

## **AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SUBSTRATOS PARA A FORMAÇÃO DE BIOFILMES *IN VITRO* DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*<sup>1</sup>**

### *EVALUATION OF DIFFERENT SUBSTRATES FOR IN VITRO BIOFILM FORMATION BY PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

**Priscilla Maciel Quatrin<sup>2</sup>, Vanessa Mozzaquatro Comim<sup>2</sup>, Leonardo Quintana Soares Lopes<sup>2</sup>, André Gündel<sup>3</sup>, Rodrigo de Almeida Vaucher<sup>4</sup> e Roberto Christ Vianna Santos<sup>5</sup>**

#### **RESUMO**

O bacilo Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa* está relacionado às diversas causas de infecções devido à colonização de dispositivos médicos e a consequente formação de biofilme, ocasionando nestes casos, importantes complicações clínicas e elevados custos associados ao manejo dos pacientes. Neste trabalho se teve como objetivo a avaliação da formação de biofilme de *P. aeruginosa* em placas de Metal (Liga de Ferro), Alumínio, Acrílico, Vidro, Politereftalato de Etileno (PET), Polietileno de Alta Densidade (PEAD) e Politetrafluoretileno (Teflon®). Após a formação de biofilme por 10 dias, o mesmo foi revelado pela técnica de cristal violeta, além da visualização por microscopia de força atômica. Em todos os substratos utilizados ocorreu a formação de biofilmes. Os maiores crescimentos foram associados ao Teflon® e Metal, seguido de Acrílico, PEAD, PET, Alumínio e Vidro.

**Palavras-chave:** dispositivos médicos, microscopia de força atômica, PA01.

#### **ABSTRACT**

*The Gram-negative bacillus Pseudomonas aeruginosa is related to many causes of infection due to the colonization of medical devices and the subsequent biofilm formation, resulting in clinical complications and high costs of patient care. The aim of this study was to evaluate P. aeruginosa biofilm formation on a surface of Metal Plates (Iron Alloy), Aluminium, Acrylic, Glass, Polyethylene Terephthalate (PET), High Density Polyethylene (HDPE), and Polytetrafluoroethylene (Teflon®). After 10 days of biofilm formation, it was revealed by the crystal violet stain method, and the visualization by atomic force microscopy. Biofilm formation happened in all of the substrates analyzed. The highest growth rates were associated with Teflon® and Metal, followed by Acrylic, HDPE, PET, Aluminium and Glass.*

**Keywords:** medical devices, atomic force microscopy, PA01.

<sup>1</sup> Trabalho Final de Graduação - TFG.

<sup>2</sup> Acadêmicos do Curso de Biomedicina - Centro Universitário Franciscano.

<sup>3</sup> Colaborador - Unipampa Campus Bagé.

<sup>4</sup> Colaborador - Centro Universitário Franciscano.

<sup>5</sup> Orientador. Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano. E-mail: robertochrist@gmail.com

## INTRODUÇÃO

A formação do biofilme é caracterizada pela presença de comunidades microbianas aderidas aos substratos bióticos ou abióticos, constituídas por uma estrutura densa e complexa, envoltas por uma matriz extracelular. Esta matriz consiste principalmente de macromoléculas, incluindo polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos e protege as células microbianas do biofilme contra agressões externas além de atuar como barreira para a penetração de agentes antimicrobianos (BRANDA et al., 2005). Os mecanismos que diferentes microrganismos utilizam para formação de biofilmes variam, frequentemente dependendo das condições ambientais e de atributos específicos de formação. As infecções crônicas como endocardite, otite média, pneumonia, fibrose cística e infecções associadas à biomateriais implantados, muitas vezes, estão relacionados com a formação de biofilme (COSTERTON, 1999).

Estima-se que 10 a 30% dos cateteres urinários estão associados à infecções e formação de biofilmes e o mesmo ocorre em 5 a 10% dos materiais de fixação de fraturas ósseas, além de 3 a 8% dos cateteres venosos centrais, 1 a 7% dos marca-passos, enxertos vasculares, próteses articulares e válvulas cardíacas mecânicas (DONELLI, 2006; VIALE; STEFANI, 2006; OPILLA, 2008). Os biofilmes associados as infecções urinárias e cateteres representam altos custos hospitalares, além de altas taxas de morte (ANDERSON, 2003; FINE, 2005).

A *P. aeruginosa* é um patógeno associado a diversas infecções nosocomiais, do trato respiratório e urinário, em queimaduras, feridas, olhos, dentre outras (GALES; SADER; JONES, 2002; BRANSKI et al., 2009; CHI et al., 2009; DRAGO, 2009). Tem como característica importante sua capacidade de adesão e propagação sobre dispositivos médicos como cateter, lentes de contato e próteses, resultando em muitos casos na formação de biofilmes (BRANSKI et al., 2009; DIEC et al., 2009). Atualmente é um dos principais patógenos responsáveis por infecções respiratórias agudas em pacientes portadores de ventilação mecânica ou imunocomprometidos, além de infecções crônicas, como a fibrose cística. Entre os anos de 1975 e 2003, observou-se um aumento de 9,6% para 18,1% das infecções hospitalares por este microrganismo, tornando-se a causa mais comum de infecções respiratórias agudas (GAYNES; EDWARDS, 2005).

As taxas de mortalidade por pneumonia associada ao uso de ventilação mecânica aumentaram de 42,1% para 87%, em infecções por *P. aeruginosa* (FUJITANI et al., 2011). Este microrganismo também está associado a mais de 80% da morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística. A capacidade deste microrganismo em se aderir e formar biofilmes é de extrema relevância para explicar estas altas prevalências (RAJAN; SAIMAN, 2002). Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de formação de biofilme pela cepa de *P. aeruginosa* (PA01) em diferen-

tes materiais, como placas de Metal (Liga de ferro), Alumínio, Acrílico, Vidro, PET, PEAD e Teflon®, por quantificação espectrofotométrica (coloração de cristal violeta) e Microscopia de Força Atômica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ESTIRPE BACTERIANA E CONDIÇÕES DE CULTURA

A cepa de *P. aeruginosa* PA01, foi gentilmente cedida pela Professora Barbara Iglewski, Universidade de Rochester – Estados Unidos da América. O microrganismo foi cultivado em ágar Mueller-Hinton e armazenada em estufa à 37°C por 24 horas, para posterior confecção dos inóculos na escala de 1 de McFarland.

### SUBSTRATOS

Foram utilizados como substratos para adesão do biofilme placas de Metal (Gerdau®), Alumínio (Alcoa®), Acrílico (Braskem®), Vidro (Perfecta®), PET (Braskem®), PEAD (Braskem®) e Teflon® (Dupont®). Os materiais foram previamente esterilizados. Para isto, as placas de Metal e Alumínio foram autoclavadas e as demais foram submetidas à solução de ácido peracético 10% (Peresal®).

### FORMAÇÃO DO BIOFILME

Em placas de petri de vidro (9 cm de diâmetro), foram adicionados os substratos previamente esterilizados juntamente com 3 mL de caldo *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) e 1 mL da suspensão bacteriana (escala de 1 de McFarland. As placas foram armazenadas em estufa à 37°C por 10 dias com substituição diária do meio de cultura (BHI). Para cada grupo experimental foi realizado o seu respectivo grupo controle negativo de formação de biofilme, onde os substratos foram incubados somente com o BHI (sem microrganismos). Para cada placa, foram adicionados 3 pedaços de substratos realizando o teste em triplicata.

### REVELAÇÃO DO BIOFILME – CRISTAL VIOLETA

Para a revelação do biofilme, foi utilizado o método proposto por Gwendolyn et al. (2009) com algumas modificações. Os resultados dos grupos experimentais foram obtidos após a formação do biofilme por 10 dias, as placas dos diferentes substratos foram retiradas e lavadas em

água corrente destilada por 30 segundos. Os substratos foram adicionados em placas de poliestireno de 6 poços (um substrato/poço) e secas em estufa a 60°C durante 5 minutos, em seguida, foram coradas com cristal violeta 1% durante 15 minutos. Os substratos foram lavados com água corrente destilada por 30 segundos e secos novamente em estufa a 60°C durante 5 minutos. Posteriormente, os substratos foram passados para nova placa de 6 poços (um substrato/poço) com adição de 3 mL de etanol absoluto para que o cristal violeta fosse dissolvido. Para evitar a evaporação, as placas foram seladas com *Parafilm*<sup>®</sup> e uma camada externa de plástico filme, e deixadas em temperatura ambiente durante 48 horas para a dissolução completa do cristal violeta retido pelo biofilme. A densidade óptica (OD) nos poços foi determinada espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 570 nm. Tendo em vista que os substratos apresentam uma discreta diferença de tamanho, se fez necessário padronizar a mesma área para todos os materiais, pois haveria maior área disponível para a fixação do biofilme em alguns substratos. Para tanto, foi dividido o valor de absorbância obtido pela área total do substrato (em mm<sup>2</sup>), sendo desenvolvida uma unidade: Unidade de Absorbância/mm<sup>2</sup>.

## MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Para visualização do biofilme por MFA, os substratos foram fixados com Metanol Absoluto durante 1 minuto. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio Agilent Technologies 5500. As imagens (5 µm × 5 µm e 1 µm × 1 µm) foram coletadas em modo não-contato usando pontas PPP-NCL (Nanosensors, constante de força = 48 N/m). As imagens foram analisadas usando o *software* PicoView.

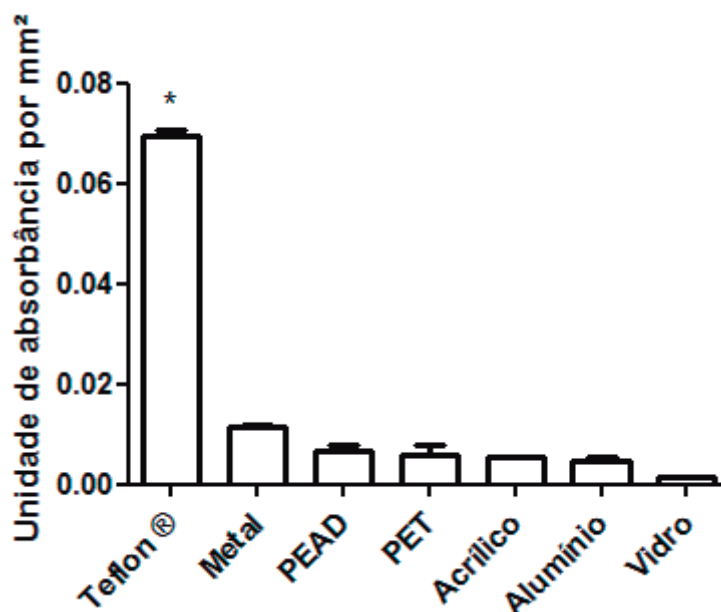
## ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento de revelação com cristal violeta foi preparado e realizado em triplicata (n = 3). Os resultados estão expressos em média ± DP (Desvio Padrão). A análise estatística dos dados foi realizado utilizando a análise de variância simples (ANOVA) seguido de teste Tukey com intervalo de confiança de 99,9% (p < 0,001).

## RESULTADOS

No presente trabalho, foi analisada a formação de biofilmes em diferentes substratos testados, sendo Teflon<sup>®</sup> o que demonstrou maior adesão microbiana, seguido de Metal, Acrílico, PEAD, PET, Alumínio e Vidro, como pode ser visualizado na figura 1.

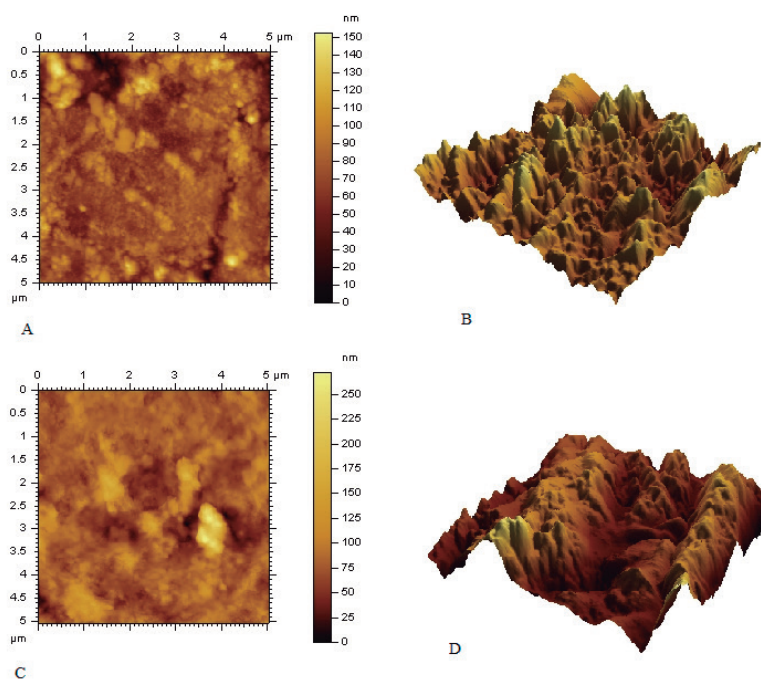
**Figura 1** - Quantificação da formação de biofilmes nos diferentes substratos, revelados pela coloração com cristal violeta, sendo que o aumento da absorbância reflete em uma maior formação de biofilme.



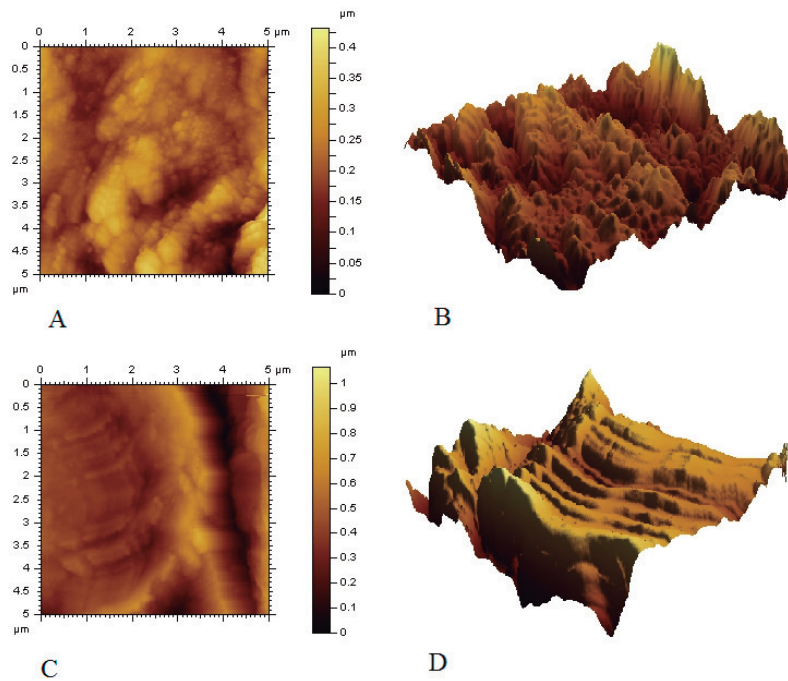
\*Valor estatisticamente diferente para  $p < 0,001$ .

Para a visualização das estruturas formadas, os substratos foram submetidos à Microscopia de Força Atômica, como apresentam as figuras 2 a 8. Quando analisadas as imagens de MFA, verifica-se a presença de agregados microbianos sugestivos de biofilmes (A e B), quando comparados com o seus respectivos controles negativos (C e D) em todos os substratos analisados.

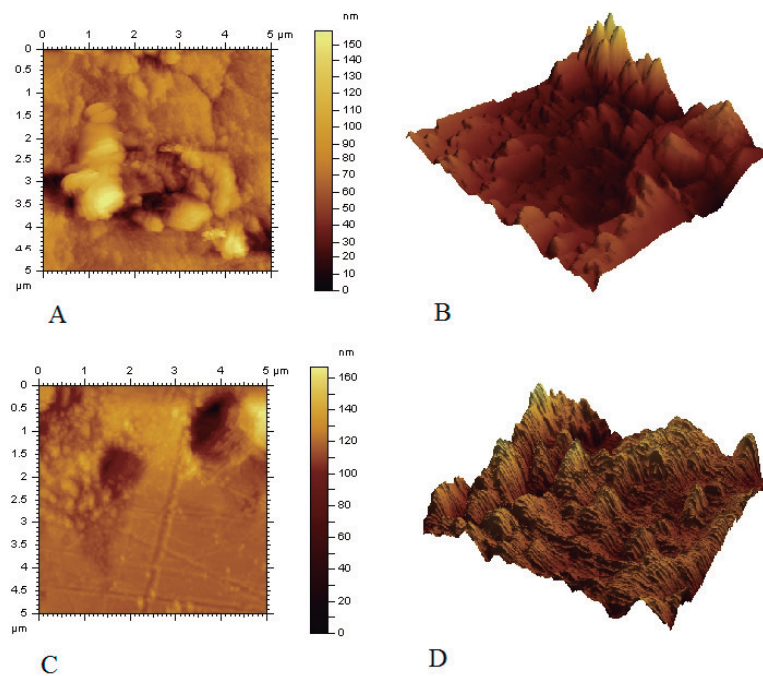
**Figura 2** - Análise da superfície do Metal obtidas através de MFA comparando a presença de biofilme, pela adesão e proliferação microbiana de *P. aeruginosa* PA01 (A e B), com seus respectivos controles negativos, sem a presença de microrganismos (C e D).



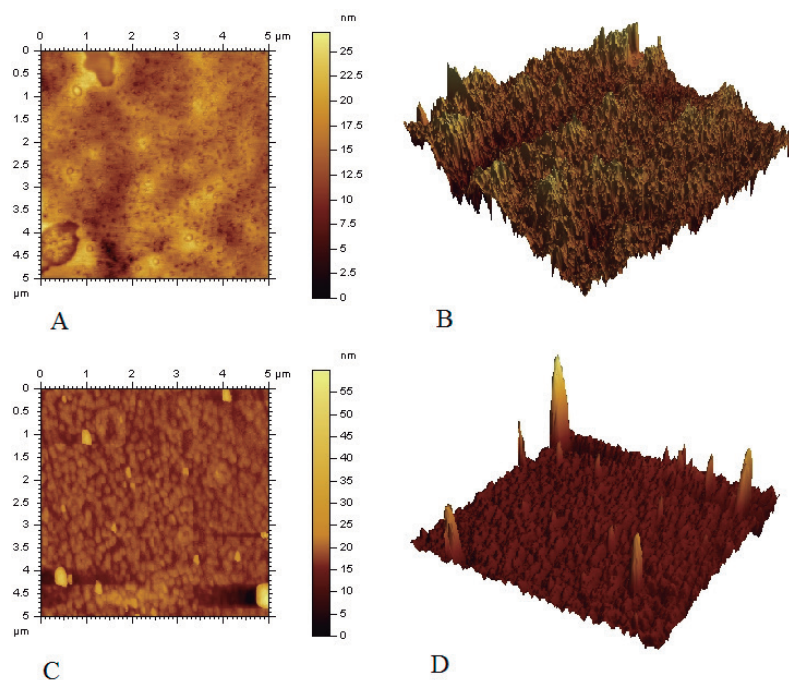
**Figura 3** - Análise da superfície do Alumínio. Imagens obtidas através de MFA comparando a presença de biofilme pela adesão e proliferação microbiana de *P. aeruginosa* PA01 (A e B), com seus respectivos controles negativos, sem a presença de microrganismos (C e D).



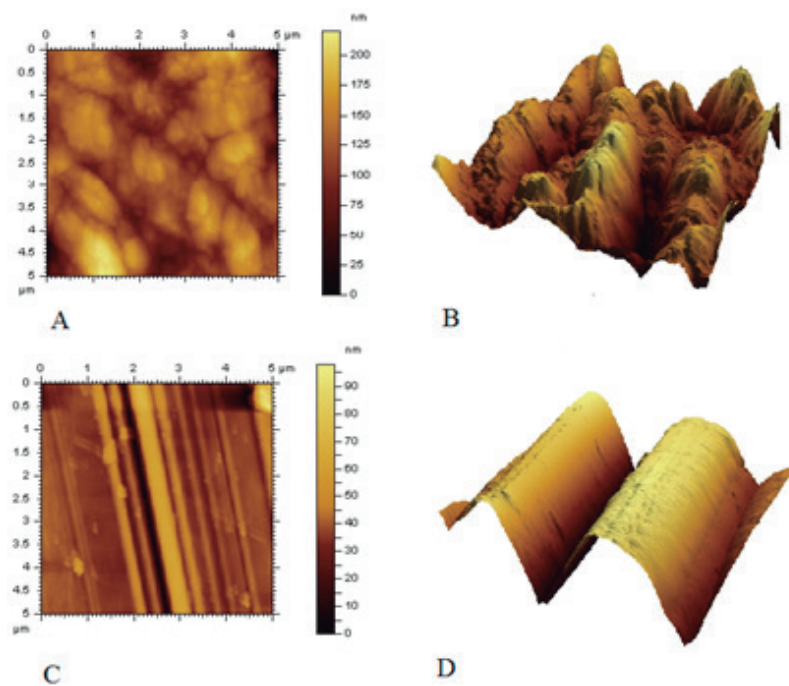
**Figura 4** - Análise da superfície do Acrílico. Imagens obtidas através de MFA comparando a presença de biofilme pela adesão e proliferação microbiana de *P. aeruginosa* PA01 (A e B), com seus respectivos controles negativos, sem a presença de microrganismos (C e D).



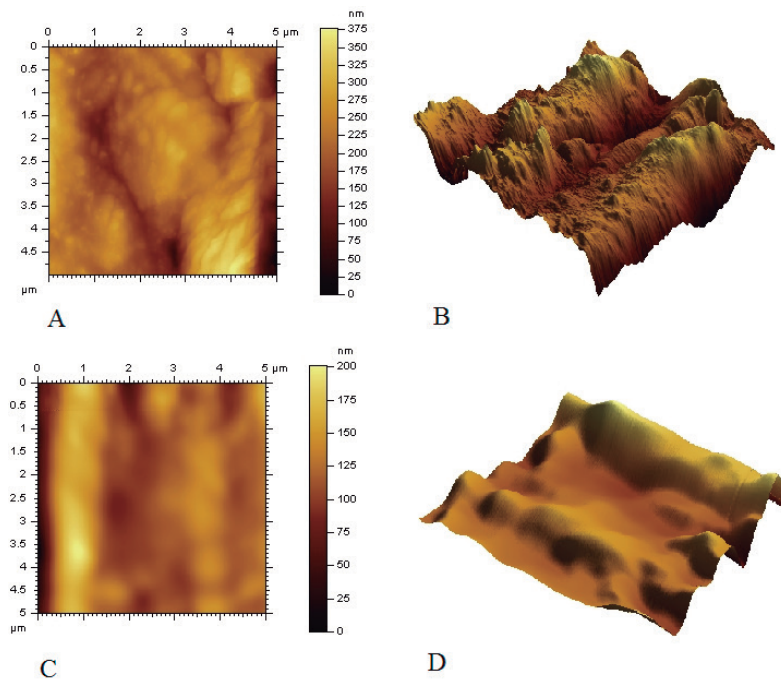
**Figura 5** - Análise da superfície do Vidro. Imagens obtidas através de MFA comparando a presença de biofilme pela adesão e proliferação microbiana de *P. aeruginosa* PA01 (A e B), com seus respectivos controles negativos, sem a presença de microrganismos (C e D).



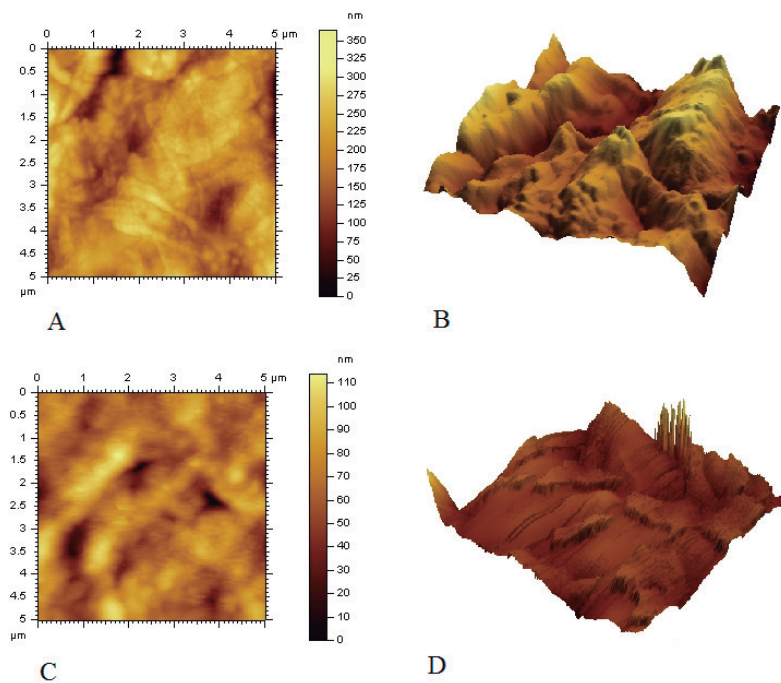
**Figura 6** - Análise da superfície do PET. Imagens obtidas através de MFA comparando a presença de biofilme pela adesão e proliferação microbiana de *P. aeruginosa* PA01 (A e B), com seus respectivos controles negativos, sem a presença de microrganismos (C e D).



**Figura 7** - Análise da superfície do PEAD. Imagens obtidas através de MFA comparando a presença de biofilme pela adesão e proliferação microbiana de *P. aeruginosa* PA01 (A e B), com seus respectivos controles negativos, sem a presença de microrganismos (C e D).



**Figura 8** - Análise da superfície do Teflon®. Imagens obtidas através de MFA comparando a presença de biofilme pela adesão e proliferação microbiana de *P. aeruginosa* PA01 (A e B), com seus respectivos controles negativos, sem a presença de microrganismos (C e D).





## DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi avaliada a formação de biofilme por *P. aeruginosa* em diferentes substratos, havendo crescimento significativo de biofilme nos distintos substratos. Alguns endoscópios utilizados em procedimentos médicos, são revestidos internamente por Teflon<sup>®</sup>, com canais longos e com lumens estreitos, favorecendo a aderência de matéria orgânica e microrganismos, com consequente formação de biofilme (BALSAMO et al., 2012). Metais (Ti-6Al-4V, Co-Cr-Mo e aço inoxidável), são comumente utilizados na fabricação de implantes ortopédicos. Estudos demonstram que o Teflon<sup>®</sup> é um dos materiais menos favoráveis na confecção de cateteres, pois são menos biocompatíveis e com pouca flexibilidade. Além disso, o Teflon<sup>®</sup> também está relacionado a maiores taxas de infecções microbianas, por esse motivo, vem sendo substituído por poliuretano e silicone (STENQVIST et al., 1983; GAUKROGER; ROBERTS; MANNERS, 1988).

O impacto da presença de biofilmes em ambientes naturais, médicos e industriais pode afetar negativamente os seres humanos. Por exemplo, o biofilme formado em dispositivos médicos, como cateteres ou implantes podem resultar em infecções crônicas e difícil tratamento. Algumas das infecções associadas com a formação de biofilme podem acometer a superfície dos dentes, da pele e do trato urinário (HATT; RATHER, 2008; HALL-STOODLEY et al., 2008). Neste contexto, a adesão dos microrganismos às diferentes superfícies é influenciada pelas propriedades físico-químicas das mesmas, que aderem-se com mais facilidade às superfícies hidrofóbicas (plásticos) do que às hidrofílicas (vidro ou metais). Estudos vêm mostrando que a adesão dos microrganismos é melhor com o aumento da hidrofobicidade, tanto da superfície celular como do substrato de adesão (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Os implantes ortopédicos são destinados a restaurar funções específicas de partes do corpo, como as próteses para quadril, joelho, tornozelo, ombro e cotovelo. Também destacam-se os dispositivos de fixação de fratura, tais como fios, pinos, placas, parafusos, etc (PAITAL; DAHOTRE, 2009). Estudos realizados por Stoodley et al. (2005), demonstraram que a *P. aeruginosa* pode facilmente formar biofilmes em parafusos ortopédicos de aço inoxidável e titânio.

A introdução de um implante no organismo está associada ao risco de infecção microbiana, tornando-se um grave problema em ortopedia, levando à falha do implante. Estas infecções podem levar à substituição de implantes e, em casos graves, pode resultar em amputação e mortalidade. Polímeros são comumente usados em ortopedia, articulando superfícies de próteses e como material de interposição entre o osso e superfícies dos implantes. Os polímeros mais comuns utilizados são polietileno de peso molecular ultra elevado (UHMWPE) e polimetilmetacrilato (PMMA) (LONG, 2008).

A problemática em relação a formação de biofilmes em dispositivos médicos refere-se, em primeiro lugar, ao reservatório de microrganismos formado sobre a superfície destes dispositivos, que podem conduzir à uma infecção crônica. Em segundo lugar, a resistência da comunidade de micror-

ganismo ao tratamento convencional, e por fim, as respostas do hospedeiro e terapias antimicrobianas são frequentemente incapazes de eliminar as bactérias que crescem nos biofilmes, uma resposta inflamatória crônica no local do biofilme pode ser produzida (TURNER et al., 2009).

Infecções dos tecidos ósseos como osteomielite, artrite séptica e as infecções de próteses articulares, ainda representam as piores complicações da cirurgia ortopédica e traumatologia. As principais vias de infecção são decorrentes de bacteremia, infecção a partir do tecido local, ou resultante da infiltração do osso, geralmente após lesão, cirurgia ou a implantação de um corpo estranho, como a substituição da articulação (BRADY et al., 2006; WRIGHT; NAIR, 2010).

A formação de biofilme em Acrílico também apresentou crescimento considerável, sendo clinicamente preocupante pela sua utilização em próteses orais. As resinas acrílicas são comumente utilizadas para a fabricação de dentaduras, porém, estudos vêm demonstrando que a base de resinas acrílicas de dentadura podem atuar como reservatório de microrganismos com potencial para formação de biofilme (RADFORD et al., 1998; PEREIRA-CENCI et al., 2008). A resina acrílica é um material de base para dentaduras, possui propriedades polares que absorvem água, favorecendo a adesão e colonização de microrganismos. É amplamente utilizado devido às suas boas propriedades de trabalho, tais como preparação simples e fixação, precisão de ajuste, estabilidade no ambiente oral, aspecto estético e baixo preço (KANIE et al., 2000; CHEN; LIANG, 2004). As próteses de acrílico pode ocasionar infecções como a estomatite protética, que é um dos problemas mais comuns dos usuários de próteses antigas, com 25-65% de prevalência. A presença de fissuras na prótese torna-se um local apropriado para colonização de microrganismos (PEREZOUS et al., 2005; THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2007; LI et al., 2010; RAMAGE et al., 2012).

A presença do biofilme é preocupante, pois além de comprometer a saúde do paciente com complicações clínicas, também gera altos custos hospitalares com os cuidados à saúde. Toda esta problemática em relação a formação de biofilme na clínica médica pode ser reduzida pela substituição da matéria prima dos biomateriais, quando possível, ou por medidas profiláticas adequadas, como rigorosos procedimentos de higiene, dispositivos revestidos com antimicrobianos, dentre outros.

## CONCLUSÃO

O presente estudo, observou-se a capacidade de adesão microbiana e conseqüente formação de biofilme em diferentes substratos, sendo que, a análise pela coloração com cristal violeta revelou que o Teflon® demonstrou maior proliferação microbiana. A partir da MFA dos distintos materiais testados, pode-se observar agregados microbianos sugestivos de biofilmes.

## REFERÊNCIAS

ANDERSON, G. G. et al. Intracellular Bacterial Biofilm-Like Pods in Urinary Tract Infections. **Scien.**, v. 301, p. 105-107, 2003.

BALSAMO, A. C. et al. Remoção de biofilme em canais de endoscópios: avaliação de métodos de desinfecção atualmente utilizados. **Rev Esc Enferm USP**, v. 46, p. 91-98, 2012.

BRADY, R. A. et al. Osteomyelitis: Clinical Overview and Mechanisms of Infection Persistence. **Clin Microbiol Newsl.**, v. 28, p. 65-72, 2006.

BRANDA, S. S. et al. Biofilms: The matrix revisited. **Trends Microbiol**, v. 13, p. 20-26, 2005.

BRANSKI, L. K. et al. Emerging infections in burns. **Surg Infect (Larchmt)**, v. 10, p. 389-397, 2009.

CHEN, S. Y.; LIANG, W. M. Effects of fillers on fiber reinforced acrylic denture base resins. **Mid Taiwan J Med.**, v. 9, p. 203-10, 2004.

CHI, H. et al. Infections associated with indwelling ventriculostomy catheters in a teaching hospital. **Int J Infect Dis.**, v. 14, p. 216-219, 2009.

COSTERTON, J. W. Introduction to biofilm. **Int J Antimicrob Agents**, v. 11, p. 217-221, 1999.

DIEC, J. et al. Prompt diagnosis and treatment of microbial keratitis in a daily wear lens. **Optom Vis Sci.**, v. 86, p. 904-907, 2009.

DONELLI, G. Vascular catheter-related infection and sepsis. **Surg Infect (Larchmt)**, v. 7, p. 25-27, 2006.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, p. 167-193, 2002.

DRAGO, L. Bacteria and biofilm in respiratory tract infections. **L Infez Med.**, v. 2, p. 3-9, 2009.

FINE, D. Advancing oral health through industry/academic partnerships. **UMDNJ-New Jer Dent Sch**, v. 6, p. 7-8, 2005.

FUJITANI, S. et al. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. Part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. **Chest**, v. 139, p. 909-919, 2011.

GALES, A. C.; SADER, H. H.; JONES, R. N. Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin America: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 44, p. 301-311, 2002.

GAUKROGER, P. B.; ROBERTS, J. G.; MANNERS, T. A. Infusion thrombophlebitis: a prospective comparison of 645 Vialon and Teflon cannulae in anaesthetic and postoperative use. **Anaesth Inten Care**, v. 16, p. 265-271, 1988.

GAYNES, R.; EDWARDS, J. R. Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli. **Clin Infect Dis.**, v. 41, p. 848-854, 2005.

GWENDOLYN, M. D. et al. The Influence of Maggot Excretions on PAO1 Biofilm Formation on Different Biomaterials. **Clin Orthop Relat Res.**, v. 467, p. 536-545, 2009.

HALL-STOODLEY, L. et al. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. **BMC Microbiol.**, v. 8, p. 173, 2008.

HATT, J. K.; RATHER, P. N. Role of bacterial biofilms in urinary tract infections. **Curren. Top in Microbiol. and Immunol.**, v. 322, p. 163-192, 2008.

KANIE, T. et al. Flexural properties and impact strength of denture base polymer reinforced with woven glass fibers. **Dent Mater**, v. 16, p. 150-158, 2000.

LI, L. et al. In vitro study of biofilm formation and effectiveness of antimicrobial treatment on various dental material surfaces. **Mol Oral Microbiol.**, v. 25, p. 384-390, 2010.

LONG, P. H. Medical devices in orthopedic applications. **Toxicol Pathol.**, v. 36, p. 85-91, 2008.

OPILLA, M. Epidemiology of bloodstream infection associated with parenteral nutrition. **Am J Infect Control.**, v. 36, p. 173-178, 2008.

PAITAL, S. R.; DAHOTRE, N. B. Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies. **Mater Sci Eng Rep.**, v. 66, p. 274-281, 2009.

PEREIRA-CENCI, T. et al. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. **J Appl Oral Sci.**, v. 16, p. 86-94, 2008.

PEREZOUS, L. F. et al. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. **J Prosthet Dent.**, v. 93, p. 288-293, 2005.

RADFORD, D. R. et al. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. **J Dent.**, v. 26, p. 577-583, 1998.

RAJAN, S.; SAIMAN, L. Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. **Semin Respir Infect.**, v. 17, p. 47-56, 2002.

RAMAGE, G. et al. In vitro *Candida albicans* biofilm induced proteinase activity and SAP8 expression correlates with in vivo denture stomatitis severity. **Mycopath.**, v. 174, p. 11-19, 2012.

STENQVIST, O. et al. Stiffness of central venous catheters. **Acta Anaesth Scand.**, v. 27, p. 153-157, 1983.

STOODLEY, P.; KATHJU, S.; HU, F. Z. et al. Molecular and imaging techniques for bacterial biofilms in joint arthroplasty infections. **Clin Orthop Relat Res.**, v. 437, p. 31-40, 2005.

THEIN, Z. M.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. **Arch Oral Biol.**, v. 52, p. 1200-1208, 2007.

TURNER, I. G. et al. Sterility and Infection. In: Narayan R. (ed). **Biomedical Materials**. New York, NY: Springer Science, p. 239-258, 2009.

VIALE, P.; STEFANI, S. Vascular catheter-associated infections: a microbiological and therapeutic update. **J Chemother.**, v. 18, p. 235-249, 2006.

WRIGHT, J. A.; NAIR, S. P. Interaction of staphylococci with bone. **Int J Med Microbiol.**, v. 300, p. 193-204, 2010.

