

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ATIVIDADE DA CLOREXIDINA SOBRE BIOFILMES
MICROBIANOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Pauline Cordenonsi Bonez

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

ATIVIDADE DA CLOREXIDINA SOBRE BIOFILMES MICROBIANOS

Pauline Cordenonsi Bonez

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM – RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Marli Matiko Anraku de Campos
Co-orientador: Prof^o Dr. Roberto Christ Vianna Santos

Santa Maria, RS, Brasil
2014

ERRATA

No Artigo Científico

Página: e120

Linha: 68-74

Onde se lê

Acinetobacter baumannii, *Escherichia coli*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, (MRSA) and *Pseudomonas aeruginosa* were used to study standard strains of *Candida albicans* (ATCC 90028), *E. coli* (ATCC 35218), and *P. aeruginosa* (ATCC 27853), along with clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, *S. aureus* (ATCC 6538), and MRSA. All of these organisms are able to form biofilms, as reported previously.⁸⁻¹¹

Leia-se

In this study, were used standard strains of *Candida albicans* (ATCC 90028), *E. coli* (ATCC 35218), *S. aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) and clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and meticilin-resistant *S. aureus* (MRSA). All of these organisms are able to form biofilms, as reported previously.⁸⁻¹¹

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

ATIVIDADE DA CLOREXIDINA SOBRE BIOFILMES MICROBIANOS

elaborada por
Pauline Cordenonsi Bonez

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marli Matiko Anraku de Campos, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UNIFRA)
(Co-orientador)

Sandra Trevisan Beck, Dra. (UFSM)

Rodrigo de Almeida Vaucher, Dr. (UNIFRA)

Santa Maria, 28 de janeiro de 2014.

*Dedico este trabalho a minha família,
em especial a minha mãe Maria Izabel,
por não poupar esforços em minha formação acadêmica e
por todo amor e carinho a mim dedicados.*

O meu mais profundo reconhecimento e admiração!

Te amo!

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento a Deus, presença constante em minha vida, pela saúde, esperança, e auxílio na escolha do melhor caminho a seguir.

A minha amada mãe, Maria Izabel, pelo amor maior, apoio, doação e exemplo de superação. Obrigada por me guiar, por me mostrar a importância do estudo e por me ajudar a ser quem sou hoje.

Ao meu pai Enio (saudades eternas...), pelo legado que nos deixou, pelos valores que prezava, pelo exemplo, pelo amor, pela sabedoria e pela imensa preocupação com o nosso futuro e nossa educação. Te amo!

Ao meu querido irmão Mateus, por fazer parte do meu crescimento, pelo amor, pelo apoio, pelo carinho e pela confiança. Te amo, irmão!

Ao meu namorado Ronei, pelo amor, pelo carinho, pela amizade e pelo companheirismo. Obrigada por fazer parte da minha vida, dos meus dias....Obrigada pelos momentos felizes, pela compreensão, e também pelos conselhos e puxões de orelha. Te amo muito! Obrigada por tudo!

A minha orientadora, professora Marli Matiko Anraku de Campos, pela incansável dedicação, preocupação, respeito, compreensão, competência e amizade. A você, minha admiração e gratidão.

Ao meu co-orientador, professor Roberto Christ Vianna Santos, pelo exemplo, por todos os ensinamentos, apoio, incentivo e confiança.

A toda minha família, em especial à nona, por sempre rezar por mim. Obrigada tios e primos pela força e confiança depositadas em mim. Amo todos vocês!

À família do meu namorado, Dona Rose, Sr. Onei, Leonardo, José Pedro e Greice. Muito obrigada pelo carinho.

A todos os meus amigos, principalmente à Laura, à Paula e à Márcia, pelas palavras de incentivo, pela amizade e pelos momentos de descontração. Amo vocês!

Aos meus queridos colegas e amigos do Labmyco, Vanessa A., Tanise, Jaciane, Vanessa F., Caren, Grazielle, Bianca e Fallon. Obrigada pelo convívio diário, pela amizade, pela parceria e pela ajuda. Espero sempre encontrar pessoas como vocês em meu caminho.

À Camilla, que muito colaborou na realização deste trabalho, obrigada pela amizade e dedicação.

Ao meu pequeno amiguinho Shiva, que através de um simples olhar demonstra companheirismo, amor e carinho.

A toda a equipe do Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), obrigada pela imensa ajuda e infraestrutura concedida.

Aos professores, membros da banca, pela disposição e por avaliarem este trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria, ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT).

À CAPES e ao CNPq pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, e não estão nominalmente citados.

Muito obrigada a todos por esta conquista.

*O resto é o resto...
O que resta é o agora e simplesmente o agora.
O agora é o sempre e o sempre-eterno é ele.*

Agora viver, viver o agora...

Enio Bonez

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

ATIVIDADE DA CLOREXIDINA SOBRE BIOFILMES MICROBIANOS

AUTORA: PAULINE CORDENONSI BONEZ

ORIENTADORA: MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de janeiro de 2014.

Biofilmes são comunidades biológicas com elevado grau de organização, onde os microrganismos se encontram aderidos a uma superfície. Os microrganismos, quando em biofilme, tornam-se alvo de preocupação na área clínica devido à baixa resposta aos tratamentos antimicrobianos e à facilidade de colonização de superfícies como próteses, cateteres e instrumentos cirúrgicos. Vários estudos demonstram que os antimicrobianos e biocidas têm sua eficácia diminuída frente aos biofilmes. A clorexidina é um poderoso antisséptico largamente empregado no ambiente hospitalar, aplicado especialmente na antisepsia de mãos, desinfecção de ambientes cirúrgicos e esterilização de instrumentos utilizados em procedimentos invasivos. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo verificar se biofilmes bacterianos e fúngico são capazes de resistir à atuação antimicrobiana da clorexidina. Testes de disco-difusão e de suscetibilidade foram conduzidos de acordo com CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute), 2013. Para a determinação da CIB (Concentração de Inibição de Biofilme), a clorexidina foi testada nas concentrações da CIM (Concentração Inibitória Mínima) e em concentrações maiores, quando necessário. As placas foram reveladas com solução de 0.1% de Cristal Violeta e a densidade óptica (D.O.) obtida em 570nm. Os resultados demonstraram que a clorexidina possui uma excelente atividade antimicrobiana para a maioria dos microrganismos testados em suas formas livres, porém, mostrou-se menos eficaz contra os biofilmes de *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* resistentes a Meticilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa*, desenvolvidos de forma isolada para cada espécie. Assim, sugere-se que a clorexidina apresenta sua atividade antimicrobiana diminuída quando exposta a microrganismos em biofilme. Provavelmente isso ocorra devido aos mecanismos de resistência atribuídos à estrutura do biofilme - matriz exopolissacarídica, *quorum sensing* (QS), diversidade genética - e também ao uso inadequado deste biocida.

Palavras-chave: Biofilmes. Resistência microbiana. Clorexidina.

ABSTRACT

Master's Thesis
Graduate Program in Pharmaceutical Sciences
Universidade Federal de Santa Maria

CHLORHEXIDINE ACTIVITY AGAINST BACTERIAL BIOFILMS

AUTHOR: PAULINE CORDENONSI BONEZ
ADVISER: MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS
Date and Place of Defense: Santa Maria, January 28, 2014.

Biofilms are biological communities with a high degree of organization in which microorganisms are adhered to a surface. Microorganisms, when in biofilm, become a target of concern in the clinical field due to the low response to antimicrobial treatments and ease of colonization of surfaces such as implants, catheters and surgical instruments. Several studies have shown that antimicrobial and biocides have their effectiveness decreased against biofilms. Chlorhexidine is a powerful antiseptic widely used in hospitals especially applied in hand antisepsis, disinfection of environments, and sterilization of surgical instruments used in invasive procedures. Thus, the present study aimed to determine whether bacterial and fungal biofilms are able to resist the antimicrobial action of chlorhexidine. Disk diffusion and susceptibility tests were performed according to Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), 2013. To determine the Biofilm Inhibition Concentration (BIC), chlorhexidine was tested at concentrations of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and at higher concentrations when necessary. The plates were developed with a solution of 0.1% crystal violet and the optical density (OD) was obtained at 570 nm. Results showed that chlorhexidine has excellent antimicrobial activity against most organisms tested in its free form; however, it was less effective against biofilms of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* resistant to Methicillin (MRSA) and *Pseudomonas aeruginosa*, developed in isolation for each species. Thus, chlorhexidine is likely to have its antimicrobial activity decreased when exposed to microorganisms in biofilms. This probably occurs due to resistance mechanisms attributed to the biofilm structure – exopolysaccharide matrix, *quorum sensing* (QS), genetic diversity – and to the inappropriate use of this biocide.

Keywords: Biofilms. Microbial resistance. Chlorhexidine.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Revisão da Literatura

Figura 1 - Resumo esquemático das funções associadas ao QS.	21
Figura 2 - Esquema dos estágios de desenvolvimento do biofilme microbiano.	25
Figura 3 - Estrutura química da Clorexidina.	35

Artigo Científico

Figura 1 - Densidade óptica das cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em biofilme em relação às diferentes concentrações testadas de clorexidina.	42
Figura 2 - Densidade óptica das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Candida albicans</i> em biofilme em relação à concentração testada de clorexidina.	42
Figura 3 - Densidade óptica das cepas de <i>Escherichia coli</i> e <i>MRSA</i> em biofilme em relação às diferentes concentrações testadas de clorexidina.	42

LISTA DE TABELAS

Artigo Científico

Tabela 1 - Correlação entre os halos obtidos para cada microrganismo e seus valores da CIM.	41
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJIC	American Journal of Infection Control
API	Adesina Plissacarídica Intracelular
ATCC	<i>Amercian Type Colection Culture</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
c-di-GMP	bi-monofosfato de guanosina cíclico dimérico
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMIB	Concentração Mínima de Inibição de Biofilme
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
D.O.	Densidade Óptica
DACT	Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
IBE	Inibidores de Bombas de Efluxo
IQS	Inibidores de <i>Quorum Sensing</i>
IRC	Infecções Relacionadas ao Cateter
ITU	Infecção do Trato Urinário
LABMYCO	Laboratório de Micobacteriologia
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a Meticilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
QS	<i>Quorum Sensing</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RS	Rio Grande do Sul
SPE	Substâncias Poliméricas Extracelulares
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UNIFRA	Centro Universitário Franciscano

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - UFSM.	58
Anexo B - Autorização da revista <i>American Journal of Infection Control</i> (AJIC) para anexação do artigo nesta dissertação.	61

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Resumos Publicados em Congressos.	67
---	----

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	16
2 INTRODUÇÃO	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Biofilmes: conceito, estrutura e composição	19
3.2 Fatores que influenciam na formação de biofilmes	22
3.3 Etapas da formação do biofilme	24
3.4 Participação de biofilmes na resistência antimicrobiana	25
3.5 Microrganismos patogênicos e formadores de biofilmes	27
3.5.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	27
3.5.2 <i>Candida albicans</i>	28
3.5.3 <i>Escherichia coli</i>	29
3.5.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
3.5.5 <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>S. aureus</i> resistente à meticilina (MRSA)	30
3.6 Impacto da formação de biofilmes na área clínica	31
3.7 Estratégias de controle de biofilmes	33
3.8 Clorexidina	35
4 OBJETIVOS	38
4.1 Objetivo Geral	38
4.2 Objetivos Específicos	38
5 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA	39
6 CONCLUSÕES	44
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	45
8 REFERÊNCIAS	47
ANEXOS	57
APÊNDICES	66

1 APRESENTAÇÃO

O item **INTRODUÇÃO** consta de uma breve apresentação sobre o assunto investigado e sua relevância. No segmento **REVISÃO DA LITERATURA**, está descrita uma sucinta revisão bibliográfica sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências, encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **CONCLUSÕES** e **CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho, assim como expectativas e sugestões a serem realizadas em estudos futuros.

As **REFERÊNCIAS** remetem somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO DA LITERATURA** desta dissertação.

2 INTRODUÇÃO

Conceitualmente, o biofilme é o resultado de um complexo ecossistema microbiológico formado por populações desenvolvidas a partir de uma única ou de múltiplas espécies. A microbiota que o compõe pode ser formada por bactérias, fungos e/ou protozoários, de modo isolado ou em combinação. Comumente há a associação dos microrganismos com seus produtos extracelulares, constituindo uma matriz de polímeros orgânicos que se encontra aderida a uma superfície (KASNOWSKI et al., 2010). Estima-se que mais de 90% dos microrganismos são capazes de viver sob a forma de biofilmes e, em tese, praticamente não existe superfície que não possa vir a ser colonizada por microrganismos - seja ela natural ou sintética (COSTERTON et al., 1999; HOIBY et al., 2011).

Os biofilmes, além de representar uma fonte potencial de contaminação em indústrias - entupindo tubulações e precipitando a corrosão de equipamentos - têm grande importância para a saúde pública. De acordo com o Ministério da Saúde, cerca de 80% de todas as infecções microbianas em humanos estão relacionadas a biofilmes e, em muitos casos, estão associadas a implantes de dispositivos médicos como cateteres e próteses (HOEFLER et al., 2006; VASCONCELLOS, 2009; MARCINKIEWICZ et al., 2013).

A diversidade de microrganismos capazes de formar biofilmes é bastante vasta, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras. Dentre os mais reportados, pode-se incluir *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* (CHEN et al., 2013; AGARWAL et al., 2010). *S. aureus* e *S. epidermidis* são frequentemente associados a cateteres cardiovasculares sendo responsáveis por cerca de 40% a 50% das infecções relacionadas ao implante desses dispositivos (AGARWAL et al., 2010).

Os cateteres intravasculares estão associados a um risco elevado de infecção, tanto a nível superficial, da pele no local de inserção, quanto à sepse. Abordagens recentes para reduzir o risco de Infecções Relacionadas ao Cateter (IRC) incluem melhoria da antisepsia da pele e uso de cateteres com antimicrobianos (PRATT et al., 2007; CASEY et al., 2008). No entanto, a eficácia de tais medidas é questionável, pois os antissépticos frequentemente utilizados no ambiente hospitalar, além de não erradicarem todos os microrganismos da pele,

não os atingindo nas camadas mais profundas, podem, até mesmo, incentivar a formação de biofilmes quando em baixas concentrações (KARPANEN et al., 2009).

A dificuldade de tratamento adequado para infecções persistentes, causadas a partir da formação de biofilmes, está diretamente relacionada à estrutura compacta dos mesmos, onde substâncias tóxicas às células microbianas, como por exemplo, os antimicrobianos e antissépticos, enfrentam dificuldades para penetrar no biofilme (VASCONCELLOS, 2009).

Diversas pesquisas demonstram que a habilidade de erradicar microrganismos em biofilmes é significativamente menor do que a habilidade de destruí-los na forma planctônica. A resistência das populações microbianas em biofilme aos fármacos e biocidas pode ser de 100 a 1000 vezes maior do que a resistência de populações equivalentes de microrganismos livres (MAKI et al., 1991; DAVIES et al., 1998; DONLAN, 2001). Além disso, microrganismos em biofilme também mostram-se resistentes à fagocitose e a outros mecanismos de imunidade inata do hospedeiro (MARCINKIEWICZ et al., 2013).

Neste contexto, é de fundamental interesse científico, que estudos sejam realizados a fim de se conhecer os mecanismos ambientais, moleculares e genéticos envolvidos na formação de biofilmes. Da mesma forma, a avaliação da efetividade de agentes antimicrobianos e biocidas, frente a essas estruturas, se mostra necessária e pertinente, uma vez que a formação de biofilmes está relacionada com problemas terapêuticos graves em humanos. Somente através destes novos conhecimentos será possível estabelecer estratégias capazes de eliminar os biofilmes e/ou impedir sua formação.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biofilmes: conceito, estrutura e composição

Os microrganismos são estruturas simples que estão presentes nos mais diversos habitats, porém são capazes de desenvolver comportamentos bastante complexos e variados (COSTERTON et al., 1999). Apresentam-se, tanto na forma planctônica como na forma sésil. Na forma planctônica, os microrganismos encontram-se em suspensão e vivem isoladamente, enquanto que, na forma sésil, se encontram aderidos a superfícies sob a forma de biofilmes (COSTERTON et al., 1995).

Os biofilmes podem ser definidos como sendo estruturas funcionais complexas, que apresentam uma variável distribuição de células e agregados, os quais constituem um modo protegido de crescimento, permitindo a sua sobrevivência num ambiente hostil. A vida no interior do biofilme proporciona aos microrganismos um grande número de benefícios quando comparados aos seus homólogos de vida livre. Essas vantagens ocorrem devido ao fato dos agregados de microrganismos apresentarem maior disponibilidade de nutrientes, interferindo nas taxas de crescimento, cooperatividade metabólica e proteção aos fatores externos (DAVIES et al., 1998; BEHLAU & GILMORE, 2008).

Biofilmes permitem a coexistência de diferentes microrganismos em sua estrutura, sejam ou não de mesma espécie. São constituídos, não somente por microrganismos, mas também pelas Substâncias Poliméricas Extracelulares (SPE) ou matriz exopolissacarídica e por quaisquer outros resíduos do ambiente colonizado. Biofilmes também são constituídos por proteínas, lipídeos, DNA, RNA, íons e água, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada (OLIVEIRA, 2011).

A matriz exopolissacarídica é o material extracelular - constituído por diferentes biopolímeros - produzida pelos próprios microrganismos ao qual o biofilme está incorporado. Em média, 90% da massa seca dos biofilmes é contabilizada pelas SPE (GARNETT & MATTHEWS, 2012). As SPE são as responsáveis pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional dos biofilmes. Do mesmo modo, sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas, assim como condiciona a vasta gama de vantagens a este modo de vida (FLEMMING & WINGENDER, 2001; FLEMMING, 2011).

A matriz oferece um ambiente protetor às células microbianas, dificultando a penetração de agentes germicidas e agindo como uma barreira de filtração, gerando uma penetração lenta ou reduzida de agentes antimicrobianos em geral, quer sejam antibióticos ou biocidas. A matriz também protege os microrganismos contra a dessecação, oxidação, radiação ultravioleta e defesa imunitária (FLEMMING, 2011).

Esta forma de organização favorece a captação de elementos necessários à sobrevivência, porque a sua estrutura permite a circulação de água, oxigênio e nutrientes. Devido à retenção de enzimas extracelulares, um sistema versátil é gerado, onde os nutrientes são captados e dissolvidos a partir da água existente, permitindo que sejam utilizados como fontes de energia. Assim, os elementos nutritivos presentes nos fluídos circulam e tendem a se depositar neste aglomerado celular (COSTERTON et al., 1999).

A arquitetura do biofilme é influenciada por muitos fatores, os quais incluem condições hidrodinâmicas, concentração de nutrientes, motilidade microbiana e comunicação intracelular (FLEMMING, 2011). A matriz exopolissacarídica apresenta papel fundamental no desenvolvimento estrutural do biofilme, e isolar os seus componentes tem sido um desafio em muitas pesquisas. Evidenciou-se, por exemplo, que em estirpes mucóides de *P. aeruginosa*, o alginato - uma SPE - não é essencial para a formação do biofilme, porém, tem efeito notável sobre a estrutura do biofilme. Cepas mucóides, produtoras de alginato, formaram biofilmes estruturalmente heterogêneos, enquanto que cepas não mucóides desenvolveram estruturas planas e mais homogêneas (TIELEN et al., 2005).

Apesar de ser praticamente impossível quantificar toda a matriz constituinte de um biofilme, pode-se estudar a imensa gama de elementos que a compõe, como enzimas, proteínas e lipídeos. Cada componente requer um modo de extração específico - centrifugação, filtração, aquecimento, sonicação, tratamento com agentes de complexação - assim como se supõe terem uma função determinada. Através deste isolamento, pode-se chegar a conclusões ainda mais minuciosas sobre o funcionamento do biofilme (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

A matriz exopolissacarídica também é responsável por manter as células bem próximas dentro da estrutura do biofilme, permitindo, por conseguinte, fortes interações intercelulares (FLEMMING & WINGENDER, 2010). Este modo de organização é denominado de “*quorum sensing*” (QS), que pode ser entendido como um “sentido de grupo”. Ou seja, as células, dentro da estrutura do biofilme, se comunicam entre si por meio de moléculas químicas exibindo um modo de vida organizado onde se estabelecem atividades coordenadas (DONLAN, 2001).

Esse comportamento só é percebido quando os microrganismos atingem uma determinada densidade populacional limitante, do contrário, se comportam como simples organismos celulares (BHARDWAJ et al., 2013). Microrganismos oportunistas, como *P. aeruginosa*, expressam o seu fenótipo virulento ao atingirem um determinado tamanho populacional que seja capaz de superar as defesas do hospedeiro (KALIA, 2013).

O QS é o exemplo mais bem caracterizado de comunicação química entre os microrganismos, sendo responsável por modular uma variedade de funções celulares, incluindo a formação do biofilme, a patogênese, a aquisição de nutrientes, a motilidade e a produção de metabólitos secundários (RENNER & WEIBEL, 2011). Biofilmes são, portanto, comunidades microbianas espacialmente estruturadas, cuja função depende dessa complexa teia de interações simbióticas (JIANG & LI, 2013). A figura 1 ilustra a gama de funções atribuídas ao QS.

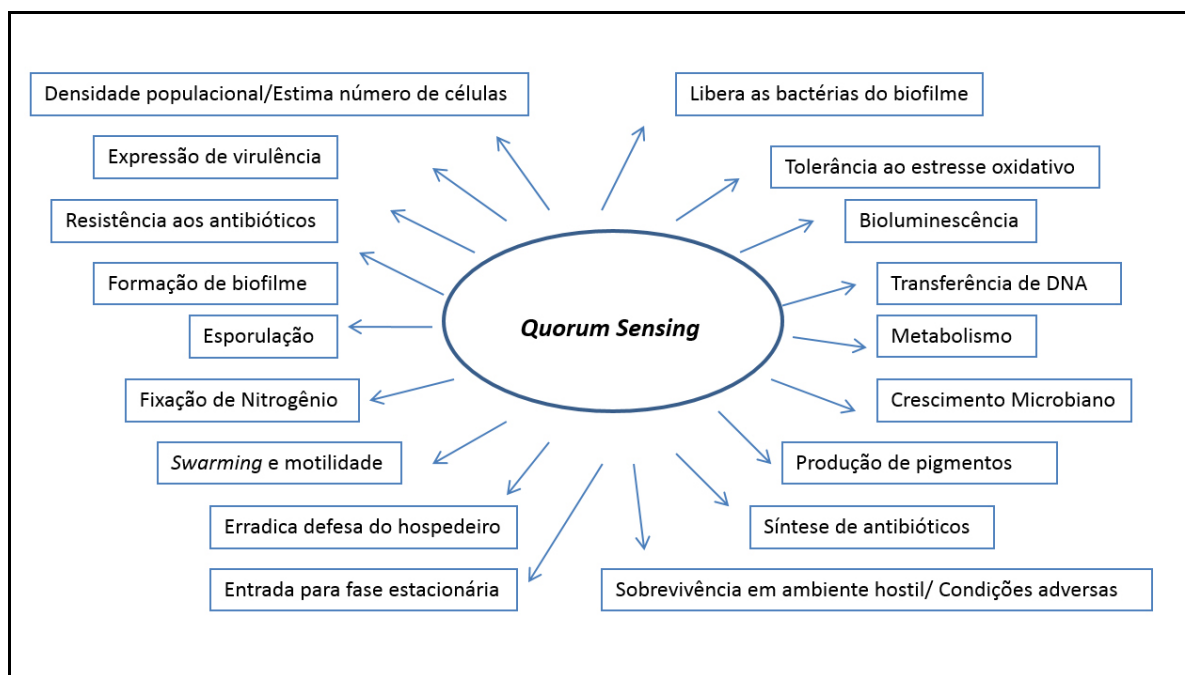


Figura 1: Resumo esquemático das funções associadas ao QS (Adaptado de BHARDWAJ et al., 2013).

3.2 Fatores que influenciam na formação de biofilmes

Múltiplos fatores contribuem para a adesão de um microrganismo à determinada superfície. Dentre eles, incluem-se as características dos microrganismos - como espécie, concentração, produção de SPE, hidrofobicidade, presença de flagelo, fimbria, pili - e as características do material aderente, como porosidade e aspereza, além de elementos como íons, pH, temperatura, pressão e oxigênio (O'TOOLE & KOLTER, 1998; KASNOWSKI et al., 2010; STEWART & COSTERTON, 2001).

O tipo de microrganismo envolvido na formação de biofilmes também interfere, uma vez que a sua capacidade de produzir polímeros extracelulares está intimamente relacionada com a adesão às superfícies. Microrganismos com baixa produção de componentes da matriz tendem, por conseguinte, a ter dificuldade no desenvolvimento de biofilmes (MILLEZI, 2012).

A hidrofobicidade da superfície dos microrganismos também é um fator que contribui para a sua aderência e colonização de superfícies, sejam inertes ou vivas. Em estirpes de *S. aureus*, provenientes de cárie dentária, verificou-se que a maioria dos isolados apresentou comportamento hidrofílico, porém, os isolados considerados altamente hidrofóbicos, foram os que demonstraram maior capacidade de formar biofilmes em placas de poliestireno (KOUIDHI et al., 2010).

A relação entre a motilidade e formação de biofilme tende a ser complexa. A presença de flagelos permite a mobilidade necessária para que o microrganismo alcance uma determinada superfície e também para que estes se movam dentro do biofilme maduro, fazendo com que haja a propagação e crescimento do mesmo. A pili facilita a adesão dos microrganismos e, por conseguinte, a formação do biofilme. Por outro lado, a motilidade também está envolvida na liberação das células microbianas a partir do biofilme maduro, facilitando a sua fragmentação e destruição (VERSTRAETEN et al., 2008).

Neste sentido, muitos estudos têm documentado a importância da motilidade na formação do biofilme em vários agentes patogênicos, incluindo *P. aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* e *E. coli* (O'TOOLE & KOLTER, 1998; PRATT & KOLTER, 1998; LEE et al., 2013; CHELLAPPA et al., 2013; TODHANAKASEM & YOUNG, 2008). A repressão de genes relacionados com a motilidade de *P. aeruginosa* é capaz de diminuir a produção de biofilme por esse microrganismo (O'TOOLE & KOLTER, 1998; CHELLAPPA et al., 2013; LEE et al., 2013). Corroborando com estes achados, o mesmo ocorre para estirpes mutantes

de *E. coli*, onde a ausência de motilidade implica em problemas no desenvolvimento do biofilme (PRATT & KOLTER, 1998). Em contrapartida, a perda de flagelos em cepas de *L. monocytogenes* acarretou em uma maior formação de biofilmes pela diminuição da motilidade (TODHANAKASEM & YOUNG, 2008).

Determinadas condições ambientais e nutricionais como variações de pH, temperatura, meio de cultura e adição de íons e minerais, afetam significativamente a formação de biofilmes por alguns microrganismos. *Citrobacter werkmanii*, por exemplo, tem o seu crescimento planctônico em amplas faixas de pH, porém, a formação de biofilme é maior em valores de pH mais baixos (ZHOU et al., 2013). Dentre os demais microrganismos, contudo, a maioria é capaz de desenvolver biofilme somente em faixas neutras de pH (MACHADO, 2005). Verifica-se, também, que um aumento na concentração de cátions, como sódio, cálcio e íons férrico afeta a fixação de *Pseudomonas fluorescens*, reduzindo as forças de repulsão entre a célula e a superfície, facilitando a formação de biofilme (KOKARE et al., 2009).

Íons, como de ferro e de zinco, foram associados à formação de biofilmes de *Mycobacterium tuberculosis*. O ferro e zinco são cofatores metálicos de importantes enzimas envolvidas na geração e captura de CO₂, bem como na síntese de ácidos micólicos, essenciais na formação e maturação de biofilmes em *M. tuberculosis*. O oxigênio também representa um elemento importante na formação de biofilmes por *M. tuberculosis* e, diferentemente da maioria dos microrganismos, o biofilme se desenvolve na interface líquido-ar (OJHA et al., 2008).

Condições ambientais como presença de glicose, temperatura e hidrofobicidade modulam, também, a expressão de genes específicos e de segundos mensageiros que desempenham importantes funções sobre a formação de biofilmes (DAVEY & O'TOOLE, 2000). O segundo mensageiro bi-monofosfato de guanosina cíclico dimérico (c-di-GMP) tem sido documentado por ser regulador de uma variedade de processos celulares envolvidos na formação de biofilmes (KIM & PARK, 2013). Esta molécula seria a chave para a transcrição do modo de vida planctônico para a vida em biofilme (SUPPIGER et al., 2013). Informações sobre os mecanismos e funções fisiológicas do c-di-GMP ainda não foram totalmente elucidadas, porém, trabalhos recentes abordaram a importância desta molécula na biologia do biofilme onde relataram que níveis elevados de c-di-GMP intracelular promovem uma maior formação de biofilme para microrganismos como *Bordetella bronchiseptica* e *P. aeruginosa* (SISTI et al., 2013; KIM & PARK, 2013).

A formação de biofilme parece estar intimamente relacionada com a expressão de bombas de efluxo em alguns microrganismos. Trata-se de um mecanismo de resistência que

pode ser encontrado em bactérias e fungos, o qual permite que o ambiente interno das células microbianas seja regulado através da remoção de substâncias tóxicas, incluindo agentes antimicrobianos e moléculas sinalizadoras do QS (OLIVARES et al., 2013; SOTO, 2013). Em estirpes do complexo *Burkholderia* (*Burkholderia pseudomallei*), por exemplo, a formação de biofilme demonstrou ser dependente de bombas de efluxo do tipo BpeAB - Opr-B (CHAN & CHUA, 2005). As bombas de efluxo são, portanto, altamente ativas em biofilmes, tornando-se um alvo atraente para medidas anti-biofilme (BAUGH et al., 2012).

3.3 Etapas da formação do biofilme

O processo de formação do biofilme inicia-se com a adesão microbiana e a posterior maturação do biofilme. A fase de adesão inicial é caracterizada pela aproximação do microrganismo à superfície (CARPENTIER & CERF, 2003). Nesta etapa, há a participação de estruturas de adesão (fímbrias e flagelos) presentes na superfície celular. A motilidade flagelar é necessária para levar a célula bacteriana até a superfície superando as forças de repulsão, facilitando a adesão (O'TOOLE & KOLTER, 1998).

À medida que os nutrientes se acumulam, as células pioneiras se reproduzem originando microcolônias. Na ausência de interferência mecânica ou química, a adesão torna-se, nesta fase, irreversível. As microcolônias também sintetizam substâncias extracelulares e passam a atuar como substrato para a aderência de microrganismos denominados colonizadores secundários, que podem se aderir diretamente aos primários ou promoverem a formação de co-agregados com outros microrganismos, e então se aderirem aos primários (DONLAN, 2001).

Posterior à adesão irreversível do microrganismo à superfície, inicia-se o processo de maturação do biofilme. A consolidação do biofilme maduro acontece, principalmente, pelo aumento da densidade populacional e deposição de componentes extracelulares gerados pelos microrganismos. O biofilme maduro caracteriza-se por ser uma estrutura altamente hidratada e viscoelástica, constituindo-se de um aspecto gelatinoso e escorregadio (DONLAN, 2001; WATNICK & KOLTER, 2000).

Por fim, quando o biofilme atinge uma etapa de amadurecimento, a massa microbiana é liberada e os microrganismos desprendidos poderão colonizar novos ambientes e se

tornarem fontes de contaminação (GARNETT & MATTHEWS, 2012). As etapas de desenvolvimento do biofilme podem ser visualizadas na figura 2.

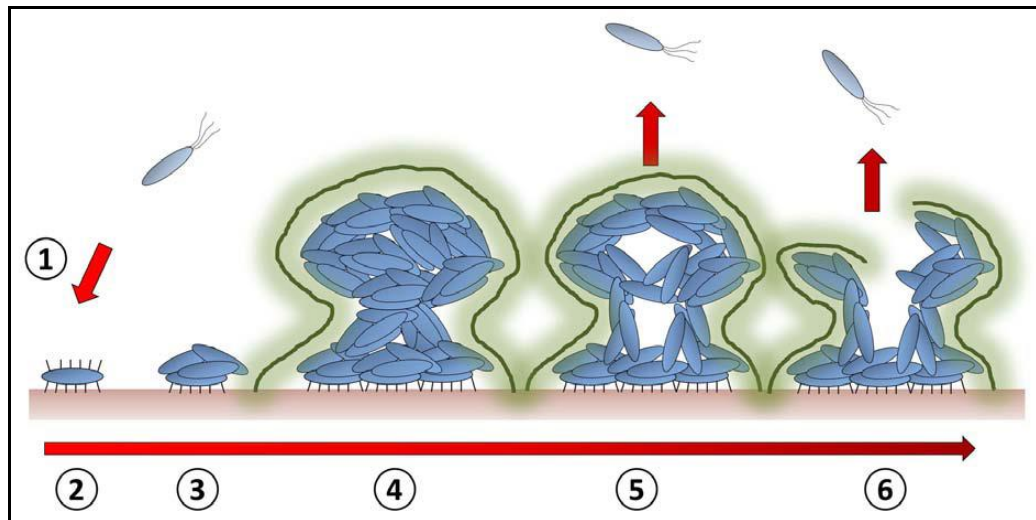


Figura 2: Esquema para o modelo mais aceito dos estágios de desenvolvimento do biofilme microbiano. (1) Microrganismos planctônicos. (2) Adesão reversível a uma superfície. (3) Os microrganismos começam a se dividir e a formar microcolônias. (4) As colônias crescem e secretam uma mistura complexa de hidratos de carbono, proteínas e lípidos. (5) Biofilme totalmente maduro com arquitetura complexa. (6) Desestruturação do biofilme e dispersão das células que darão início a novos biofilmes (Adaptado de GARNETT & MATTHEWS, 2012).

3.4 Participação de biofilmes na resistência antimicrobiana

No biofilme, os microrganismos desenvolvem várias relações de cooperação, de forma sinérgica ou inibitória, que influenciam na patogenia e na saúde do paciente (PIVA, et al., 2011). Bactérias ou fungos em biofilme apresentam maior resistência aos fármacos antimicrobianos e desinfetantes, causando infecções que persistem apesar do tratamento. O inóculo necessário para a manifestação da infecção é cerca de 100 vezes menor quando este forma superfícies de biofilme. Do mesmo modo, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para microrganismos em biofilme podem ser de até 1000 vezes maior do que para microrganismos planctônicos (DAVIES et al., 1998; DONLAN, 2001).

Múltiplos mecanismos, atuando conjuntamente, podem explicar a resistência de biofilmes frente a antimicrobianos e biocidas. As substâncias poliméricas que o constituem induzem a resistência física retardando a difusão dos antimicrobianos e desinfetantes, impedindo a penetração destes nas camadas mais profundas. Além disso, os microrganismos

poderiam se diferenciar em fenótipos mais resistentes ou a depleção de nutrientes e acúmulo de resíduos poderia antagonizar os efeitos dos antimicrobianos (STEWART & COSTERTON, 2001).

O comportamento multicelular da vida em biofilme é um dos principais mecanismos moduladores da resistência aos fármacos e biocidas (KALIA, 2013). A influência do QS sobre a virulência de alguns microrganismos quando em biofilme como *Burkholderia cepacia*, *P. aeruginosa* e *Staphylococcus* sp. são somente alguns exemplos de patógenos que têm sua tolerância aos antimicrobianos associada a este complexo sistema (SUPIGGER et al., 2013; DENG et al., 2013; KONG et al., 2013).

Outro fator responsável pela resistência a antimicrobianos em estruturas de biofilmes é a expressão de bombas de efluxo por alguns microrganismos (SOTO, 2013). O seu exato papel sobre a resistência de biofilmes não está totalmente esclarecido. Supõe-se que este mecanismo possa influenciar na regulação exercida pelo QS e, por conseguinte, acarretar em alterações na biologia do biofilme. O sistema de efluxo seria necessário para que as moléculas se difundissem através da membrana celular, aumentando a sinalização e, conseqüentemente, a expressão de genes de resistência. Ao mesmo tempo, pode estar relacionado com a extrusão dessas moléculas (SOTO, 2013).

Em *P. aeruginosa*, a resistência atribuída aos biofilmes é mediada por alguns genes reguladores, entretanto, o mecanismo pelo qual agem é pouco elucidado. Evidenciou-se, que um desses genes reguladores - o *brlR* - atua ativando bombas de efluxo neste microrganismo e, por isso, há tolerância dos biofilmes aos antimicrobianos (LIAO et al., 2013). Ainda neste sentido, também em biofilme de *P. aeruginosa*, foi demonstrado que a supressão de genes que codificam seu sistema de efluxo ocasiona um aumento na sensibilidade de alguns antimicrobianos (ZHANG & MAH, 2008).

Os microrganismos podem tornar-se resistentes aos antimicrobianos por mutação espontânea ou através de aquisição de informação genética de outros microrganismos através da troca de plasmídeos por conjugação no interior do biofilme (DAVEY & O'TOOLE, 2000). A conjugação (mecanismo de transferência de plasmídeos) ocorre numa taxa maior entre as células em biofilmes do que entre as planctônicas, pois há uma maior proximidade física entre as células, favorecendo a passagem dos plasmídeos. Essa transferência horizontal de genes é importante para a evolução e diversidade genética das comunidades microbianas. Os microrganismos no interior de um biofilme expressam diferentes características quando comparadas com seus homólogos de vida livre. Isso se deve, justamente, à transcrição de

genes durante a vida planctônica e às diferentes fases do ciclo de vida em um biofilme (DONLAN, 2001; COSTERTON et al., 1999).

Instiga-se, também, que muitos microrganismos possam adquirir resistência a antissépticos e desinfetantes por adaptar-se a uma variedade de condições ambientais. (MURTOUGH et al., 2001). A teoria de adaptação a biocidas foi comprovada pela atividade de concentrações subinibitórias de Cloreto de Benzalcônio, que mantiveram ativos ou selecionaram microrganismos adaptados ao ambiente natural. A concentração do biocida e a natureza limitante em nutrientes poderiam, portanto, desempenhar um papel significativo no resultado do processo de seleção de microrganismos multirresistentes (MC CAY et al., 2010). Deste modo, além dos conhecidos mecanismos envolvidos na resistência de biofilmes a antimicrobianos - matriz exopolissacarídea, sinalização célula-célula, diversidade genética - pode-se sugerir que o uso contínuo e inadequado dos desinfetantes pode estar relacionado aos maiores índices de resistência.

3.5 Microrganismos patogênicos e formadores de biofilmes

Praticamente todos os microrganismos são capazes de formar biofilmes em determinadas condições. Várias espécies bacterianas e fúngicas têm sido estudadas no sentido de elucidar os mecanismos envolvidos na formação e resistência dos biofilmes (COSTERTON et al., 1999). Dentre os microrganismos altamente patogênicos incluem-se também os potencialmente formadores de biofilme que assumem papel importante na capacidade de causar infecções graves e persistentes em humanos (HOIBY et al., 2011).

3.5.1 *Acinetobacter baumannii*

Bactérias do gênero *Acinetobacter* sp. são importantes patógenos nosocomiais, os quais contribuem significativamente com a morbidade e mortalidade de pacientes internados (WROBLEWSKA et al., 2008). Durante muito tempo, *Acinetobacter* sp. foi considerado um agente oportunista de baixa patogenicidade. No entanto, têm sido reportados um grande número de surtos de infecções hospitalares envolvendo *Acinetobacter* sp. multirresistentes em

diversas partes do mundo (D'AREZZO et al., 2009). Infecções adquiridas em ambiente hospitalar por *Acinetobacter* sp. envolvem, principalmente, o trato respiratório, trato urinário e feridas, podendo progredir para sepse (SILVA, 2009). *A. baumannii*, especialmente, possui capacidade de sobreviver na maioria das superfícies ambientais. A habilidade deste patógeno de formar biofilme pode explicar sua proeminente resistência aos antimicrobianos e as consequentes propriedades de sobrevivência (WROBLEWSKA et al., 2008; BIERHALS, 2012). Isolados clínicos de *A. baumannii* provenientes de amostras biológicas como feridas, ossos e sangue foram altamente formadores de biofilme segundo publicação recente. Das 53 estirpes isoladas de *A. baumannii*, 29 foram capazes de formar biofilme (SANCHEZ et al., 2013).

A formação de biofilme em instrumentos médico-hospitalares fornece um nicho favorável à formação de biofilme por *A. baumannii*, a partir dos quais este microrganismo pode colonizar pacientes e dar origem a infecções graves. Igualmente, o *A. baumannii* demonstrou ser capaz de sobreviver em condições de dessecação e à desinfecção, tornando-se, desta forma, fonte de preocupação na área clínica e científica (BIERHALS, 2012).

3.5.2 *Candida albicans*

Espécies do gênero *Candida* correspondem a cerca de 80% das infecções fúngicas de origem hospitalar e são a quarta causa de infecções sanguíneas, conduzindo a óbito em 25 a 38% dos pacientes que desenvolvem candidemia. Neste contexto, *C. albicans* é considerado o patógeno mais comumente isolado em pacientes com fungemia (SWINDELL, 2009).

C. albicans é um microrganismo comensal, estando presente no ser humano sem causar infecções, coexistindo com o hospedeiro. Pode colonizar o trato intestinal, oral, vaginal, respiratório, urinário e sanguíneo. Contudo, em pacientes imunocomprometidos, esta levedura pode causar sérias infecções nas mucosas, que incluem candidíases vaginais e infecções orais ou sistêmicas (CARDOSO, 2004).

Entre as espécies fúngicas, é o microrganismo mais comumente associado à formação de biofilmes. Os biofilmes de *C. albicans* estão associados a implantes de materiais invasivos como *stents*, próteses, tubos endotraqueais e representam, juntamente com outros fungos, a terceira causa de infecções associadas à cateteres (RAMAGE et al., 2005). O desenvolvimento de biofilme por este microrganismo tem repercussões clínicas sérias, uma

vez que alguns antifúngicos convencionais não são efetivos, sendo altamente resistentes a uma ampla gama de agentes antifúngicos (TOBUDIC et al., 2012).

3.5.3 *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria anaeróbia facultativa Gram-negativa que faz parte da microbiota normal do homem e de animais. Entretanto, em condições de imunossupressão, essa espécie pode causar infecções e levar à doença no trato intestinal ocorrendo, em alguns casos, disseminação e colonização para o sistema nervoso central, o trato urinário e o sangue (MILLEZI, 2012). Atualmente é responsável por mais de 80% de todas as infecções do trato urinário (ITU) e está frequentemente relacionada com a implantação de dispositivos médicos (OLIVEIRA, 2011). Provavelmente, a aderência bacteriana esteja, também, relacionada com o processo de infecção deste microrganismo (HANCOCK et al., 2007).

Diversos estudos relatam a formação de biofilmes em linhagens de *E. coli* patogênicas nas mais variadas superfícies, que vão desde polipropileno até objetos invasivos (MILLEZI, 2012). Alguns fatores, como a presença de fímbrias, contribuem para a adesão e o crescimento deste microrganismo em biofilme (EMODY et al., 2003).

Recentemente, constatou-se que cepas de *E. coli* tornaram-se tolerantes a alguns biocidas - como hipoclorito de sódio - ao serem expostas a concentrações sub-inibitórias destes produtos. Por consequência, essas cepas apresentaram menor suscetibilidade a uma gama de antimicrobianos e maior capacidade de formação de biofilme (CAPITA et al., 2013).

3.5.4 *Pseudomonas aeruginosa*

A família de bactérias mais pesquisada, em termos de adesão a superfícies, pertence à *Pseudomonadaceae*, sendo *P. aeruginosa* o microrganismo mais explorado. É um patógeno oportunista conhecido por causar infecções do trato urinário e do sistema respiratório, assim como dermatites, infecções dos tecidos moles, bacteremia e uma variedade de infecções sistêmicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos (BERNARDO, 2009). Atualmente, se posiciona entre as principais bactérias causadoras de infecções hospitalares,

afetando mais de dois milhões de pacientes todos os anos, sendo responsável por cerca de 90.000 mortes (FIGUEIREDO et al., 2007; MULCAHY et al., 2013).

Muitas dessas infecções estão associadas ao implante de dispositivos médicos - como cateteres, tubos e sondas. O desenvolvimento de biofilmes nesses materiais está estreitamente relacionado com a dificuldade terapêutica encontrada nestes casos. Os biofilmes de *P. aeruginosa* são tolerantes a uma série de antimicrobianos e biocidas sob uma variedade de condições de crescimento, sendo os isolados clínicos multirresistentes, os de maior habilidade em desenvolver biofilmes (MULCAHY et al., 2013).

Foi demonstrado que *P. aeruginosa* tem habilidade para formar biofilmes em uma série de superfícies, incluindo tecidos vivos como os pulmões, feridas e queimaduras (O'TOOLE & KOLTER, 1998). A formação de biofilmes por este microrganismo, em pacientes com fibrose cística, por exemplo, pode causar complicações sérias e até a morte, uma vez que a antibioticoterapia se torna altamente ineficaz frente à fixação dos biofilmes no tecido pulmonar (SINGH et al., 2000).

Superfícies de alumínio, encontradas em aparelhos odontológicos, também demonstraram ser um nicho altamente propício à formação de biofilme por este microrganismo (FREITAS et al., 2010). Do mesmo modo, *P. aeruginosa* é capaz de formar biofilmes em lentes de contato, podendo ocasionar um sério risco de contaminação e dano ocular (DUTTA et al., 2012).

3.5.5 *Staphylococcus aureus* e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA)

O *S. aureus* é considerado um patógeno humano oportunista e frequentemente está associado a infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar. No indivíduo sadio, o *S. aureus* é usualmente comensal das fossas nasais, pele e até intestino. As infecções resultam, portanto, da introdução dessas bactérias em locais previamente estéreis após um trauma, abrasões de pele e mucosas ou durante procedimentos cirúrgicos (MENEGOTTO & PICOLI, 2007). Infecções comuns envolvem a pele (celulite, impetigo) e feridas em sítios diversos, porém, episódios mais graves, como bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite e meningite, também podem ocorrer (ZAVADINACK et al., 2001; OTTO, 2008).

Este microrganismo foi capaz de desenvolver rapidamente resistência aos antimicrobianos. Já na década de 60, foi constatada a resistência à meticilina, a qual era a alternativa terapêutica lançada para cepas resistentes à penicilina. Neste período então, passaram a ser identificados os denominados *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (MENEGOTTO & PICOLI, 2007).

O gênero *Staphylococcus* em geral - incluindo *S. aureus* e MRSA - são reconhecidos como causas frequentes de infecções associadas à formação de biofilmes. Por isso, os dispositivos precisam ser retirados com frequência dos pacientes infectados (OTTO, 2008).

Muitos aspectos fisiológicos e moleculares, envolvidos na formação de biofilmes de *S. aureus* e MRSA, vêm sendo amplamente estudados (OTTO, 2008). Estes microrganismos têm extraordinária capacidade de fixação em dispositivos médicos de longa permanência e isso ocorre devido interação direta com a superfície do polímero ou através do estabelecimento de conexões com proteínas da matriz (PERIASAMY et al., 2012).

A formação de biofilme em *S. aureus* é mediada pela produção de API (Adesina Polissacarídea Intracelular) e pela expressão de diversas proteínas. A expressão da API requer algumas condições ambientais específicas de cultivo, como por exemplo, a presença de glicose, anaerobiose, alta osmolaridade e temperatura, assim como limitação de etanol e ferro. Além disso, os genes que codificam a API - produtos do locus *ica* - demonstraram ser fundamentais para a formação e virulência dos biofilmes formados por estas estirpes (ARCHER et al., 2011).

Isolados clínicos de *S. aureus* provenientes de cárie bucal apresentaram os genes *icaA* e *icaD* em 50% de todas as estirpes estudadas por KOUIDHI et al. (2010). Em outro trabalho, estirpes de MRSA, isoladas de pacientes internados em unidade intensiva de tratamento, exibiram, em 68,3%, habilidade em formar biofilmes. Do total de 86 isolados formadores de biofilmes, 100% expressaram o gene *icaD* e 96,5%, o gene *icaA* (CHA et al., 2013).

3.6 Impacto da formação de biofilmes na área clínica

Os biofilmes têm grande importância tanto para a produtividade industrial quanto para a saúde pública (ZHANG, 2012). Constitui uma das principais justificativas para a dificuldade de tratamento de endocardites, já que podem se formar biofilmes nas superfícies de válvulas naturais ou protéticas. Neste contexto, a maioria das infecções causadas por biofilmes está

associada à utilização de implantes médicos invasivos (cateteres intravenosos e urinários, próteses ortopédicas, mamárias, etc.). Atualmente, um grande número de cateteres é inserido em pacientes, e destes mais de 60% acabam relacionados com a formação de biofilmes. Nestes casos, o período de hospitalização pode aumentar de 2 a 3 dias, exacerbando em 1 bilhão de dólares, todos os anos, os custos associados ao manejo destes pacientes (DAVEY & O'TOOLE, 2000).

As infecções associadas com a formação de biofilme em cateteres causam a morte de cerca de 10.000 pacientes, e despesas hospitalares de US\$ 11 bilhões por ano nos Estados Unidos (FINE, 2005). Estima-se que a formação de biofilme ocorre em 20% dos cateteres urinários inseridos em pacientes, acarretando em dificuldades na terapêutica. Além disso, embora menos estabelecido, o biofilme pode estar relacionado a doenças sem associação com implantes, como a fibrose cística. Esta condição se apresenta intimamente relacionada com os microrganismos formadores de biofilme (DAVEY & O'TOOLE, 2000).

Os hospitais utilizam uma grande quantidade de desinfetantes para eliminar microrganismos tanto da pele humana como de superfícies inanimadas (NUÑEZ & MORETTON, 2007). Muitos agentes oportunistas pela capacidade formação de biofilmes estão relacionados a infecções hospitalares. Biofilmes de *S. epidermidis* mostraram-se resistentes aos efeitos de isopropanol, etanol, metanol, peróxido de hidrogênio e cloreto de benzalcônio, sugerindo que alguns biocidas utilizados atualmente no ambiente hospitalar, quando em baixas concentrações, não conseguem controlar este reservatório de infecção hospitalar (CHAIEB et al., 2010).

O aumento da resistência dos biofilmes aos desinfetantes tem dificultado a sua erradicação nos ambientes hospitalares. A falta de sucesso na eliminação desses biofilmes vem se tornando um fator preponderante em surtos de infecções e doenças, devido a problemas de contaminação. Os processos de desinfecção e esterilização, assim como outras técnicas antissépticas, constituem procedimentos importantes para o controle e prevenção de infecções hospitalares e necessitam, por conseguinte, de uma avaliação criteriosa de suas atividades antimicrobianas a fim de comprovar a sua eficiência (SILVA, 2009).

3.7 Estratégias de controle de biofilmes

Os antimicrobianos convencionais - devido ao seu uso indiscriminado e à estrutura complexa dos biofilmes - na maioria das vezes, não são efetivos contra biofilmes. Deste modo, muitas estratégias alternativas têm sido estudadas e utilizadas para prevenir a adesão microbiana, retardar a formação de biofilmes e eliminar ou pelo menos reduzir a sua acumulação. Atualmente, tem aumentado a busca de táticas efetivas contra os biofilmes, principalmente no que diz respeito à obtenção de novos produtos que possuam alta atividade antimicrobiana (MARCINKIEWICZ et al., 2013; MARTINEZ-GUTIERREZ et al., 2013).

Essas abordagens incluem a utilização de moléculas de baixo peso molecular capazes de atuarem como Inibidores do QS (IQS), nanopartículas, revestimentos anti-biofilme, combinação de antimicrobianos, utilização de produtos naturais, inibidores de bombas de efluxo, entre outras. As moléculas e enzimas têm sido investigadas para inibir ou interromper a formação de biofilmes; os revestimentos têm sido alvo com o propósito de modificar e/ou revestir superfícies de dispositivos médicos a fim de dificultar a adesão microbiana (MARCINKIEWICZ et al., 2013).

A descoberta de compostos capazes de inibir a ação de moléculas sinalizadoras de QS parece ser uma estratégia promissora para controlar a formação e virulência dos biofilmes. Diversos IQS já foram descritos e patenteados, os quais incluem, por exemplo, furanonas, triclosan, extrato de alho, macrolídeos e ciprofloxacino (KALIA, 2013; MARCINKIEWICZ et al., 2013). Estes compostos interferem na sinalização célula-célula, provocando, conseqüentemente, a inibição de biofilmes (MARCINKIEWICZ et al., 2013).

Ainda neste contexto, nos últimos 15 anos, muito se têm explorado sobre a relação entre Inibidores de Bombas de Efluxo (IBE) e a formação de biofilmes (KOURTESI et al., 2013). Algumas publicações têm comprovado que os IBEs são potenciais agentes capazes de inibir a formação de biofilmes, assim como os IQS. A atuação de inibidores de bomba sobre biofilme de *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* e *Pseudomonas putida* evidenciaram diminuição e, até mesmo, erradicação das películas formadas (KVIST et al., 2008; BAUGH et al., 2012). Da mesma forma, o verapamil - conhecido IBE - desempenhou excelente atividade anti-biofilme de *C. albicans*. Neste mesmo estudo, o verapamil, quando em combinação com fluconazol e tunicamicina, demonstrou efeitos sinérgicos contra o biofilme (YU et al., 2013).

Nos últimos anos, a aplicação de nanopartículas se expandiu consideravelmente (MARTINEZ-GUTIERREZ et al., 2013). A utilização desta tecnologia para aperfeiçoar a atividade de compostos frente a biofilmes também tem sido relatada. Nanopartículas de prata demonstraram, recentemente, excelente eficácia na prevenção da formação dessas películas e na erradicação de biofilmes já estabelecidos por estirpes de *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, MRSA e *Streptococcus mutans*. Nanopartículas de hexametáfosfato de clorexidina também foram ativas contra MRSA e *P. aeruginosa*, tanto na forma planctônica quanto em biofilme (BARBOUR et al., 2013). Logo, sugere-se que este artifício venha a ser considerado na prevenção e tratamento de infecções relacionadas aos biofilmes (MARTINEZ-GUTIERREZ et al., 2013).

Os produtos naturais são fonte de compostos biologicamente ativos, muitos dos quais, têm sido a base para o desenvolvimento de novos fármacos (PALOMBO, 2011). Neste sentido, alguns inibidores de biofilmes têm sido isolados a partir de plantas medicinais, o que é bastante vantajoso, pois estes são, em geral, menos tóxicos e mais específicos do que os compostos sintéticos. A alga marinha *Delisea pulchra* produz furanonas halogenadas capazes de inibir o QS e, conseqüentemente, protege-la da colonização microbiana. O extrato de alho tem atividade semelhante à furanona e reduz a formação de biofilme por *P. aeruginosa* pela inibição do QS. O extrato de gengibre também demonstrou ser efetivo contra biofilme de *P. aeruginosa* (KIM & PARK, 2013).

Compostos - como o sulfatiazol - capazes de interferir na produção de c-di-GMP ou facilitar a degradação desta molécula constituem outra categoria de inibidores de biofilme, uma vez que este é um segundo mensageiro que modula este estilo de vida. Em adição, a dispersina e óxido nítrico, capazes de promoverem a dispersão das células do biofilme, e enzimas que degradam o DNA, também foram documentados como opção terapêutica para a eliminação de biofilmes (KIM & PARK, 2013).

A utilização de bacteriófagos - vírus específicos que infectam bactérias - pode ser um tratamento promissor contra os biofilmes. Os bacteriófagos poderiam atuar na degradação de exopolissacarídeos da matriz extracelular que compõe o biofilme e, assim, destruí-los (SHARMA et al., 2013). Recentemente, foi confirmado que o bacteriófago K foi capaz de reduzir significativamente a colonização bacteriana e a presença de biofilme formado em cateter venoso central por *S. aureus* (LUNGREN et al., 2013).

Ademais, processos físicos como a terapia fotodinâmica também tem sido utilizada. Trata-se de lasers de baixa potência que combatem os microrganismos tratados com drogas fotossintetizantes (SHARMA et al., 2013). Em estirpes de *C. albicans*, *Candida glabrata* e

Staphylococcus mutans a utilização desta terapia mostrou-se bastante promissora, uma vez que reduziu significativamente a atividade metabólica do biofilme quando comparado ao grupo controle (QUISHIDA et al., 2013). As vantagens deste mecanismo incluem a não evidência de resistência bacteriana e a opção de combiná-lo com nanopartículas a fim de potencializar o efeito antimicrobiano (SHARMA et al., 2013).

3.8 Clorexidina

A clorexidina é representada pela fórmula molecular de $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$, com massa molecular de 505,4 g/mol (PUBCHEM, 2013). Quimicamente é classificada como Digluconato de Clorexidina. É uma molécula estável, que quando ingerida é excretada pelas vias normais, sendo que a pequena porcentagem retida no organismo não é tóxica. Quando em baixas concentrações provoca lixiviação de substâncias de pequeno peso molecular, como o potássio e o fósforo, exercendo efeito bacteriostático e bactericida em altas concentrações (BAMBACE et al., 2003).

A clorexidina é composta estruturalmente por dois anéis clorofenólicos nas extremidades, ligados a um grupamento biguanida de cada lado, conectados por uma cadeia central de hexametileno, como pode ser visualizado na figura 3. Esta biguanida catiônica é uma base forte, mais estável na forma de sal, sendo praticamente insolúvel em água. Os sais originalmente produzidos foram o acetato de clorexidina e o cloridrato de clorexidina, mas devido a sua baixa solubilidade em água foram substituídos, com o passar do tempo, pelo sal atualmente usado, o digluconato de clorexidina (VITALIS, 2012).

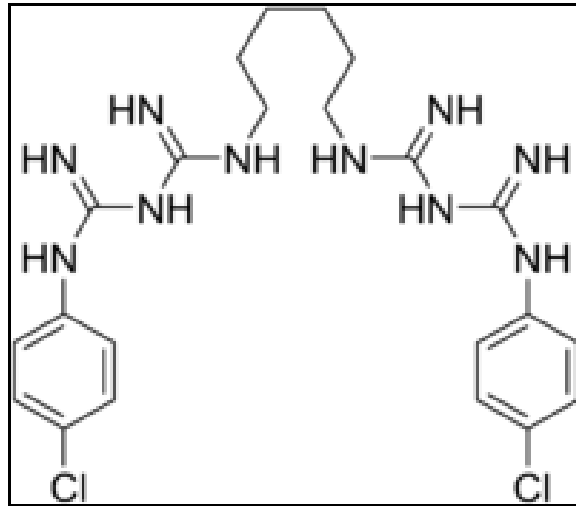


Figura 3: Estrutura química da Clorexidina (PUBCHEM, 2013).

As soluções aquosas de clorexidina são mais estáveis em valores de pH de 5 a 8. Acima deste valor, ocorre precipitação da clorexidina, enquanto que em pH ácido, há redução da sua atividade, devido à perda da estabilidade da solução. Em pH fisiológico, exerce excelente atividade antimicrobiana, proporcionada pela liberação das moléculas de carga positiva (PARSONS et al., 1980; RINGEL et al., 1982).

O efeito antimicrobiano da clorexidina se dá pela atração e adsorção das moléculas catiônicas da clorexidina à superfície celular dos microrganismos. Esta interação promove a alteração da permeabilidade da membrana celular, resultando na perda dos componentes intracelulares e no desequilíbrio osmótico da célula. A quantidade de fármaco absorvida é proporcional à saída dos constituintes celulares. Em pH neutro, é rapidamente adsorvida à superfície celular dos microrganismos, fazendo com que a concentração de moléculas livres de clorexidina na solução seja baixa (VITALIS, 2012; CLOREXIDINA, 2013).

Atualmente, o digluconato de clorexidina é amplamente utilizado como desinfetante hospitalar e odontológico. É utilizado como colutório bucal e em tratamento das infecções gengivais e em cirurgias odontológicas. Na área médica atenta-se para o seu uso em assepsia pré-operatória, assepsia do campo operatório e em instrumentos cirúrgicos. (CLOREXIDINA, 2013).

A clorexidina vem sendo alvo de muitas pesquisas as quais tentam demonstrar sua atividade antimicrobiana frente às cepas bacterianas e fúngicas que tenham relevância clínica e principalmente àquelas que são capazes de formar biofilmes. Um estudo realizado por Shen et al., (2011), o qual teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana da clorexidina

frente a bactérias em biofilme em diferentes fases de desenvolvimento constatou haver, sim, uma maior resistência dos microrganismos testados frente ao desinfetante. Pôde-se observar também que a taxa de resistência aumentava tanto quanto mais maduro fosse o biofilme bacteriano.

Em equipamentos para ventilação mecânica, tanto a clorexidina quanto peróxido de hidrogênio ou hipoclorito de sódio, apresentam menos efeito sobre a microbiota residente em biofilme que sobre bactérias planctônicas (PEETERS et al., 2008). A clorexidina não seria capaz, também, de erradicar biofilmes bacterianos formados em placas dentárias (DORNELLES-MORGENTAL et al., 2011). Em adição, demonstrou capacidade de interromper a formação de biofilme formado por *Porphyromonas gingivalis*, porém, foi incapaz de destruir o biofilme (YAMAGUCHI et al., 2013).

A clorexidina também tem sido explorada em estudos que pretendem inibir o desprendimento do biofilme e a consequente formação dessas películas em outros locais, evitando assim, outros focos de infecção. O desprendimento de biofilmes de *S. mutans* foi diminuído pela clorexidina, porém, somente em concentrações superiores à CIM (Concentração Inibitória Mínima). Utilizando a CIM, a clorexidina promoveu o desprendimento do biofilme formado por este microrganismo (LIU et al., 2012).

Para resolver o problema da presença de microrganismos no ponto de inserção de cateteres, formulações de clorexidina em gel têm sido associadas a esses dispositivos, demonstrando alta atividade durante até sete dias dessa apresentação, reduzindo assim o risco de infecção (KARPANEN et al., 2011). Da mesma forma, essas formulações parecem exercer boa atividade contra biofilmes dentais, porém, pastas contendo metronidazol, minociclina e ciprofloxacina apresentaram-se mais efetivas nestes casos (ORDINOLA-ZAPATA et al., 2013).

Neste contexto, vernizes de clorexidina com liberação sustentada também têm sido especulados. Essa formulação apresentou excelente atividade antibiofilme contra *P. aeruginosa*, *Enterococcus* sp. e *E. coli* isolados de cateter urinário e *stents* uretrais, respectivamente (SHAPUR et al., 2012; ZELICHENKO et al., 2013). Todavia, mais estudos são necessários antes que esta abordagem seja implementada na prática clínica (ZELICHENKO et al., 2013).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade da clorexidina sobre biofilmes microbianos.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Verificar, através de disco-difusão, a atividade antimicrobiana da clorexidina frente aos microrganismos testados;

4.2.2 Determinar as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) da clorexidina frente aos microrganismos;

4.2.3 Avaliar a capacidade de formação de biofilme de cada microrganismo de acordo com ensaio semi-quantitativo em placas;

4.2.4 Determinar a Concentração Mínima de Inibição de Biofilme (CMIB);

5 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, o qual se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências, encontram-se no próprio artigo. O artigo está disposto na forma como foi publicado na revista *American Journal of Infection Control*.

American Journal of Infection Control

(ISSN 0196-6553, Qualis B1, Fator de Impacto 2.731)

(Dezembro/2013, vol. 41, nº 12)





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

American Journal of Infection Control

journal homepage: www.ajicjournal.org

Brief report

Chlorhexidine activity against bacterial biofilms

Pauline Cordenonsi Bonez MSc^{a,*}, Camilla Filippi dos Santos Alves MSc^a,
 Tanise Vendruscolo Dalmolin MSc^a, Vanessa Albertina Agertt MSc^a, Caren Rigon Mizdal MSc^a,
 Vanessa da Costa Flores MSc^a, Jaciane Baggiotto Marques MSc^a, Roberto Christ Vianna Santos PhD^b,
 Marli Matiko Anraku de Campos PhD^a

^a Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

^b Graduate Program in Nanoscience, Franciscan University Center (UNIFRA), Santa Maria, RS, Brazil

Key Words:
 Biofilms
 Chlorhexidine
 Microbial resistance

Background: A biofilm is a complex microbiological ecosystem deposited on surfaces. Microorganisms in form of biofilms are of particular clinical concern because of the poor response to antimicrobial treatments. This study aimed to determine whether bacterial and fungal biofilms are able to resist the antimicrobial activity of chlorhexidine, a powerful antiseptic widely used in the hospital environment.

Methods: Disk diffusion and susceptibility tests were conducted in accordance with Clinical and Laboratory Standards Institute standards for the determination of biofilm inhibitory concentration. Chlorhexidine was tested first at a minimum inhibitory concentration and then at higher concentrations when it was not able to destroy the biofilm. The plates were developed with a solution of 0.1% crystal violet, and readings were made at an optical density of 570 nm.

Results: Chlorhexidine demonstrated excellent antimicrobial activity for most microorganisms tested in their free form, but was less effective against biofilms of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*.

Conclusion: This study confirms that microorganisms in biofilms have greater resistance to chlorhexidine, likely owing to the mechanisms of resistance conferred to the structure of biofilms.

Copyright © 2013 by the Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Hospitals use a wide variety of disinfectants to eliminate microorganisms from both human skin and inanimate surfaces.¹ Chlorhexidine digluconate is a powerful antiseptic widely used in hospitals for hand sanitization, disinfection of surgical environments, and sterilization of instruments used in invasive procedures.² The antimicrobial effect of chlorhexidine involves the attraction and adsorption of cationic molecules to the cell surface of microorganisms, promoting change in cell membrane permeability, resulting in the loss of intracellular components and osmotic imbalance in the cell.²

Disinfection and sterilization, as well as other aseptic techniques, are crucial for the prevention and control of nosocomial infections. Thus, careful assessment of the antimicrobial activity of disinfectants used in hospitals is warranted.³

Biofilms are functional complex structures with varying distributions of cells and cell aggregates that provide a protective medium for the growth of microorganisms. Despite the proven antimicrobial activity of chlorhexidine, microorganisms contained in a biofilm structure become resistant to this antimicrobial disinfectant.⁴

An estimated >90% of microorganisms are biofilms.⁵ In theory, there is no surface that cannot become colonized by bacteria. The clinical importance of bacterial and fungal biofilms lies in the fact that they are usually related to persistent infections, as in cases of infections related to surgical implants, prosthetics, and catheters, all common causes of nosocomial infection. The difficulty of proper treatment and recurrent infections is directly related to the formation of biofilms, highly hydrated structures that protect microorganisms against host defense mechanisms and entry of antimicrobial agents, and hinder diffusion of drugs in tissues.⁶

The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration can be up to 1,000 times greater for microorganisms in biofilms than for planktonic bacteria.^{4,7} An established biofilm is a strong source of endotoxin, which, together

* Address correspondence to Pauline Cordenonsi Bonez, Ave Roraima 1000, Cidade Universitária, Santa Maria, RS, Brazil.

E-mail address: pauline-cb@hotmail.com (P.C. Bonez).

Conflict of interest: None to report.

with polysaccharides and fragments, is released in water. It is extremely difficult to remove biofilms that have form, owing to the strong adhesion of microorganisms to surfaces.⁷

Despite the vast literature on the use of chlorhexidine solutions in hospital disinfection, limited information is available on the effect of such solutions on bacterial and fungal biofilms. The present study aimed to assess the effectiveness of chlorhexidine against biofilms formed by clinically important bacterial and fungal strains.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

Acinetobacter baumannii, *Escherichia coli*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Pseudomonas aeruginosa* were used to study standard strains of *Candida albicans* (ATCC 90028), *E coli* (ATCC 35218), and *P aeruginosa* (ATCC 27853), along with clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, *S aureus* (ATCC 6538), and MRSA. All of these organisms are able to form biofilms, as reported previously.^{8–11}

For the preparation of standardized suspensions, gram-negative strains were cultivated on MacConkey agar (HiMedia Laboratories, Mumbai, India) for 24 hours at 37°C. The gram-positive strains were grown in nutrient agar (HiMedia), and fungal strains were grown on Sabouraud dextrose agar (HiMedia) under the same conditions. After incubation, the organisms were suspended in 10 mL of sterile physiological solution and standardized visually using a 0.5 MacFarland standard.

Compound

The solution based on 2% chlorhexidine digluconate (Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil) was provided by the Pharmacy of the University Hospital of Santa Maria and used according to the manufacturer's recommendations.

Disk diffusion test and MIC

Disk diffusion testing was performed to determine the antimicrobial activity of chlorhexidine with the tested microorganisms. Paper disc filters were impregnated with chlorhexidine. Microorganisms that demonstrated resistance were not used in subsequent assays. Susceptibility tests were conducted by the method of broth microdilution according to Clinical and Laboratory Standards Institute standards M7-A6 and M27-A3.^{12,13} Triplicate wells were used for each experimental condition. A total of 100 µL of the standardized microorganism suspension was placed in each test well of a 96-well microtiter plate, along with an equal volume of compound to be tested in different concentrations. We performed a broth control, a growth control, and a compound control with which to compare results. The plates were incubated for 24 h at 37°C. The MIC was considered the lowest concentration of the test product capable of producing inhibition of the growth of microorganisms evidenced by the use of 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride 1%.

Biofilm formation and determination of biofilm inhibitory concentration

The test for biofilm formation was conducted according to the method described by Merritt et al,¹⁴ with some modifications. Concentrations of chlorhexidine were based on the MIC and higher concentrations when no destruction of the biofilm occurred. Cells weakly adhered to the biofilm were removed by washing with saline, and the biofilm was dried at room temperature for several minutes.

Table 1

Correlation between the halo of inhibition obtained from each organism and the associated MIC value

Microorganism	Halo of inhibition, mm	MIC, µg/mL
<i>A baumannii</i>	14	290
<i>C albicans</i>	16	<145
<i>E coli</i>	14	<145
MRSA	20	<145
<i>S aureus</i>	20	145
<i>P aeruginosa</i>	17	<145

A 200-µL suspension of 0.1% crystal violet was added to each well and maintained at rest for 10 minutes, followed by washing with saline to remove planktonic cells and the remaining excess. Then 200 µL of 95% ethanol was added to each well, kept for 15 minutes, and transferred to another plate for subsequent reading at an optical density (OD) of 570 nm on a plate reader (TP-Reader; ThermoPlate, Goiás, Brazil). Biofilm formation was determined by the difference between the mean OD readings obtained in the positive control (culture medium and bacteria) and the negative control (culture media only).

Statistical analysis

OD readings obtained in the biofilm formation assay were recorded as mean ± SE and were submitted to the *t* test (compared with the positive control). A *P* value >.05 was considered to indicate statistical significance. Graphs were prepared using GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

RESULTS

The disk diffusion assay data and the MIC of chlorhexidine demonstrated a susceptible profile to all microorganisms (Table 1). For the strains of *A baumannii* and *P aeruginosa* tested, although the MIC could be determined, chlorhexidine was less effective than it was for strains in the free state (Fig 1). Chlorhexidine exerted a satisfactory effect only for antibiofilm *C albicans* and *S aureus*, destroying biofilms formed at the same MIC (Fig 2). For *E coli* and MRSA, there was no difference in OD of positive control microbial growth and that of the growth obtained at the concentrations tested (Fig 3).

DISCUSSION

Cells grown in biofilm express different properties than planktonic cells, with the main difference the increased microbial resistance to antimicrobial agents commonly used in clinical practice.¹⁵ Bacteria in biofilms at different developmental stages are more resistant to chlorhexidine.¹⁶ Our disk diffusion assay data and the MIC of chlorhexidine show a susceptible profile to microorganisms that commonly acquire multiresistance—*P aeruginosa*, *A baumannii*, and MRSA. However, these results were not sustained after biofilm formation in some strains.

In a previous study, biofilm *P aeruginosa* exposed to chlorhexidine showed a decrease in biofilm viability of only 40%.¹⁷ In the present study, strains of *P aeruginosa* in biofilm also showed resistance to the antiseptic, with chlorhexidine at the MIC not able to destroy the biofilm. In line with our findings, other authors have reported lower susceptibility to the antimicrobials routinely used for biofilm *P aeruginosa*.¹⁸

Biofilms formed by clinical isolates of strains of *A baumannii* show great variability in phenotype, with some strongly adhered and other with a less dense aspect.¹⁹ In the present study, strains of *A baumannii* in biofilm exhibited similar chlorhexidine resistance as seen in the strains of *P aeruginosa*.

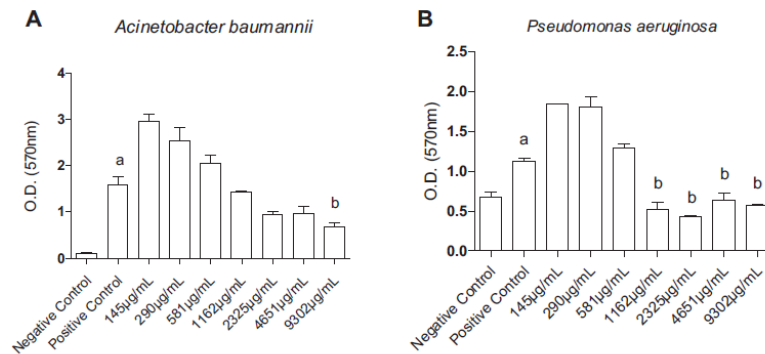


Fig 1. OD of the strains of *A baumannii* and *P aeruginosa* biofilm in relation to different concentrations of chlorhexidine tested. (A) Statistically significant difference between the negative control and the positive control. (B) Statistically significant difference between the positive control and the corresponding concentration.

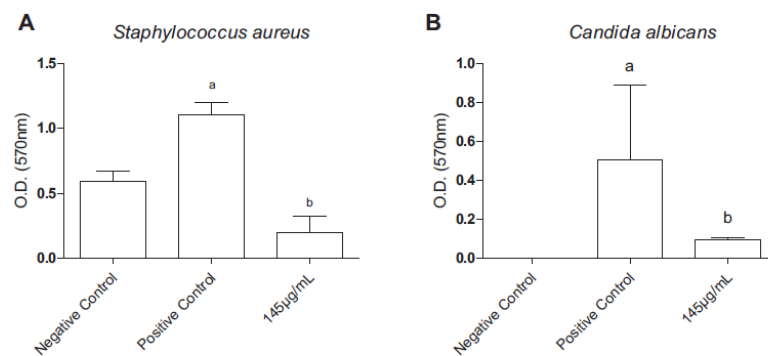


Fig 2. OD of the strains of *S aureus* and *C albicans* in biofilm compared with the tested concentration of chlorhexidine. (A) Statistical significant difference between the negative control and the positive control. (B) Statistically significant difference between the positive control and the corresponding concentration.

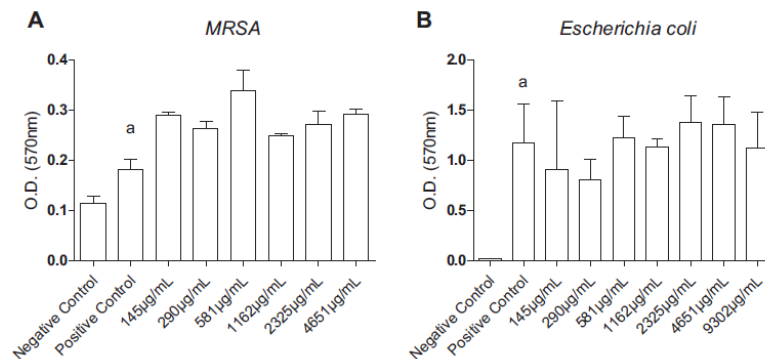


Fig 3. OD of the strains of MRSA and *E coli* in biofilm in relation to different concentrations of chlorhexidine tested. (A) Statistically significant difference between the negative control and the positive control. (B) Statistically significant difference between the positive control and the corresponding concentration.

Lamfon et al²⁰ reported that *C albicans* strains in biofilm are 8-fold more resistant to chlorhexidine compared with the same strains in planktonic form. In contrast, in the present study, biofilm formed by *C albicans* was destroyed at the same MIC as the planktonic form.

Chlorhexidine is known to have excellent activity against biofilm *S aureus*, with a reported 84% decrease in viability of formed biofilm.¹⁷ Our findings for biofilm *S aureus* are in agreement with those reported in the literature. We did not test other

concentrations of chlorhexidine for *C albicans* and *S aureus*, because the MIC showed good activity against the biofilms; thus, biofilm inhibitory concentration was not determined for these microorganisms.

The mechanism of action of the antibacterial chlorhexidine involves adsorption to the cell membrane by electrostatic interactions.²¹ Theoretically, chlorhexidine cannot act against microorganisms in biofilms, because it cannot transpose the molecules composing the film to reach the biofilm bacterial wall. Nonetheless,

our findings show that chlorhexidine is effective against biofilms of some microorganisms, but not others. Further studies are needed to analyze the composition of biofilms and the mechanism of penetration of chlorhexidine to the cell wall.

The challenges of treating persistent infections associated with biofilms is directly related to the films' compact structure, which hinders penetration of substances toxic to microbial cells, including antimicrobials and disinfectants, to reach the cells.⁶ In addition, many microorganisms acquire resistance to antiseptics and disinfectants and can adapt to changing environmental conditions.²² Thus, along with the mechanisms known to be involved in the resistance of biofilms to antibiotics—cell-cell signaling, genetic diversity, nutritional shortages—inappropriate continued use of chlorhexidine may be related to the results found for *E coli*, MRSA, *P aeruginosa*, and *A baumannii*.

Efforts to reduce the risk of nosocomial infections include appropriate programs for disinfecting surfaces, furniture, equipment, and physical areas, along with appropriate antiseptics of hands and use of gloves. The increased resistance of biofilms to disinfectants, including chlorhexidine, has hindered their elimination in hospital environments. The lack of success in eliminating these biofilms has become a major factor in outbreaks of infections and diseases related to contamination problems. Thus, future research should focus on identifying combinations of biocides to establish a synergistic mechanism of biofilm inhibition, along with other alternative approaches to containing these films, mainly in the medical and hospital environment, to minimize the negative effects on human health.

References

- Núñez L, Moretto J. Disinfectant-resistant bacteria in Buenos Aires City Hospital wastewater. *Braz J Microbiol* 2007;38:644–8.
- Vitalis GS. Use of nanoparticles as an alternative to chlorhexidine dressing (master's dissertation). Santa Maria, Brazil: Franciscan University Center of Santa Maria; 2012. Available from: http://sites.unifra.br/Portals/11/Disserta%C3%A7%C3%B5es/2012-2/GRACIELA%20SCHNEIDER%20VITALIS_UNIFRA.pdf. Accessed October 2012.
- Duarte RS, Lawrence MC, Fonseca LD, Lion SC, Amorim ED. Epidemic of post-surgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. *J Clin Microbiol* 2009;47:2149–55.
- Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Healthc Epidemiol* 2001;33:1387–92.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318–22.
- Hoiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PO, et al. The impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* 2011;3:55–65.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP, et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998;280:295–8.
- Silva RNP. The importance of *Acinetobacter baumannii* infection in acquired health care. Dissertation (Integrated Master Course in Medicine). University of Porto, 2009. Available from: <http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/21147/2/A%20Importancia%20do%20Acinetobacter%20baumannii%20na%20IACS%20cor.pdf>. Accessed November 2012.
- Swindell K. Parenteral lipid emulsion induces germination of *Candida albicans* and increases biofilm formation on medical catheter surfaces. *J Infect Dis* 2009;200:473–80.
- Hancock V, Ferrières L, Klemm P. Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol Lett* 2007;267:30–7.
- O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 1998;30:295–304.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 7th ed. CLSI document M7-A7. Wayne [PA]: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. 3rd ed. CLSI document M27-MA2. Wayne [PA]: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA. Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protoc Microbiol* 2005;Chapter 1:Unit 1B.1.
- Mah TC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001;9:34–9.
- Shen Y, Stojčić S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endodont* 2011;37:657–61.
- Totè K, Horemans T, Vanden Berghe D, Maes L, Cos P. Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:3135–42.
- Jass J, Lappin-Scott HM. The efficacy of antibiotics enhanced by electrical currents against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 1996;38:987–1000.
- Wroblewska MM, Sawicka-Grzelak A, Marchel H, Luczak M, Sivan A. Biofilm production by clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients in two tertiary care hospitals. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;53:140–4.
- Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in the constant depth film fermentor to chlorhexidine, miconazole and fluconazole: a longitudinal study. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:383–5.
- Zanatta FB, Rosing CK. Chlorhexidine's action mechanisms and recent evidence of its efficacy over supragingival biofilm context. *Sci-A* 2007;1:35–43. Available from: http://www.angelofreireendodontia.com.br/cms_wp/wp-content/uploads/2010/08/CHLORHEXIDINE-ACTION%E2%80%99S-MECHANISMS-AND-RECENT1.pdf. Accessed December 2012.
- Murtough SM, Hiom SJ, Palmer M, Russell AD. Biocide rotation in the healthcare setting: is there a case for policy implementation? *J Hosp Infect* 2001;8:1–6.

6 CONCLUSÕES

A partir dos objetivos e resultados deste estudo, pode-se concluir que:

- No ensaio de disco-difusão, a clorexidina mostrou-se efetiva contra todos os microrganismos testados em suas formas planctônicas;
- Através da técnica de microdiluição em caldo, a clorexidina foi capaz de inibir o crescimento dos microrganismos em concentrações ideais, evidenciando a eficácia e o alto rendimento deste composto;
- Como previamente relatado na literatura, todos os microrganismos estudados foram capazes de formar biofilme quando submetidos à técnica semi-quantitativa;
- A formação de biofilme de *C. albicans* e *S. aureus* não altera a suscetibilidade destes microrganismos frente à ação da clorexidina;
- *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, em biofilme, apresentaram maior resistência à clorexidina quando comparados às formas livres. Novos testes - com concentrações menores do composto - seriam necessários para determinar a concentração mínima capaz de destruir o biofilme formado por esses microrganismos;
- A clorexidina, nas concentrações testadas, não foi efetiva para inibir o crescimento microbiano de *E. coli* e MRSA.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A habilidade em desenvolver biofilmes está intimamente associada com a capacidade do microrganismo de causar infecções e, como tal, deve ser motivo de preocupação na comunidade científica. A compreensão de fatores genéticos e fisiológicos, associados à formação de biofilmes, contribui para a elucidação do potencial patogênico apresentada por estes microrganismos.

A presente dissertação concentrou-se no estudo da eficácia da clorexidina sobre biofilmes formados por estirpes causadoras de infecções graves e de grande relevância clínica. Pôde-se comprovar, através dos experimentos, que alguns dos microrganismos testados, quando em estrutura de biofilme, apresentaram, de fato, um comportamento diferente no que diz respeito à capacidade de resistir aos agentes biocidas.

Entretanto, ainda que os objetivos deste trabalho tenham sido alcançados, muitas questões não ficaram bem esclarecidas e outras surgiram. Este trabalho proporcionou apenas um entendimento preliminar sobre a biologia do biofilme, tornando-se, desta forma, imprescindível que estudos complementares sejam realizados, visando a um melhor entendimento sobre os mecanismos envolvidos na formação de biofilmes e na resistência a antimicrobianos atribuída a estas complexas estruturas.

Assim sugere-se, a curto e a longo prazo:

- Incorporar aos estudos de formação de biofilmes uma cepa padrão capaz de desenvolver estas películas, a fim de tornar os resultados ainda mais fidedignos, como por exemplo a *P. aeruginosa* PAO1;
- Expandir o estudo a outros biocidas e agentes antimicrobianos;
- Testar os biocidas em concentrações mais diversas - maiores ou menores - com a finalidade de obter as concentrações exatas capazes de destruir o biofilme;
- Caracterizar fenotipicamente os biofilmes através de testes de hidrofobicidade, autoagregação e coagregação a células;
- Avaliar a motilidade microbiana através de testes de motilidade e produção de *slime*;

- Identificar e avaliar as condições ambientais ideais de formação de biofilmes, como temperatura, pH, tempo de incubação e concentração de nutrientes;
- Quantificar os níveis de proteínas e SPE nos biofilmes formados;
- Avaliar a formação de biofilme em diferentes tipos de materiais;
- Analisar opticamente o biofilme - através da Microscopia Confocal e/ou Força Atômica - a fim de obter informações 3D da estrutura do biofilme;
- Pesquisar e avaliar, por PCR, a expressão de genes correlacionados com a formação e resistência de biofilmes;
- Sequenciar o produto de PCR das estirpes que apresentarem ou não estes genes, correlacionando as mutações verificadas com o padrão fenotípico de produção de biofilme;
- Pesquisar a presença de sistemas de efluxo - através de métodos fenotípicos e genotípicos - e correlacionar com a formação e resistência de biofilme;
- Avaliar a formação de biofilmes após a inibição das bombas de efluxo com Inibidores de Bomba de Efluxo (IBE);
- Verificar a suscetibilidade de isolados clínicos provenientes de materiais invasivos - como cateteres, por exemplo;
- Testar novas estratégias de controle de biofilmes baseada na combinação de antimicrobianos e biocidas.
- Determinar e comparar a influência do estresse oxidativo na formação de biofilmes entre estirpes resistentes e sensíveis aos fármacos testados;
- Avaliar a eficácia dos antimicrobianos e biocidas - frente aos biofilmes - na forma de fármaco livre e nanopartículas.

8 REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SINGH K. P.; JAIN, A. Medical significance and management of staphylococcal biofilm. **FEMS Immunology and Medical Microbiol.** v.58, p.147-160, 2010.

ARCHER, N. K. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. **Virulence.** v. 2, n. 5, p. 445-459, 2011.

BAMBACE, A. M. J. et al. Efficacy of chlorhexidine aqueous solutions to disinfect surfaces. **Revista de Biociências.** v. 9 n. 2 p. 73-81, 2003.

BARBOUR, M. et al. Synthesis, characterization, and efficacy of antimicrobial chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles for applications in biomedical materials and consumer products. **International Journal of Nanomedicine.** v. 8, p. 3507-3519, 2013.

BAUGH, S. et al. Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in impaired ability to form a biofilm. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 67, p. 2409-2417, 2012.

BEHLAU, I.; GILMORE, M. Microbial Biofilms in Ophthalmology and Infectious Disease. **Archives Ophthalmology.** v. 126, n. 11, p. 1572-1581, 2008.

BERNARDO S. P. C. **Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos e formação de biofilmes em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de água mineral.** 2009. Dissertação. (Pós-Graduação em Vigilância Sanitária). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

BHARDWAJ, A. K.; VINOTHKUMAR, K.; RAJPARA, N. Bacterial Quorum Sensing Inhibitors: Attractive Alternatives for Control of Infectious Pathogens Showing Multiple Drug Resistance. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery.** v. 8, p. 68-83, 2013.

BIERHALS, C. G. **Avaliação da capacidade de formação de biofilme por *Acinetobacter baumannii* e perfil transcricional de genes envolvidos nesse processo.** Dissertação. 2012. (Mestrado em Microbiologia Agrícola e Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

CAPITA, R. et al. Exposure to sub-lethal concentrations of food-grade biocides influences the ability to form biofilm, the resistance to antimicrobials and the ultrastructure of *Escherichia coli* ATCC 12806. **Applied Environment Microbiology.** p. 1-43, 2013.

CARDOSO, B. C. **Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis***. Dissertação. 2004. (Mestrado em Biotecnologia) Universidade do Minho, Braga, 2004.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**. v.75, p. 499-511, 2003.

CASEY, A. L. et al. Antimicrobial central venous catheters in adults: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infection Disease**. v. 8, p. 763-76, 2008.

CHA, J-O. et al. Investigation of Biofilm Formation and its Association with the Molecular and Clinical Characteristics of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Osong Public Health and Research Perspective**. v. 4, n. 5, p. 225-232, 2013.

CHAIIEB, K. et al. XTT assay for evaluating the effect of alcohols, hydrogen peroxide and benzalkonium chloride on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Microbial Pathogenesis**. v. 50, p. 1-5, 2010.

CHAN, Y. Y.; CHUA, K. L. The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB-OprB Efflux Pump: Expression and Impact on Quorum Sensing and Virulence. **Journal of Bacteriology**. v. 187, n.14, p. 4707-4719, 2005.

CHELLAPPA, S. T. et al. Motility of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to SOS-inducible biofilm formation. **Research in Microbiology**. v. 164, n. 10, p. 1019-27, 2013.

CHEN M.; YU, Q.; SUN, H. Novel Strategies for the Prevention and Treatment of Biofilm Related Infections. **International Journal of Molecular Science**. v. 14, p. 18488-18501, 2013.

CLOREXIDINA, Neobrax: **Relatório Técnico**. Disponível em: www.neobrax.com.br/download/clorexidina.pdf . Acesso em Junho de 2013.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial Biofilms. **Annual Review Microbiology**. v. 49, p. 711-45, 1995.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**. v. 284, p. 1318-1322, 1999.

D'AREZZO, S. et al. Epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* related to European clonal types I and II in Rome (Italy). **Clinical Microbiology and Infection**. v.15, n. 4, p. 347-357, 2009.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. . **American Society for Microbiology**. v.64, n.4, p. 847-867, 2000.

DAVIES, D. G. et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**. v. 280, p. 295-257, 1998.

DENG, Y. et al. Cis-2-dodecenoic acid signal modulates virulence of *Pseudomonas aeruginosa* through interference with quorum sensing systems and T3SS. **BMC Microbiology**. v. 13, p. 1-11, 2013.

DONLAN, R. M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. **Healthcare Epidemiology**. v. 33, p.1387-1392, 2001.

DORNELLES-MORGENTAL, D. R. et al. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**. v. 112, p. 396-400, 2011.

DUTTA, D.; COLE, N.; WILLCOX, M. Factors influencing bacterial adhesion to contact lenses. **Molecular Vision**. v. 18, p. 14-21, 2012.

EMODY, L.; KERENYI, M.; NAGY, G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 22, p. 29-33, 2003.

FIGUEIREDO, E. A. P. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Frequency of Resistance to Multiple Drugs and Cross-Resistance between Antimicrobials in Recife/PE. **RBTL**. v. 19, n. 4, p. 421-427, 2007.

FINE, D. Advancing oral health through industry/academic partnerships. **UMDNJ-New Jersey Dental School**. v. 6, p. 7-8, 2005.

FLEMMING, H-C. The perfect slime. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 86, p. 251-259, 2011.

FLEMMING, H-C.; WINGENDER, J. Extracellular polymeric substances (EPS): the biofilme construction material. **Water Science Technology**. v. 43, n. 6, p. 1-8, 2001.

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

FREITAS, V. R.; SAND, S. T. V. D.; SIMONETTI, A. B. Formação in vitro de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação. **Revista de Odontologia UNESP**. v. 39, n. 4, p. 193-200, 2010.

GARNETT J. A; MATTHEWS S. Interactions in Bacterial Biofilm Development: A Structural Perspective. **Current Protein and Peptide Science**. v. 13, p.739-755, 2012.

HANCOCK, V.; FERRIE` RES, L.; KLEMM, P. Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains. **FEMS Microbiology Letters**. v. 267, p. 30-37, 2007.

HOEFLER, R. et al. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. **Boletim de Farmacoterapêutica**. n.4, 2006. Disponível em: <http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/13/farmacoterapeutica.pdf>. Acesso em 15 de outubro de 2013.

HOIBY, N. et al. The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Science**. v.3, p. 55-65, 2011.

JIANG, T.; LI, M. Quorum sensing inhibitors: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. v. 23, n. 7, p. 867-94, 2013.

KALIA, V. C. Quorum sensing inhibitors: An overview. **Biotechnology Advances**. v. 31, p. 224-245, 2013.

KARPANEN, T. J. et al. Human Skin and Aqueous Solutions within Excised. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n.4, p. 1717-1719, 2009.

KARPANEN, T. J. et al. Antimicrobial activity of a chlorhexidine intravascular catheter site gel dressing. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 66, n. 8, p. 1777-1784, 2011.

KASNOWSKI, M. C. et al. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. n. 15, 2010.

KIM, H-S.; PARK, H-D. Ginger Extract Inhibits Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. **Plos One**. v. 8, n. 9, p. 1-16, 2013.

KOKARE, C. R. et al. Biofilm: Importance and applications. **Indian Journal of Biotechnology**. v. 8, p. 159-168, 2009.

KONG, K-F.; VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 196, p. 133-139, 2013.

KOUIDHI. B.; ZMANTAR, T.; HENTATI, H.; BAKHROUF, A. Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries. **Microbial Pathogenesis**. v. 49, p.14-22, 2010.

KOURTESI, C. et al. Microbial Efflux Systems and Inhibitors: Approaches to Drug Discovery and the Challenge of Clinical Implementation. **The Open Microbiology Journal**. v. 7, p. 34-52, 2013.

KVIST, M.; HANCOCK, V.; KLEMM, P. Inactivation of Efflux Pumps Abolishes Bacterial Biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, n. 23, p. 7376-7382, 2008.

LEE, J-H. et al. Diverse plant extracts and trans-resveratrol inhibit biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* O157:H7. **Biofouling**. v. 29, n. 10, p. 1189-1203, 2013.

LIAO, J. et al. The MerR-Like Regulator BrlR Confers Biofilm Tolerance by Activating Multidrug Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Journal of Bacteriology**. v. 195, n 15, p. 3352-3363, 2013.

LIU, J. et al. Effect of Sodium Fluoride, Ampicillin, and Chlorhexidine on *Streptococcus mutans* Biofilm Detachment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 56, n. 8, p. 4532-4535, 2012.

LUNGREN. M. P. et al. Bacteriophage K for reduction of *Staphylococcus aureus* biofilm on central venous catheter material. **Bacteriophage**. v. 3, n.4, p. e26825-1- e26825-3, 2013.

MACHADO, S. M. O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis**. 2005. Dissertação. (Mestrado em Tecnologia do Ambiente). Universidade do Minho, Braga, 2005.

MAKI, D. G.; RINGER, M.; ALVARADO, C. J. Prospective randomized trial of povidone-iodine, alcohol, and chlorhexidine for prevention of infection associated with central venous and arterial catheters. **The Lancet**. v. 338, p. 339-43, 1991.

MARCINKIEWICZ, J.; STRUS M.; PASICH, E. Antibiotic resistance: a “dark side” of biofilm-associated chronic infections. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**. v. 123, n. 6, p. 309-312, 2013.

MARTINEZ-GUTIERREZ, F. et al. Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. **Biofouling**. v. 29, n. 6, p. 651-60, 2013.

MC CAY, P. H.; OCAMPO-SOSA, A. A.; FLEMING, G. T. A. Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture. **Microbiology**. v. 156, p. 30-38, 2010.

MENEGOTTO, F. R.; PICOLI, S. U. Resistent oxacilin *Staphylococcus aureus* (MRSA): incidence of cepas acquired in the community (CA-MRSA) and importance of research and descolonization in hospital. **RBAC**. v. 39, n. 2, p. 147-150, 2007.

MILLEZI, A. F. **Ação de óleos essenciais sobre biofilmes formados por estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. 2012. Tese. (Pós-graduação em Microbiologia de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MULCAHY, L. R.; ISABELLA, V. M.; LEWIS, K. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. **Microbial Ecology**, 2013.

MURTOUGH, S. M. et al. Biocide rotation in the healthcare setting: is there a case for policy implementation? **Journal of Hospital Infection**. v. 8, p. 1-6, 2001.

NUÑEZ, L.; MORETTON, J. Disinfectant-resistant bacteria in Buenos Aires city hospital wastewater. **Brazilian Journal of Microbiol.** v. 38, n. 38, p. 644-648, 2007.

O'TOOLE, G.A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**. v. 30, n. 2, p. 295-304, 1998.

OJHA, A. H. et al. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. **Molecular Microbiology**. v. 69, n. 1, p. 164-174, 2008.

OLIVARES, J. et al. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**. v. 4, n.103, p. 1-15, 2013.

OLIVEIRA, K. R. **Análise da formação de biofilmes em cateteres: métodos de identificação e controle**. 2011. Monografia. (Pós-graduação em Análises Clínicas e Gestão de Laboratório) - Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, 2011.

ORDINOLA-ZAPATA, R. et al. Antimicrobial Activity of Triantibiotic Paste, 2% Chlorhexidine Gel, and Calcium Hydroxide on an Intraoral-infected Dentin Biofilm Model. **Antimicrobial Activity of Intracanal Medications**. v. 39, n. 1, p. 115-118, 2013.

OTTO, M. *Staphylococcal* Biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 322, p. 207-228, 2008.

PALOMBO E. A. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Product with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. p. 1-15, 2011.

PARSONS, G. J. et al. Uptake and release of chlorhexidine by bovine pulp and dentin specimens and their subsequent acquisition of antibacterial properties. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**. v. 49, p. 455-459, 1980.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, C. Evaluation of the efficacy of disinfection procedures against *Burkholderia cenocepacia* in biofilms. **Journal Hospital Infection**. v.70, n. 4 p. 361-368, 2008.

PERIASAMY, S. et al. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. **PNAS**. v.109, n.4, p. 1281-1286, 2012.

PIVA, E. et al. Interação entre *Escherichia coli* e *Candida albicans* em biofilmes formados in vitro: análise da viabilidade celular por método colorimétrico. **Revista de Odontologia UNESP**. v. 40, n. 5, p. 222-227, 2011.

PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular Microbiology**. v. 30, n. 8, p. 285-293, 1998.

PRATT, R. J. et al. epic2: National evidence-based guidelines for preventing healthcare-associated infections in NHS hospitals in England. **Journal Hospital Infection**; v. 65, n. 1, p. 61-64, 2007.

PUBCHEM. **Pubchem substance database**. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em junho de 2013.

QUISHIDA, C. C. C. et al. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. **Lasers Medical Science**, 2013.

RAMAGE, G. et al. *Candida* Biofilms: an Update. **Eukaryotic Cell**. v. 4, n. 4, p. 633-638, 2005.

RENNER, L. D.; WEIBEL, D. B. Physicochemical regulation of biofilm formation. **MRS Bulletin**. v. 36, n. 5, p. 347-355, 2011.

RINGEL, A. M. et al. *In vitro* evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. **Journal of Endodontics**. v. 8, p. 200-204, 1982.

SANCHEZ, C. J. J. et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. **BMC Infectious Diseases**. v. 13, n. 47, p. 1-12, 2013.

SHAPUR, N. K. et al. Sustained Release Varnish Containing Chlorhexidine for Prevention of Biofilm Formation on Urinary Catheter Surface: In Vitro Study. **Journal of Endourology**. v. 26, n. 1, p. 26-31, 2012.

SHARMA, G. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. **Biologicals**. v. 13, p. 1045-1056, 2013.

SHEN, Y. et al. Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine against Bacteria in Biofilms at Different Stages of Development. **Journal of Endodontics**. v. 37, n. 5, p. 657-661, 2011.

SILVA, R. N. P. **A Importância do *Acinetobacter baumannii* na Infecção Adquirida nos Cuidados de Saúde**. 2009. Dissertação. (Mestrado Integrado em Medicina) - Universidade do Porto, Porto, 2009.

SINGH, P. K. et al. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. **Nature**. v. 407, p. 762-764, 2000.

SISTI, F. et al. Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. **Microbiology**. v. 159, p. 869-879, 2013.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**. v. 4, n. 3, p. 223-229, 2013.

STEWART, P. S.; COSTERTON J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**. v. 358, n. 14, p. 135-138, 2001.

SUPPIGER, A. et al. Two quorum sensing systems control biofilm formation and virulence in members of the *Burkholderia cepacia* complex. **Virulence**. v. 4, n. 5, p. 400-409, 2013.

SWINDELL, K. Parenteral Lipid Emulsion Induces Germination of *Candida albicans* and Increases Biofilm Formation on Medical Catheter Surfaces. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 200, p. 473-80, 2009.

TIELEN, P. et al. Alginate acetylation influences initial surface colonization by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiological Research**. v. 160, p.165-176, 2005.

TOBUDIC, S. et al. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilm. **Mycoses**. v. 55, p. 199-204, 2012.

TODHANAKASEM, T.; YOUNG, G. M. Loss of Flagellum-Based Motility by *Listeria monocytogenes* Results in Formation of Hyperbiofilms. **Journal of Bacteriology**. v. 190, n. 17, p. 6030-6034, 2008.

VASCONCELLOS, M. F. **Padrão de adesão agregativa e formação de biofilme em *Escherichia coli* enteroagregativa típica e atípica: papel da proteína Shf**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

VERSTRAETEN, N. et al. Living on a surface: swarming and biofilm formation. **Trends in Microbiology**. v.16, n.10, p. 496-506, 2008.

VITALIS, G. S. **Utilização de nanopartículas de clorexidina como alternativa de medicação intracanal**. 2012. Dissertação. (Mestrado em Nanociências) – Centro Universitário Franciscano de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, City of Microbes. **Journal of Bacteriology**. v. 182, n. 10, p. 2675-2679, 2000.

WROBLEWSKA, M. M. et al., Biofilm production by clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients hospitalized in two tertiary care hospitals. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 53, p. 140-144, 2008.

YAMAGUCHI, M. et al., *Porphyromonas gingivalis* biofilms persist after chlorhexidine treatment. **European Journal of Oral Science**. v.121, p. 162-168, 2013.

YU, Q. et al. In vitro activity of verapamil alone and in combination with fluconazole or tunicamycin against *Candida albicans* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 41, p. 179-182, 2013.

ZAVADINACK, M. N. et al. *Staphylococcus aureus*: incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária. **Acta Scientiarum**. v. 23, n. 3, p. 709-712, 2001.

ZELICHENKO, G. et al. Prevention of Initial Biofilm Formation on Ureteral Stents Using a Sustained Releasing Varnish Containing Chlorhexidine: In Vitro Study. **Journal of Endourology**. v. 27, n. 3, p. 333-337, 2013.

ZHANG, L.; MAH, T-F. Involvement of a Novel Efflux System in Biofilm-Specific Resistance to Antibiotics. **Journal of Bacteriology**. v. 190, n. 13, p. 4447-4452, 2008.

ZHANG, T. Modeling of Biocide Action Against Biofilm. **Bulletin of Mathematical Biology**. v. 74, n. 6, p. 1427-1447, 2012.

ZHOU, G. et al. Effects of nutritional and environmental conditions on planktonic growth and biofilm formation of *Citrobacter werkmanii* BF-6. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 23, n. 12, p. 1673-82, 2013.

ANEXOS

ANEXO A – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Pesquisa de compostos que atuam sobre biofilmes microbianos

Pesquisador: MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 12114713.1.0000.5346

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 203.802

Data da Relatoria: 19/02/2013

Apresentação do Projeto:

A deposição de microrganismos em determinadas superfícies e a conseqüente formação de biofilmes são fenômenos que ocorrem naturalmente, mas, também, são estratégias desenvolvidas pelos microrganismos para se protegerem de fatores agressivos externos. Os microrganismos, quando em biofilme, tornam-se alvo de preocupação na área clínica devido à baixa resposta aos tratamentos antimicrobianos e à facilidade de colonização de superfícies como próteses, cateteres e instrumentos cirúrgicos. Vários estudos demonstram que antimicrobianos e biocidas têm sua eficácia diminuída frente à biofilmes. Deste modo, este trabalho tem como objetivo principal avaliar a capacidade de inibição da formação de biofilmes de isolados clínicos de cateteres, frente a novos compostos sintetizados e a biocidas frequentemente utilizados no ambiente hospitalar. Para avaliar o grau de inibição da formação do biofilme serão utilizadas microplacas e através da leitura das absorbâncias será possível verificar a atividade dos compostos.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Avaliar a atividade de novos compostos sintetizados e biocidas sobre biofilmes microbianos.

Específicos:

- Determinar, através de disco-difusão, a atividade antimicrobiana dos compostos frente aos microrganismos testados;
- Verificar, através da técnica de microdiluição, as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) dos compostos frente a diferentes microrganismos;

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar

Bairro: Cidade Universitária - Camobi **CEP:** 97.105-900

UF: RS **Município:** SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E**



- Determinar, através do ensaio de microtitulação em placa, a Concentração Mínima de Inibição de Biofilme (CMIB);
- Determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracional (FICI) de associações de desinfetantes frente aos biofilmes microbianos;
- Determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracional (FICI) de associações de sulfametoxazol com metais e trimetopim frente aos biofilmes microbianos;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa não trará risco de ordem física ou psicológica, nem benefícios diretos ao paciente, pois estes não serão envolvidos diretamente na pesquisa. Os testes in vitro serão realizados com material já coletado e processado não havendo intervenção dos pesquisadores na coleta e diagnóstico do paciente. Os prontuários também não serão consultados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa será conduzida por pesquisadores com experiência na área. Os resultados esperados terão importância prática e científica. A justificativa é contundente e a revisão bibliográfica adequada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores solicitaram a dispensa do TCLE, já que os pacientes não serão abordados. Além disso, os prontuários também não serão consultados.

Para os ensaios, será utilizada amostra de conveniência de cerca de 120 isolados clínicos de cateteres coletados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria (LAC-HUSM) no período de 12 meses.

Projeto aprovado pela DEPE.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Como o material utilizado será coletado e processado sem que haja intervenção dos pesquisadores na coleta e diagnóstico do paciente, o projeto não precisaria de aprovação deste Comitê.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar

Bairro: Cidade Universitária - Camobi

CEP: 97.105-900

UF: RS

Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



SANTA MARIA, 23 de Fevereiro de 2013

Assinador por:
Félix Alexandre Antunes Soares
(Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar

Bairro: Cidade Universitária - Camobi **CEP:** 97.105-900

UF: RS **Município:** SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com

ANEXO B – Autorização da revista *American Journal of Infection Control (AJIC)* para anexação do artigo nesta dissertação.

02/12/13

Rightslink Printable License

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Dec 02, 2013

This is a License Agreement between Pauline Bonez ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Pauline Bonez
Customer address	Av Roraima nº 1000 Santa Maria, RS 98300-000
License number	3280840008013
License date	Dec 02, 2013
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	American Journal of Infection Control
Licensed content title	Chlorhexidine activity against bacterial biofilms
Licensed content author	Pauline Cordenonsi Bonez, Camilla Filippi dos Santos Alves, Tanise Vendruscolo Dalmolin, Vanessa Albertina Agertt, Caren Rigon Mizdal, Vanessa da Costa Flores, Jaciane Baggiotto Marques, Roberto Christ Vianna Santos, Marli Matiko Anraku de Campos
Licensed content date	December 2013
Licensed content volume number	41
Licensed content issue number	12
Number of pages	4
Start Page	e119
End Page	e122
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Title of your thesis/dissertation	Atividade da clorexidina sobre biofilmes microbianos

02/12/13

Rightslink Printable License

Expected completion date	Feb 2014
Estimated size (number of pages)	50
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD
VAT/Local Sales Tax	0.00 USD / 0.00 GBP
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com)

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have

disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article. If this license is to re-use 1 or 2 figures then permission is granted for non-exclusive world rights in all languages.

16. **Website:** The following terms and conditions apply to electronic reserve and author websites:

Electronic reserve: If licensed material is to be posted to website, the web site is to be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course if

This license was made in connection with a course,

This permission is granted for 1 year only. You may obtain a license for future website posting.

All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image,

A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com> , and

Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

17. **Author website** for journals with the following additional clauses:

All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image, and the permission granted is limited to the personal version of your paper. You are not allowed to download and post the published electronic version of your article (whether PDF or HTML, proof or final version), nor may you scan the printed edition to create an electronic version.

A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> . As part of our normal production process, you will receive an e-mail notice when your article appears on Elsevier's online service ScienceDirect (www.sciencedirect.com). That e-mail will include the article's Digital Object Identifier (DOI). This number provides the electronic link to the published article and should be included in the posting of your personal version. We ask that you wait until you receive this e-mail and have the DOI to do any posting.

Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

18. **Author website** for books with the following additional clauses:

Authors are permitted to place a brief summary of their work online only.

A hyper-text must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com> . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version.

Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

19. **Website** (regular and for author): A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or for books to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>

20. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis

02/12/13

Rightslink Printable License

be published commercially, please reapply for permission.

21. Other Conditions:

v1.6

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK501172100. Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

**Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006**

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Resumos Publicados em Congressos.

BONEZ, P. C.; MARQUES, J. B.; ALVES, C. F. S.; MIZDAL, C. R.; ROSSI, G. G.; FORNO, N. L. D.; SANTOS, V. C. R.; CAMPOS, M. M. A. Atividade da Clorexidina sobre biofilme de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 29 de setembro a 3 de outubro de 2013, Natal-RN.

FLORES, V. C.; **BONEZ, P.C.**; ALVES, C.F.S.; SIQUEIRA, F. S.; ROSSI, G. G.; DALMOLIN, T.V.; BIANCHINI, B.V.; MIZDAL, C.R.; CAMPOS, M.M.A; SANTOS, R.C.V. Avaliação do efeito da Clorexidina sobre biofilme de *Eschericia Coli*. III Congresso Latino Americano de Resistência Microbiana e X Sul Encontro de Controle de Infecção, 8 a 11 de maio de 2013, Gramado-RS.

SIQUEIRA, F. S.; FLORES, V. C.; **BONEZ, P.C.**; ROSSI, G. G.; MIZDAL, C.R.; DALMOLIN, T.V.; BIANCHINI, B.V.; ALVES, C.F.S.; CAMPOS, M.M.A; SANTOS, R.C.V. Atividade da Clorexidina sobre biofilme de *Staphylococcus aureus*. III Congresso Latino Americano de Resistência Microbiana e X Sul Encontro de Controle de Infecção, 8 a 11 de maio de 2013, Gramado-RS.

BIANCHINI, B.V.; DALMOLIN, T.V.; SIQUEIRA, F. S.; ROSSI, G. G.; FLORES, V. C.; **BONEZ, P.C.**; MIZDAL, C.R.; ALVES, C.F.S.; CAMPOS, M.M.A.; SANTOS, R.C.V. Efetividade da Clorexidina sobre biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. III Congresso Latino Americano de Resistência Microbiana e X Sul Encontro de Controle de Infecção, 8 a 11 de maio de 2013, Gramado-RS.

MARQUES, J.B.; **BONEZ, P.C.**; AGERTT, V.A.; FLORES, V. C.; BIANCHINI, B.V.; MIZDAL, C.R.; CAMPOS, M.M.A.; SANTOS, R.C.V. Atividade da clorexidina sobre biofilme de *Acinetobacter baumannii*. XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 28 de outubro a 1º de novembro de 2012, Santos-SP.

CAMPOS, M.M.A.; **BONEZ, P.C.**; FLORES, V. C.; AGERTT, V.A.; MARQUES, J.B.; BIANCHINI, B.V.; DALMOLIN, T.V.; SANTOS, R.C.V. Atividade da clorexidina sobre biofilme de *Candida albicans*. XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 28 de outubro a 1º de novembro de 2012, Santos-SP.