ser encontradas na forma planctônica ou sésseis. Aquelas classificadas como planctônicas estão livres e aquelas sésseis estão agrupadas, constituindo os biofilmes (APARNA; YADAV, 2008).

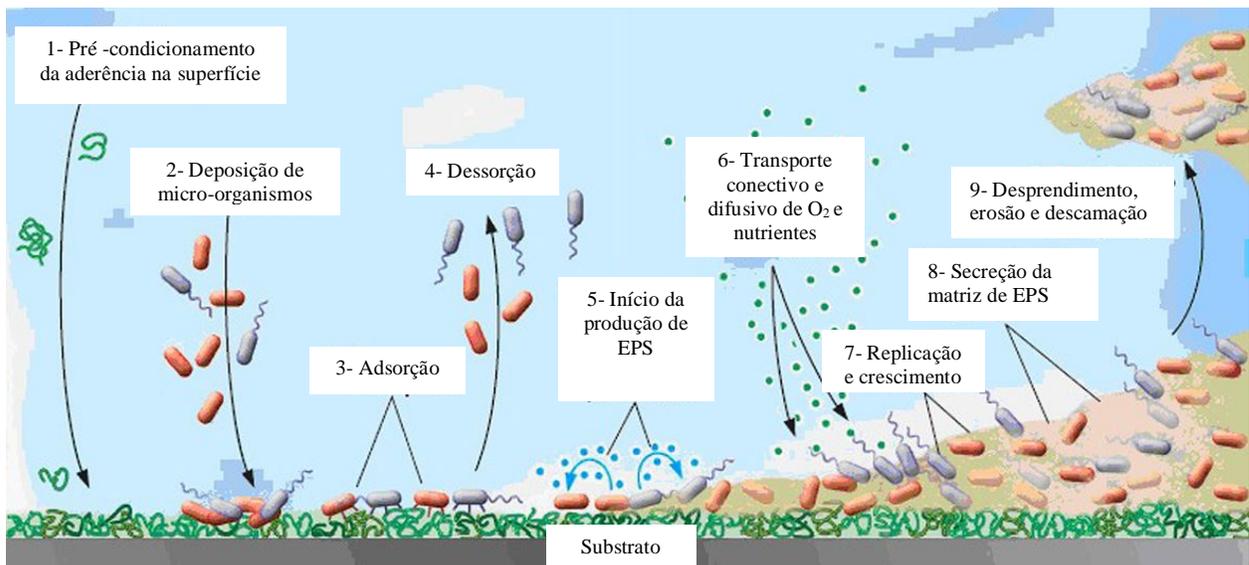
Biofilme é uma colonização de micro-organismos em superfícies bióticas ou abióticas conectada através de uma matriz polimérica constituída de compostos inorgânicos e orgânicos como proteínas e ácidos nucleicos (LEROY et al., 2008). Durante seu desenvolvimento os biofilmes repletos de células sésseis tendem a se multiplicarem tanto que começam a desprender-se, liberando células em estado planctônico que poderão colonizar locais distantes. Esse tipo de formação ocorre como forma de defesa e comunicação entre os micro-organismos, que unidos em complexas comunidades, são capazes de sobreviverem a estresses ambientais externos (APARNA; YADAV, 2008).

A capacidade dos micro-organismos formarem biofilmes foi observada pela primeira vez em 1970, entretanto, não se sabia ao certo do que era composto, devido à falta de tecnologia. Apenas com o passar do tempo e com o avanço tecnológico descobriu-se que se trata de uma placa densa formada pela associação de células microbianas, que podem ser únicas ou mistas (APARNA; YADAV, 2008). A matriz exopolimérica tem a finalidade de sustentar o biofilme. Pode possuir diversas conformações: lisas, planas, ásperas, filamentosas ou até mesmo macias, variando também a sua porosidade, criando, dessa forma, um ambiente de biodiversidade para favorecer a transitoriedade de compostos inorgânicos e orgânicos que são utilizados como fonte de nutrição para os micro-organismos ou ainda para a troca de material genético (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Muitos micro-organismos possuem a capacidade de formar apêndices filamentosos que facilitam a motilidade e a fixação destes nos biofilmes. Entre esses apêndices encontramos flagelos, pili ou fímbrias. Os flagelos são os responsáveis pela motilidade. O pili está envolvido com o processo de adesão; micro-organismos que o possuem tem uma forte fixação a outros e ao biofilme (SIMÕES et al., 2010).

Os micro-organismos se unem formando o biofilme com a finalidade de sobreviver, crescer e resistir a qualquer tentativa de tratamento. Seu desenvolvimento ocorre em diferentes etapas. Tudo se inicia com a fixação das células microbianas na superfície que altera o ambiente de acordo com suas necessidades nutricionais, temperatura, pH, entre outros. A melhor fixação

ocorre em superfícies ásperas e hidrofóbicas, e nesta fase as células crescem logaritmicamente. A etapa seguinte é a própria multiplicação das células que se comunicam pelo *quorum sensing*, sinais químicos, que favorecem a patogênese. Quando essa multiplicação atinge um término, começa a produção de exopolissacarídeos (EPS) formado por proteínas; ácidos nucléicos; orgânicos e inorgânicos, que retém os nutrientes e as células microbianas. Neste momento, a motilidade diminui e é na próxima etapa que o biofilme, propriamente dito, está formado. Em seguida, ele apenas amadurece. Assim, quando o biofilme atinge a espessura necessária, caracterizada por várias etapas de maturações, esse finalmente atinge a última fase onde ocorre a dispersão celular (APARNA; YADAV, 2008), como representado na Figura 1.



**Figura 1:** Etapas de desenvolvimento do biofilme.  
Fonte: SIMÕES et al.(2010, com modificações).

Biofilmes podem ser encontrados colonizando diferentes estruturas como hospitalares, industriais, equipamentos que ficam em contato com águas naturais, rede de tratamento de água e esgoto, além de dispositivos médicos e ortodônticos (LEROY et al., 2008).

Os biofilmes procuram pontos vulneráveis para sua formação, pois assim são dificilmente removidos. Dentre os lugares mais propícios encontramos: fissuras, becos, articulações, cantos, válvulas, rachaduras (SIMÕES et al., 2010).

Quando as células microbianas se unem formando biofilmes, desenvolvem alguns mecanismos patogênicos como produção de toxinas, fugas de fagocitoses, formação de cepas mais virulentas, proteção a antimicrobianos, que conferem resistência a várias formas de

tratamento disponíveis atualmente, levando a sérios problemas de saúde pública, além de graves prejuízos industriais. Essas células, quando colonizam seres vivos, podem liberar ainda antígenos que causam a produção de anticorpos, porém esses não são eficazes para combatê-los (APARNA; YADAV, 2008).

A formação de biofilmes configura um grave problema tanto para o setor industrial como para a área da saúde, uma vez que, sua resistência, impede o tratamento com antibioticoterapia ou desinfetantes convencionais. Vários dos antibióticos desenvolvidos e disponíveis no mercado são capazes de destruir micro-organismos livres, porém não são eficazes contra biofilmes, gerando infecções recorrentes (APARNA; YADAV, 2008). Sendo assim as pesquisas a respeito de biofilmes vem aumentando na tentativa de se encontrar novas opções para o tratamento.

Dentre as alternativas que vem sendo estudadas, destaca-se a combinação de novas descobertas com outras antigas no intuito de eliminar biofilmes de longa permanência de diferentes dispositivos, médicos ou industriais, como por exemplo, a utilização de produtos naturais que possuam alto teor de polifenóis, flavonóides, taninos, ou seja, diferentes metabólitos secundários com ação antimicrobiana (BRÄUNLICH et al., 2013); aplicação de peptídeos naturais humanos (XU et al., 2014); polímero de exoesqueleto de crustáceos (MARTINEZ et al., 2010); detergentes a base de proteases (LEQUETTE et al., 2010); aminoácidos próprios dos micro-organismos (KOLODKIN-GAL et al., 2010); entre outras.

## 2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão da literatura científica com a finalidade de destacar diferentes aspectos da formação de biofilmes microbianos, seus impactos negativos na saúde pública e verificar quais as opções disponíveis para o seu controle.

### 3 METODOLOGIA

Realizou-se revisão da literatura científica abordando a questão da formação de biofilmes microbianos. Foram utilizados dados atuais disponíveis nos bancos eletrônicos como *Pubmed* e *Science* para as seguintes palavras-chave: biofilmes microbianos, impactos negativos para a saúde e setores industriais, benefícios, tratamentos disponíveis, estratégias de controle para biofilmes, micro-organismos formadores de biofilmes, *S. aureus* e biofilme, *C. albicans* e biofilme, *B. cereus* e biofilme, *P. aeruginosas* e biofilme, *E. coli* e biofilme, próteses e biofilme, hemodiálise e biofilme.

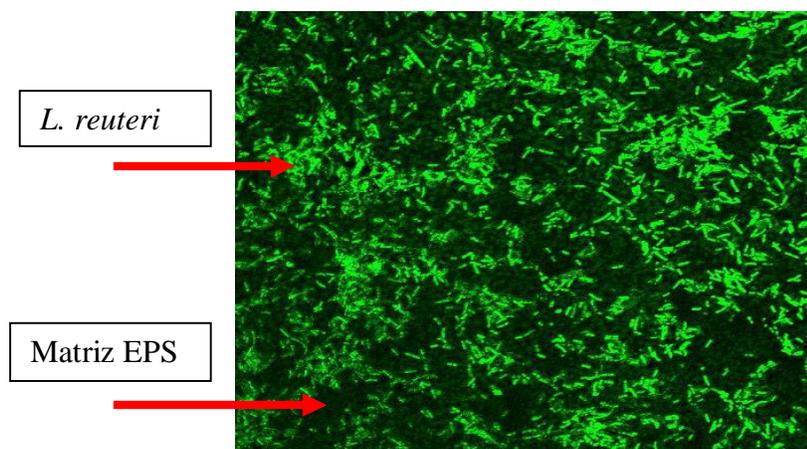
## 4 DESENVOLVIMENTO

### 4.1 BIOFILMES

A maioria dos micro-organismos são capazes de formar biofilmes, independentemente se bactérias ou fungos, no entanto, alguns micro-organismos apresentam maior relevância em saúde pública, devido às suas altas taxas de incidência, como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Candida* sp., *Pseudomonas aeruginosas*, entre outros (SIMÕES et al., 2010).

Os biofilmes são formados por células sésseis e podem ser monoespécies ou multiespécies, os biofilmes multiespécies são aqueles formados por colônias de diferentes micro-organismos (BOARI et al., 2009).

Apesar de em determinadas situações os biofilmes trazerem alguns benefícios para a sociedade (SUGIMOTO, 2013), pois possuem diversas aplicações como, por exemplo, no uso de biofertilizantes, uma vez que a formação de biofilmes por bactérias e fungos pode aprimorar o metabolismo das plantações aumentando a produção (SENEVIRATNE et al., 2007); como produção de enzimas por fungos filamentosos (SATO et al., 2014); como alternativa para purificar água e diminuir a utilização de agentes químicos (SUGIMOTO, 2013); como probióticos, uma vez que a colonização por biofilmes de *Lactobacillus reuteri* impede que infecções se instalem no trato gastrointestinal (Figura 2) e diminuem a atividade do Fator de Necrose Tumoral (JONES; VERSALOVIC, 2009).



**Figura 2:** Biofilme formado por *L. reuteri* nas células do trato gastrointestinal, observado por microscopia confocal.

Fonte: JONES; VERSALOVIC (2009).

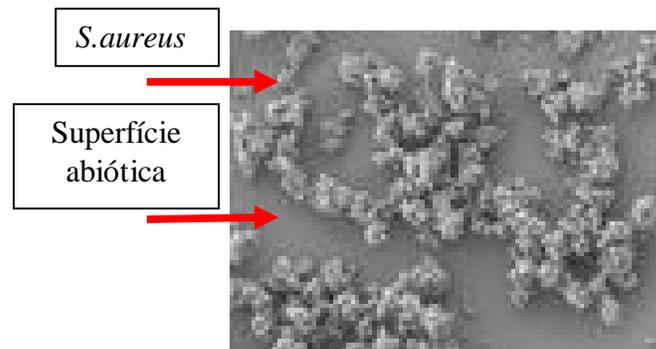
Quando se trata de saúde pública, na maioria dos casos, esses biofilmes contribuem para o aumento da morbidade e mortalidade, sobretudo se associados a dispositivos biomédicos. E ainda podem estar envolvidos em processos indesejados de contaminação industrial.

#### **4.1.1 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria, coco Gram-positiva comumente encontrada formando biofilmes nas indústrias alimentos. Os alimentos possuem uma ampla superfície de contato possibilitando assim a adesão dessas bactérias. Em estudo onde foi avaliada a capacidade de formação e aderência de biofilmes de *S. aureus* em processamento de alimentos, notou-se um crescimento rápido em superfícies de polipropileno e aço inoxidável, mostrando uma maior contaminação quando o aço encontrava-se corroído facilitando a aderência e formação desse biofilme. O biofilme necessitou de 3 a 5 dias para maturar, após a adesão inicial e apenas com 10 dias foi considerado um biofilme maduro com aumento de população e deposição de exopolissacarídeos (SOUZA et al., 2014).

O biofilme de *S. aureus* possui a capacidade de se formar em cateteres gerando grandes infecções, podendo levar a bacteremia e posteriormente ao óbito se não forem tomadas medidas rápidas. *S. aureus* é o segundo patógeno reconhecidamente capaz de formar o biofilme com alta taxa de morbidade e mortalidade em bacteremias (CHAFTARI et al., 2014). O *S. aureus* produz adesinas como a proteína SASG, que facilita a formação do biofilme em materiais implantados, pois estas adesinas ligam-se as fibronectinas na matriz extracelular (ARNOLD et al., 2014), como demonstrado na Figura 3.

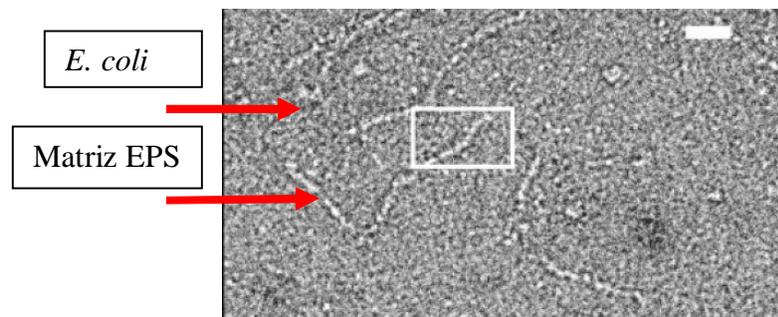
Para ocorrer a inativação destes biofilmes, o antimicrobiano deve penetrar na matriz de EPS para assim inviabilizar as células microbianas causando remoção do biofilme. Os sanitizantes mais utilizados são: ácido peracético e hipoclorito de sódio (SOUZA et al., 2014).



**Figura 3:** Biofilme de *S. aureus* em dispositivo hospitalar, observado por microscopia eletrônica de varredura. Fonte: KOSEKI et al. (2014).

#### 4.1.2 *Escherichia coli*

É uma bactéria Gram-negativa capaz de formar biofilmes permanentes. Cepas patogênicas agregadas a sondas uretrais, drenos ou cateter, como representado na Figura 4, causam inúmeros problemas de saúde como cistite, prostatite, infecções do trato biliar, entre outros. Além de diversos agravos a saúde, também pode causar corrosões e incrustações em estruturas industriais, como em oleodutos, sistemas de água, trocadores de calor. Na tentativa de controlar os biofilmes de *E. coli*, muitas vezes, são necessários em média 220 vezes mais antibióticos do que quando suas células se encontram em estado planctônico (BRÄUNLICH et al., 2013).

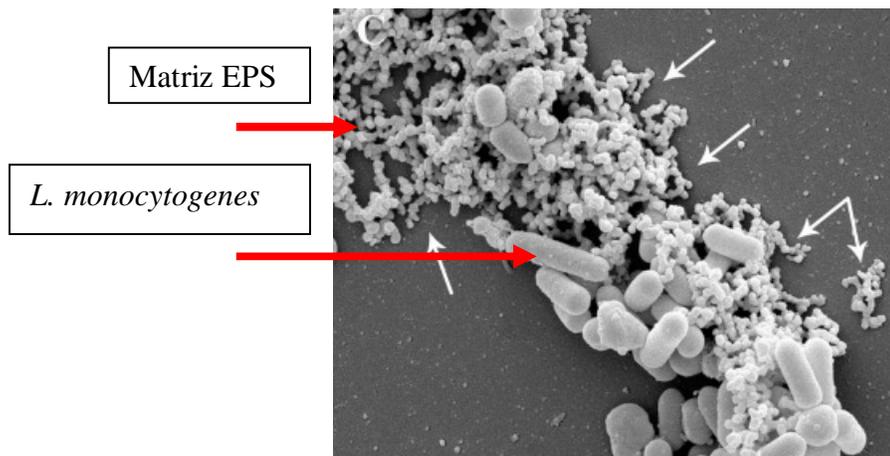


**Figura 4:** Biofilme de *E. coli* em superfície de polímero, observado por microscopia eletrônica de varredura. Fonte: BERRY et al. (2014).

#### 4.1.3 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria patogênica Gram-positiva que causa Listeriose, o aumento de sua virulência ocorre quando está formando biofilmes. Listeriose é uma severa infecção alimentar causada pela ingestão do alimento contaminado por biofilme, esse biofilme pode se desprender e migrar para o sangue causando septicemia ou ainda migrar para o cérebro causando meningite (KUREK et al., 2014). É comumente encontrada formando biofilme nas indústrias de alimentos, pois possui grande capacidade de aderência e formação de biofilmes até mesmo em temperaturas baixas e com o mínimo de nutrientes necessário. Devido a essa facilidade, contaminam os equipamentos industriais, como apresentado na Figura 5, conseqüentemente, contaminam os alimentos, estragando-os, além de deteriorar os equipamentos por causa das incrustações, estão diretamente envolvidos em infecções alimentares graves (LEE et al., 2013).

As medidas preventivas são escassas, pois a remoção desse biofilme é minuciosa devido o contato com os alimentos, os produtos de limpeza comerciais ou até mesmo a água sanitária já não são mais eficazes (LEE et al., 2013).

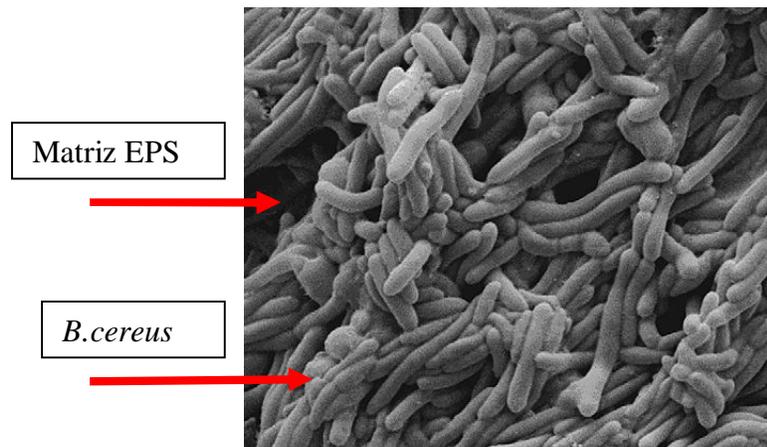


**Figura 5:** Biofilme de *L. monocytogenes* em equipamento industrial, observado por microscopia eletrônica de varredura.

Fonte: AMMENDOLIA et al. (2014)

#### 4.1.4 *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* é uma bactéria Gram-positiva relevante no setor alimentício, devido a capacidade de formação de biofilmes altamente resistentes no maquinário das indústrias de alimentos, como representado na Figura 6. Esses são dificilmente removidos pelos processos de limpeza comuns. São comumente transmitidos por alimentos contaminados. Também podem ser encontrados aderidos a cateteres, tubos de traqueostomia, causando infecções sanguíneas, infecções no Sistema Nervoso Central, entre outras. Acometem principalmente pacientes imunodeprimidos ou imunocompetentes. A remoção dessas células é difícil, pois quando em biofilme mudam suas informações genéticas, fazendo com que sua resistência aumente contra qualquer antimicrobiano utilizado para desinfecção (BRÄUNLICH et al., 2013).

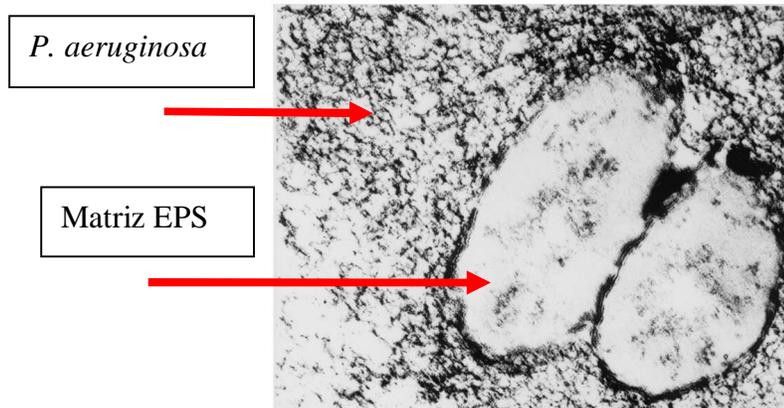


**Figura 6:** Biofilme de *B. cereus* em superfície de aço inoxidável, observado por microscopia eletrônica de varredura.  
Fonte: SIMÕES et al. (2010).

#### 4.1.5 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa oportunista, que acomete pacientes que necessitam de respiradores e indivíduos com o sistema imunológico comprometido. Além de seus biofilmes serem encontrados também colonizando cateteres e outros dispositivos médicos (Figura 7), ainda causam infecções em pacientes queimados. Pode unir-se a bactéria *Burkholderia cenocepacia* formando um biofilme multiespécie e infectar tecidos pulmonares, sendo considerada a maior causa de óbitos por fibrose cística. Para a inativação destes biofilmes tem se estudado a desinfecção com antibióticos, biocidas, agentes quelantes e também a

combinação deles, em busca de alternativas menos agressivas e mais eficazes (VANDERVOORT; BRELLES-MARINO, 2014).



**Figura 7:** Biofilme de *P. aeruginosa* em dispositivo médico, observado por microscopia eletrônica de varredura.  
Fonte: DUNNE JR. (2002)

#### 4.1.6 *Candida albicans*

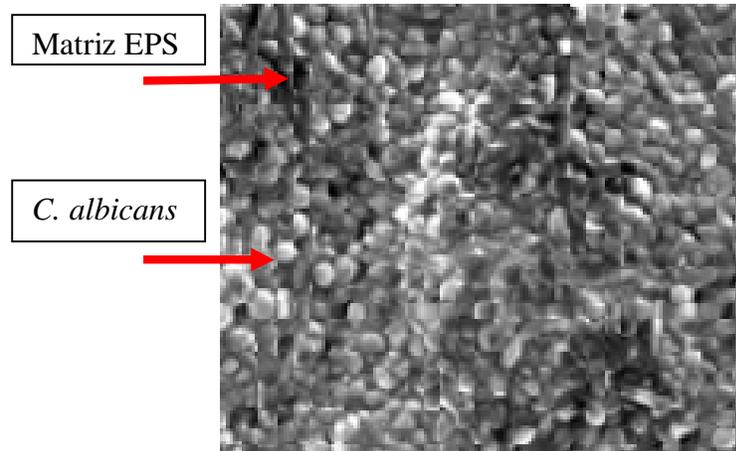
É considerado um fungo comensal bucal, porém, capaz de gerar candidíase, sendo um dos micro-organismos mais virulentos da espécie (OLIVEIRA et al., 2013). As células de *C. albicans* quando em biofilme são mil vezes mais resistentes aos antifúngicos do que quando em sua forma planctônica (NETT et al., 2011).

O biofilme de *C. albicans*, representado na Figura 8, é constituído por hifas, pseudohifas e muitas leveduras e é comumente encontrado infectando diferentes dispositivos médicos (APARNA; YADAV., 2008).

É um fungo dimórfico podendo ser patogênico, causando infecções superficiais ou até mesmo profundas que colocam a vida de pacientes em risco. Diante desta característica de dimorfismo o desenvolvimento de seu biofilme é diferente das bactérias, pois podem alterar a forma de leveduras para filamentosos (RAMAGE et al., 2001). É um micro-organismo capaz de infectar cateteres (MARTINEZ et al., 2010), e de colonizar materiais ortodônticos como dentaduras, afetando a microbiota da boca gerando infecções bucais conhecidas como estomatite de dentadura ou Candidíase Atrófica Crônica (POLAQUINI et al., 2006).

Existe certa dificuldade para encontrar maneiras que inativem o biofilme de *C. albicans* (RAMAGE et al., 2001), sendo que algumas disponíveis são: óleos essenciais (OLIVEIRA et al.,

2014), polímeros de exoesqueletos de crustáceos (MARTINEZ et al., 2010) e extratos de plantas (POLAQUINI et al., 2006).



**Figura 8:** Biofilme de *C. albicans* em discos de polimetilmetacrilato, observado por microscopia eletrônica.

Fonte: RAMAGE et al. (2001).

Estão representadas na Tabela 1 o resumo de características importantes apresentadas por micro-organismos comumente envolvidos a problemas de saúde pública.

**Tabela 1:** Características de micro-organismos envolvidos a impactos negativos na saúde pública.

Micro-organismos	Classificação	Patogenicidade	Biofilmes	Referências
<i>S. aureus</i>	Bactéria Gram-positiva	Bacteremia, óbito	Indústrias, cateteres e implantes	ARNOLD et al., 2014; CHAFTARI et al., 2014; SOUZA et al., 2014
<i>E. coli</i>	Bactéria Gram-negativa	Infecções, corrosões, incrustações	Sondas uretrais, drenos, cateteres	BRAÜNLICH et al., 2013
<i>L. monocytogenes</i>	Bactéria Gram-negativa	Listeriose	Indústria de alimentos	LEE et al., 2013; KUREK et al., 2014
<i>B. cereus</i>	Bactéria Gram-positiva	Infecções em imunodeprimidos	Setor alimentício, cateteres e tubos de traqueostomia	BRAÜNLICH et al., 2013
<i>P. aeruginosas</i>	Bactéria Gram-negativa	Oportunista	Dispositivos médicos, queimaduras e pulmão	VANDERVOORT; BRELLES-MARINO, 2014
<i>C. albicans</i>	Fungo	Dimorfismo	Dispositivos médicos e materiais ortodônticos	APARNA; YADAV, 2008; MARTINEZ et al., 2010; NETT et al., 2011

## 4.2 IMPACTOS NA SAÚDE PÚBLICA

Para que ocorra a formação de biofilmes em superfícies de biomateriais é necessário que estes possuam propriedades que facilitem essa aderência, como hidrofiliabilidade, que é afinidade que este representa pela água, rugosidade, potencial  $Z$  que é a medida de atração e repulsão entre duas matérias, quando esse potencial é diminuído para 0 ocorre a união das mesmas, estrutura química e energia de superfície. Os biofilmes aderem-se as superfícies através de forças gravitacionais, forças de Van der Waals, interações iônicas, entre outras (KOSEKI et al., 2014).

Os biomateriais utilizados na área da saúde devem ser compatíveis ao ser humano e possuir resistência a desgastes, corrosões e fraturas. Na maioria das vezes são constituídos de zircônio, nióbio e polímeros, pois estes quase não apresentam toxicidade, porém, em geral, possuem propriedades que permitem a adesão de micro-organismos (KOSEKI et al., 2014).

Biofilmes microbianos foram encontrados colonizando cateteres urinários, marca-passo cardíaco, próteses em geral, aparelhos ortopédicos e lentes de contatos. Geralmente a colonização ocorre devido aos longos períodos de permanência com esses dispositivos médicos, sendo que o mais comum é a infecção por cateteres urinários (AZEVEDO et al., 2014).

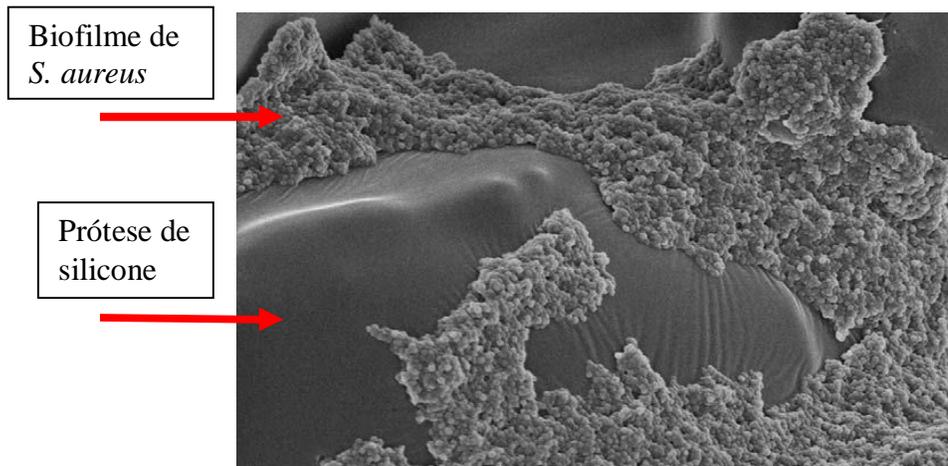
Esses cateteres proporcionam um ambiente ótimo para o crescimento de micro-organismos devido ao fluxo nutritivo da urina e também por estar na temperatura corporal. Observou-se em um estudo a formação de biofilme de *E. coli* juntamente com micro-organismos não patogênicos como *Delftia tsuruhatensis* e *Achromobacter xylosoxidans* em cateteres. Notou-se que diferentes micro-organismos podem co-existir no mesmo local e ainda conviver em comensalismo, pois são capazes de degradar certos componentes do polímero do cateter que serão utilizados pela *E. coli* como fonte nutritiva (AZEVEDO et al., 2014).

Quando ocorre a formação de biofilmes multiespécies em cateteres tem-se uma infecção polimicrobiana, o que confere mais resistência ao biofilme. No entanto, a *E.coli* se sobressai no momento de formar o biofilme, pois extrai a maioria dos nutrientes para o seu desenvolvimento mostrando que qualquer outro micro-organismo não interfere no seu crescimento, o que justifica sua prevalência em cateteres associados a infecções do trato urinário (AZEVEDO et al., 2014).

Biofilmes formados por *P. aeruginosa* causam infecções pulmonares associadas à fibrose cística que facilmente leva o paciente a óbito. Ela possui fatores que regulam sua virulência e maturação do biofilme, modulando ainda mais sua expressão. A antibioticoterapia nestes casos, apenas alivia os sintomas, porém não cura o paciente (APARNA; YADAV, 2008). Essa

resistência ao tratamento pode ser devido à falta de nutrientes disponíveis as bactérias, desse modo começam a produzir tolerância como mecanismo de proteção. Acredita-se que quando as bactérias estão em fase de crescimento é mais fácil destruí-las do que quando estão estabilizadas e sem nutrição, pois o objetivo dos micro-organismos é apenas nutrir-se e replicar-se, a partir do momento em que o biofilme está formado seu objetivo altera para sobreviver e proteger-se contra qualquer maneira de desinfecção, procurando dessa forma amadurecer (NQYEN, 2011).

Observou-se também a formação de biofilmes de *Staphylococcus* sp. em próteses de silicone empregadas em cirurgias plásticas para o aumento da mama (Figura 9). Quando é realizada a implantação da prótese acontece um processo normal de cicatrização onde forma-se uma camada de fibrose em volta desta. Caso essa camada comece a se tornar muito espessa e muito rígida significa que o silicone foi infectado por micro-organismos e estes estão formando biofilme no local, o que irá deformar a prótese e na maioria dos casos existe a necessidade de realizar reimplantação de uma nova prótese. Em casos que não é possível perceber essa alteração pode ocorrer a formação de um granuloma e assim evoluir podendo chegar a uma necrose do local (CONSTANTINE et al., 2013).



**Figura 9:** Biofilme aderido à prótese de silicone, microscopia eletrônica de varredura.

Fonte: CONSTANTINE et al. (2013).

Os biofilmes multiespécies são associações de dois ou mais micro-organismos que se unem para conseguir uma resistência maior aos antimicrobianos. Um exemplo disso é o biofilme formado pelo *S. aureus* e a *C. albicans*. O fato de *S. aureus* ser uma bactéria e *C. albicans* ser um

fungo não impede sua associação, pois os dois possuem características de patogenicidade parecidas como a de ser capaz de provocar vários tipos de doenças, como peritonite, infecção associada ao tecido dos órgãos, septicemias, pneumonias, infecções em feridas, entre outros. A forma pela qual acontece essa associação foi estudada e notou-se que o *S. aureus* tem a capacidade de se aderir às hifas de *C. albicans* durante o crescimento do biofilme (PETERS; NOVERR, 2013).

Há uma grande preocupação em relação à formação de biofilmes em equipamentos utilizados para a hemodiálise, principalmente no sistema de tratamento de água, pois estes podem se desprender ou até mesmo liberar partículas de EPS, de peptídeos e toxinas, facilitando a penetração através da membrana de diálise. Um dos micro-organismos capazes de formar biofilme nesses equipamentos é a *Candida* sp., pois possuem grande capacidade de se desenvolver e disseminar-se mais rapidamente (PIRES et al., 2013).

Cerca de 70% das infecções tratadas estão associadas à formação de biofilmes microbianos, resultando em impacto negativo sobre a saúde, que além de todas as implicações, se traduz em crescentes encargos financeiros para os sistemas de saúde pública mundiais (UPPULURI et al., 2009).

#### 4.3 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE

Os micro-organismos agrupam-se e formam o biofilme como forma de adaptação ao meio ambiente e proteção ao estresse ambiental, assim recebem a denominação de ‘supermicrobíos’, pois se tornam mais resistentes e são dificilmente removidos ou destruídos (XU et al., 2014).

Para realizar a remoção de biofilmes é necessário compreender sua natureza e também as características do material onde está aderido, para assim selecionar a substância antimicrobiana mais eficaz (SIMÕES et al., 2010).

A utilização de sanitizantes comuns na limpeza tradicional está levando ao surgindo de micro-organismos resistentes. Estudos avaliaram diferentes detergentes a base de proteases, como amilases e serinas, capazes de degradar o polissacarídeo do biofilme, demonstrando que a combinação de várias enzimas foi capaz de realizar uma limpeza de alta eficiência eliminando biofilmes. Com esse tipo de limpeza conseguiu-se ainda diminuir os agentes químicos utilizados, o consumo de água e o custo de energia (LEQUETTE et al., 2010).

Segundo Kolodkin-gal et al. (2010), com o passar do tempo a vida do biofilme torna-se limitada, pois os nutrientes ficam escassos, ocorre a acumulação de resíduos e começa a ser mais vantajoso para o micro-organismo se desprender do biofilme. Assim observou-se que os próprios micro-organismos produzem aminoácidos que ajudam na desestruturação do biofilme, entre eles: D-leucina, D-tirosina, D-triptofano e D-metionina. Para que esse processo ocorra os D-aminoácido tem que trocar de lugar com o aminoácido D-alanina que faz parte da cadeia de peptideoglicano do biofilme, provocando uma alteração na cadeia fazendo com que ele se desestruture. Entretanto, esse é um processo que leva tempo, então nesse estudo o intuito foi adicionar esses D-aminoácidos adquiridos comercialmente a fim de destruir os biofilmes como estratégia para a prevenção e a erradicação do biofilme nas indústrias e dispositivos médicos.

Na tentativa de controlar a formação de biofilmes em locais com presença de líquidos, Xu et al. (2014) estudou um possível antibiofilme que foi capaz de inibir o crescimento do biofilme de *P. aeruginosa* e ainda de destruir os biofilmes pré-formados. Isso ocorreu empregando-se um peptídeo natural humano, chamado catelicidina. Esses peptídeos melhorados mostraram a capacidade de modificar todas as propriedades de aderência devido à alteração de temperatura, aumentando a espessura da camada, modificando o ambiente, levando a destruição do biofilme através de uma característica natural dos peptídeos antimicrobianos, a anfipaticidade. Essa característica possibilitou o aumento da atividade bactericida e da citotoxicidade dos antibióticos.

A fim de inibir a formação do biofilme de *C. albicans*, diminuindo a atividade metabólica, deixando-os inativos, estudou-se o polímero presente nos exoesqueletos dos crustáceos, a quitosana. Este polímero mostrou-se eficiente, sem ser tóxico para as células endoteliais de humanos. Acredita-se que, a quitosana seja um potente antifúngico que pode proteger as superfícies hospitalares prevenindo infecções, pois tem a capacidade de penetrar no biofilme e danificar as células de *C. albicans*, inviabilizando e diminuindo a atividade metabólica das mesmas. Assim superfícies revestidas com quitosana apresentaram resistência para a instalação de biofilmes (MARTINEZ et al., 2010).

Na tentativa de minimizar biofilmes formados por *C. albicans* estudou-se o extrato de *Azadirachta*, popularmente conhecida como Neem e empregada popularmente para escovar dentes, mostrando ação antimicrobiana. Este extrato aquoso diminuiu a placa dentária (biofilme) de um modo positivo *in vitro*, através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), verificou-se que este dificultou a formação da mesma e, além disso, não mostrou toxicidade em

testes complementares. O extrato de Neem mostrou esta capacidade de antiadesão das cepas de *C. albicans* para a formação do biofilme, provavelmente devido às suas propriedades fitoquímicas, como a presença de flavinas e de outros compostos presentes no extrato (POLAQUINI et al., 2006).

Um antibiofilme composto por N-acetil-Dglucosamina, Acetiltransferase 1-fosfato e sulfato de protamina e que recebeu o nome de inibidor antibiofilme GlnU, foi testado frente a diferentes biofilmes microbianos, apresentando efeito satisfatório. O inibidor GlnU foi eficaz contra a formação de biofilme multiespécie em cateteres, pois esse faz parte de uma classe de compostos de maleimida que são muito reativos contra enzimas que contêm sulfidrilas o que propicia pouca especificidade, atingindo tanto bactérias Gram-positivas como Gram-negativas. Ainda tem-se na composição deste antibiofilme o sulfato de protamina que potencializa o efeito dos antibióticos aumentando a permeabilidade das membranas por expandir os canais de entrada (BURTON et al., 2006).

Oliveira et al. (2014) analisou a eficácia de dois óleos essenciais extraídos de *Citrus limonum* e *Citrus aurantium* na inibição da formação de biofilmes multiespécies formados por *E. coli*, *C. albicans* e *Enterococcus faecalis*. Observou-se que os óleos possuíam a capacidade de reduzir o biofilme de maneira semelhante ao controle realizado com hipoclorito de sódio.

O extrato aquoso, etanólico e diclorometano, e as substâncias isoladas (cianidina e procianidina) da espécie vegetal *Aronia melanocarpa* mostraram capacidade de inibir a formação de biofilme de *E. coli* e *Bacillus cereus* reduzindo ambas as estirpes no biofilme (BRÄUNLICH et al., 2013).

A fim de inibir a formação e de destruir os biofilmes previamente formados, foram testados dois desinfetantes em equipamentos de hemodiálise, o peróxido de hidrogênio e o ácido peracético, entretanto notou-se que além desses desinfetantes possuírem um custo elevado, danificavam, em curto prazo, o sistema hidráulico. Desse modo, procurando alternativas mais econômicas e menos prejudiciais notou-se que a combinação do peróxido de hidrogênio com o ácido acético foi eficaz contra biofilmes fúngicos e bacterianos, sendo ativo contra microorganismos do mesmo modo que o hipoclorito de sódio (PIRES et al., 2013).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diferentemente do que se acreditava no passado, hoje, sabe-se que os micro-organismos preferem crescer sob forma de biofilme que na forma planctônica, pois assim conseguem proteger-se eficientemente devido a camada de EPS, que além de conferir proteção e nutrição, confere resistência aos antimicrobianos (VANDERVOORT; BRELLES-MARINO, 2014). Além disso, o biofilme protege os micro-organismos do sistema imunológico do ser humano (KOSEKI et al., 2014), e é também por esse motivo que os biofilmes são dificilmente erradicados.

Os micro-organismos são capazes de colonizar qualquer superfície de biomaterial formando o biofilme (BURTON et al., 2006), causando assim infecções associadas à diferentes dispositivos biomédicos e estruturas relacionadas ao âmbito da saúde (VANDERVOORT; BRELLES-MARINO, 2014).

Espera-se que, futuramente, a realização de novos estudos que permitam o reconhecimento, por parte de pesquisadores, da importância que a formação de biofilmes desempenha em quadros de infecções graves, sobretudo em pacientes que possuam dispositivos biomédicos ou ainda em ambientes hospitalares, tragam avanços promissores para o tratamento destes.

## 6 CONCLUSÃO

Conclui-se que os biofilmes apresentam diferentes características quanto a sua constituição, podendo ser monoespécie ou multiespécie, e que devido a sua capacidade de aderir a diferentes estruturas abióticas e bióticas podem causar sérios impactos negativos à saúde pública, seja por meio de infecções diretas, por contaminação de estruturas hospitalares ou de indústrias de alimentos. Além disso, muitos são os estudos que procuram conhecer como essa formação e adesão ocorrem e ainda buscam alternativas de controle e erradicação destes.

## REFERÊNCIAS

- AMMENDOLIA, M. G.; IOSI, F.; BERARDIS, B.; GUCCIONE, G.; SUPERTI, F.; CONTE, M. P.; LONGHI, C. *Listeria monocytogenes* Behaviour in Presence of Non-UV-Irradiated Titanium Dioxide Nanoparticles. **PLoS One**. v. 9, n. 1, 2014.
- APARNA, M. S; YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. **Braz. J. Infect. Dis.** v.12, n. 6, 2008.
- ARNOLD, W.; SHIRTLIFF, M.; STOODLEY, P. Bacterial Biofilms and Periprosthetic Infections. **AAOS**. v. 63, p. 385-391, 2014.
- AZEVEDO, A. S.; ALMEIDA, C.; MELO, L. F.; AZEVEDO, N. F. Interaction between atypical microorganisms and *E. coli* in catheter-associated urinary tract biofilms. **Biofouling**. v. 30, n. 8, p. 893-902, 2014.
- BERRY, A. A.; YANG, Y.; PAKHARUKOVA, N.; GARNETT, J. A.; LEE, W.; COTA, E.; MARCHANT, J.; ROY, S.; TUUTTILA, M.; LIU, B.; INMAN, K. G.; RUIZ-PEREZ, F.; MANDOMANDO, I.; NATARO, J. P.; ZAVIALOV, A. V.; MATTHEWS, S. Structural Insight into Host Recognition by Aggregative Adherence Fimbriae of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **PLoS Pathog**. v. 10, n. 9, 2014.
- BOARI, C.; ALVES, M.; TEBALDI, V.; SAVIAN, T.; PICCOLI, R. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.
- BRÄUNLICH, M; ØKSTAD, O; SLIMESTAD, R; WANGENSTEEN, H; MALTERUD, K; BARSETT, H. Effects of *Aronia melanocarpa* Constituents on Biofilm Formation of *Escherichia coli* and *Bacillus cereu.*, **Molecules**. v. 18, n. 14991, 2013.
- BURTON,E.; GAWANDE,P.; YAKANDAWALA, N.; LOVETRI, K.; ZHANEL, G.; ROMEO, T.; FRIESEN, A.; MADHYASTHA,S. Antibiofilm Activity of GlmU Enzyme

Inhibitors against Catheter-Associated Uropathogens. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 50, n. 5, p. 1835, 2006.

CHAFTARI, A.; ZAKHEM, A.; JAMAL, M.; JIANG, Y.; ANDISSAM RAAD, R. The use of minocycline-rifampin coated central venous catheters for exchange of catheters in the setting of *Staphylococcus aureus* central line associated bloodstream infections. **BMC Infect. Dis.** v.14, n. 518, 2014.

CONSTANTINE, R.S.; CONSTANTINE, F. C.; ROHRICH, R.J. The Ever-Changing Role of Biofilms in Plastic Surgery. **PRS.** v. 133, n. 6, p. 865-872, 2013.

DUNNE JR., W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good. Biofilms Lately?. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews.** v. 8, p. 623 – 633, 2010.

JONES, S; VERSALOVIC, J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. **BMC Microb.** v. 9, n. 35, 2009.

KOLODKIN-GAL, I.; ROMERO, D.; CAO, S.; CLARDY, J.; KOLTER, R.; LOSICK, R. D-Amino Acids Trigger Biofilm Disassembly. **Science.** v. 328, n. 627, 2010.

KOSEKI, H.; YONEKURA, A.; SHIDA, T.; YODA, I.; HORIUCHI, H.; MORINAGA, Y.; YANAGIHARA, K.; SAKODA, H.; OSAKI, M.; TOMITA, M. Early Staphylococcal Biofilm Formation on Solid Orthopaedic Implant Materials: *In Vitro* Study. **J. Pone.** v. 9, n. 10, 2014.

KUREK,A.; MARKOWSKA, K.; GRUDNIAK, A.; JANISZOWSKA, W.; WOLSKA,K. The Effect of Oleanolic and Ursolic Acids on the Hemolytic Properties and Biofilm Formation of *Listeria monocytogenes*. **Polish J. Microb.** v. 63, n. 1, p. 21-25, 2014.

LEE, H.; CHAI, L.; PUI, C.; MUSTAFA, S.; CHEAH, Y.; NISHIBUCHI, M.; RADU, S. Formation of biofilm by *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 at different incubation temperatures and concentrations of sodium chloride. **Braz. J. Microbiol.** v. 44, n. 1, 2013.

LEQUETTE, Y.; BOELS, G.; CLARISSE, M.; FAILLE, C. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. **Biofouling.** v. 26, n. 4, p. 421-43, 2010.

LEROY, C.; DELBARRE, C.; GHILLEBAERT, F.; COMPERE, C.; COMBES, D. Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium. **Biofouling.** v. 24, n. 1, p. 11-22, 2008.

MARTINEZ, L.; MIHU, M.; TAR, M.; CORDERO, R.; HAN, G.; FRIEDMAN, A.; FRIEDMAN, J.; NOSANCHUK, J. Demonstration of Antibiofilm and Antifungal Efficacy of Chitosan against Candidal Biofilms, Using an In Vivo Central Venous Catheter Model. **JID.** v. 201, n. 9, p. 1436–1440, 2010.

MUSSATI, M.; FUENTES, M.; AGUIRRE, P.; SCENNA, N. A steady-state module for modeling anaerobic biofilm reactors. **Lat. Am. appl. res.** v. 34, n. 4, p. 255-263, 2005-10.

NETT, J.; SANCHEZ, H.; CAIN, M.; ROSS, K.; ANDES, D. Interface of *Candida albicans* Biofilm Matrix-Associated Drug Resistance and Cell Wall Integrity Regulation. **Eukaryot Cell.** v. 10, n. 12, p. 1660-1669, 2011.

NGUYEN, D.; DATAR, A.; LEPINE, F.; BAUERLE, E.; OLAKANMI, O.; BEER, K.; MCKAY, G.; SIEHNEL, R.; SCHAFHAUSER, J.; WANG, Y.; BRITIGAN, B.; SINGH, P. Active Starvation Responses Mediate Antibiotic Tolerance in Biofilms and Nutrient-Limited Bacteria. **Science.** v. 334, n. 982, 2011.

OLIVEIRA, S. A. C.; ZAMBRANA, J.; DI IORIO, F.; PEREIRA, C.; JORGE, A. The antimicrobial effects of *Citrus limonum* and *Citrus aurantium* essential oils on multi-species biofilms. **ISSN 1807-3107.** v. 28, n. 1, 2014.

PETERS, B.; NOVERR, M. *Candida albicans-Staphylococcus aureus* Polymicrobial Peritonitis Modulates Host Innate Immunity. **Infect. Immu.** v. 81, n. 6, p. 2178-2189, 2013.

PIRES, R. H.; SILVA, J. F.; MARTINS, C. H. G.; ALMEIDA, A. M. F.; SOARES, C. P.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Effectiveness of Disinfectants Used in Hemodialysis against both *Candida orthopsilosis* and *C. parapsilosis* Sensu Stricto Biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 57, n. 5, p. 2417-2421, 2013.

POLAQUINI, S.; SVIDZINSKI, T.; KEMMELMEIER, C.; GASPARETTO, A. Effect of aqueous extract from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in composite resin by *Candida albicans*. **Archoralbio.** v. 51, p. 482-490, 2006.

RAMAGE, G.; WALLE, K.; WICKES, B.; LÓPEZ-RIBOT, J. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Rev Iberoam Micol.** v. 18, p. 163-170, 2001.

SATO, V. S.; JORGE, J. A.; OLIVEIRA, W. P.; SOUZA, C. R. F.; GUIMARÃES, L. H. S. Phytase Production by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* Biofilm: Characterization of Enzymatic Activity After Spray Drying in Presence of Carbohydrates and Nonconventional Adjuvants. **J. Microbiol. Biotechnol.** v. 24, n. 2, p. 177-187, 2014.

SENEVIRATNE, G; KECSKÉS, M; KENNEDY, I. Biofilmed biofertilisers: Novel inoculants for efficient nutrient use in plants. **ACIAR.** p. 126-130, 2007.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.; VIEIRA, M. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT.** v. 43, p. 573-583, 2010.

SOUZA, E.; MEIRA, Q.; BARBOSA, I.; ATHAYDE, A.; CONCEIÇÃO, M.; SIQUEIRA JUNIOR, J. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. **Braz. J. Microbiol.** v. 45, n. 1, p. 67-75, 2014.

SUGIMOTO, K. Biofilm as a new bio-material. **Innovatie Attaché Tokio**. 2013. Disponível em <http://www.rvo.nl/sites/default/files/Biofilm%20Japan.pdf>. Acesso em: 25/11/2014.

UPPULURI, P.; PIERCE, C. G.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida albicans* Biofilm Formation and its Clinica Consequences. **Future Microb**. v. 4, n. 1, p. 1235-1237, 2009.

VANDERVOORT, K.; BRELLES-MARINO, G. Plasma-Mediated Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Grown on Borosilicate Surfaces under Continuous Culture System. **J. Pone**. 2014.

XU, W.; ZHU, X.; TAN, T.; LI, W.; SHAN, A. Design of embedded-hybrid antimicrobial peptides with enhanced cell selectivity and anti-biofilm activity. **J. Pone**. v. 9, n. 6, 2014.