

BIOFILMES MICROBIANOS: UM DESAFIO PARA A SAÚDE

Dalila Kênia Oliveira¹, Alessandra Marques Cardoso^{2*}

1. Biomédica, Especialista em Microbiologia Clínica e Medicina Laboratorial pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás).

2. Biomédica, Doutora e Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública, com área de concentração em Microbiologia (UFG); Professora Adjunta da Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas da PUC Goiás; Biomédica da Secretaria Estadual de Saúde de Goiás (SES-GO).

*Autor correspondente: Alessandra Marques Cardoso. Endereço: Rua Tambuqui, Quadra 175, Lotes 2 e 3, Apto. 604, Residencial Tambuqui, Parque Amazônia, Goiânia-Goiás, CEP: 74.835-530. Telefone: (62) 8469-1569; E-mail: alemarques5@yahoo.com.br

Resumo

Biofilmes podem ser definidos como comunidades microbianas sésseis altamente estruturadas, embebidas em uma matriz polimérica extracelular, a qual possibilita a aderência irreversível a superfícies bióticas e abióticas. Na natureza, os biofilmes podem ser formados por numerosas espécies de bactérias, fungos, protozoários e algas. A capacidade de formar biofilmes determina a patogenicidade destes microrganismos. Atualmente se acredita que 80% das infecções bacterianas humanas estão associadas à formação de biofilme, especialmente, aquelas que envolvem o uso de dispositivos médicos, como cateteres, válvulas cardíacas, lentes de contato entre outros. Dentre as espécies de microrganismos comumente envolvidas na formação de biofilmes estão *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Diversos estudos têm indicado que microrganismos agregados a comunidades se tornaram substancialmente mais resistentes à ação de antibióticos do que aqueles que vivem isoladamente, de forma planctônica. Fato que pode ser atribuído a fraca penetração e difusão das drogas antimicrobianas através da matriz polimérica extracelular, forte expressão de bombas de efluxo e enzimas capazes de degradar moléculas de antimicrobianos. Estes mecanismos têm impulsionado vários estudos na tentativa de desenvolver materiais

resistentes à adesão de microrganismos, além de possíveis tratamentos no caso de biofilmes já formados.

Palavras-chave: Biofilmes microbianos; Resistência aos Antimicrobianos; Exapolissacarídeos; Dispositivos médicos.

Abstract

Biofilms can be defined as highly structured sessile microbial communities embedded in an extracellular polymer matrix, which allows the irreversible adhesion to biotic and abiotic surfaces. In nature, biofilms can be formed by numerous species of bacteria, fungi, protozoa and algae. The ability to form biofilms determines the pathogenicity of these organisms. It is currently believed that 80% of human bacterial infections are associated with biofilm formation, especially those involving the use of medical devices such as catheters, heart valves, contact lenses, among others. Among the species of microorganisms commonly involved in biofilm formation are *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. Currently, many studies have indicated that aggregates microorganism communities have become substantially more resistant to the action of antibiotics than those who live alone, in planktonic form. This fact can be attributed to poor penetration and diffusion of antimicrobial drugs by extracellular polymer matrix, strong expression of efflux pumps and enzymes capable of degrading antimicrobial molecules. These mechanisms have driven several studies attempting to develop materials resistant to microbial adhesion, and possible treatments in the case of biofilm already formed.

Key words: Microbial biofilms; Antimicrobial Resistance; exopolysaccharides; Medical devices.

INTRODUÇÃO

Durante anos acreditou-se que o crescimento bacteriano era predominantemente planctônico, ou seja, numa suspensão em meio líquido. No entanto, atualmente, a maioria dos estudos reconhece que grande parte das populações bacterianas, independentemente do contexto (ambiental, alimentar ou médico), preferencialmente formam agregados de várias

espécies constituindo uma comunidade de microrganismos, e acredita-se que tal fenômeno é impulsionado pelo princípio da sobrevivência, como mecanismo de adaptação ao estresse ambiental (1). A estas comunidades foi atribuído o nome de biofilme, uma forma de vida microbiana sésil, caracterizada por células aderidas a superfícies bióticas ou abióticas e incorporadas a uma matriz hidratada de substâncias poliméricas extracelulares (2).

Os biofilmes conferem uma espécie de proteção às células microbianas, permitindo seu crescimento e sobrevivência em diversos ambientes (3). Microrganismos associados a biofilmes diminuem drasticamente sua sensibilidade a agentes antimicrobianos. Esta resistência pode ser intrínseca, como resultado natural do crescimento em biofilme, ou adquirida, devido à transferência de elementos entre microrganismos presentes na comunidade, um exemplo seria a transferência de plasmídeos de resistência a antimicrobianos. Considerado um desafio, a sensibilidade de biofilmes a agentes antibacterianos não pode ser determinada por testes de microdiluição padrão, uma vez que estes testes representam a suscetibilidade de células planctônicas, suspensas, e não de células sésseis, associadas à superfícies (4).

Bactérias sésseis que crescem em superfícies têm limitações de nutrientes e assim podem crescer mais lentamente e apresentar mobilidade restrita; formas planctônicas em meios de cultura têm acesso natural a nutrientes e multiplicam-se rapidamente. Bactérias planctônicas estão mais susceptíveis aos efeitos de antibióticos e aos fatores ambientais. Por outro lado, bactérias sésseis são capazes de resistir ou evadir de tais fatores destrutivos, formando agregados, alterando sua fisiologia e aproveitando de deficiências nos mecanismos de defesa do hospedeiro. De tal maneira, para alguns antibióticos, a concentração necessária para eliminar bactérias sésseis pode ser mil vezes maior que a concentração necessária para destruir formas planctônicas da mesma estirpe bacteriana (5).

Infecções causadas por agentes etiológicos amplamente resistentes aos antimicrobianos representam um dos principais desafios na atualidade, acarretando em altas taxas de morbi-mortalidade, aumento no tempo de internação e nos gastos do sistema de saúde. O que tem impulsionado vários estudos sobre biofilmes bacterianos, desde a sua formação, regulação, assim como os mecanismos envolvidos na resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos, entretanto ainda há muito a ser entendido. Esta revisão da literatura descreve os principais aspectos envolvidos na adesão e formação de biofilmes bacterianos, importância clínica e as recentes estratégias desenvolvidas para o seu controle.

Dessa forma, objetivamos descrever o processo de formação de biofilmes e seu impacto nos serviços de saúde, tendo como objetivos específicos, conceituar biofilmes

microbianos, descrever as etapas envolvidas em sua formação, discutir a importância clínica das infecções associadas à formação de biofilme e as principais estratégias utilizadas atualmente para o combate ao desenvolvimento destas comunidades microbianas em ambientes hospitalares.

Este trabalho é um estudo exploratório, descritivo e documental baseado em levantamento bibliográfico dos artigos disponíveis sobre o assunto no banco de dados do LILACS, MEDLINE, SCIELO, Google Acadêmico, PUBMED e ANVISA, além da consulta em livros, compreendendo o período de 2000 a 2015. O levantamento englobou a literatura brasileira e estrangeira, sendo selecionados artigos originais gratuitos e disponíveis na íntegra, utilizando-se os seguintes descritores: biofilmes microbianos, resistência aos antimicrobianos, exopolissacarídeos e dispositivos médicos.

ASPECTOS GERAIS SOBRE OS BIOFILMES MICROBIANOS

As bactérias são os seres mais antigos da terra e nenhuma outra forma de vida tem tanta importância na sustentação e manutenção da vida no planeta como estas. Ubíquas na natureza, elas estão presentes no solo, no ar e na água, colonizam a pele, as mucosas e o trato intestinal dos homens e de outros animais, estando intrinsecamente ligadas à vida dos organismos e aos diversos ambientes em que habitam (6).

Por muito tempo acreditou-se que as bactérias viviam apenas de forma isolada, planctônica. No entanto, estudos tem revelado que a maioria das bactérias não cresce apenas como seres individuais, mas também em comunidades estruturadas, fixadas a um substrato. (2).

Os biofilmes microbianos foram observados pela primeira vez por Antony van Leeuwenhoek, em meados do século XVII, ao examinar seus próprios dentes ele notou a existência de mais fragmentos de células agregadas do que planctônicas. Entretanto a teoria geral da existência de biofilmes só foi promulgada em 1978 por Costerton, que utilizando técnicas mais sofisticadas de microscopia constatou que a maioria dos microrganismos, nos ambientes naturais, se encontravam fixos a substratos e não na forma dispersa em suspensão. A partir de então, o conceito de biofilme tem evoluído e impulsionado várias pesquisas nas mais diversas áreas relacionadas à ecologia microbiana (4).

Atualmente o biofilme pode ser entendido como uma comunidade microbiana multicelular, estruturalmente complexa e dinâmica, que permite o crescimento de células planctônicas protegidas, capazes de sobreviver a ambientes hostis. Os biofilmes podem

compreender uma única espécie microbiana ou várias espécies e se desenvolver em uma variedade de superfícies bióticas e abióticas (7).

Considerada uma estrutura muito adsorvente e porosa, o biofilme é composto essencialmente por água, representando 97% de seu conteúdo total. Os microrganismos constituem apenas uma pequena parte, de 2 a 5%, porém excretam substâncias poliméricas extracelulares, polissacarídeos, glicoproteínas, fosfolipídios e ácidos nucleicos, que juntos compõem a massa seca do biofilme. Estas substâncias são responsáveis pela morfologia, estrutura e integridade funcional, que juntas formam uma espécie de “rede”, na qual se acumulam água e nutrientes essenciais para a sobrevivência bacteriana (8).

A camada de lodo que se forma nas pedras em riachos é um exemplo clássico de biofilme, assim como o tártaro formado nos dentes. E estima-se que mais de 90% dos microrganismos vivam sob a forma de biofilmes e que estes estão presentes em praticamente todos os ecossistemas (9,10).

Alguns biofilmes bacterianos podem ser considerados benéficos para a saúde humana. A existência de algumas cepas de bactérias que evoluíram para formar biofilmes que persistem em nichos humanos específicos foi importante para estabelecer um grupo diversificado de bactérias simbióticas que são referidos como microbioma humano. Um exemplo é a microbiota intestinal que contribui para a síntese de vitaminas, absorção de nutrientes e produção de energia, além de contribuir para a maturação do sistema imunológico. Um biofilme bacteriano também pode ser prejudicial para a saúde humana, a exemplo a bioincrustação bacteriana de implantes cirúrgicos, cateteres e lentes de contato, que além de interferir na função destes sistemas, fornece um mecanismo para a introdução de bactérias patogênicas no corpo humano, culminado no aparecimento de infecções sistêmicas graves (11, 12).

A FISILOGIA DOS BIOFILMES

Quando resolvemos nos mudar, vários aspectos são necessários para facilitar nossa vida em uma nova cidade. O primeiro seria escolher a cidade, então selecionar o bairro que melhor atende às nossas necessidades e, finalmente, construirmos nossa casa entre as casas de outras pessoas. Os mesmos passos ocorrem na formação de um biofilme bacteriano. Em primeiro lugar, a bactéria se aproxima intimamente de uma determinada superfície formando uma associação provisória. Esta associação passageira permite que a bactéria procure um melhor lugar para viver. Quando a associação se torna definitiva significa que a bactéria

escolheu um lugar para se estabelecer e tornou-se membro de uma microcolônia. Finalmente, quando o fornecimento de nutrientes se torna escasso e as condições ambientais desfavoráveis, ou um vizinho hostil entra na comunidade, assim como nós, as bactérias podem se mudar e deixar a matriz do biofilme (13).

Esta analogia nos permite compreender de maneira simples a concepção de um biofilme. Mas o que se sabe atualmente é que este processo é altamente complexo, e envolve diversos mecanismos físico-químicos que promovem a adesão, comunicação bacteriana e estimulam uma modificação na expressão gênica, permitindo a construção e sobrevivência desta comunidade bacteriana (13).

Segundo Percival et al. (2011), o processo de formação de um biofilme pode ser subdividido em cinco etapas (14). Em resumo, é uma reação em cadeia, resultante dos seguintes processos físicos, químicos e biológicos (Figura 1):

- **Etapa 1: Formação do filme condicionante e fixação reversível.** Nesta etapa as bactérias utilizam uma variedade de organelas e proteínas extracelulares para detecção e fixação em superfícies, incluindo pilis, flagelos, fimbrias e diversas proteínas externas de membrana.
- **Etapa 2: Fixação irreversível.** Esta etapa é marcada pela secreção de uma substância polimérica extracelular (EPS) que consiste em DNA, proteínas, lipídeos e lipopolissacarídeos que facilitam a adesão das bactérias à superfície.
- **Etapa 3: Replicação/Multiplicação.** As células adsorvidas à superfície se multiplicam formando microcolônias.
- **Etapa 4: Amadurecimento.** A comunidade cresce em uma estrutura tridimensional e amadurece. As células de um biofilme maduro ficam aderidas pela EPS e resistem a tensões mecânicas e ao deslocamento da comunidade a partir da superfície do substrato.
- **Etapa 5: Dispersão.** Algumas células se desprendem e podem adsorver-se a outras superfícies e formar novos biofilmes. Esta etapa é muito importante para a propagação e auto-renovação da comunidade.

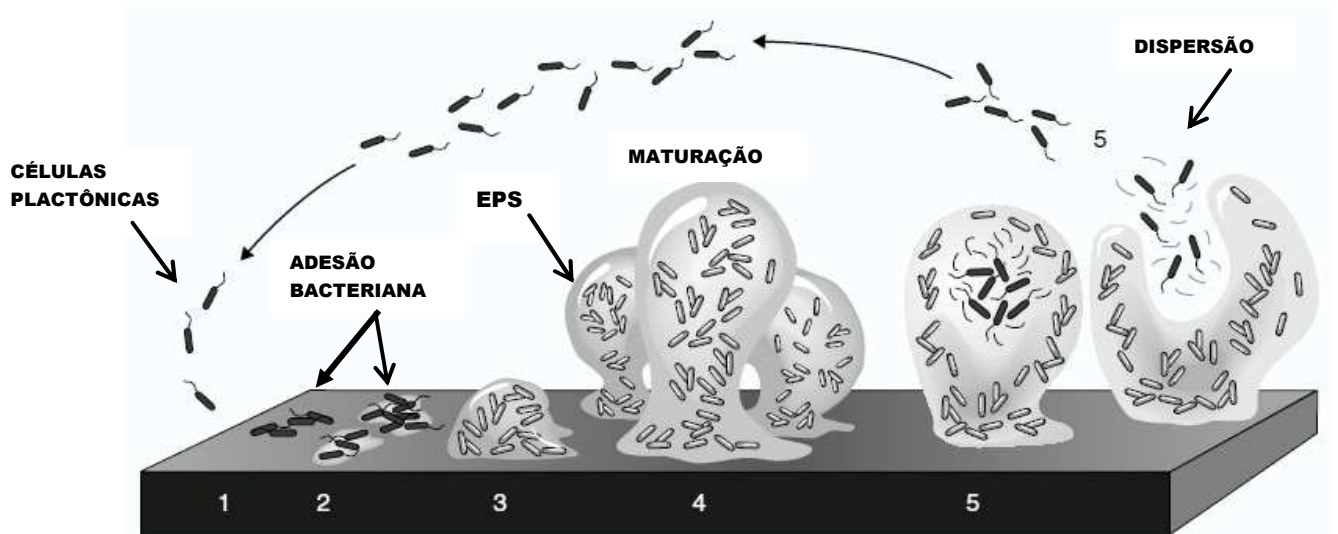


Figura 1 - Etapas de desenvolvimento do biofilme bacteriano. Fonte: Adaptado de STOODLEY et al., 2002 (15).

Em um ambiente natural, os microrganismos não se aderem diretamente a um substrato por si, sendo necessária a formação de uma película “condicionante” nesta superfície. Muitos microrganismos não possuem mecanismos que lhe permitam aderir direta ou fortemente a superfícies, na ausência de filme condicionante. A instauração deste filme ocorre rapidamente e sua velocidade de formação está diretamente ligada à concentração de substâncias orgânicas no meio e sua afinidade pelo suporte sólido. A presença do filme condicionante pode alterar consideravelmente as características físico-químicas da superfície do suporte sólido, favorecendo ou em alguns casos inibindo a adesão inicial de microrganismos (14).

Canales et al. (2009) acompanharam 27 pacientes que fizeram uso de cateter uretral e após a remoção deste cateter avaliaram a formação e a composição proteica de um filme condicionante. Observou-se grande variedade de proteínas adsorvidas a estes cateteres, entre elas, albumina, fibrinogênio, proteína de Tamm-Horsfall e em maior prevalência histonas, proteínas de condensação de DNA nuclear, que estão presentes em pequena quantidade na urina humana, como produto de células epiteliais descamadas. Estas proteínas tem a característica de serem carregadas positivamente e isso as torna solúvel em água, o que provavelmente facilitou sua adsorção ao cateter. Uma vez adsorvida, esta proteína forma a “base” ou “filme condicionante” para a adesão inicial de microrganismos, já que em solução aquosa normalmente a maioria das bactérias estão carregadas negativamente (16).

O *Staphylococcus aureus* é uma espécie bacteriana frequentemente associada à infecções mediadas por biofilme. Um microrganismo comensal, encontrado na pele, narinas e mucosas e que pode se tornar fonte de infecções graves. Biofilmes de *S. aureus* podem ocorrer em diversos tecidos do hospedeiro como, válvulas cardíacas (endocardite) e tecido ósseo (osteomielite), porém, a sua capacidade de colonizar dispositivos médicos (cateteres e próteses) tem sido motivo de grande preocupação. Uma vez implantados, estes dispositivos são facilmente revestidos por proteínas do plasma como fibrinogênio e fibronectina, formando o filme condicionante, e o *S. aureus* possui a capacidade de se ligar a estes componentes sanguíneos, através de receptores específicos, proporcionando a adesão bacteriana e iniciando a formação do biofilme (17).

O fenômeno de adesão ocorre naturalmente em meios aquosos e tanto as propriedades estruturais da superfície, quanto as características físico-químicas da membrana celular bacteriana são fatores determinantes neste processo. Conhecer o ambiente, as características da superfície e o comportamento bacteriano são pré-requisitos básicos para compreensão do mecanismo de adesão (18).

Segundo Donlan (2002), características do meio, tal como o pH, níveis de nutrientes, força iônica, temperatura, concentração de bactérias e tempo de exposição podem desempenhar um papel fundamental na taxa de adesão microbiana a um substrato, assim como a presença de agentes antimicrobianos, que podem dificultar a adesão de microrganismos sensíveis. A figura 2 apresenta os principais determinantes necessários para a adesão bacteriana ao substrato: ambientais, de superfície e do microrganismo (7).

Além das forças eletrostáticas, as características do material como rugosidade, composição química e hidrofobicidade podem facilitar a adesão inicial do microrganismo (11). Superfícies ásperas são mais suscetíveis à formação de biofilme, provavelmente devido à redução das forças de cisalhamento e do aumento da superfície de contato. Estudos indicam que os biofilmes também tendem a se formar mais prontamente em materiais hidrofóbicos, como teflon e outros plásticos, do que em vidro e metal (19).

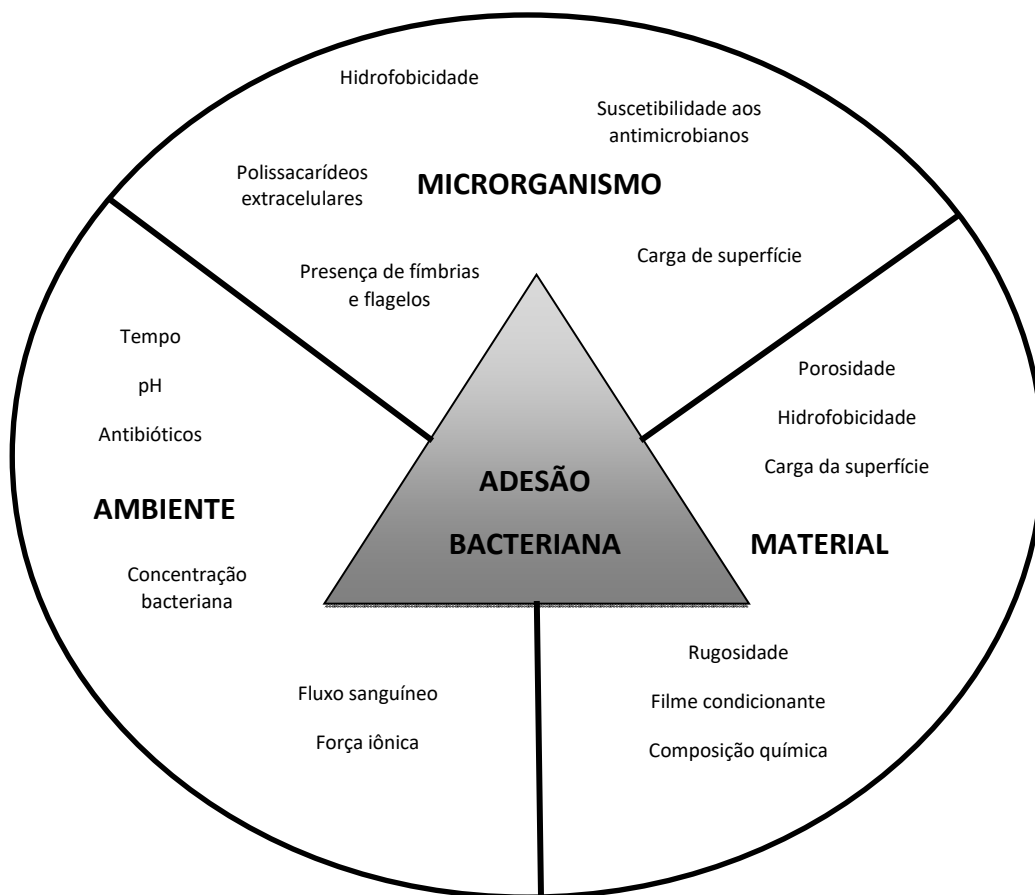


Figura 2 - Fatores determinantes da Adesão Bacteriana. Tríade interação: Microrganismo, Ambiente e Material (superfície). Fonte: Adaptado de TRETER; MACEDO, 2011 (20).

Posteriormente à adesão inicial, a formação do biofilme maduro está frequentemente associada à síntese de moléculas específicas que medeiam à adesão célula-a-célula e célula-superfície. A fase irreversível é caracterizada pela produção de apêndices celulares como flagelos, adesinas, fímbrias, pilis e uma grande quantidade de substância polimérica extracelular (EPS). Fímbrias e pilis podem superar a força de repulsão eletrostática entre célula e substrato, auxiliando na adesão da célula bacteriana. Bactérias imóveis ou que não possuem flagelos, mesmo que transportadas em fluido de baixa velocidade não se aderem, já bactérias móveis, que possuem flagelos funcionais, se aderem à superfície independentemente da velocidade do fluido (21).

Blumer et al. (2005), estudaram o papel do gene *LrhA* na expressão de fímbrias do tipo I, bem como a formação de biofilme por cepas de *Escherichia coli* uropatogênicas. Fímbrias do tipo I são moléculas proteicas que recobrem a parede bacteriana e funcionam como adesinas, sendo capazes de reconhecer e se ligar a receptores específicos na superfície de

células eucariotas. E sabe-se que o gene *LrhA* atua como um regulador dos genes envolvidos na produção de flagelos, motilidade e quimiotaxia. Ao estimular a expressão deste gene, os pesquisadores notaram que a formação de biofilme foi fortemente afetada, provavelmente pela não expressão de fimbrias do tipo I, já que estas exercem um papel fundamental na adesão bacteriana (22).

A *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) é umas das principais causas de diarreia infantil no mundo. Estudos tem mostrado que a EPEC possui a habilidade de anexar, colonizar e formar biofilmes em várias superfícies, sendo elas bióticas ou abióticas (23). Nascimento et al. (2014) avaliaram a capacidade de formação de biofilme em 126 amostras de EPEC isoladas de 92 crianças com diarreia e 34 assintomáticas, tidas como grupo controle. Houve a produção de biofilme tanto por cepas do grupo controle quanto por cepas de pacientes com diarreia, porém a formação de biofilme foi significativamente maior no grupo com diarreia, sugerindo que a capacidade de desenvolver biofilme relaciona-se diretamente a maior patogenicidade. Os autores também observaram que a formação de biofilme foi significativamente maior entre as cepas capazes de expressar fimbrias do tipo I, corroborando com estudos anteriores que demonstraram a importância destas estruturas na adesão inicial do microrganismo à superfície (24).

Uma vez aderidas à superfície, as bactérias se multiplicam emitindo sinais químicos que permitem a comunicação entre si. Neste momento se inicia a produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que são capazes de interceptar nutrientes e novas células planctônicas (15).

Se biofilmes podem ser metaforicamente chamados de "cidade dos microrganismos", os EPS representam a "casa das células do biofilme". Inicialmente conhecida como glicocálix, a matriz de polímeros extracelulares determina as condições imediatas de vida das células dentro do biofilme, afetando a porosidade, densidade, teor de água, carga elétrica, hidrofobicidade e estabilidade mecânica desta comunidade (25). O termo "EPS" foi desenvolvido em 1990 por Thomas Neu, Hans-Curt Flemming e seus colaboradores, para abranger as substâncias poliméricas extracelulares ou secreções bacterianas. EPS foi cunhado para ressaltar a ampla gama de moléculas tais como proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídios que compreendem estas secreções (26).

O fato das bactérias produzirem polissacarídeos extracelulares (EPS) tem sido reconhecido há décadas, e em grande parte por estes serem responsáveis pela virulência bacteriana. Polissacarídeos extracelulares são classificados como polissacarídeos capsulares ou exopolissacarídeos, a distinção entre os dois é operacional: quando bactérias são cultivadas

em cultura líquida e em seguida centrifugadas, os polissacarídeos extracelulares que permanecem associados à célula bacteriana são referidos como cápsula, enquanto aqueles que permanecem no sobrenadante são referidos como exapolissacarídeos (27).

A biossíntese de EPS é fundamental para a formação e manutenção do biofilme. Na fase inicial, a secreção destas moléculas garante a fixação e durante o desenvolvimento do biofilme o EPS promove a formação e manutenção da comunidade. A matriz de EPS possui geralmente de 0,2 a 1 µm de espessura, porém, em algumas espécies esta camada não excede 10nm. Alguns exapolissacarídeos promovem o pré-condicionamento da superfície favorecendo o processo de adesão. Inicialmente estas macromoléculas estão acumuladas na superfície celular, e após serem secretadas para o meio externo, as proteínas são adsorvidas à superfície, formando uma espécie de camada proteica, o filme condicionante (28).

A produção de EPS parece ser um processo complexo que se modifica de espécie para espécie. A *P. aeruginosa* é um patógeno oportunista responsável por infecções em feridas de queimaduras e nos pulmões de pacientes com fibrose cística. Estudos recentes têm demonstrado que cepas de *P. aeruginosa* produtoras de biofilme sintetizam três exapolissacarídeos fundamentais para a formação e estruturação desta comunidade microbiana. O alginato exapolissacarídeo polianônico, composto por ácidos urônicos, confere ao microrganismo um aspecto mucoide e funciona como mediador de aderência à mucina, além de promover resistência parcial aos mecanismos de defesa do sistema imune, inibindo a ligação de anticorpos, a fagocitose e a morte intracelular em leucócitos. O Psl, produzido na fase planctônica, é um polissacarídeo rico em manose e galactose, estando envolvido na fixação inicial e formação do biofilme. O terceiro polissacarídeo é conhecido como Pel, um polímero de celulose rico em glicose, essencial para a formação de uma película na interface ar-líquido, favorecendo a interação célula-célula. A falta de qualquer um destes exapolissacarídeos parece prejudicar diretamente a formação e amadurecimento do biofilme (29).

Assim como a *P. aeruginosa* produz o alginato, algumas cepas de *Escherichia coli* quando expostas a condições estressantes como choque osmótico, baixas temperaturas e dessecação, secretam um exapolissacarídeo conhecido como ácido colânico, que assim como o alginato, forma uma espécie de cápsula viscosa em torno da superfície celular bacteriana. Estudos têm demonstrado que células planctônicas sob condições de crescimento laboratoriais normais não expressam ácido colânico, porém células aderidas a uma superfície sólida produzem este exapolissacarídeo durante o desenvolvimento do biofilme maduro, permitindo a adesão célula-célula e dando origem à estrutura tridimensional do biofilme (30).

As interações célula-célula podem ser baseadas na capacidade de comunicação entre si, no sentido em que a expressão de determinado gene de toda aquela população pode ser regulada simultaneamente. E o processo de comunicação só é possível devido à produção de moléculas sinalizadoras difusíveis, denominadas autoindutores. Estas moléculas são produzidas em níveis basais e se acumulam durante o crescimento da população bacteriana, de forma que quando atingem um nível crítico, podem se ligar e ativar receptores dentro da célula bacteriana, ativando ou inibindo a expressão de diferentes genes. Por ser um processo célula-dependente de densidade, este fenômeno tem sido chamado de “*quorum sensing*”, ou seja, a concentração de moléculas autoindutoras é dependente da densidade bacteriana naquela comunidade (31).

Sendo assim, *quorum sensing* é um tipo de comunicação microbiana que regula a expressão de genes em altas densidades celulares e que se baseia na produção de moléculas de sinalização liberadas a partir da célula para o meio circundante (32).

Alvo de vários estudos nos últimos anos, este mecanismo é responsável por regular uma grande variedade de processos fisiológicos, que envolvem a produção de metabólitos secundários, motilidade, simbiose, transferência de plasmídeo, maturação do biofilme e virulência em numerosos gêneros bacterianos. A capacidade de se comunicar permite que estes microrganismos modifiquem seu fenótipo para que seu metabolismo e suas atividades sejam bem sucedidas no novo ambiente (33, 34, 35).

A ASSOCIAÇÃO ENTRE A RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E OS BIOFILMES

A medicina moderna tem direcionado esforços para solucionar a propagação das infecções bacterianas associadas à formação de biofilmes, uma vez que estas respondem por mais de 80% dos casos de infecções bacterianas. Os antimicrobianos figuram entre os medicamentos mais utilizados em todo o mundo, no entanto seu uso indiscriminado tem sido associado ao desenvolvimento de resistência por parte dos microrganismos (36, 20).

Os antimicrobianos podem atuar inibindo a síntese da parede celular bacteriana, assim como a síntese proteica. Determinados agentes atuam diretamente na membrana celular, aumentando sua permeabilidade e causando o extravasamento celular. Algumas classes de antimicrobianos interferem diretamente no metabolismo dos ácidos nucleicos bacterianos e são capazes de inibir metabólitos essenciais, como a síntese de purinas e de ácido fólico. Entretanto, para que o antimicrobiano exerça sua atividade, primeiramente deverá atingir

concentração ideal no local da infecção, ser capaz de atravessar, de forma passiva ou ativa, a parede celular bacteriana, apresentar afinidade pelo sítio de ligação no interior da bactéria e permanecer tempo suficiente para exercer seu efeito inibitório (37).

A perda de porinas, alteração de sítios-alvo, a expressão de bombas de efluxo e de enzimas capazes de degradar moléculas de antibióticos, estão associadas ao desenvolvimento de resistência bacteriana e estes mecanismos podem ocorrer por mutação natural ou por aquisição de genes de resistência (37).

A estrutura do biofilme e seus atributos fisiológicos conferem uma tolerância intrínseca aos agentes antimicrobianos, sejam eles antibióticos, desinfetantes, germicidas ou antifúngicos. Existem pelo menos três razões para essa resistência, primeiro, os agentes antimicrobianos devem se difundir através da matriz de EPS para entrar em contato e inativar os microrganismos dentro do biofilme. No entanto, as substâncias poliméricas extracelulares formam uma espécie de barreira, influenciando tanto na taxa de transporte do antimicrobiano para o interior do biofilme, quanto na reação do material antimicrobiano com o material da matriz microbiana (14). A exemplo, Walters et al. (2003) demonstraram que a penetração de aminoglicosídeos, carregados positivamente, em um biofilme é retardada pela sua ligação a matrizes carregadas negativamente, tal como o alginato produzido em biofilmes de *P. aeruginosa* (38).

Microrganismos associados a biofilmes reduzem significativamente sua taxa de crescimento, devido à escassez de oxigênio e de nutrientes, vivendo em fase estacionária de crescimento e por consequência a taxa de permeação dos antimicrobianos para as células é reduzida, gerando um fenômeno chamado tolerância. Com isso, tais microrganismos se tornam menos suscetíveis à ação de agentes quimioterápicos dependentes da multiplicação bacteriana, como os β -lactâmicos, os quais atuam inibindo a síntese de parede celular (39).

O ambiente circundante das células dentro de um biofilme pode proporcionar condições de proteção para o microrganismo. Estudos têm demonstrado que no interior dos biofilmes há uma grande produção de enzimas que inativam antimicrobianos, como as β -lactamases. E o acúmulo dessas moléculas produz gradientes de concentração que fornecem proteção às células bacterianas subjacentes. Acredita-se que estas enzimas acumulam-se na matriz do biofilme por secreção ou lise celular e atuam desativando antibióticos β -lactâmicos nas camadas de superfície impedindo a sua difusão para o interior da matriz do biofilme (40).

No que diz respeito à resistência adquirida, os microrganismos associados a biofilmes reduzem dramaticamente sua sensibilidade aos antimicrobianos, pois constituem um ambiente ideal para troca de plasmídeos, círculos de DNA extracromossômico, que podem codificar

resistência a diferentes classes de antimicrobianos. O fato dos biofilmes facilitarem a troca de material genético entre as células determina o aumento da resistência bacteriana nestas comunidades, dificultando o tratamento e controle de infecções hospitalares (7).

A IMPORTÂNCIA CLÍNICA DOS BIOFILMES

Dada a prevalência de biofilmes em ambientes naturais não é de se estranhar que estas formas de crescimento sejam responsáveis por infecções em homens e animais. De acordo com o órgão norte-americano *National Institute of Health*, aproximadamente 80% de todas as infecções no mundo estão associadas a biofilmes, incluindo otites, endocardites, conjuntivites e vaginites. Importantes colonizadores de dispositivos médicos, como cateteres venosos centrais, cateteres urinários, dispositivos intra-uterinos, lentes de contato e próteses de válvulas cardíacas, os biofilmes constituem a principal causa de infecções crônicas e persistentes (4, 20).

Os principais focos de microrganismos são o próprio paciente, pele e mucosas, os profissionais de saúde, pelas mãos, por meio de contaminação durante procedimentos, e o ambiente, pela água e antissépticos contaminados. Conseqüentemente, microrganismos associados à formação de biofilmes estão integrados à microbiota humana e ao ambiente como exemplo: *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *Candida* sp., *Enterococcus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus* e *E. coli* (39).

Alguns autores consideram que até 60% das infecções hospitalares estão associadas à formação de biofilmes por microrganismos oportunistas e pela utilização de dispositivos médicos ou implantes cirúrgicos (41).

Tabela 1 - Infecções humanas associadas à formação de biofilme.

Infecções	Espécies bacterianas envolvidas
Cárie dentária	Cocos Gram-positivos (<i>Streptococcus</i> spp.)
Periodontite	Bactérias bucais anaeróbias Gram-negativas
Otite média	<i>Haemophilus influenzae</i>
Amigdalite crônica	Várias espécies
Fibrose cística	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Endocardite	<i>Streptococcus</i> do grupo viridans e <i>Staphylococcus</i> spp.

Fasciite necrosante	<i>Streptococcus</i> do grupo A
Infecções músculo-esqueléticas	Cocos Gram-positivos
Osteomielite	Várias espécies
Infecção do trato biliar	Bactérias entéricas
Infecções renais	Bacilos Gram-negativos
Prostatite bacteriana	<i>Escherichia coli</i>
Desvio de líquido cefalorraquidiano	<i>Staphylococcus</i> spp.
Lentes de contato	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e cocos Gram-positivos
Suturas	<i>Staphylococcus</i> spp.
Pneumonia associada a sistema de ventilação	Bacilos Gram-negativos
Válvulas mecânicas cardíacas	Cocos Gram-positivos
Infecções em cateter endovascular	<i>Staphylococcus</i> spp.
Tubos endotraqueais	Várias bactérias e fungos

Fonte: VERMELHO et al., 2008. (42)

Dentre as infecções de origem hospitalar, a pneumonia configura-se como a infecção mais frequente, sendo causa importante de morbidade e mortalidade. Resultando em uma considerável diminuição da qualidade de vida do indivíduo, bem como no aumento dos custos hospitalares. A pneumonia bacteriana de origem nosocomial ocorre tipicamente entre 48 a 72 horas após a admissão em um hospital e pode ou não estar associada ao uso de ventilador. A cavidade bucal sofre colonização contínua, apresentando praticamente metade de toda a microbiota do corpo humano e, em adição a esse fato, a placa bacteriana, uma espécie de biofilme, serve de reservatório permanente de microrganismos e estes podem influenciar diretamente na progressão da pneumonia devido à aspiração de bactérias do biofilme para o aparelho respiratório (43, 1).

Enquanto as pneumonias de origem comunitária são principalmente causadas por estirpes que normalmente colonizam a orofaringe, tais como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Mycoplasma pneumoniae*, a pneumonia nosocomial é, em contraste, muitas vezes causada por bactérias que não são membros comuns da orofaringe, tais como *P. aeruginosa*, *S. aureus* e algumas bactérias Gram-negativas. Estes microrganismos colonizam a cavidade bucal em determinadas circunstâncias, como em

pacientes internados, ou em pessoas que vivem em áreas atendidas pelos suprimentos de água insalubres (44).

O encargo global de infecções hospitalares por biofilmes é significativo. Por exemplo, em países desenvolvidos estima-se que, entre os 60.000 pacientes com fibrose cística, cerca de 80% irão desenvolver infecção crônica no pulmão e nos seios paranasais. Em pacientes com feridas crônicas, mais de 60% provavelmente irão desenvolver biofilmes. Para todos os pacientes com dispositivos ortopédicos, 0,5 a 2% irão desenvolver uma infecção no período de dois anos após o procedimento cirúrgico. Além disso, pacientes em unidades de terapia intensiva que fazem uso de cateteres intravenosos, 5 a cada 1.000 desenvolvem infecção de corrente sanguínea relacionada ao uso de cateter. E cerca de 50% dos cateteres urinários implantados tornam-se colonizados nos primeiros 10-14 dias de inserção (45).

O primeiro relato científico da utilização de um cateter data de 1823, quando um cateter de bexiga foi usado para suportar a extração de cálculos da bexiga. E a partir da década de 1990, o surgimento de novos materiais e tecnologias permitiram o uso rotineiro de cateteres em hospitais, a um custo relativamente baixo. Em consequência desse aumento, os hospitais estão hoje sistematicamente desafiados a combater infecções associadas ao uso de cateter. Costerton (1984) relatou pela primeira vez uma infecção causada por cateter contaminado por biofilme bacteriano. Desde então, tem-se observado um aumento vertiginoso dos relatos referentes a biofilme e infecção, corroborando com a ideia de alto índice de inserção de cateteres em hospitais, tornado-os uma das principais causas de infecção de corrente sanguínea associada aos cuidados à saúde (46).

Infecções do trato urinário associadas ao uso de cateter (CAUTI's) configuram o tipo mais comum de infecção nosocomial. Uma pesquisa recente nos EUA relatou que a infecção do trato urinário foi a quarta mais comum, respondendo por 12,9% das infecções associadas a assistência à saúde e 67,7% destes pacientes fizeram uso de cateter urinário. A formação de biofilme ao longo do cateter é a principal causa de bacteriúria, além disso, a urina de pacientes com cateter de longa duração é o principal local de isolamento de microrganismos Gram-negativos multirresistentes (47).

Cateteres urinários são dispositivos médicos padrão, utilizados tanto em ambiente hospitalar quanto em lares de idosos para aliviar a retenção e a incontinência urinária. O cateter de Foley é o mais comum, um sistema fechado, estéril, constituído por um tubo inserido através da uretra mantido por um balão insuflável que permite a drenagem da bexiga urinária. Infecções do trato urinário associadas a uso de cateteres são importantes não só pelo seu alto índice e o custo econômico subsequente, mas também por causa das graves sequelas

que podem resultar. Embora a maioria dos casos de bacteriúria associados ao uso de cateter sejam assintomáticos, as CAUTI's podem se tornar sintomáticas, se manifestando de forma leve (febre, cistite e uretrite) ou de forma grave (pielonefrite aguda, cicatrização renal, formação de cálculos e bacteremia). Se não tratadas adequadamente, estas infecções podem evoluir para urosepsis, podendo levar a morte do paciente (48).

Proteus mirabilis e *E. coli* são os microrganismos mais frequentemente isolados em infecções relacionadas ao uso de cateter urinário. No caso de *P. mirabilis*, este possui um conjunto de genes de virulência associados à produção eficiente de biofilmes persistentes que o tornam especialmente bem adaptado para sobrevivência e proliferação tanto no cateter quanto no urotélio. As estirpes de *E. coli* consideradas uropatogênicas são capazes de formar biofilmes, o que contribui para a sua persistência e dificuldade de erradicação do aparelho urinário. Sendo assim, o aumento da ocorrência de infecções urinárias causadas por microrganismos resistentes ao tratamento com antimicrobianos, aliada à dificuldade de erradicação devido à sua capacidade de formação de biofilmes, tem tornado este tipo de infecção um dos maiores desafios no tratamento de infecções nosocomiais (48,49)

A cateterização intravascular, venosa ou arterial, com finalidades de monitorização hemodinâmica, manutenção de uma via de infusão de soluções ou medicações, nutrição parenteral prolongada, hemodiálise, ou mesmo para a coleta de amostras sanguíneas para análises laboratoriais, configura outro procedimento frequente em unidades de terapia intensiva. Aproximadamente 150 milhões de cateteres são puncionados a cada ano nos hospitais e clínicas dos Estados Unidos, sendo mais de 5 milhões de cateteres venosos centrais. O uso de tais dispositivos são responsáveis por cerca de 90% de todas as infecções nosocomiais de corrente sanguínea (50,51). É importante ressaltar que na revisão da literatura nacional não foram encontrados dados numéricos de inserção de cateteres intravasculares.

A infecção relacionada ao cateter intravascular ocorre devido à formação de biofilme e a maioria dos microrganismos envolvidos não são virulentos na sua forma planctônica, mas podem causar infecção persistente, quando estão agrupados formando o biofilme (52).

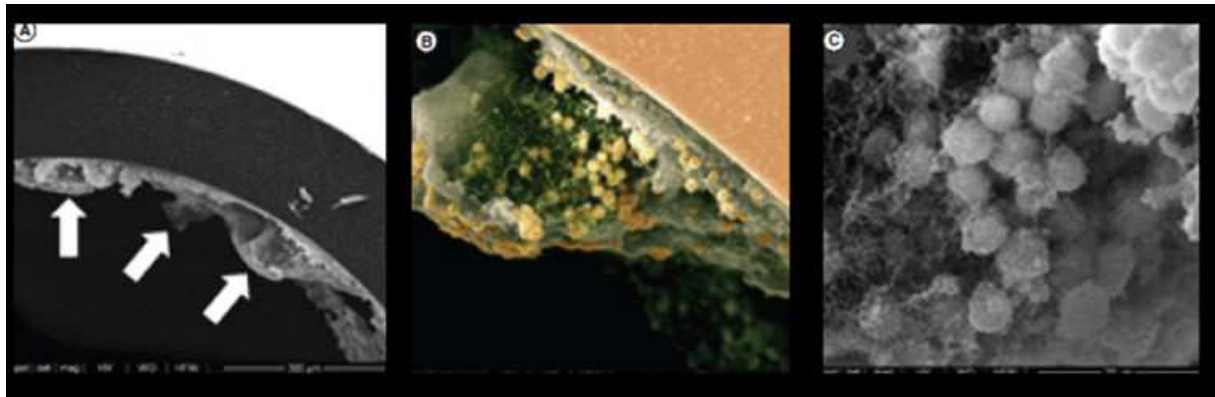


Figura 3 - Biofilme associado a cateter. (A) Demonstra a presença de biofilme aderido à parede interna do cateter (ampliado 200x); (B) imagem A ampliada 800x, sendo possível visualizar numerosos cocos (amarelo), provável matriz de EPS (verde) e parede do cateter (salmão); (C) Cocos agregados aos cachos (ampliado 3000x). Microscopia eletrônica de varredura. Fonte: Adaptado de RABIN et al. 2015 (53).

A colonização de um cateter pode ocorrer em até 24 horas após a sua inserção em função do filme condicionante produzido pelo hospedeiro, constituído de plaquetas, plasma e proteínas tissulares, além disso a maioria dos biomateriais utilizados para manufaturar cateteres são hidrofóbicos, o que facilita a adesão bacteriana inicial, como já foi descrito anteriormente (39). Esta colonização pode se desenvolver por cinco principais mecanismos: contaminação do cateter no momento da inserção; migração das bactérias da pele ao longo da superfície externa do cateter; contaminação do *hub* do cateter por fontes extrínsecas ou endógenas, via lúmen do cateter; infusão contaminada e disseminação hematogênica de uma infecção em local distante do cateter (54).

Donlan (2001) relatou que os biofilmes sobre cateteres podem ser formados por bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Compostos por uma única espécie ou múltiplas espécies de microrganismos, o que depende do cateter e do seu tempo de uso no paciente (39). As bactérias isoladas a partir de cateter incluem *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus* do grupo viridans, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*. Estes microrganismos podem ser oriundos da pele do próprio paciente ou da equipe multiprofissional de saúde, da água potável na qual ficam expostos os conectores, ou de outras fontes do meio ambiente. Nas duas últimas décadas, os estafilococos foram consistentemente associados com a maioria das infecções. Os estafilococos coagulase negativa estão envolvidos em 39% dos casos de infecção relacionada ao cateter e *S. aureus* em 26%, enquanto os bacilos Gram-negativos estão associados em 14% dos casos e *Candida*

spp. em 11%. Os enterococos estão envolvidos em 13% dos casos de infecção de corrente sanguínea associada ao cateter intravascular (55).

Cateteres venosos centrais representam um risco maior de infecção relacionada à dispositivos do que qualquer outro tipo de dispositivo médico e são as principais causas de morbidade e mortalidade. Eles também são a principal fonte de bacteremia e sepse em pacientes hospitalizados. Infecção de corrente sanguínea relacionada ao uso de cateter é uma das complicações mais frequentes, letais e onerosas do cateterismo venoso central (56).

ESTRATÉGIAS DE COMBATE À FORMAÇÃO DOS BIOFILMES

Atualmente as pesquisas de abordagens alternativas para prevenir ou tratar biofilmes podem ser divididas em duas linhas. A primeira fundamentada no processo de formação de biofilme (Figura 4) busca estratégias de inibição da adesão de microrganismos à superfície, inibindo a formação de um filme condicionante (etapa 1). Cátions metálicos tais como Ca^{+2} e Mg^{+2} desempenham um papel importante na aderência bacteriana, formação de biofilme e crescimento bacteriano. Estes cátions bivalentes estimulam a adesão célula-célula e agregação, através de interações com os ácidos teicóicos presentes na parede celular bacteriana. Portanto, a remoção de cátions livres pode reduzir a adesão bacteriana inicial e consequentemente a formação de biofilme (57).

A diversificada composição química da matriz do biofilme torna o EPS suscetível à degradação por uma série de enzimas exogenamente adicionadas. De tal modo alguns pesquisadores têm avaliado enzimas e outras moléculas capazes de desintegrar a matriz do EPS e erradicar biofilmes já formados (etapa 3). A intenção não é necessariamente inibir o crescimento bacteriano, mas sim, perfurar a estrutura do biofilme, sendo útil em combinação com um agente antimicrobiano para o tratamento de infecções associadas a biofilmes (58).

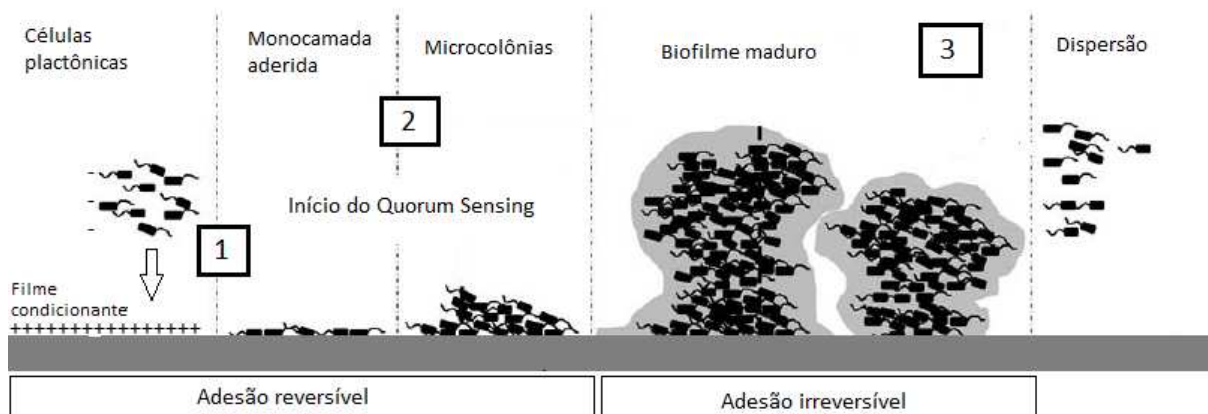


Figura 4 - Principais alvos de combate aos biofilmes microbianos. Inibição da adesão bacteriana e/ou formação de filme condicionante na superfície do biomaterial (etapa 1); rompimento da comunicação bacteriana – *Quorum sensing* (etapa 2); erradicação ou tratamento de biofilmes já formados (etapa 3). Fonte: Adaptado de MACEDO e ABRAHAM (2009) (59).

A segunda linha de pesquisa se concentra na modificação de biomateriais usados em dispositivos médicos para torná-los resistentes à formação de biofilme. Considerando que muitas infecções microbianas são relacionadas ao uso de cateteres, as estratégias anticolonização e antiadesão são bastante interessantes. Desenvolver novas superfícies com características físicas de antiaderência, evitando interações físico-químicas que medeiam a adesão primária ao substrato, bem como recobrir superfícies com os mais diversos compostos, incluindo antibióticos e moléculas inibidoras do sistema de comunicação bacteriana, representam uma alternativa na prevenção da formação de biofilmes (60,20).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o advento da medicina moderna, infecções bacterianas agudas causadas pela rápida proliferação de células plactônicas foram gradualmente substituídas por infecções crônicas devido ao aparecimento de biofilmes. A dificuldade no diagnóstico preciso, devido a ineficácia das técnicas de cultura convencionais para prever a susceptibilidade de microrganismos sésseis, tem impedindo a escolha apropriada de tratamento. De tal modo estas infecções vêm contribuindo significativamente para a morbimortalidade de pacientes,

aumentando os custos hospitalares com antimicrobianos e ocasionando longos períodos de internação.

Por fim, torna-se necessário para a concepção de novas medidas de controle, prevenção, e tratamento, conhecer melhor o papel das comunidades microbianas no desenvolvimento de infecções, bem como a formação de biofilmes em ambientes hospitalares, além de buscar, por meio de estudos, novas técnicas capazes de avaliar corretamente a susceptibilidade destes microrganismos aos antimicrobianos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Henriques A, Vasconcelos C, Cerca N. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais – o estado da arte. *Arq. de medicina*. p. 27-36, 2013.
2. Menoita E, Santos V, Testas C, Gomes C, Santos A. Biofilms: knowing the entity. *Journal of aging & innovation*. 1(2): 23-32, 2012.
3. Costerton AJW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 2011.
4. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms biofilms. *Clin. microbiol. Rev.* 15(2), 2002.
5. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian journal of veterinary research*. 66: 86-92, 2002.
6. Santos NQ. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto Contexto Enferm.* 13: 64-70, 2004.
7. Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 8(9), 2002.
8. Davey ME, Toole GAO. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4): 847-867, 2000.
9. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*. 41: 435-64, 1987.
10. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews. Microbiology*. 2(2): 95-108, 2004.

11. Weinel DB, Renner LD. Physicochemical regulation of biofilm formation. *Mrs bull.* 36(5): 347-355, 2011.
12. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, et al. The human microbiome project: exploring the microbial part of our selves in a changing world. *Nature.* 449(7164): 804-810, 2013.
13. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology.* 182(10): 2675-2679, 2000.
14. Percival SL, Malic S, Cruz H, Williams DW. Introduction to biofilms. *Biofilms and Veterinary Medicine.* 6: 41-69, 2011.
15. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 187-209, 2002.
16. Canales BK, Higgins L, Markowski BS, et al. Presence of five conditioning film proteins are highly associated with early stent encrustation. *Journal of Endourology.* 23(9): 1437-1442, 2009.
17. Gil C, Solano C, Burgui S, et al. Biofilm matrix exoproteins induce a protective immune response against *Staphylococcus aureus* biofilm infection. *Infection and Immunity.* 82(3): 1017-29, 2014.
18. Araújo EA, Andrade NJ, Carvalho AF, Mota A, Henrique L. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. *Quim. Nova.* 33(9): 1940-1948, 2010.
19. Aparna MS, Yadav S. Biofilms : microbes and disease. *The Brazilian journal of Infectious Diseases.* 12: 526-530, 2008.
20. Trentin DS, Giordani RB, Macedo AJ. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato.* 14(22): 113-238, 2013.
21. McClaine JW, Ford RM. Reversal of flagellar rotation is important in initial attachment of *Escherichia coli* to glass in a dynamic system with high- and low-ionic-strength buffers. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(3): 1280-1289, 2002.
22. Blumer C, Kleefeld A, Lehnen D, et al. Regulation of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the transcriptional regulator Irha of *Escherichia coli*. *Microbiology.* 151: 3287-3298, 2005.
23. Ochoa TJ, Contreras CA. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Curr Opin Infect dis.* 24: 478-483, 2011.

24. Nascimento HH, Silva LEP, Souza RT, et al. Phenotypic and genotypic characteristics associated with biofilm formation in clinical isolates of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (AEPEC) strains. *Microbiology*. 14(184): 1-7, 2014.
25. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The eps matrix: the “house of biofilm cells”. *Journal of Bacteriology*. 189(22): 7945-7, 2007.
26. Decho AW. The eps matrix as an adaptive bastion for biofilms: introduction to special issue. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(12): 23297-300, 2013.
27. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*. 13(1): 20-6, 2005.
28. Czaczyk K, Myszka K. Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish j. of Environ. Stud.* 16(6): 799-806, 2007.
29. Ghaffoor A, Hay ID, Rehm BH. A role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(15): 5238-46, 2011.
30. Hanna A, Berg M, Stout V, Razatos A. Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(8): 4474-4481, 2003.
31. Antunes LCM, Ferreira RBR, Buckner MMC, Finlay BB. *Quorum sensing* in bacterial virulence. *Microbiology (reading, england)*. 156 (8): 2271-82, 2010.
32. Montgomery K, Charlesworth JC, Lebard R, Visscher PT, Burns BP. *Quorum sensing* in extreme environments. *Life (basel, switzerland)*. 3(1): 131-48, 2013.
33. Joint I, Allan Downie J, Williams P. Bacterial conversations: talking, listening and eavesdropping an introduction. *Philosophical Transactions of the royal society of london. series b, biological sciences*. 362(1483): 1115-7, 2007.
34. Lopez D, Vlamakis H, Kolte R. Biofilms. *Cite this article as cold spring harb perspect boil.* p. 1-11, 2010.
35. Guo L, He, X, Shi W. Intercellular communications in multispecies oral microbial communities. *Frontiers in Microbiology*. 5(july): 328, 2014.
36. Brunton L, Parker K, Blumenthal D, Buxton I. Goodman & Gilman: Manual de farmacologia e terapêutica. Porto Alegre: mc graw hill, 11ª edição, 2010.

37. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Antimicrobianos – bases teóricas e uso clínico. *Anvisa publicações eletrônicas*. 2007. disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/antimicrobianos.htm. acesso em 13/01/2015.
38. Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, and Stewart PS. Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47(1): 317-323, 2003.
39. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Healthcare Epidemiology*. 33, 2001.
40. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*. 13(1): 34-40, 2005.
41. Silva HR, Regini JRR, Negri M. Biofilme: ameaça invisível em ambientes cirúrgicos. *Braz. J. Surg. Clin. Res.* 4: 43-48, 2013.
42. Vermelho AB, Bastos MCF, Sá MHB. Bacteriologia geral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
43. Amaral SM, Cortês ADQ, Pires FR. Pneumonia nosocomial: importância do microambiente oral. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 35(11): 1116-1124, 2009.
44. Paju S, Scannapieco FA. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Diseases*. 13(6): 508-512, 2007.
45. Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, et al. Escmid guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the european society of clinical microbiology and infectious diseases*. 1-25, 2015.
46. Treter J, Macedo AJ. Catheters: a suitable surface for biofilm formation. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. p. 835-842, 2011.
47. Nicolle LE. Catheter associated urinary tract infections. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 3(1): 23, 2014.

48. Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HLT, Shirtliff ME. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 21(1): 26-59, 2008.
49. Jacobsen SM, Shirtliff, ME. *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Virulence*. 29(5): 460-5, 2011.
50. Araújo S. Acessos venosos centrais e arteriais periféricos - aspectos técnicos e práticos. *Revista Brasileira Terapia Intensiva*. 15 (19): 70-82, 2003.
51. Mesiano ERAB, Merchán-Hamann E. Bloodstream infections among patients using central venous catheters in intensive care units. *Rev Latino-Am Enfermagem*. 15(3), 2007.
52. Rimondini L, Fini M, Giardino R. The microbial infection of biomaterials: a challenge for clinicians and researchers. a short review. *J. Appl. Biomater. & Biomech*. 3: 1-10, 2005.
53. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med. Chem*. 7(4): 493-512, 2015.
54. Mermel LA, Farr BM, Sherertz, RJ, et al. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. *Journal of Intravenous Nursing: The Official Publication of the Intravenous Nurses Society*. 24: 180-205, 2001.
55. CDC. Centers for Disease Control and Prevention: Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter Related Infections. *morb. mortal. wkly. rep*. 51(10): 1-26, 2002.
56. Gahlot R, Nigam C, Kumar V, Yadav G, Anupurba S. Catheter-related bloodstream infections. *International journal of Critical Illness and Injury Science*. 4(2): 162-167, 2014.
57. Abraham MN, Lamlerthton S, Fowler VG, Jefferson KK. Chelating agents exert distinct effects on biofilm formation in *Staphylococcus aureus* depending on strain background: role for clumping factor b. *Journal of Medical Microbiology*. 61: 1062-1070, 2012.
58. Boles BR, Horswill AR. Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends in Microbiology*. 19 (9): 449-455, 2011.
59. Macedo AJ, Abraham WR. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? *Medicinal Chemistry*. 5: 517-528, 2009.
60. Chen M, Yu Q, Sun H. Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *International Journal of Molecular Sciences*. 14: 18488-18501, 2013.