



**Sandra Cristina  
Amaro Beirão**

**Inativação fotodinâmica de biofilmes microbianos**



**SandraCristina  
Amaro Beirão**

## **Inativação fotodinâmica de biofilmes microbianos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada com especialização em Microbiologia Clínica e Ambiental, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e sob a co-orientação científica da Doutora Maria do Amparo Ferreira Faustino, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Este trabalho foi parcialmente suportado pelo Convénio de Cooperação FCT – DAAD “Métodos rápidos de avaliação de compostos tetrapirrólicos como fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica antimicrobiana” (2012-2013).

*Aos meus avós maternos, Esperança da Conceição Tibúrcio  
e João Mendes Amaro.*

## **o júri**

presidente

**Profª. Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida**

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Vogais

**Profª. Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha (orientadora)**

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Profª. Doutora Maria do Amparo Ferreira Faustino (co-orientadora)**

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutor João Paulo Costa Tomé (arguente)**

Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Quero expressar os meus melhores agradecimentos e o meu profundo reconhecimento a todos aqueles que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização deste trabalho:

À Professora Doutora Ângela Cunha agradeço a orientação científica, o incentivo, a confiança depositada, a disponibilidade e o apoio ao longo de todo o trabalho em especial durante a escrita da tese e revisão final.

À Professora Doutora Maria do Amparo Faustino, co-orientadora desta tese, pelo apoio e ajuda prestados durante a fase de escrita desta tese e pela prontidão no esclarecimento de qualquer dúvida.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia Ambiental e Aplicada, sem exceção, pelo apoio e ajuda, mas principalmente pela paciência sempre presentes.

Aos colegas do laboratório de Química Orgânica pela simpatia com que me receberam, pelo apoio laboratorial e pela disponibilidade constante.

À Sara Fernandes pelo apoio incondicional, pela presença constante, pelo carinho que jamais terei como agradecer.

Aos meus pais e irmão, pelo apoio, compreensão e estímulo incondicionais, pelo amor e união, por tornarem tão mais fácil esta caminhada.

Ao Gonçalo, por todo o amor e carinho, apoio e total dedicação e paciência.

**palavras-chave**

Inativação fotodinâmica de microrganismos, porfirinas catiónicas, biofilmes, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, teste da resazurina

**resumo**

A inativação fotodinâmica de microrganismos é uma técnica que combina três elementos não-tóxicos, luz, oxigênio e um fotossensibilizador (PS) para inativar microrganismos. O PS, quando absorve luz na presença de oxigênio molecular, gera oxigênio singuleto ( $^1O_2$ ), entre outras espécies reativas de oxigênio, responsáveis por danos celulares nos microrganismos que podem levar à sua destruição. As porfirinas catiónicas foram já usadas com sucesso como PS na inativação fotodinâmica de várias suspensões microbianas como bactérias, fungos e vírus. No entanto, é também conhecido que a organização dos microrganismos em biofilmes lhes confere resistência acrescida aos agentes antimicrobianos relativamente à observada por células da mesma estirpe em forma planctónica.

O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a eficiência da porfirina catiónica tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il)porfirina (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me) como PS, na inativação fotodinâmica de biofilmes de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* bem como na inativação destas estirpes em forma planctónica. Os biofilmes utilizados nas experiências de inativação fotodinâmica foram desenvolvidos por transferência de cultura em meio líquido para microplacas de 96 poços que foram incubadas a 37 °C durante 24 h e 48 h (dependendo da estirpe utilizada). A inativação fotodinâmica dos biofilmes foi avaliada de forma indireta (teste da resazurina) e de forma direta (por contagem de colónias) para determinar a viabilidade celular, após exposição dos biofilmes a diferentes concentrações (5, 10 e 20 µM) de Tetra-Py<sup>+</sup>-Me e irradiados com luz branca durante 30, 60, 90, 180 e 270 min.

Os resultados mostram que a porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me causa inativação fotodinâmica dos microrganismos testados, tanto na forma de biofilmes como na forma planctónica, sendo assim promissora a sua utilização como PS na inativação fotodinâmica de biofilmes microbianos.

**keywords**

Photodynamic inactivation of microorganisms , cationic porphyrin, biofilms *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, resazurin assay

**abstract**

The photodynamic inactivation of microorganisms is a technique which relies of three non-toxic elements: light, oxygen and a photosensitizer (PS). The PS, when activated by light in the presence of molecular oxygen, generates singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ), and other reactive oxygen species, which cause cellular damage in microorganisms that lead to cell death. Cationic porphyrins have been successfully used as photosensitizers for the inactivation of bacteria, fungi and viruses. However, it is also known that the organization of microorganisms in biofilms confers increased resistance to antimicrobial agents, comparing to that observed for cells of the same strain in the planktonic form.

The aim of this study was to evaluate and compare the efficiency of the cationic porphyrin tetra-iodide 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl) porphyrin (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me) as PS for the photodynamic inactivation of biofilms of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* as well in the photodynamic inactivation of these strains in the planktonic form. Biofilms used in photodynamic inactivation experiments were developed by transference of liquid to culture microplates of 96 wells which were incubated at 37 °C for 24 h or 48 h, depending on the strain.

Photodynamic inactivation was assessed after exposure of the biofilms to different concentrations (5, 10 and 20  $\mu\text{M}$ ) of Tetra-Py<sup>+</sup>-Me and irradiation with white light for 30, 60, 90, 180 and 270 min, by the indirect method of resazurin reduction and by colony counts.

The results show that the Tetra-Py<sup>+</sup>-Me causes significant inactivation of the microorganisms, either in biofilms or in the planktonic form and may be regarded as a promising PS for photodynamic inactivation of microbial biofilms.

# Índice

<b>Agradecimentos</b>	<b>i</b>
<b>Resumo</b>	<b>ii</b>
<b>Abstract</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de tabelas</b>	<b>viii</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>ix</b>
<b>Capítulo I – INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. Biofilmes microbianos	2
1.2. Microrganismos produtores de biofilmes	4
1.3. Processos de formação de biofilmes	5
1.4. Principais fatores que influenciam a formação de biofilmes	7
1.4.1. Estruturas celulares especializadas na fixação	8
1.4.2. Substâncias poliméricas extracelulares	9
1.4.3. Sinalização celular (quórum sensing)	12
1.5. Resistência dos biofilmes a agentes antimicrobianos	12
1.6. Relevância dos biofilmes microbianos	13
1.7. Estratégias clássicas no controlo de biofilme	15
1.7.1. Métodos físicos	16
1.7.2. Métodos químicos	16
1.8. Novas estratégias no controlo de biofilmes	18
1.8.1. Enzimas	18
1.8.2. Bacteriófagos	18
1.8.3. Metabolitos	19
1.8.4. Terapia fotodinâmica	20
1.8.4.1. Famílias de fotossensibilizadores utilizados na inativação microbiana	21
1.8.4.2. Porfirinas como fotossensibilizadores	24
1.9. Métodos de quantificação de biofilmes	25
1.9.1. Quantificação da biomassa de biofilmes	26
1.9.2. Quantificação da matriz de biofilmes	27
1.9.3. Quantificação da viabilidade celular	27
1.8.3.1. Teste da resazurina	28



1.10. Objetivo do trabalho experimental	31
<b>Capítulo II – MATERIAL e MÉTODOS</b>	<b>32</b>
2.1. Microrganismo e condições de crescimento	33
2.2. Condições de cultura	33
2.3. Otimização das condições de preparação de biofilmes	34
2.4. Ensaio de inativação fotodinâmica	35
2.4.1. Fotossensibilizador	35
2.4.2. Condições de irradiação	36
2.4.3. Controlos	36
2.4.4. Ensaio de inativação fotodinâmica de biofilme	37
2.3.4.1. Avaliação da atividade metabólica pelo teste de resazurina	37
2.3.4.2. Avaliação direta por contagem de colónias	38
2.4.5. Ensaio de inativação fotodinâmica de células em suspensão	38
2.4.6. Quantificação das unidades formadoras de colónias (UFCs)	39
2.4.7. Ligação do fotossensibilizador ao material biológico	40
<b>Capítulo III – RESULTADOS</b>	<b>42</b>
3.1. Otimização dos tempos de desenvolvimento do biofilme e de quantificação pelo método da resazurina	43
3.2. Ensaio de inativação fotodinâmica de biofilmes	45
3.2.1. Avaliação indireta da atividade microbiana pelo ensaio de resazurina	45
3.2.2. Avaliação direta por contagem de colónias	47
3.3. Ensaio de inativação fotodinâmica de células em suspensão	50
3.4. Ligação do fotossensibilizador ao material biológico	51
<b>Capítulo IV – DISCUSSÃO e CONCLUSÃO</b>	<b>53</b>
<b>Capítulo V – BIBLIOGRAFIA</b>	<b>61</b>

## Lista de figuras

**Figura 1.1** - Etapas de formação de um biofilme

**Figura 1.2** – Esquema do processo fotodinâmico

**Figura 1.3** – Estrutura químicas de alguns fotossensibilizadores usados em aPDT

**Figura 1.4** – Estruturas químicas da resazurina e da resorufina

**Figura 2.1**- Esquema de inoculação e incubação numa microplacas de 96 poços, que permitiu obter biofilmes com diferentes graus de desenvolvimento.

**Figura 2.2** - Representação estrutural da porfirina tetra-iodeto 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il)porfirina testada nos ensaios de aPDT.

**Figura 3.1**– Resultados do teste de resazurina (Absorvância 600nm) aplicado a biofilmes de *Staphylococcus aureus* (A), *Pseudomonas aeruginosa* (B), *Candida albicans* (C) ou *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* em biofilmes mistos (D) com tempos de desenvolvimento de 24 a 96 h e incubados com resazurina durante 30 a 180 min. As barras de erro correspondem ao desvio padrão dos resultados de 3 ensaios independentes

**Figura 3.2**– Inativação fotodinâmica de biofilmes de *Staphylococcus aureus* (A), *Pseudomonas aeruginosa* (B), *Candida albicans* (C) ou biofilmes mistos de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (D) avaliada pelo ensaio de resazurina em que a absorvância corresponde à intensidade de cor azul e resazurina (forma oxidada), após irradiação com luz PAR ( $40 \text{ W.m}^{-2}$ ) na presença de 5, 10 e 20  $\mu\text{M}$  de porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. Os pontos representam o valor médio e as barras de erro representam o desvio padrão de 3 ensaios independentes. As linhas correspondem à interpolação dos valores entre pontos consecutivos

**Figura 3.3** – Inativação fotodinâmica de biofilmes de *Staphylococcus aureus* (A), *Pseudomonas aeruginosa* (B), *Candida albicans* (C) ou biofilmes mistos de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (D) avaliada pela contagem de colónias após irradiação com luz PAR ( $40 \text{ W.m}^{-2}$ ) na presença de 5, 10 e 20  $\mu\text{M}$  de porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. Os pontos representam o valor médio e as barras de erro representam o desvio padrão de 3 ensaios independentes. As linhas correspondem à interpolação dos valores entre pontos consecutivos

**Figura 3.4** – Inativação fotodinâmica de *Staphylococcus aureus* (A), *Pseudomonas aeruginosa* (B), *Candida albicans* (C) avaliada pela contagem de colónias após

irradiação com luz PAR ( $40 \text{ W.m}^{-2}$ ) na presença de 5, 10 e 20  $\mu\text{M}$  de porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. Os pontos representam o valor médio e as barras de erro representam o desvio padrão de 3 ensaios independentes. As linhas correspondem à interpolação dos valores entre pontos consecutivos

**Figura 3.5** “Uptake” [moléculas (PS).UFCs<sup>-1</sup>] do PS para cada uma das estirpes testadas sob a forma de: A - suspensão (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*) após 15 e/ou 60 minutos de incubação na ausência de luz, sob agitação ( $\approx 100 \text{ rpm}$ ), a 25-28 °C; B - biofilme (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*), após 30 minutos de incubação na ausência de luz, sob agitação ( $\approx 100 \text{ rpm}$ ), a 25-28 °C

## **Lista de tabelas**

**Tabela 1.1** – Variáveis importantes na fixação das células, formação e desenvolvimento de biofilme

**Tabela 1.2** – Funções de substâncias poliméricas extracelulares (SPEs) em biofilmes de bactérias

**Tabela 1.3** – Agentes químicos mais comuns

**Tabela 1.4** – Exemplos de fotossensibilizadores usados na fotoinativação de biofilmes

## Lista de abreviaturas

ALA	Ácido delta-aminolevulínico
BPA	<i>“Baird-Parker Agar”</i>
DMMB	<i>“1,9-dimethyl methylene blue”</i>
DMSO	Dimetilo sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CLSM	Microscopia confocal de varrimento a laser
CTC	<i>“5-cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride”</i>
CVC	Coloração de violeta de cristal
FDA	Diacetato de fluoresceína
Gram (-)	Gram-negativa
Gram (+)	Gram-positiva
Log	Logaritmo de base 10
MTT	<i>“3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide”</i>
NADH	<i>“Nicotinamide adenine dinucleotide”</i>
NADPH	<i>“Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate”</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PDT	Terapia fotodinâmica
PS	Fotossensibilizador
QS	<i>Quorum sensing</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigénio r
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SPE	Substâncias poliméricas extracelulares
TSA	<i>“Tryptic soy agar”</i>
TSB	<i>“Tryptic soy broth”</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
YGC	<i>“Yeast Extract Glucose Chloramphenicol”</i>
YGCA	<i>“Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar”</i>
XTT	<i>“2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5- [(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide”</i>

# Capítulo I

---

**Introdução**

---

### **1.1. Biofilmes microbianos**

Os microrganismos podem encontrar-se no ambiente na forma planctónica, no caso de ambientes aquáticos, ou na forma sésil ou de biofilme, colonizando superfícies sólidas ou desenvolvendo-se em interfaces. Na forma planctónica, os microrganismos encontram-se em suspensão e dispersos no meio líquido, enquanto que, na forma sésil encontram-se aderentes a superfícies sólidas ou organizados em agregados que constituem biofilmes. Estima-se que mais de 90% dos microrganismos viva sob a forma de biofilmes e praticamente não exista nenhuma superfície que não possa ser ou vir a ser colonizada por eles (Costerton et al., 1987; Characklis et al., 1990).

A composição dos biofilmes é dependente das condições do meio (temperatura, composição do meio, pressão, pH e oxigénio dissolvido) e não é necessariamente uniforme, podendo até englobar partículas sólidas (argilas, areias, partículas orgânicas) provenientes do meio aquoso onde está imerso (Characklis e Marshall, 1990; Flemming, 1991; Wimpenny et al., 1993; O'Toole et al., 2000).

Existem várias definições de biofilme mas, geralmente, a designação refere-se a uma matriz polimérica de aspecto gelatinoso, aderente a uma superfície sólida, quase sempre imersa em meio líquido e é, principalmente, composta por água, um aglomerado de células microbianas, e seus produtos de excreção (substâncias poliméricas extracelulares - SPEs) (Sutherland et al., 2001; Allison, 2003). Os biofilmes apresentam uma estrutura muito absorvente e porosa (possui inúmeros canais de água e poros) devido ao facto de serem constituídos essencialmente por água (contém cerca de 80 a 95% de água). Segundo algumas estimativas, a razão



massa de água/massa de biofilme pode ser até próxima de 99% (Azeredo et al., 2000). Os microrganismos representam somente uma pequena parte da massa e do volume do biofilme, geralmente menos de 10%, embora estes excretem SPes que representam a fração predominante da matéria orgânica seca do biofilme. As SPes, formam uma teia polimérica envolvendo todas as células microbianas e representam cerca de 50 e 90% do total da matéria orgânica da massa seca dos biofilmes (Bakke et al., 1984; Flemming, 1993).

A espessura dos biofilmes varia com as condições do meio, composição química e hidrodinamismo, podendo encontrar-se desde películas muito finas (5 a 10  $\mu\text{M}$ ) por exemplo, em sistemas oligotróficos, até algumas bastante espessas (5 a 10 mm), por exemplo em circuitos de águas residuais da indústria do papel e da pasta de papel (Characklis et al., 1990)

Os biofilmes proporcionam importantes benefícios aos microrganismos que os constituem. A concentração de nutrientes é mais elevada nas interfaces líquido-biofilme uma vez que a matriz polimérica favorece a fixação de diversos compostos. As células encontram-se mais protegidas contra fatores ambientais adversos, como flutuações de pH e da concentração de sais, desidratação, ação tóxica de agentes antimicrobianos, poluentes e metais pesados. Em virtude dos longos tempos de retenção do microrganismo no biofilme, aumenta a probabilidade de transferência horizontal de material genético entre microrganismos, facilitando o desenvolvimento de microconsórcios e o estabelecimento de relações de simbiose, bem como a utilização sintrófica de substratos de difícil degradação (Flemming, 1991).

## 1.2. Microrganismos produtores de biofilmes

É enorme a diversidade de espécies microbianas que podem estar presentes nos biofilmes, quer em habitats naturais, quer habitats criados pelo Homem. Microalgas, fungos, protozoários, bactérias e vírus são microrganismos frequentemente encontrados em biofilmes (Characklis et al., 1990).

As bactérias e os fungos são os microrganismos mais abundantes em biofilmes estando frequentemente associados a problemas ambientais mas também perdas económicas associadas a processos industriais ou a condições clínicas relevantes em saúde humana (Tournu et al., 2011). As famílias de bactérias mais estudadas, em termos de adesão a superfícies pertencem às famílias *Pseudomonadaceae* (Gram -) e *Staphylococcaceae* (Gram +), sendo os géneros *Pseudomonas* e *Staphylococcus* os mais estudados. Dentro destes géneros, as espécies mais relevantes em termos de formação de biofilmes são *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, respetivamente. O reduzido tamanho que as bactérias apresentam, as elevadas taxas de divisão, a grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio circundante, são as principais características que fazem destas excelentes produtores de biofilmes.

Os biofilmes bacterianos desenvolvem-se facilmente nas redes de distribuição de água, em equipamentos industriais, e mesmo em dispositivos médicos sendo grandes causadores de infeções oportunistas no Homem (Mattila-Sandholm et al., 1992; Wirtanen, 1995 Simões et al., 2010; Yang et al., 2011).

O género *Candida*, particularmente a espécie *Candida albicans*, é um dos fungos frequentemente associado a biofilmes em dispositivos médicos (Martinez et

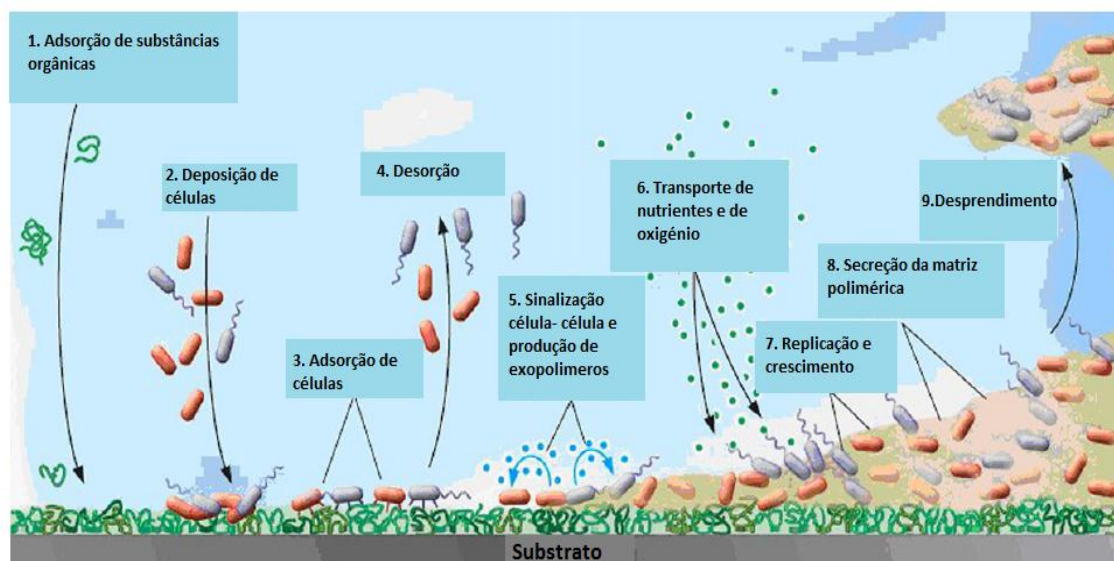
al., 2010; Tournu et al., 2011). Tal como as bactérias, o fungo dimórfico, *Candida albicans*, é um patógeno oportunista do corpo humano, quando a sua proliferação não é controlada pelo sistema imunitário do hospedeiro. É um dos agentes mais frequentemente identificados em infeções nosocomiais e é capaz de invadir praticamente qualquer local do hospedeiro humano, quer tecidos profundos e órgãos, quer locais mais superficiais, tais como a pele e as unhas, e implantes médicos e cateteres (Martinez et al., 2010; Tournu et al., 2011).

Aparentemente, os biofilmes podem ser formados por uma única espécie de microrganismos. No entanto, na maioria dos ambientes naturais e artificiais, os biofilmes monoespecíficos são relativamente raros. Por outro lado, os microrganismos muitas das vezes estão associados a comunidades multiespecíficas em superfícies complexas. Infelizmente, esta complexidade, não é tida em consideração quando os microrganismos são experimentalmente cultivados em monoculturas, em condições laboratoriais. As dinâmicas estruturais e funcionais de biofilmes mistos são em grande parte devido às interações entre as diferentes espécies. Assim, as interações metabólicas entre espécies contribuem para a organização de biofilmes multiespecíficos e na produção de um ambiente dinâmico. Todas estas interações podem muitas vezes alterar a fisiologia da espécie de biofilme individuais, bem como as funções de toda a comunidade (Rao et al., 2005; Koskaki et al., 2012).

### **1.3. Processos de formação de biofilmes**

A acumulação de biofilme em superfícies é um fenómeno natural que acontece em meios aquosos e resulta da interação de processos físicos, químicos e

biológicos (Bott, 1993). Atualmente, é aceite que a formação de biofilme compreende a sequência de 9 passos que se ilustra na figura 1.1: 1. Adsorção de substâncias orgânicas dissolvidas a uma superfície sólida em contacto com o meio aquoso; 2. Transporte de células planctónicas do meio líquido para a superfície; 3. Adsorção das células à superfície; 4. Desadsorção das células aderentes reversivelmente; 5. Adsorção irreversível de células bacterianas à superfície; 6. Produção de moléculas de sinalização célula-célula; 7. Transporte de substratos para dentro do biofilme; 8. Metabolismo do substrato pelas células do biofilme e transporte de produtos para fora do biofilme, acompanhados de crescimento celular, replicação e produção de SPEs; 9. Perda de células do biofilme por desprendimento (Simões et al., 2010).



**Figura 1.1** - Etapas de formação de um biofilme (adaptado Simões et al., 2010)

Este processo é inicialmente caracterizado como reversível. Contudo, torna-se irreversível, assim que os microrganismos começam a segregar substâncias poliméricas extracelulares (SPEs). As SPEs são compostas por uma variedade de biomoléculas, provenientes do microrganismo e do ambiente circundante. Servem como barreira para defender os microrganismos da ação dos agentes

antimicrobianos e para proporcionar um espaço protegido para a maturação do biofilme (Bryers, 2000; Richards, 2009). A maturação do biofilme é frequentemente detetada pela sua estrutura tridimensional. A morfologia deste torna-se muito distinta ao longo do seu desenvolvimento. Formam-se saliências e reentrâncias, permitindo a maximização da absorção de nutrientes e eliminação de resíduos. Além disso, a formação de canais no interior do biofilme torna-se evidente. Estas características estruturais proporcionam ao biofilme um sistema de transporte de água e de células na forma planctónica (Richards, 2009). Os processos de desenvolvimento e descolamento do biofilme ocorrem em equilíbrio, de tal modo que a quantidade total de biomassa na superfície mantém-se aproximadamente constante no tempo (Bryers, 2000).

#### **1.4. Principais fatores que influenciam a formação de biofilmes**

Os microrganismos são capazes de contactar com uma superfície, fixar-se firmemente a ela, promover interações célula-célula e crescer como uma estrutura complexa (Bryers et al., 2004; Simões et al., 2010), contribuindo para isto uma grande diversidade de mecanismos. A ligação dos microrganismos às superfícies é um processo complexo. Em geral, a ligação dos microrganismos ocorre mais facilmente em superfícies mais rugosas e hidrofóbicas. (Donlan, 2002). As propriedades da superfície da célula, principalmente a presença de apêndices extracelulares, bem como as interações envolvidas na comunicação de célula-célula e a produção de SPEs por microrganismos, são fatores importantes que podem eventualmente proporcionar uma vantagem competitiva para um microrganismo, onde uma comunidade mista está envolvida (Donlan, 2002). Na

Tabela 1.1 estão resumidas as principais variáveis envolvidas na adesão e formação de biofilmes.

**Tabela 1.1** - Variáveis importantes na fixação das células, formação e desenvolvimento de biofilmes (adaptado de Donlan, 2002 e Simões et al.,2010).

Propriedades da superfície de adesão	Propriedades do meio aquoso	Propriedades da célula
	Velocidade de fluxo	Hidrofobicidade celular
	pH	Apêndices extracelulares
Textura ou rugosidade	Temperatura	Substâncias poliméricas
Hidrofobicidade	Nutrientes	extracelulares
	Presença de agentes antimicrobianos	Moléculas de sinalização

Os aspetos biológicos, isto é, os aspetos dependentes das características das células, serão descritos detalhadamente nas secções seguintes.

#### 1.4.1. Estruturas celulares especializadas na fixação

A hidrofobicidade da superfície celular e a presença de apêndices filamentosos extracelulares podem influenciar a taxa e a extensão da ligação de células microbianas. A hidrofobicidade da superfície celular é importante para a adesão, porque as interações hidrofóbicas tendem a aumentar com o aumento da natureza não polar de uma ou de ambas as superfícies em causa, isto é, a célula microbiana e da superfície de adesão (Donlan, 2002) uma vez que a capacidade dos microrganismos se fixarem uns nos outros e às superfícies depende, em parte, da interação de domínios hidrófobos (Drenkard et al., 2002).

Muitas células produzem apêndices filamentosos extracelulares: flagelos, pili, fímbrias, prothecae ou pedúnculos (Harbron et al., 1988). Estes podem

desempenhar um papel importante no processo de fixação das células do biofilme, aumentando o raio da zona de interação das células com a superfície.

#### **1.4.2. Substâncias poliméricas extracelulares**

As substâncias poliméricas de origem biológica envolvidas na formação de agregados microbianos, são responsáveis pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional dos biofilmes e a sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas destes (Flemming e Wingender, 1999; Geesey, 1982).

A composição geral das SPEs é muito heterogênea e complexa, sendo os polissacarídeos um constituinte maioritário (Horan e Eccles, 1986; Wimpenney et al., 1993). Proteínas, ácidos nucleicos (DNA, RNA) (Jahn e Nielsen, 1998), lípidos, heteropolímeros, tais como glicoproteínas, (Gehrke et al., 1998), e substâncias húmicas fazem também parte da constituição da matriz polimérica extracelular (Wingender et al., 1999; Xavier, 2005; Tournu et al., 2011).

Por definição, as SPEs estão localizadas à superfície da célula ou no seu exterior, independentemente da origem. A localização da matriz extracelular e a sua composição podem ser o resultado de diferentes processos: a secreção, a lise de células, e a adsorção a partir do meio ambiente (Wingender et al., 1999).

Um dos papéis fundamentais das SPEs é conferir estabilidade mecânica ao biofilme, através de interações não covalentes, quer diretamente entre as cadeias de polissacarídeos ou indiretamente, através de interações com catiões polivalentes (Flemming 1996; Higgins e Novak, 1997; Allison, 2003). Além disso, as proteínas estão também envolvidas em ligações hidrofóbicas dentro da matriz das SPEs (Dignac et al., 1998). Algumas destas proteínas são enzimas cuja principal

função é a digestão de macromoléculas exógenas e material particulado no microambiente das células imobilizadas. Desta forma, tornam-se disponíveis nutrientes de baixo peso molecular que podem ser facilmente absorvidos e metabolizados pelas células (Junter et al., 2002). As enzimas podem estar envolvidas na degradação dos polissacarídeos das SPEs causando a libertação de células de biofilme e a dispersão de células (Boyd e Chakrabarty, 1994., Wingender et al., 1999).

Uma das funções frequentemente atribuídas às SPEs é o seu efeito protetor sobre os organismos do biofilme contra condições adversas. As células dos biofilmes podem tolerar concentrações significativamente mais elevadas de alguns agentes antimicrobianos (O'Toole, 2001; Allison, 2003) principalmente, em resultado de alterações fisiológicas, mas também por um efeito de barreira de SPEs, que restringe a difusão dos biofilmes (Morton et al., 1998; Pereira et al., 2001).

Na tabela 1.2 estão sumariadas algumas das funções das SPEs associadas à formação de biofilme (Wingender et al.,1999).



**Tabela 1.2** - Funções de substâncias poliméricas extracelulares (SPEs) em biofilmes de bactérias (Wingender et al.,1999).

<b>Função</b>	<b>Importância para os biofilmes</b>	<b>Componentes da SPE envolvidos</b>
Adesão a superfícies	Permite os passos iniciais da colonização de superfícies por células na forma planctónica e a fixação de longo prazo de biofilmes em superfícies inteiras.	Polissacáridos, proteínas, DNA e moléculas anfífilas.
Agregação de células microbianas	Permite a ligação entre as células, a imobilização temporária de populações microbianas, o desenvolvimento de densidades celulares elevadas e o reconhecimento célula-célula.	Polissacáridos, proteínas e DNA
Coesão	Forma uma rede de polímeros hidratados (a matriz do biofilme) mediando a estabilidade mecânica do biofilme (geralmente em conjunto com catiões polivalentes) e, através da estrutura de SPE e permite a comunicação célula-célula.	Polissacáridos neutros e carregados, proteínas (tais como amilóides e lectinas), e DNA
Retenção de água	Mantém um microambiente altamente hidratado em torno de organismos do biofilme que aumenta a sua resistência à dessecção.	Polissacáridos hidrofílicos e, possivelmente, proteínas
Atividades enzimáticas	Digestão de macromoléculas exógenas para a aquisição de nutrientes, a libertação de células do biofilme por degradação de SPE do biofilme.	Proteínas
Barreira de proteção	Resistência a agentes antimicrobianos.	Polissacáridos e proteínas
Adsorção de compostos orgânicos exógenos	Acumulação de nutrientes a partir do ambiente.	Polissacáridos carregados ou hidrofóbicos e proteínas
Adsorção de iões inorgânicos	Acumulação de iões metálicos tóxicos (contribui para a desintoxicação do ambiente);	Polissacáridos carregados e proteínas, incluindo os substituintes inorgânicos tais como fosfato e sulfato
Troca de informação genética	Transferência horizontal de genes entre as células do biofilme	DNA
Aceitador ou dador de eletrões	Permite atividade redox na matriz do biofilme	Proteínas (por exemplo, as formadoras de pili) e, eventualmente, as substâncias húmicas

### **1.4.3. Sinalização celular (quorum sensing)**

O *quorum sensing* (QS) é um mecanismo de sinalização intercelular que permite aos microrganismos coordenar a expressão de determinados genes (Fux et al., 2005; Dickschat, 2010). Trata-se de um sistema de comunicação microbiano com base na produção e secreção de pequenas moléculas de sinal chamadas auto-indutoras que se acumulam no ambiente extracelular, quando densidades celulares elevadas são atingidas (Romero et al., 2011) Uma vez atingida a concentração limiar intracelular, a molécula sinalizadora desencadeia a expressão de genes múltiplos que regulam importantes funções biológicas tais como a transferência de plasmídeos, mobilidade, agregação, luminescência, biossíntese de antibióticos, expressão de fatores de virulência, simbiose, e desenvolvimento do biofilme (Fux et al., 2005a; Romero et al., 2011). Este conceito torna-se especialmente relevante em biofilmes microbianos (Davies et al., 1998; Decho, 1999; Parsek et al., 2005). A sinalização celular desempenha um papel importante na adesão celular e no descolamento de biofilmes (Donlan, 2002; Daniels et al., 2005; Fuqua e Greenberg, 2002). A adaptação desses microrganismos às mudanças nas condições naturais requer que os microrganismos sejam capazes de perceber e reagir ao seu ambiente externo e modular a expressão dos genes em conformidade (Decho, 1999; Daniels et al., 2004).

### **1.5. Resistência dos biofilmes a agentes antimicrobianos**

É quase universalmente aceite que os microrganismos organizados em biofilmes são mais resistentes a ação dos agentes antimicrobianos do que as células em suspensão (Costeron, 1987; Brown et al., 1993; Heinzl, 1998). A

resistência a antibióticos é uma característica comum em biofilmes microbianos. Os antibióticos correntes apenas conseguem matar as células metabolicamente ativas presentes nas superfícies dos biofilmes, não afetando a viabilidade das células localizadas no seu interior (Kharidia et al., 2011). Os mecanismos que levam os microrganismos organizados em biofilme a adquirir formas de resistência à ação dos agentes antimicrobianos ainda não estão completamente explorados nem entendidos. No entanto, acredita-se que essa resistência possa estar relacionada com diversos fatores, entre os quais: expressão de genes de resistência, a baixa taxa de crescimento dos microrganismos nos biofilmes e a difusão dificultada dos compostos antimicrobianos na matriz extracelular do biofilme (Kharidia et al., 2011). Existem ainda autores que atribuem a menor sensibilidade dos biofilmes aos agentes antimicrobianos, ao facto de estes poderem reagir com constituintes inorgânicos dos biofilmes a uma velocidade superior à velocidade de difusão do agente no interior do biofilme (Stewart, 1998) o que leva a uma redução apreciável da concentração de agente antimicrobiano efetivamente disponível.

### **1.6. Relevância dos biofilmes microbianos**

Os biofilmes desempenham um papel importante, em diversas áreas, tais como indústria, ambiente e saúde. Do ponto de vista do interesse do Homem podem ser benéficos ou prejudiciais, resultando na necessidade do seu estudo para poder desenvolver estratégias no sentido de melhorar as suas características, caso ele seja benéfico, ou para o eliminar ou inibir a sua formação, quando a sua ação é prejudicial (Bryers, 2000).

Os biofilmes aparecem na natureza, depositados em rios, lagos ou no mar, sendo benéficos porque contribuem para a remoção de contaminantes da água. Têm sido usados em processos biotecnológicos, nomeadamente, no tratamento de efluentes, removendo poluentes orgânicos e inorgânicos de águas contaminadas. Alguns dos exemplos mais vulgares da aplicação de sistemas de biofilme em tratamento de efluentes são os filtros de areia, os sistemas de biodiscos aplicados à purificação de água, entre outros. Na indústria alimentar os biofilmes apresentam inúmeras vantagens, podendo ser utilizados na produção de alimentos fermentados, como por exemplo, a produção de vinagre por oxidação biológica de etanol, de ácido cítrico e na produção de “sherry” (Melo, 1994).

Infelizmente, nem sempre a presença dos biofilmes é vantajosa para o Homem. Na maioria das situações, a adesão de microrganismos a superfícies sólidas torna-se um inconveniente pois, de uma maneira geral, está associada à deterioração das superfícies e/ou ambiente circundante. Quando a produção de biofilme é indesejada, este é designado, frequentemente, por *biofouling* e pode ocorrer em inúmeras situações. Por exemplo, na indústria as principais consequências do *biofouling* são a nível económico, devido à redução do desempenho dos processos, à diminuição da eficiência de operação dos equipamentos, e aos danos nas superfícies sólidas onde se acumulam. Como tal, há perdas de energia, verificando-se aumento no consumo energético e diminuição da qualidade dos produtos, bem como, despesas acrescidas de limpeza e manutenção através da substituição precoce das peças deterioradas dos equipamentos (Characklis, 1990; Matilla-Shandhom et al., 1992). Pode ainda ocorrer no interior de oleodutos, em aquicultura, em sistemas de ar condicionado e em monumentos contribuindo de forma significativa para a sua deterioração (Characklis, 1989;

Miller, 2008). O *biofouling* e a consequente dispersão de microrganismos pode também ter uma forte implicação a nível de segurança e de saúde pública e ambiental.

Nas ciências médicas, os biofilmes apresentam geralmente um carácter nocivo uma vez que estão associados a um grande número de patologias, tais como infeções em tecidos moles, infeções do trato urinário e infeções na cavidade oral, (Costerton et al., 1981; Neu et al., 1992).

### **1.7. Estratégias clássicas no controlo de biofilmes**

Para combater os biofilmes, isto é, para prevenir a adesão de microrganismos, retardar a formação dos biofilmes e eliminar ou pelo menos reduzir a sua acumulação, várias estratégias têm vindo a ser estudadas. Técnicas de biotecnologia têm produzido agentes antimicrobianos com novos mecanismos de ação. As estratégias existentes para o controlo de biofilmes implicam tratamentos físicos, químicos ou biológicos, embora as abordagens químicas sejam as mais comuns e economicamente mais viáveis (Lin et al., 2004). A aplicação de enzimas que despolimerizam componentes do biofilme, uso de bacteriófagos, o uso de substâncias produzidas pelos próprios microrganismos (*e.g.* surfactantes) e a terapia fotodinâmica (PDT) têm sido sugeridas como alternativa para a destruição dos biofilmes. A opção de um método em detrimento de outro depende muito da relação custo/benefício (LeChevallier, 1990).

### **1.7.1. Métodos físicos**

Limpeza manual, choque térmico, choque osmótico, uso de campos elétricos, aplicação de ultra-sons, injeção de ar ou gás e radiação ultravioleta são alguns exemplos de métodos físicos aplicados na remoção física de biofilmes (Bolt, 1995).

Apesar de serem considerados dos métodos mais eficientes, a implementação destes métodos na remoção de biofilmes é geralmente dificultada, por fatores de ordem técnica e económica, que se prendem, essencialmente, com a estrutura e desenho dos equipamentos (*e.g.* equipamentos industriais) (Mattila-Sandholm et al., 1992) ou com a necessidade de utilizar equipamento suplementar (Bolt, 1995).

De uma maneira geral os métodos físicos têm um impacto ambiental reduzido mas implicam custos energéticos, que irão agravar os custos. Alguns destes métodos são bastante dispendiosos (caso das radiações ultravioleta), o que condiciona, logo à partida, a sua aplicabilidade (Bolt, 1992)

### **1.7.2. Métodos químicos**

Quando os métodos físicos são demasiado dispendiosos ou não são suficientes para evitar a acumulação de biofilmes, recorre-se geralmente à aplicação de substâncias químicas com propriedades antimicrobianas, propriedades tensioactivas e/ou propriedades dispersantes. Os mecanismos de ação destas substâncias passam essencialmente pela fragilização da matriz polimérica dos biofilmes, pelo enfraquecimento das interações biofilme-superfície de adesão e pela dispersão de depósitos biológicos ou, idealmente, mesmo pela prevenção da formação de biofilmes (Flemming, 1996). Na Tabela 1.3 encontram-se alguns dos agentes químicos utilizados mais comuns.

**Tabela 1.3** - Agentes químicos mais comuns (Adaptado de Bott 1995)

<b>Agente</b>	<b>Modo de ação</b>
Sequestrante/ Quelante	Formação de complexos químicos com os agentes de <i>biofouling</i> por forma a mantê-los em solução ou suspensão, inibindo ou mesmo reduzindo a precipitação de componentes formadores de <i>biofouling</i> .
Dispersante	Dispersão das células e de outras partículas coloidais de maneira a que permaneçam em suspensão e não ocorra a sua deposição nas superfícies.
Tensioactivo/ Detergente	Redução da tensão superficial da água e/ou redução da tensão interfacial.
Biocida	Eliminação dos microrganismos; Inviabilização da capacidade de adesão dos microrganismos às superfícies.
Bioestático	Inibição da reprodução dos microrganismos; Redução da atividade dos microrganismos (inibição metabólica).

De todos os agentes químicos referidos, os biocidas são dos agentes mais usados. O uso de biocidas de carácter químico persistente é do ponto de vista ambiental inaceitável em face dos potenciais riscos ambientais que poderão surgir quer nos sistemas de tratamento de águas residuais quer nos sistemas de água naturais (rios, lagos, lençóis friáticos), uma vez que os biocidas acabam por ser lançados no ambiente podendo ter impacto na saúde humana. Um exemplo flagrante do papel negativo dos biocidas na saúde e no ambiente é o cloro. Durante muitos anos o cloro foi dos biocidas mais usados devido à sua elevada eficiência, facilidade de aplicação e relativo baixo custo. No entanto, os subprodutos resultantes da reação do cloro com matéria orgânica presente nos sistemas de água (trihalometanos) (Chen, 1993; Cloete, 1998) conduzem a poluentes tóxicos e carcinogénicos que são não só persistentes no ambiente, como podem entrar na cadeia alimentar. Como resultado, o uso do cloro tem vindo a ser restringido nomeadamente através introdução de medidas legislativas.

## **1.8. Novas estratégias no controlo de biofilmes**

Para dar resposta às limitações impostas pela legislação ambiental, novas abordagens para o controlo de biofilmes têm vindo a ser desenvolvidas com o objetivo de obter produtos mais seguros do ponto de vista do manuseamento e armazenamento, e simultaneamente económicos e eficientes no ataque aos biofilmes sem prejuízos para o ambiente e saúde humana (Gaylarde et al., 1999).

### **1.8.1. Enzimas**

A utilização de detergentes à base de enzimas pode servir como uma opção viável. As enzimas podem ser usadas para degradar o biofilme, através da degradação dos biopolímeros extracelulares envolvidos na adesão celular e na integridade estrutural do biofilme. No entanto pode ser necessário utilizar-se uma mistura de enzimas, uma vez que as SPEs são uma matriz muito heterogénea. (Simões et al., 2010). As enzimas que se têm revelado mais úteis neste processo são as proteases e hidrolases de polissacáridos (Simões et al., 2010). A heterogeneidade e complexidade dos polissacarídeos que fazem parte da matriz polimérica e a falta de enzimas específicas que possam ser aplicadas na sua degradação são as principais barreiras a ultrapassar para que este método se imponha e seja considerado uma alternativa a custo aceitável (Johansen et al., 1997; Simões et al., 2010).

### **1.8.2. Bacteriófagos**

Os bacteriófagos, vírus que infetam bactérias, são ubíquos na natureza e podem fornecer uma abordagem natural, altamente específica, não-tóxica para



controlar vários microrganismos envolvidos na formação do biofilme (Simões et al., 2010). Embora existam em concentrações relativamente elevadas nos ecossistemas naturais, só recentemente as suas potencialidade começaram a ser exploradas e aplicadas no controlo de biofilmes. Devem codificar enzimas capazes de degradar os polímeros extracelulares, pelo que, e de acordo com Hughes et al. (1998), a ação dos bacteriófagos em biofilmes é resultante da combinação entre a degradação da matriz polimérica pelas enzimas virais e a infeção de bactérias embebidas no biofilme e sua lise subsequente.

No entanto, este tipo de abordagem ainda não está otimizada ao ponto de poder ser considerada como uma alternativa real aos agentes antimicrobianos, havendo ainda falta de informação disponível sobre a ação do bacteriófago no biofilme (Simões et al., 2010). Além disso, a infeção do biofilme por fagos é extremamente condicionada pela composição química do biofilme e por fatores ambientais tais como a temperatura e a fase de desenvolvimento do biofilme (Simões et al., 2010).

### **1.8.3. Metabolitos**

Existem muitos microrganismos capazes de produzir substâncias, cujos mecanismos de ação passam pela fragilização da matriz polimérica dos biofilmes, pelo enfraquecimento das interações biofilme-superfícies de adesão e pela dispersão de depósitos microbianos. (Daniels et al., 2004). A surfactina produzida por *Bacillus subtilis* dispersa biofilmes e previne a formação de biofilme por microrganismos tais como *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*. Além disso, as bactérias lácticas e seus produtos de metabolismo têm também

revelado atividade antimicrobiana contra o crescimento de *Listeria monocytogenes* (Zhao et al., 2004).

A exploração destas capacidades dos microrganismos pode levar ao desenvolvimento de novos e eficientes produtos naturais para controlo de biofilmes.

#### **1.8.4. Inativação fotodinâmica**

O processo fotodinâmico compreende a ação coordenada de três componentes não tóxicos: composto fotossensibilizador luz e oxigénio. Durante este processo (Figura 1.3), o fotossensibilizador (PS) é irradiado/excitado com luz de comprimento de onda adequado e, como consequência passa a um estado de maior energia. O fotossensibilizador neste estado excitado ( $^1PS^*$ ) pode, voltar ao seu estado fundamental diretamente por fluorescência ou por inversão de spin (CIS), passar para um estado excitado tripleto ( $^3PS^*$ ). No estado excitado tripleto, o PS pode interagir com o meio por dois mecanismos diferentes: o mecanismo tipo I envolvendo reações de transferência de eletrões ou átomos de hidrogénio entre o PS excitado no estado tripleto ( $^3PS^*$ ) e um substrato, levando à formação de espécies radicalares (radicais livres) e o mecanismo tipo II com transferência de energia do PS no estado excitado tripleto ( $^3PS^*$ ) para o oxigénio molecular ( $^3O_2$ ), levando à formação de oxigénio singuleto ( $^1O_2$ ) (Tavares et al., 2011).

Tanto o mecanismo do tipo I como o tipo II são extremamente dependentes de oxigénio e levam à formação de espécies de oxigénio citotóxicas altamente reativas (ROS). Estes vão interferir com a função biológica de alguns componentes celulares como os ácidos gordos insaturados das membranas, os resíduos de aminoácidos que fazem parte da estrutura proteica e as bases dos ácidos nucleicos,

em particular a guanina e a timina, conduzindo à morte celular (Almeida et al., 2009; Reddy et al., 2009; Tavares et al., 2009).

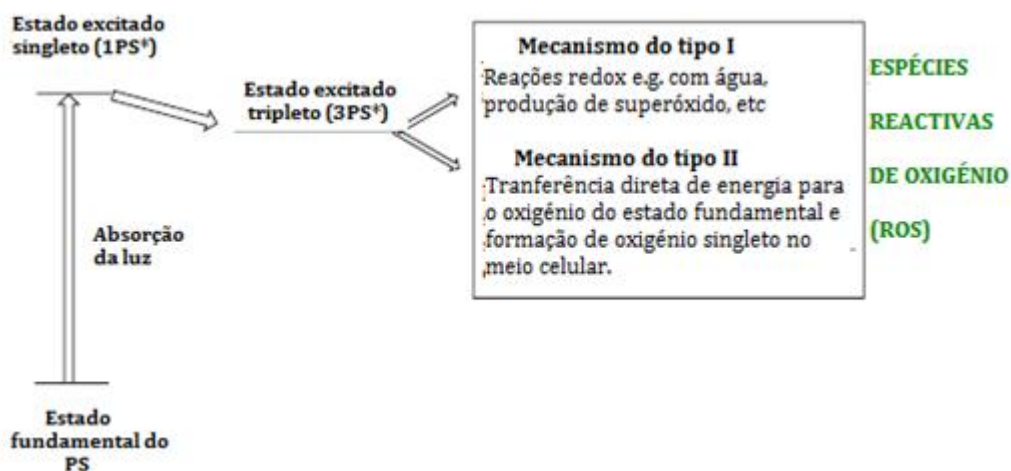


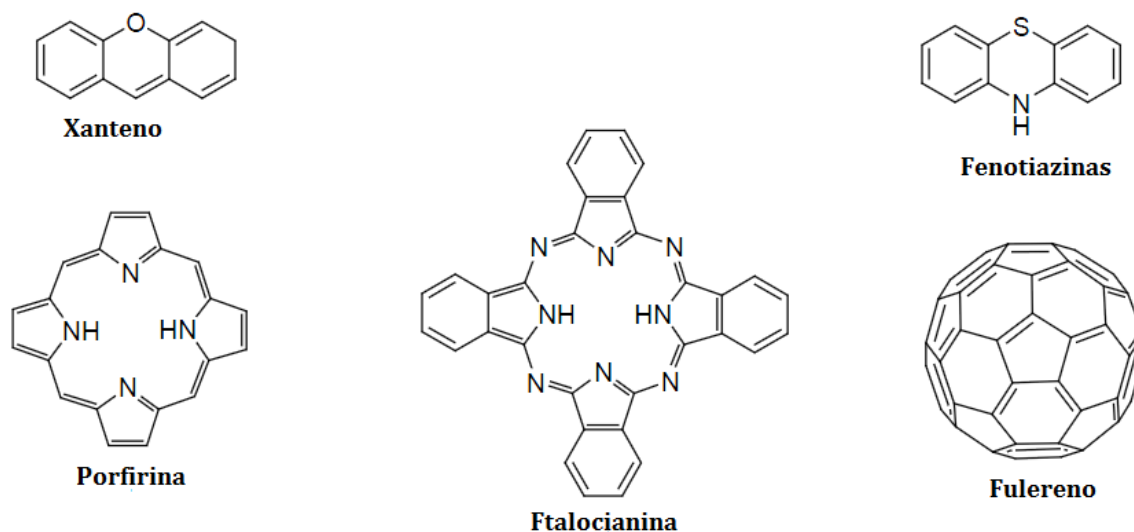
Figura 1.2 – Esquema do processo fotodinâmico.

A inativação fotodinâmica de microrganismos constitui uma aplicação particular da PDT e já provou ser eficaz *in vitro* contra vários tipos de microrganismos tais como bactérias, fungos, vírus e protozoários (Almeida et al., 2009).

#### 1.8.4.1. Famílias de fotossensibilizadores utilizados na inativação microbiana

O fotossensibilizador a utilizar na inativação microbiana pode ser um composto de origem natural ou sintético que tenha a capacidade de absorver luz visível (Almeida et al., 2009). Estes podem ser moléculas estruturalmente muito diversas, das quais destacam-se os macrociclos tetrapirrólicos (*e.g.* porfirinas, clorinas, flalocianinas, naftalocianinas), fenotiazinas (*e.g.* azul de metileno, laranja de acridina, azul de toluidina e rosa de Bengal), cianinas, merocianinas e psoralenos (furanocoumarinas) (Wainwright, 1998; Almeida et al., 2011). Na

Figura 1.4 encontram-se algumas das famílias de fotossensibilizadores usados na inativação microbiana.



**Figura 1.3** – Estrutura químicas de alguns fotossensibilizadores usados em inativação fotodinâmica de microrganismos. (Adapatado Almeida et al., 2009)

Um bom PS para a inativação de microrganismos deve satisfazer certas propriedades que nalguns casos, são dependentes da aplicação a que se destinam. Preferencialmente, deve ser quimicamente puro, produzir oxigénio singuleto ou outras espécies reativas de oxigénio, acumular-se seletivamente nos microrganismo a inativar, ser ativado por fontes de iluminação de baixo custo, não ser mutagénico, não apresentar toxicidade na ausência de luz, possuir um largo espetro de ação (bactérias, vírus, fungos, leveduras e protozoários,) e apresentar um mecanismo de inativação que minimize o risco de desenvolvimento de estirpes resistentes ao processo (Jori et al., 2006; Almeida et al., 2009).

Nos últimos anos, têm vindo a ser realizados muitos estudos sobre a fotoinativação de microrganismos. Diversas famílias de compostos, como

fenotiazinas, porfirinas e ftalocianinas foram testadas com sucesso como agentes antimicrobianos contra fotoinativação de bactérias Gram (+) e outros microrganismos patogênicos. Tem também vindo a ser realizados estudos de inativação fotodinâmica em biofilmes microbianos, sobretudo a nível clínico mas também a nível ambiental. A inativação de biofilmes de bactérias Gram (+) e Gram (-) e biofilmes mistos tem sido relatada para uma gama de fotossensibilizadores, frequentemente da família das fenotiazinas e ftalocianinas. A título de exemplo, o azul de metileno, (pertencente à família das fenotiazinas) é considerado como eficiente contra biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (Wainwright et al., 2002).

A ação de ftalocianinas tem induzido inativação com redução de cerca 0,7-1,5 log em biofilmes de *S. aureus* e *E. faecalis* e de 0,5-1 log em biofilmes de *C. albicans* (Mantereva et al., 2011). Tabela 1.4 encontra-se alguns exemplos de estudos de inativação de biofilmes utilizando vários PS.

A escolha do PS depende da finalidade da PDT. As porfirinas e os seus derivados têm sido os compostos mais promissores na fotoinativação de microrganismos (Almeida et al., 2009).

**Tabela 1.4** – Exemplos de fotossensibilizadores usados na fotoinativação de biofilmes. (Adaptado de Almeida et al., 2009)

<b>Fotossensibilizador</b>	<b>Microrganismos</b>
Hematoporfirina	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
	<i>Streptococcus sanguinis</i>
	<i>Actinomyces actinomycetemcomitans</i>
Clorina	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
	<i>Actinomyces viscosus</i>
Porfirinas endógenas	<i>Actinomyces odontolyticus</i>
	<i>Prevotella intermedia</i>
	<i>Propionibact. acnes</i>
	<i>Streptococcus mutans</i>
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Clorina e <sub>6</sub>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Clorina e <sub>6</sub> conjugado com polilisina	<i>Actinomyces naeslundii</i>
ALA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Clorina e <sub>6</sub> conjugado com polietilenoimina	<i>Proteus mirabilis</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

#### 1.8.4.2. Porfirinas como fotossensibilizadores

Os derivados porfirínicos usados como PS na inativação fotodinâmica de microrganismos podem ser divididos em dois grupos. O primeiro grupo inclui os macrociclos de origem natural, assim como os seus derivados modificados. Do segundo grupo fazem parte os derivados tetrapirrólicos sintéticos, que podem apresentar-se na forma neutra, catiónica ou aniónica. De facto, este tipo de macrociclos, tanto de origem natural ou sintética, tem revelado elevada eficácia na inativação de vários tipos de microrganismos. (Almeida et al., 2009). Embora

sejam escassos os estudos realizados com estes derivados porfirínicos em biofilmes, os resultados são promissores.

Uma das potenciais aplicações dos derivados porfirínicos, a nível clínico, é a esterilização de sangue e seus componentes e o tratamento de infecções da cavidade oral provocadas na maioria das vezes pela formação de biofilmes microbianos (Almeida et al., 2011). No entanto, a aplicação de porfirinas na inativação fotodinâmica de microrganismos não se tem limitado à área clínica. Na área ambiental, os derivados porfirínicos têm apresentado um enorme potencial na desinfecção de águas em estações de tratamento, assim como em pisciculturas. Vários têm sido os estudos que reportam resultados encorajadores no tratamento de águas residuais, usando porfirinas como PS. As porfirinas tri- e tetra-catiónicas, quando irradiadas com luz apropriada, mostraram inativar de forma eficaz bactérias Gram (+) – *e.g. Enterococcus faecalis* – e Gram (-) – *e.g. Escherichia coli*. (Alves et al., 2008; Arrojado et al., 2011)

### **1.9. Métodos de quantificação de biofilmes**

Os ensaios laboratoriais de avaliação da eficiência de novos compostos para inativação de biofilmes, dependem da construção de biofilmes artificiais e da medição do seu grau de desenvolvimento ou destruição. Ao longo das últimas décadas, uma ampla variedade de sistemas de modelo de quantificação foram descritos para o estudo *in vitro* da formação de biofilme e do seu desenvolvimento (McLean et al., 2004). Na maior parte destes sistemas modelo, a quantificação da biomassa de biofilme é feita por métodos convencionais, o que se torna trabalhoso e demorado (Donlan et al., 2002). Nos últimos anos, vários ensaios de

quantificação de biofilme em microplacas foram descritos. Estes podem ser classificados em (1) ensaios de quantificação da biomassa do biofilme (com base na quantificação da matriz e de células viáveis); (2) quantificação de matriz (de acordo com a coloração específica dos componentes da matriz); (3) avaliação da viabilidade celular (de acordo com a quantificação de células viáveis) (Peeter et al., 2008).

### **1.9.1. Quantificação da biomassa de biofilmes**

Existem alguns métodos que são usados na quantificação do biofilmes, nomeadamente, a coloração de violeta de cristal (CVC) e o corante fluorogénico Syto9.

A coloração por violeta de cristal foi o primeiro método descrito em 1985 por Christensen et al., e, desde então, tem vindo a ser otimizado para aumentar a sua precisão e permitir a quantificação da biomassa do biofilme no poço inteiro. O CVC é um corante básico, que se liga às moléculas da superfície de carga negativa e polissacarídeos na matriz extracelular. No entanto, como todas as células coram, mesmo as inativas, este método é pouco adequado para avaliar a viabilidade do biofilme (Christensen et al., 1985; Li et al., 2003; Peeter et al., 2008).

O corante fluorogénico Syto9 difunde passivamente através das membranas celulares e liga-se ao DNA das células (viáveis e não viáveis)(Peeter et al., 2008). Como o DNA é também uma parte substancial da matriz extracelular, esta coloração irá proporcionar informação sobre a biomassa total de biofilme. O corante Syto9 tem sido utilizado em microscopia confocal de varrimento a laser (CLSM) e em estudos de composição e morfologia de biofilmes (Strathmann et al., 2002; Peeter et al., 2008).



### 1.9.2. Quantificação da matriz de biofilmes

A quantificação da matriz pode ser outra forma de avaliar o biofilme. Tem havido um aumento de interesse ao nível da quantificação da matriz, um componente essencial, do biofilme.

O corante *1,9-dimethyl methylene blue* (DMMB), aplicado principalmente na quantificação de glicosaminoglicanos sulfatados em culturas de condrócitos, tem também sido utilizado para quantificar as matrizes de biofilmes nomeadamente da bactéria *Staphylococcus aureus* (Tote et al., 2007; Peeter et al., 2008). O DMMB forma um produto altamente insolúvel com os polissacarídeos sulfatados presentes na matriz do biofilme. A quantificação passa pela dissolução em solvente adequado do precipitado formado que é posteriormente medido espectrofotometricamente e a quantidade do corante libertado refletindo a quantidade de polissacáridos sulfatados presentes na matriz do biofilme (Barbosa et al., 2003; Peeter et al., 2008).

### 1.9.3. Quantificação da viabilidade celular

Para diferenciar as células viáveis das não viáveis, várias técnicas de quantificação com base na atividade metabólica das células têm vindo a ser descritas. Vários corantes de viabilidade envolvem o uso de sais de tetrazólio, tais como o *5-cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride* (CTC), o *2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide* (XTT) e o *[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]* (MTT)

O ensaio MTT, sugerido pela primeira vez por Mossman (1983), foi modificado por Dias *et al.* (1999), especificamente para células de *Tetrahymena*

*pyriformis* em suspensão em placas de 96 poços. Este método avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução metabólica do MTT por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, de que resulta a produção de cristais de formazan, intensamente coloridos, no interior das células. Estes podem ser observados ao microscópio ou extraídos e dissolvidos com solventes orgânicos, como por exemplo o dimetilo sulfóxido (DMSO), permitindo a sua quantificação através de espectrofotometria. (Mossman, 1983; Dias et al., 1999; Freimoser et al., 1999).

As células microbianas viáveis são também capazes de converter o diacetato de fluoresceína (FDA), um composto sem cor e sem emissão por fluorescência num altamente fluorescente, a fluoresceína, através da ação das esterases.

Outro ensaio da viabilidade baseia-se na redução da resazurina a resorufina por células metabolicamente ativas. Embora este corante, também conhecido como azul de alamar, seja usado principalmente em ensaios de viabilidade de células de mamíferos, tem também sido aplicado a células de microrganismos, nomeadamente a *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus mutans* (Palomino et al., 2002; Peeter et al., 2008).

Todos estes métodos avaliam a atividade metabólica das células por redução do corante adicionado. No entanto atendendo ao custo dos reagentes, o teste da resazurina é o menos dispendioso.

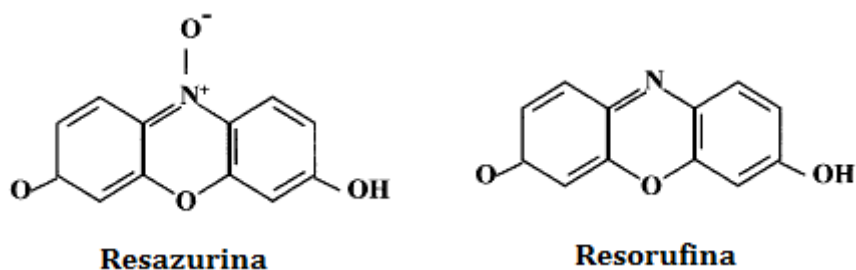
#### **1.9.3.1. Teste da resazurina**

O teste da resazurina é o teste *in vitro* ideal para avaliar a proliferação celular e a citotoxicidade. É um teste de viabilidade celular, simples, rápida, eficaz,

fiável, sensível, e seguro. Desde 1993, a resazurina tem vindo a ser estudada para dar respostas neste sentido (O'Brien et al., 2000).

A resazurina (Figura 1.4) é um corante de oxidação-redução (redox), não tóxico, solúvel em água que é reduzido intracelularmente a um composto fluorescente, resorufina, por enzimas no sistema de transporte de eletrões (Fait al., 2009). Após sofrer a redução, muda de cor azul (resazurina) a cor rosa (resorufina). A resorufina é um produto também solúvel em água e que pode ser medido por espectrofotometria no visível ou por fluorescência.

À semelhança do que acontece nos métodos escritos anteriormente, este método avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução metabólica da resazurina por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, resultando na produção do composto resorufina (Mariscal et al., 2009).



**Figura 1.4** – Estruturas químicas da resazurina e da resorufina (O'Brien 2000).

As aplicações da resazurina são sobretudo ao nível da medição de atividade celular, no entanto, tem sido utilizada em ambientes de pesquisa clínica em testes de susceptibilidade de microrganismos patogénicos e ainda como biossensor de poluentes orgânicos (Tizzard et al., 2006). Recentemente, a resazurina tem sido utilizada como ensaio *screening* na quantificação de biofilmes microbianos. Sandberg *et al.*, (2009) mostrou que o método de coloração resazurina fornece um

protocolo de triagem rápido, simples na quantificação de biofilmes. No entanto, devem ter-se em conta fatores que afetem a qualidade do sinal fluorescente. Em primeiro lugar, diferentes bactérias podem metabolizar o corante de forma diferente, e impor a necessidade de estabelecer um tempo de incubação ótimo de corante em cada um dos casos. Em segundo lugar, o teste funciona apenas com concentrações relativamente elevadas de  $>10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Assim, outros métodos de quantificação devem ser aplicados quando se trabalha com concentrações baixas de células. Terceiro, as relações entre o sinal de fluorescência medido em ensaios de triagem e contagem de placas de biofilme só pode ser estabelecido por meio da curva de calibração com biofilmes, e não com células planctónicas.

### **1.10. Objetivo do trabalho experimental**

Com este trabalho pretendeu-se avaliar a aplicabilidade do efeito fotodinâmico no controle de biofilmes microbianos, usando uma porfirina tetracatiónica (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me) como fotossensibilizador. Para tal, usou-se como modelos biológico duas bactérias (*Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) e um fungo unicelular (*Candida albicans*), frequentemente, encontrados em biofilmes. A ação fotodinâmica foi estudada em relação a fatores considerados como determinantes na eficiência de fotoinativação: (a) células em suspensão (forma planctónica) *versus* biofilme (forma séssil); (b) concentração de PS; (c) tempo de irradiação do PS com as células.

## **Capítulo II**

---

## **Material e Métodos**

---

## 2.1. Microrganismo e condições de crescimento

Para as experiências de inativação foram usadas bactérias e fungos de diferentes origens, cuja capacidade para formação de biofilmes é conhecida e documentada na literatura. Escolheu-se a bactéria Gram (+) *Staphylococcus aureus*), a bactéria Gram (-) *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo unicelular (*Candida albicans*). A estirpe de *Pseudomonas aeruginosa* tem origem ambiental e foi isolada da microcamada superficial marinha da Ria de Aveiro (Louvado et al., 2012). A estirpe de *Staphylococcus aureus* ATCC ® 700699 foi repicada a partir de um sistema comercial (Culti-loop, Thermo-Scientific). A estirpe de *Candida albicans* foi cedida pela coleção de culturas para aulas do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

## 2.2 Condições de cultura

Antes de cada ensaio, foram preparadas culturas frescas dos isolados bacterianos a partir de culturas em *Tryptic Soy Agar* (TSA, Merck) conservadas no frigorífico (4 °C). As bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus* foram repicadas pelo menos duas vezes em *Tryptic Soy Broth* (TSB, Merck) e incubadas a 37 °C com agitação a 130 rpm. A primeira repicagem foi realizada por inoculação de uma colónia isolada, da placa de TSA, em 10 mL de TSB, e incubada a 37 °C durante 24 horas. Desta cultura retirou-se 100 µL que se inoculou em 10 mL de TSB. A nova cultura foi também incubada a 37°C.

As culturas da levedura *C. albicans* foram mantidas no frigorífico a 4 °C em meio *Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar* (YGCA, Merck), entre ensaios. As culturas frescas foram obtidas por repicagem de uma colónia isolada para *Yeast*

*Extract Glucose Chloramphenicol* (YGC, Merck) e incubadas a 37 °C a 130 rpm durante 24 horas. Desta cultura foi retirada uma alíquota de 100 µL que foi inoculada num erlenmeyer de 100 mL em 10 mL de YGC e incubada com agitação a 37 °C durante 18 horas.

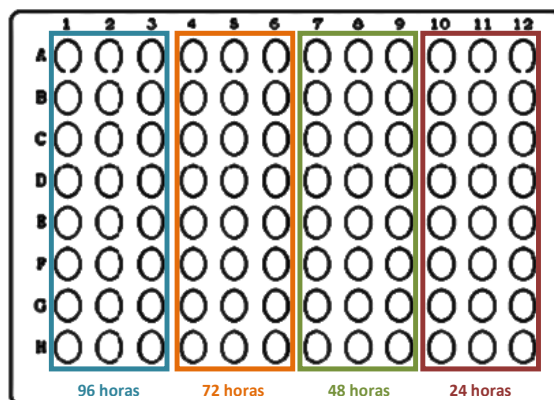
As culturas frescas foram incubadas até obtenção de uma absorvância a 600 nm, de  $\approx 0,8$  para as bactérias e de  $\approx 0,7$  para o fungo.

### **2.3. Otimização das condições de preparação de biofilmes**

Os biofilmes foram obtidos a partir de culturas frescas em meio líquido. Antes de cada ensaio, as culturas foram repicadas duas vezes, em meio apropriado para cada microrganismo e incubadas durante a noite a 37 °C até se obter, D.O.<sub>600</sub>  $\approx 0,8$  ( $\approx 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) para as bactérias e D.O.<sub>600</sub>  $\approx 0,7$  ( $\approx 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) para fungos. Para otimizar o tempo necessário ao desenvolvimento do biofilme transferiu-se 100 µL de cada cultura para cada um de 24 poços de uma microplaca de 96 poços (Greiner) e incubou-se a 37 °C durante 24 horas. Passado este período de incubação voltou a transferir-se 100 µL de uma nova cultura fresca para uma segunda série de 24 poços da mesma placa e incubou-se por mais 24 horas. Estes últimos passos mais duas vezes de modo a obter, na mesma placa, poços com biofilmes de 24, 48, 72 e 96 horas (Figura 2.2) nas mesmas condições de incubação. No final da incubação o líquido de cada poço foi cuidadosamente rejeitado. Como medida de desenvolvimento do biofilme aderente às paredes dos poços usou-se o teste de redução da resazurina (Sigma, Merck). A cada poço adicionou-se 20 µL de uma solução de resazurina a 0,1 mg/mL, e incubou-se durante 3 horas a 37 °C. Durante a incubação procedeu-se à leitura de D.O.<sub>600</sub> (cor



azul) de 30 em 30 minutos num leitor de microplacas (Multiskan Thermo Scientific), a fim de se saber qual o tempo de incubação mais adequado à discriminação entre biofilmes com diferente grau de desenvolvimento.



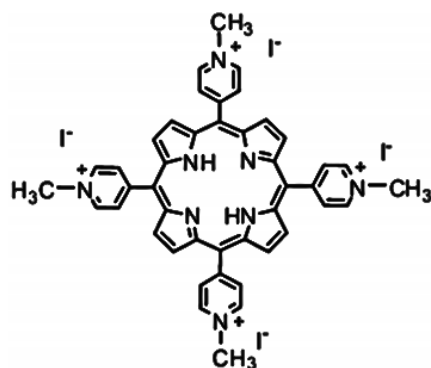
**Figura 2.1** - Esquema de inoculação e incubação numa microplacas de 96 poços, que permitiu obter biofilmes com diferentes graus de desenvolvimento.

## 2.4. Ensaio de inativação fotodinâmica

Os ensaios de inativação tiveram como objetivo avaliar o efeito fotodinâmico sobre biofilmes microbianos e sobre as células livres correspondentes. Assim, seguiu-se desenhos experimentais diferentes para cada um dos tipos de material biológico (biofilmes ou suspensões de células).

### 2.4.1. Fotossensibilizador

Como fotossensibilizador foi usada a porfirina tetra-iodeto 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il)porfirina (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me) cuja estrutura está representada na Figura 2.1. A solução de trabalho (500  $\mu$ M) foi preparada em dimetilo sulfóxido (DMSO). A porfirina foi sintetizada pelo grupo de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.



**Figura 2.2** - Representação estrutural da porfirina tetra-iodeto 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il)porfirina testada nos ensaios de inativação fotodinâmica de microrganismos.

### 2.4.2. Condições de irradiação

Como fonte de luz usou-se uma montagem de 13 lâmpadas fluorescentes (OSRAM 21 18 W) emitindo radiação PAR 380-700 nm com uma intensidade de 40 W.m<sup>-2</sup>. A intensidade da luz emitida foi determinada com um medidor de luz LICOR Modelo LI-250, Li-Cor inc., USA. A irradiação foi conduzida, a temperatura ambiente durante 270 minutos, sendo as amostras mantidas de baixo de uma plataforma de agitação sob agitação mecânica (100 rpm).

### 2.4.3. Controlos

Em cada ensaio de inativação fotodinâmica foram incluídos dois controlos: controlo escuro e controlo claro. Nas experiências com células em suspensão, o controlo escuro consistiu numa suspensão microbiana em tampão salino de fosfato (PBS: 4 g de NaCl, 0,1 g de KCl, 0,12 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,72 g de Na<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub>, para um volume final de 500 mL de H<sub>2</sub>O, a um pH 7,4 ± 0,2), adicionado da concentração de PS máxima testada (20 µM) e protegido da luz com papel de alumínio. Nos ensaios com biofilmes o controlo escuro foi preparado de modo idêntico aos testes mas

mantidos ao abrigo da luz. O controlo claro em ambos os ensaios (células em suspensão e biofilmes) consistiu de uma montagem experimental idêntica à dos testes e sujeita às mesmas condições de irradiação mas sem adição de PS. Ambos os controlos foram submetidos ao mesmo período de pré incubação que as amostras testadas.

#### **2.4.4. Ensaios de inativação fotodinâmica de biofilme**

##### **2.4.4.1. Avaliação da inibição da atividade metabólica pelo teste de resazurina**

Para avaliar de forma expedita o efeito da inativação fotodinâmica em biofilmes, foi utilizado o teste da resazurina. Os biofilmes foram preparados de acordo com o procedimento descrito em 2.3. Para cada ensaio transferiu-se 100 µL da suspensão para cada poço das microplacas de 96 poços e incubou-se a 37 °C durante 24 h para a *P. aeruginosa* ou 48 h para a *S. aureus* e *C. albicans*. No caso dos biofilmes mistos (*S. aureus* e *C. albicans*), transferiu-se 100 µL de suspensão bacteriana e 100 µL de suspensão de levedura e incubou-se a 37 °C durante 48 h (tempo ótimo de desenvolvimentos das duas espécies em separado). No final da incubação, o excesso de líquido dos poços foi removido e adicionou-se 200 µL de solução de Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. As soluções de Tetra-Py<sup>+</sup>-Me foram preparadas por diluição da solução stock (500 µM) em PBS de modo a obter as concentrações finais 5 µM, 10 µM ou 20 µM. As placas foram protegidas da luz e sujeitas a um período de pré-incubação de 30 min no escuro à temperatura ambiente (25-28 °C). Após esse período o excesso de Tetra-Py<sup>+</sup>-Me foi retirado de todos os poços. Antes da irradiação, foram adicionados 200 µL de PBS de modo a que os poços ficassem

hidratados durante a exposição à luz. De seguida procedeu-se à irradiação durante 270 min. Após a irradiação adicionou-se a cada poço 20 µL de uma solução de resazurina a 0,1 mg/mL esterilizada por filtração. Incubou-se a 37 °C durante 90, 150, 180 ou 150 minutos para biofilmes de *C. albicans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* e biofilmes mistos (*C. albicans* e *S. aureus*) respetivamente. Os tempos de incubação com resazurina foram determinados após ensaios preliminares. Leu-se a absorvância a 600 nm num leitor de microplacas (Multiskan Thermo Scientific). A inativação foi avaliada através do quociente entre a absorvância a 600 nm em cada tempo de irradiação ( $A_{t_n}$ ) sobre a absorvância no tempo zero ( $A_{t_i}$ ).

#### **2.4.4.2. Avaliação direta por contagem de colónias**

As experiências de irradiação foram montadas de acordo com o descrito em.

2.4.4.1. Após a pré-incubação, procedeu-se a irradiação nas condições descritas anteriormente.

#### **2.4.5. Ensaios de inativação fotodinâmica de células em suspensão**

As suspensões microbianas usadas nas experiências de irradiação foram preparadas a partir das soluções incubadas durante a noite  $D.O._{600} \approx 0,8$  ( $\approx 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) para as bactérias e  $D.O._{600} \approx 0,7$  ( $\approx 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) para fungos por diluição de 1/10 em PBS. Em cada ensaio transferiu-se, em condições de asséptica, para copos de vidro de 100 mL esterilizados, 1 mL da suspensão microbiana, um volume conveniente (da solução *stock* de 500 µM) de Tetra-Py<sup>+</sup>-Me de modo a obter as concentrações finais de 5 µM, 10 µM ou 20 µM. A cada copo adicionou-se PBS de modo a perfazer um volume total de 10 mL. Após da adição do PS, as

amostras e controlos foram de imediato protegidos da luz com papel de alumínio e sujeitos a um período de pré-incubação no escuro de 15 minutos, para as suspensões de bactéria, ou 60 minutos para as suspensões de levedura, com agitação (100 rpm), à temperatura ambiente (25-28 °C) para permitir a adsorção do PS às células. Após a pré-incubação, procedeu-se a irradiação nas condições descritas anteriormente.

#### **2.4.6. Quantificação das unidades formadoras de colónias (UFCs)**

A inativação fotodinâmica de cada microrganismo nas experiências com suspensões de células e com biofilmes foi avaliada pela quantificação do teor de unidades formadoras de colónias em alíquotas colhidas durante o período de irradiação. O teor de microrganismos viáveis é expresso em UFC.mL<sup>-1</sup>. Nas experiências com suspensões de células, após irradiação, as alíquotas foram diluídas em PBS e foram semeadas duas réplicas de cada uma das diluições convenientes. Para a quantificação de bactérias, semeou-se por incorporação em TSA e para a levedura semeou-se à superfície em YGCA. As colónias foram contadas na diluição mais conveniente após 24 h de incubação a 37 °C para as bactérias e 48 h para a levedura. No caso das experiências com biofilmes, o procedimento experimental foi análogo. No entanto nestas experiências, antes da diluição das alíquotas, as placas foram sujeitas a agitação mecânica para ressuspender as células aderentes às paredes dos poços das microplacas. No caso das experiências com biofilmes mistos (*S. aureus* e *C. albicans*) foi necessário semear as alíquotas já diluídas em PBS em dois meios diferentes. Para a quantificação da bactéria *S. aureus*, semeou-se por incorporação em *Baird-Parker Agar* (BPA, Merck) e para a

levedura semeou-se à superfície em YGCA. A inativação foi avaliada através do fator de sobrevivência, que consiste no quociente entre o teor de UFC em cada tempo ( $t_n$ ) e o teor inicial ( $t_0$ ). Para cada condição experimental foram realizados três ensaios independentes.

#### **2.4.7. Ligação do fotossensibilizador ao material biológico**

Para a determinação da quantidade de PS efetivamente ligado ao material biológico seguiu-se o procedimento descrito em Demidova et al., (2005), adaptado às condições experimentais e microrganismos utilizados.

Para a quantificação da adsorção da Tetra-Py<sup>+</sup>-Me às células em suspensão, preparou-se uma suspensão microbiana ( $\approx 10^8$  células.mL<sup>-1</sup>, para as bactérias; e  $\approx 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> para fungos) e incubou-se durante 15 min, para as bactérias, ou 60 minutos, para a levedura, no escuro à temperatura ambiente (25-28 °C) com as mesmas concentrações de PS usadas nos ensaios de inativação fotodinâmica (5, 10 e 20  $\mu$ M). Numa série de microtubos colocou-se 1 mL da suspensão que esteve a incubar com a Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. As células foram recolhidas por centrifugação (Thermo Scientific, Heraeus Pico 17 centrifuge) (130 rpm, durante 15 min) e, após a rejeição do sobrenadante contendo o PS não ligado, o *pellet* foi lavado com 1 mL de PBS. Após nova centrifugação, foi rejeitado o sobrenadante e adicionou-se ao *pellet* 1 mL de uma solução de digestão contendo 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de NaOH e 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS). As amostras foram incubadas no escuro, à temperatura ambiente até se tornarem límpidas.

Para a quantificação da adsorção do PS às células de biofilmes, o procedimento experimental foi semelhante ao das células em suspensão. Preparou-se uma suspensão microbiana ( $\approx 10^8$  células.mL<sup>-1</sup>, para as bactérias; e

≈10<sup>7</sup> células.mL<sup>-1</sup> para fungos). Para a obtenção de biofilmes colocou-se 1mL dessa suspensão para uma série de microtubos (no caso dos biofilmes mistos adicionou-se 500 µL da suspensão bactérias e 500 µL da suspensão de levedura) e incubou-se a 37 °C durante 24 h para a *P. aeruginosa* ou 48 h para *S. aureus*, *C. albicans* e biofilmes mistos. Passado o tempo pré-definido, retirou-se cuidadosamente o sobrenadante e incubou-se no escuro à temperatura ambiente (25-28 °C) com as concentrações de 5, 10 e 20 µM de PS, durante 30 min. As células foram destacadas da superfície por agitação mecânica no vórtex e recolhidas por centrifugação (Thermo Scientific, Heraeus Pico 17 centrifuge) (130 rpm, durante 15 min). Após a rejeição do sobrenadante contendo o PS, o *pellet* foi lavado com 1 mL de PBS. Após nova centrifugação, foi rejeitado o sobrenadante e adicionou-se ao *pellet* 1 mL da solução de digestão contendo 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de NaOH e 2% de SDS. As amostras foram incubadas no escuro, à temperatura ambiente até se tornarem límpidas. A concentração de PS foi determinada por fluorescência utilizando-se um espectofluorímetro Fluoromax 3 (Horiba Jobin Yvon). As amostras foram excitadas na região da banda Soret (420 nm) e a emissão registada no intervalo de 600-750 nm. A concentração de PS foi calculada por interpolação, usando uma reta de calibração, previamente construída por adição de concentrações conhecidas de PS à solução de digestão. Em paralelo, fez-se a quantificação das células viáveis de cada microrganismo (UFC.mL<sup>-1</sup>) na suspensão de células ou biofilme inicial. As alíquotas das suspensões microbianas incubadas foram diluídas em série em PBS e semeadas, em triplicado, em TSA ou YGCA para a contagem de colónias de bactérias ou de leveduras, respetivamente. A quantidade de PS ligada ao material biológico foi expressa em moléculas PS.UFC<sup>-1</sup>. Para cada condição experimental foram realizados três ensaios independentes.

## **Capítulo III**

---

**Resultados**

---

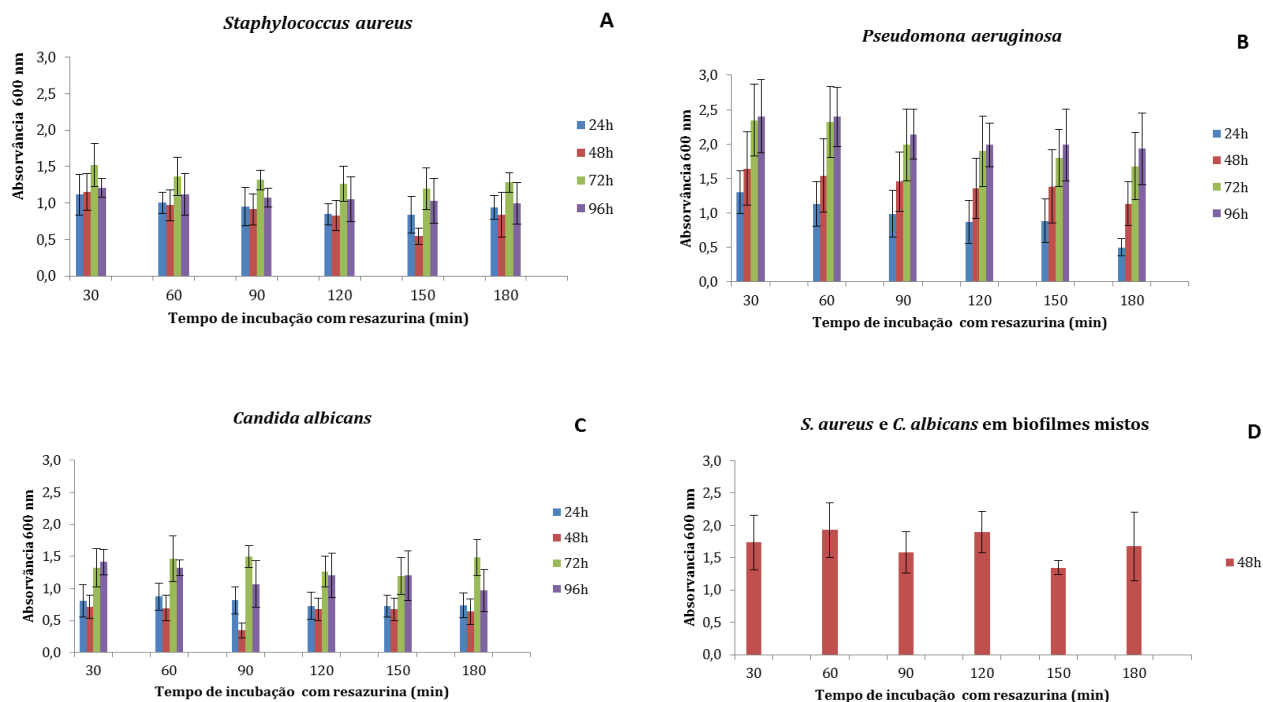


### 3.1. Otimização dos tempos de desenvolvimento do biofilme e de quantificação pelo método da resazurina

Antes de se proceder aos ensaios de inativação fotodinâmica em biofilmes realizaram-se ensaios preliminares com vista a otimização das condições experimentais a implementar nas experiências de inativação. Foram testados quatro tempos de incubação de desenvolvimento do biofilme (24, 42, 72 e 96 h) e seis tempos de incubação para o ensaio de redução da resazurina (30, 60, 90, 120, 150 e 180 min).

Na figura 3.1 encontram-se representados os resultados das leituras de absorvância a 600 nm (cor azul/forma oxidada da resazurina) correspondentes a cada uma das condições experimentais testadas em *S. aureus* (Figura 3.1 A), *P. aeruginosa* (Figura 3.1 B), *C. albicans* (Figura 3.1 C) e biofilmes mistos de *S. aureus* e *C. albicans* (Figura 3.1 D). De um modo geral observou-se um aumento da absorvância a 600 nm com o aumento do tempo de desenvolvimento do biofilme, o que indica diminuição da atividade respiratória. Este padrão foi mais nítido em *P. aeruginosa* em que os biofilmes de 96 h apresentam a maior absorvância a 600 nm enquanto que o valor mais baixo foi obtido em biofilmes de 24 h. Em *S. aureus* e *C. albicans*, os valores máximos de atividade do biofilmes, correspondentes aos valores mínimos de absorvância a 600 nm, foram registados em biofilmes de 48 h. Para a preparação de biofilmes mistos optou-se pela incubação de 48 h, uma vez que era a este tempo de incubação correspondente aos valores mínimos de absorvância nos biofilmes puros correspondentes.

Os resultados do teste de redução da resazurina não revelaram efeito significativo do tempo de incubação (30 a 180 min) na presença do substrato, em nenhum dos microrganismos testados.



**Figura 3.1** – Resultados do teste de resazurina (DO 600nm) com tempos de incubação de 30 a 180 min. aplicado a biofilmes de *Staphylococcus aureus* (A), *Pseudomonas aeruginosa* (B), *Candida albicans* (C) ou biofilmes mistos de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (D). As barras de erro correspondem ao desvio padrão dos resultados de 3 ensaios independentes.

Considerando os resultados obtidos nos ensaios preliminares, usou-se um tempo de incubação de 24 h para o desenvolvimento dos biofilmes de *P. aeruginosa* e 48 h para os biofilmes de *S. aureus* e *C. albicans* bem como para os biofilmes mistos (*S. aureus* e *C. albicans*). Os tempos de incubação com resazurina foram de 150, 180, 90 e 150 min, respectivamente, em cada tipo de biofilme, correspondendo aos tempos com menores valores da absorbância e menores desvios entre réplicas.

### **3.2. Ensaio de inativação fotodinâmica de biofilmes**

A inativação de biofilmes foi avaliada de forma indireta pelo ensaio com resazurina e confirmada de forma direta por contagem de colónias.

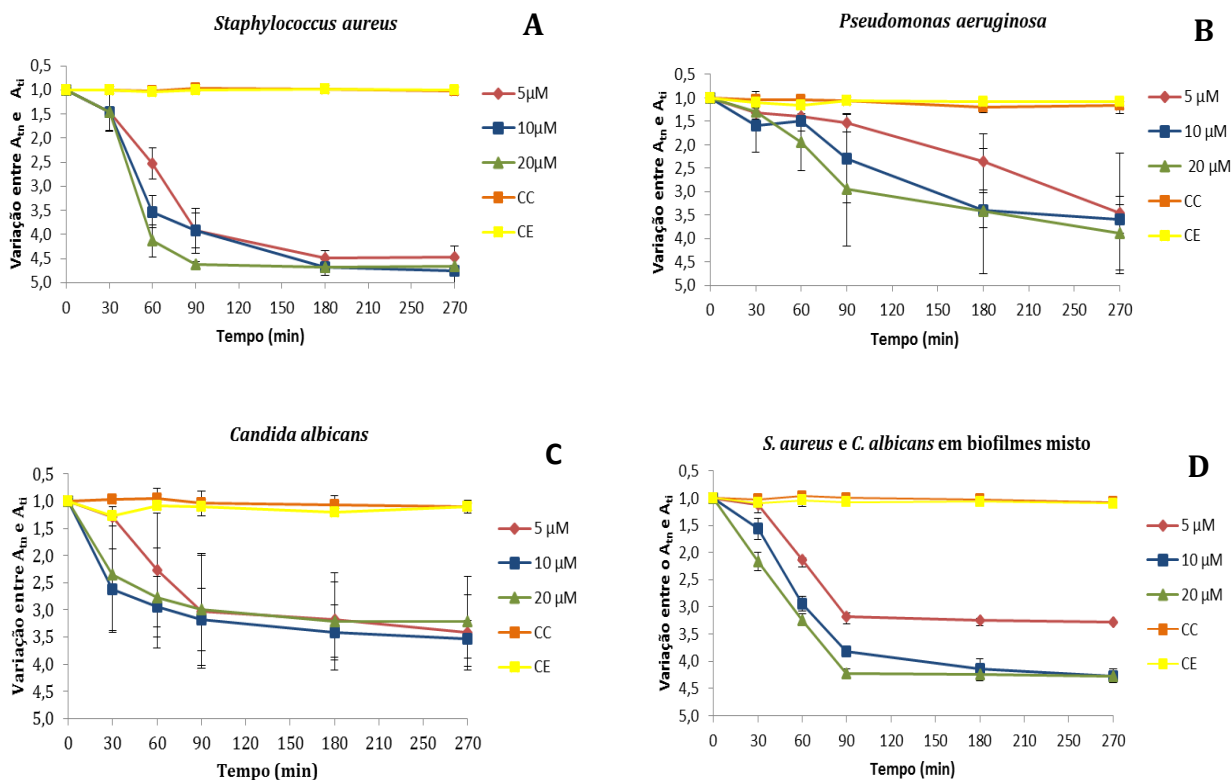
#### **3.2.1. Avaliação indireta da atividade microbiana pelo ensaio da resazurina**

Os resultados dos ensaios de inativação fotodinâmica de biofilmes microbianos, de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e de biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. aureus*, utilizando o ensaio de redução da resazurina como medida indireta de atividade das células, encontram-se apresentados na Figura 3.2.

O efeito da inativação fotodinâmica corresponde à perda de atividade e assim traduz-se em maiores valores de absorvância a 600nm. Verificou-se que ocorreu inativação de todos os biofilmes mono-específicos, traduzida por maiores valores de absorvância, ou seja, menor redução da resazurina. O fator de inativação variou com a concentração de fotossensibilizador, sendo maior para a concentração máxima testada (20  $\mu$ M). Nos biofilmes de *S. aureus* (Figura 3.2 A) a inativação correspondeu a uma variação de aproximadamente 3,6 dos valores de absorvância registados entre as amostras expostas a 20  $\mu$ M de PS durante 270 minutos de irradiação. No entanto, verificou-se que a maior redução de atividade (aumento de  $\approx$ 3,1 no valor de absorvância a 600 nm) ocorreu nos primeiros 60 minutos de irradiação. Nos biofilmes de *P. aeruginosa* (Figura 3.2 B) a inativação ocorreu de forma progressiva durante todo o período de irradiação sem que se atingisse uma plataforma estável. A redução máxima

foi registada no fim da irradiação (270 minutos) e corresponde a um fator de variação de aproximadamente 2,9 da absorvância a 600 nm, na concentração de 20  $\mu\text{M}$  e após 270 min de irradiação. Nos biofilmes de *C. albicans* (Figura 3.2 C) a inativação ocorreu de forma análoga à dos biofilmes de *S. aureus*. Assim, de um modo geral, a maior redução de atividade, correspondente a um fator de variação da absorvância de 1,6, ocorreu nos primeiros 30 minutos de irradiação, à exceção da amostra testada com 5  $\mu\text{M}$  de PS onde a redução máxima observada foi aos 90 minutos de irradiação. Com base na variação de absorvância pode-se dizer que a inativação fotodinâmica com a porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me foi mais eficiente nos biofilme de *S. aureus* e de *C. albicans*. Nos biofilmes mistos de *S. aureus* e *C. albicans* a inativação ocorreu de forma progressiva durante os primeiros 90 minutos atingindo uma plataforma estável. A redução máxima corresponde a um fator de variação de aproximadamente 3,2 da absorvância a 600 nm na concentração de 20  $\mu\text{M}$  e após 90 min de irradiação.

O perfil de variação da atividade microbiana nos controlos claro e escuro indica que o biofilme não foi diretamente afetado pela luz e que o PS testado não é tóxico no escuro.



**Figura 3.2**– Inativação fotodinâmica de biofilmes de *Staphylococcus aureus* (A), *Pseudomonas aeruginosa* (B), *Candida albicans* (C) ou biofilmes mistos de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (D) avaliada pelo ensaio de resazurina em que absorvância corresponde à intensidade de cor azul da resazurina (forma oxidada), após irradiação com luz PAR ( $40 \text{ W.m}^{-2}$ ) na presença de 5, 10 e 20  $\mu\text{M}$  de porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me.  $A_{tn}$  representa os valores de absorvância após cada período de irradiação e  $A_{ti}$  representa o valor de absorvância inicial. Os pontos representam o valor médio e as barras de erro representam o desvio padrão de 3 ensaios independentes. As linhas correspondem à interpolação dos valores entre os pontos consecutivos.

### 3.2.2. Avaliação direta por contagem de colônias

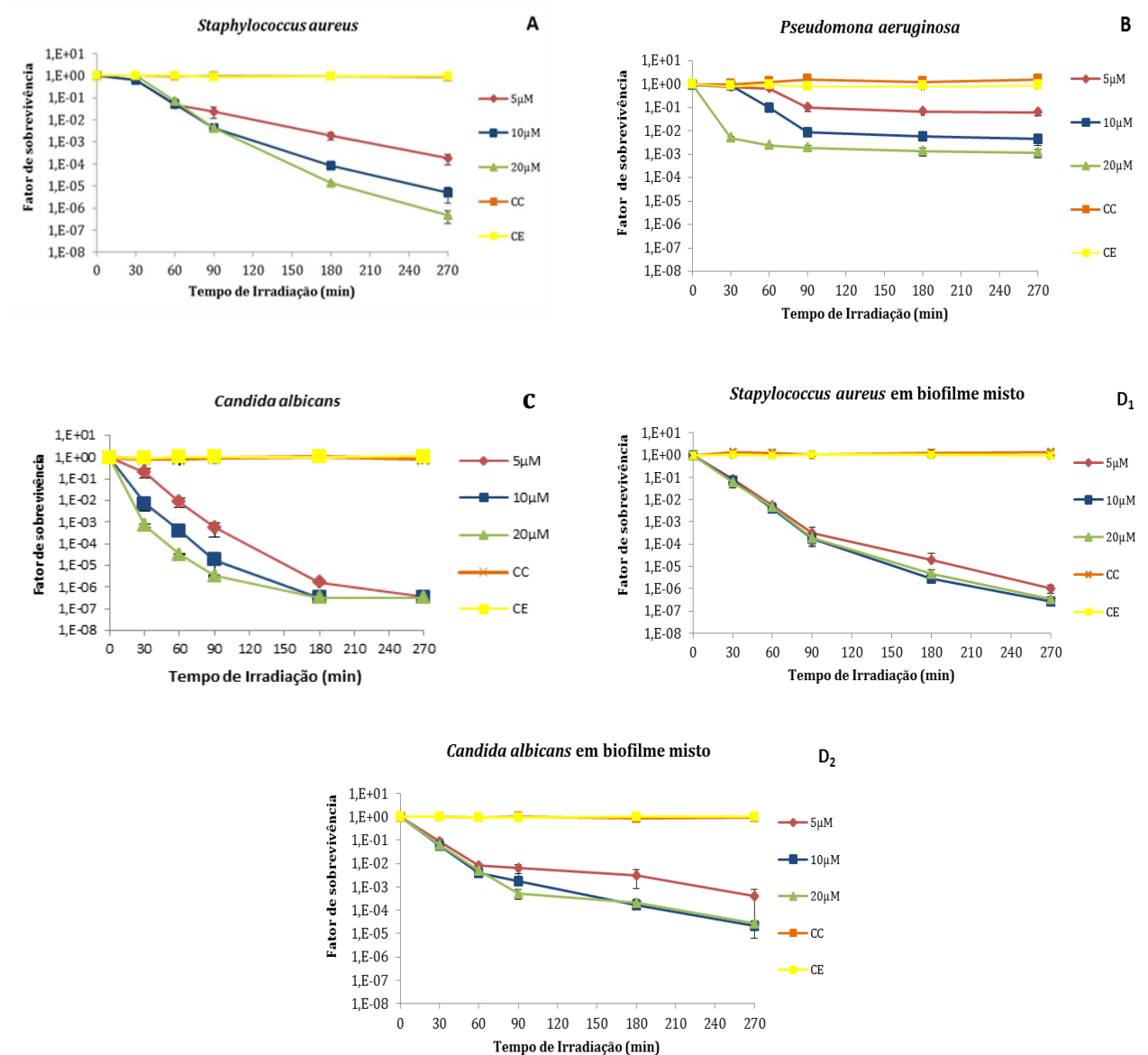
A atividade fotodinâmica da Tetra-Py<sup>+</sup>-Me em biofilme também foi avaliada diretamente por contagem de colônias. Assim, os resultados encontram-se representados na Figura 3.3.

Os ensaios de inativação com diferentes concentrações de Tetra-Py<sup>+</sup>-Me., mostraram inativação de todos os biofilmes testados, traduzido pela redução da fração de células cultiváveis (UFC). De um modo geral, o fator de sobrevivência variou com a concentração de fotossensibilizador, sendo maior para a concentração máxima testada (20 µM).

Nos biofilmes de *S. aureus* (Figura 3.3 A) a inativação ocorreu de forma progressiva durante todo o período de irradiação sem que se atingisse uma plataforma estável. O fator de sobrevivência mínimo foi registado no fim da experiência (270 min), para a concentração de 20 µM e corresponde a uma redução  $\approx 7$  log na concentração de células viáveis. Nos biofilmes de *P. aeruginosa* (Figura 3.3 B) a inativação atingiu uma plataforma estável ao fim de 90 minutos de irradiação. O fator de sobrevivência mínimo foi de  $10^{-3}$  registado ao fim de 60 min, para a concentração de 20 µM. Nos biofilmes de *C. albicans* (Figura 3.3 C) a redução máxima ( $\approx 7$  log na concentração de sobreviventes) ocorreu ao fim de 270 min de irradiação numa concentração de 5 µM. Nas concentrações mais elevadas (10 µM e 20 µM) a maior inativação foi observada ao fim de 180 min, o que correspondeu a uma redução de 7 log no teor de sobreviventes. Assim, com base no fator de sobrevivência, o biofilme que se revelou mais sensível à inativação fotodinâmica com Tetra-Py<sup>+</sup>-Me foi o de *S. aureus* e o menos sensível foi o biofilme formado pela *P. aeruginosa*.

No biofilme misto, o fator de sobrevivência de *S. aureus* no final da experiência (270 min) foi de aproximadamente  $10^{-7}$  (Figura 3.3 D<sub>1</sub>). Nos mesmos biofilmes, *C. albicans* (Figura 3.3 D<sub>2</sub>) sofreu uma redução de aproximadamente 5 log, ao fim de 270 min de irradiação. Em biofilmes mistos, a sobrevivência de *C. albicans* foi maior do que nos biofilmes mono-específicos. Esta diferença não se verificou em *S. aureus*.

Não se observou nenhuma fototoxicidade induzida pela luz nem toxicidade do PS no escuro, mantendo os controlos claro e escuro, valores muito semelhantes ao longo do tempo.



**Figura 3.3** – Inativação fotodinâmica de biofilmes de *Staphylococcus aureus* (A), *Pseudomonas aeruginosa* (B), *Candida albicans* (C) ou biofilmes mistos de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (D) avaliada pela contagem de colónias após irradiação com luz PAR (40 W.m<sup>-2</sup>) na presença de 5, 10 e 20 μM de porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. Os pontos representam o valor médio e as barras de erro representam o desvio padrão de 3 ensaios independentes. As linhas correspondem à interpolação dos valores entre os pontos consecutivos.

### 3.3. Ensaio de inativação fotodinâmica de células em suspensão

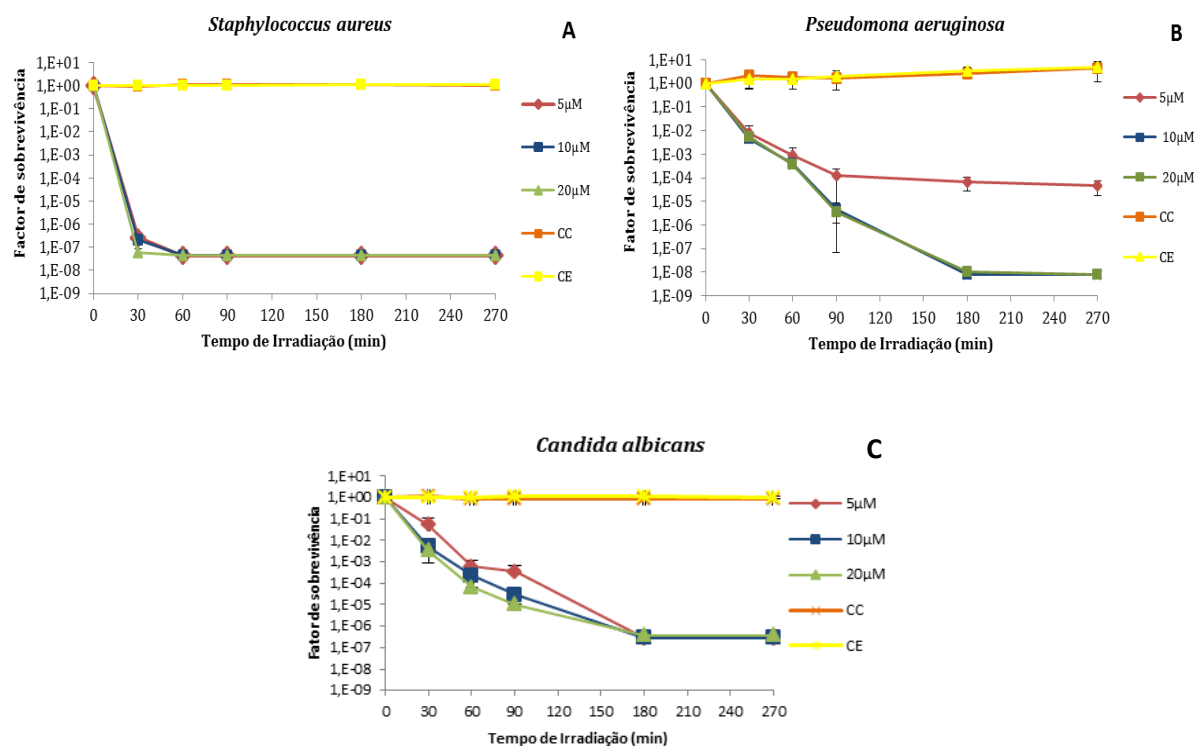
Os resultados dos ensaios de inativação fotodinâmica de células em suspensão de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* utilizando a contagem de colônias como medida direta do teor de células viáveis estão representados na Figura 3.4. Verificou-se que ocorreu inativação de todos os microrganismos testados. De um modo geral, o fator de sobrevivência variou com a concentração de Tetra-Py<sup>+</sup>-Me, sendo nalguns casos maior para a concentração máxima testada (20 µM).

Nos ensaios com *S. aureus* (Figura 3.4 A) a inativação atingiu uma plataforma estável ao fim de 60 min de irradiação. A variação máxima foi registada no fim de 30 min da irradiação nas três concentrações testadas e correspondeu a uma redução de  $\approx 7$  log na concentração de células cultiváveis. Nos ensaios com *P. aeruginosa* (Figura 3.4 B) a inativação atingiu uma plataforma estável ao fim de 90 min de irradiação (redução máxima de  $\approx 4$  log) na concentração de 5 µM. Contudo, a maior redução da concentração de sobreviventes ( $\approx 8$  log) foi registada ao fim de 180 min para as concentrações mais elevadas (10 µM e 20 µM), não sendo as diferenças estatisticamente significativas. Nos ensaios com *C. albicans* (Figura 3.4 C) a maior redução de sobreviventes (fator de sobrevivência de  $\approx 10^{-7}$ ) ocorreu ao fim de 180 minutos de irradiação e foi semelhante para as três concentrações testadas.

O microrganismo mais sensível ao fotossensibilizador foi *S. aureus* e o menos sensível foi a *P. aeruginosa*.

Os resultados obtidos no controlo claro e escuro revelam que não houve inativação direta pela luz nem toxicidade do PS no escuro.



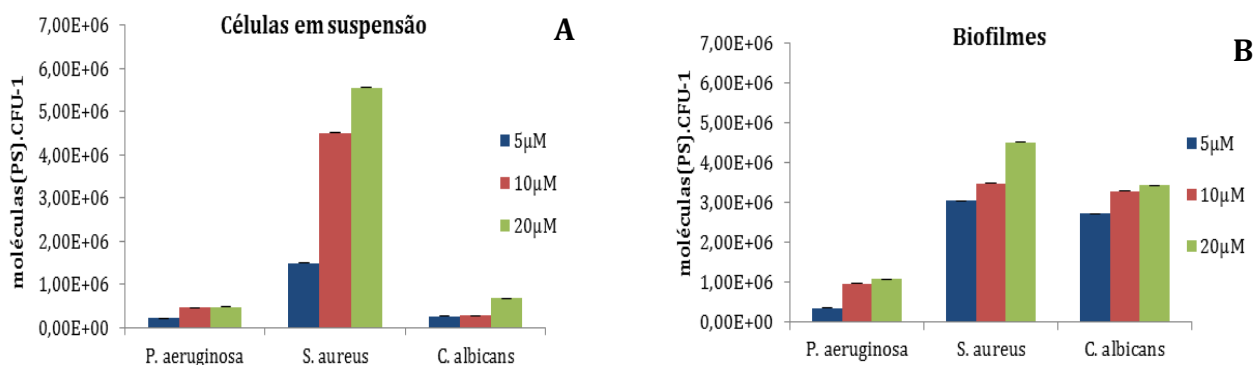


**Figura 3.4** – Inativação fotodinâmica de *Staphylococcus aureus* (A), *Pseudomonas aeruginosa* (B), *Candida albicans* (C) em suspensões celulares, avaliada pela contagem de colónias após irradiação com luz PAR (40 W.m<sup>-2</sup>) na presença de 5, 10 e 20  $\mu$ M de porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. Os pontos representam o valor médio e as barras de erro representam o desvio padrão de 3 ensaios independentes. As linhas correspondem à interpolação dos valores entre os pontos consecutivos.

### 3.4 Ligação do fotossensibilizador ao material biológico

Os resultados da análise da quantidade de fotossensibilizador ligado ao material celular, expresso por UFC, encontram-se representados na Figura 3.5. De um modo geral, a quantidade de PS ligado às células variou em função da concentração aplicada.

Em células livres (Figura 3.5 A) a maior adsorção foi registrada em *S. aureus* ( $5,6 \times 10^6$  moléculas PS.UFC<sup>-1</sup>) e a menor em *C. albicans* ( $6,7 \times 10^5$  moléculas PS.UFC<sup>-1</sup>), para a concentração de 20  $\mu$ M.



**Figura 3.5** – “Uptake” [moléculas (PS).UFCs<sup>-1</sup>] do PS para cada uma das estirpes testadas sob a forma de: A - suspensão (*P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans*) após 15 e/ou 60 minutos de incubação na ausência de luz, sob agitação ( $\approx 100$  rpm), a 25-28 °C; B - biofilme (*P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans*), após 30 minutos de incubação na ausência de luz, sob agitação ( $\approx 100$  rpm), a 25-28 °C.

Em biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa* a adsorção foi idêntica à observada em células em suspensão. No entanto, a fixação do PS em células de *C. albicans* foi maior em biofilmes (Figura 3.5 B) do que em células livres, nas três concentrações testadas. Para a concentração de 20  $\mu$ M a fixação de PS em biofilmes foi de  $3,44 \times 10^6$  moléculas PS.UFC<sup>-1</sup> enquanto que nas células livres foi  $6,50 \times 10^5$  moléculas PS.UFC<sup>-1</sup>.

## **Capítulo IV**

---

### **Discussão e Conclusão**

---

Observações diretas têm mostrado claramente que os microrganismos organizados em biofilme predominam, numérica e metabolicamente, em praticamente todos os ecossistemas onde a disponibilidade de nutrientes seja suficiente. Assim, estes organismos sésseis estão de alguma forma relacionados com a maioria dos problemas ambientais, industriais e médicos e o seu controlo tem vindo a interessar a comunidade científica, com particular ênfase na procura de estratégias para prevenir a de microrganismos tem sido proposta como método alternativo para prevenir o desenvolvimento de biofilmes microbianos. A maioria dos estudos *in vitro* demonstra que a inativação fotodinâmica de microrganismos é de um modo geral mais eficiente do que o tratamento com antibióticos convencionais na redução das populações de biofilme e com grande vantagem de atuar tanto em estirpes resistentes a antibióticos, como em estirpes sensíveis, além de não induzir o desenvolvimento de resistências.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a combinação da porfirina tetra-catiónica com a luz pode representar-se como uma alternativa viável, na inativação de biofilmes.

Neste trabalho foi estudada a capacidade da porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me para inativar os biofilmes produzidos por duas estirpes bacterianas (*S. aureus* e *P. aeruginosa*) e um fungo (*C. albicans*). Para efeito comparativo, foram também realizados ensaios de inativação dos mesmos microrganismos na forma planctónica. O PS usado neste estudo confirmou não ser tóxico na ausência de luz.

A inativação fotodinâmica dos biofilmes foi avaliada de forma indireta, através do teste da resazurina, e de forma direta, por contagem de colónias.

De um modo geral verificou-se que ocorreu inativação fotodinâmica de todos os biofilmes testados. No entanto, o ensaio da resazurina baseia-se em leituras de absorvância. Em algumas situações registaram-se valores bastante elevados pelo que podem não corresponder aos valores corretos, uma vez que não foi feita diluição das amostras mais coradas. Esta abordagem foi, pois, considerada como um método expedito de avaliação preliminar da atividade microbiana no biofilme. Sendo um teste muito pouco dispendioso e de resposta quase imediata, torna-se interessante para testes de *screening* de novos fotossensibilizadores. No entanto, a ação dos compostos mais promissores deve sempre ser confirmada diretamente por contagem de colónias. De facto, houve um paralelismo neste estudo entre os dois métodos mostrando por exemplo que em ambas as abordagens a bactéria Gram (+) *S. aureus* foi o microrganismo mais sensível à ação do PS.

Um dos objetivos deste trabalho foi comparar a eficiência da fotoativação de derivados porfirínicos sobre biofilmes, relativamente à forma livre da mesma espécie, considerando que a organização em biofilme confere aos microrganismos maior resistência ao stresse físico-químico, relativamente às células planctónicas. Assim, seria de esperar maior resistência à inativação fotodinâmica, relativamente às células livres. Os resultados do presente estudo mostram algumas diferenças, particularmente nos resultados obtidos com a bactéria Gram (-) *P. aeruginosa*. De facto, este microrganismo apresentou uma maior resistência sob a forma de biofilme (redução máxima aproximadamente de 3 log na concentração de 20 µM) em comparação com a forma livre (redução máxima aproximadamente de 8 log na

concentração de 20  $\mu\text{M}$ ). Em *S. aureus* e *C. albicans* esperar-se-ia também uma maior resistência à inativação fotodinâmica por parte destes microrganismos organizados sob a forma de biofilme. No entanto apesar das diferenças serem pouco significativas, observou-se também que estes dois microrganismos (*S. aureus* e *C. albicans*) organizados sob a forma de células livres possuem uma maior sensibilidade à inativação fotodinâmica. No que diz respeito à bactéria *S. aureus*, esta apresenta uma inativação máxima, quando organizada sob a forma de biofilme, de aproximadamente de 6,5 log na concentração de 20  $\mu\text{M}$ . Sob a forma planctónica, como foi dito anteriormente, esta bactéria apresenta uma maior sensibilidade tendo obtido uma redução máxima de aproximadamente de 8 log nas três concentrações testadas. Em relação ao fungo *C. albicans*, as diferenças não são significativas pois este apresentou uma redução máxima de aproximadamente de 7 log tanto organizado sob a forma de biofilme como em células em suspensão. No entanto quando o fungo se desenvolveu sob a forma de biofilme esta redução só foi atingida ao fim de 180 minutos e nas concentrações mais elevadas (10 e 20  $\mu\text{M}$ ). O mesmo não ocorreu com as células em suspensão que atingiu uma inativação máxima ao fim de 180 minutos nas três concentrações testadas (5, 10 e 20  $\mu\text{M}$ ). Assim, apesar deste microrganismo ter sofrido a mesma redução, apresentou uma ligeira resistência quando organizado sob a forma de biofilme em comparação com as células livres.

Os resultados da análise de PS ligado ao material celular, indicam que a matriz extracelular dos biofilmes é permeável ao PS, ligando-se de forma tão eficiente como às células em suspensão. De um modo geral as bactérias

organizadas tanto em biofilme como em células livres fixaram aproximadamente a mesma quantidade de PS. Em *C. albicans*, houve mesmo uma maior fixação de PS quando esta se desenvolveu sob a forma de biofilme. Uma característica particular dos biofilmes formados por *Candida* é a variedade de formas celulares que podem estar presentes no biofilme formado por cada uma das espécies. Os biofilmes maduros com um crescimento de cerca de 48 h consistem numa rede densa de células sob a forma de leveduras, de hifas e pseudo-hifas (Hawser et al., 1994). Assim a passagem do PS à célula é dificultada, ficando “armazenado” na rede densa de células formada, podendo levar a um aumento da fixação PS, em comparação com as células livres.

Nos ensaios com biofilmes mistos (*S. aureus* e *C. albicans*) registou-se menor eficiência de inativação fotodinâmica, do que com os biofilmes mono-específicos correspondentes, nas mesmas condições de irradiação e igual concentração de PS. Esta diferença foi mais nítida nos ensaios feitos com *C. albicans*. Por exemplo a *C. albicans* em biofilme misto é inativada em aproximadamente 4 log, com uma concentração de PS de 5 µM, após 270 min de irradiação. Em biofilme simples, esta mesma espécie, nas mesmas condições, é inativada em aproximadamente 6 log ao fim de 180 min de irradiação à mesma concentração. Sabe-se que os biofilmes mistos alteram a atividade metabólica do consórcio e, portanto, podem alterar os padrões de sensibilidade da população. Isto pode refletir-se, por exemplo, numa alteração da estrutura global de biofilme e da matriz extracelular de ambos os microrganismos, prejudicando o acesso do PS ao consórcio, ou por uma diminuição da taxa de adsorção de PS através da membrana celular (Lopes et al., 2012).

Como foi dito anteriormente, de entre as três estirpes estudadas, a mais suscetível ao processo de inativação, tanto na forma séssil como na forma planctónica, foi a bactéria Gram (+) *S. aureus*, sendo inativada num período de tempo mais reduzido e na presença de concentrações de PS mais baixas (5 µM). Esta maior suscetibilidade, comparativamente com a estirpe Gram (-) e com o fungo, está intimamente relacionada com estrutura da sua parede celular, permitindo assim, que o PS estabeleça uma ligação mais forte com o microrganismo (Hamblin et al., 2004; Jori et al., 2004; Arrojado et al., 2011). A natureza da parede da célula fúngica é muito diferente da parede celular das bactérias, complicando a comparação dos resultados. Além disso, os fungos, como organismos eucariotas, apresentam uma maior diversidade de alvos celulares comparativamente aos procariotas. Geralmente os fungos necessitam de concentrações de PS e doses de luz mais elevadas. (Gomes et al., 2011)

A bactéria *P. aeruginosa* adsorve menos PS, em ambas as formas de desenvolvimento. À medida que a concentração de PS aumenta a redução máxima obtida também aumenta. Assim verificou-se que inativação máxima registada em células em suspensão de *P. aeruginosa* foi de 4 log numa concentração de PS de 5 µM ao fim de 90 min de irradiação, e de 8 log nas concentrações mais elevadas de PS (10 µM e 20 µM) após 180 min de irradiação. A bactéria *S. aureus* adsorve mais PS, comparativamente com a *P. aeruginosa*, tanto na forma planctónica (onde obteve uma redução máxima aproximadamente 7 log) como em biofilme (redução máxima aproximadamente 6 log), o que explica também a sua maior suscetibilidade. Estes resultados estão em concordância com estudos feitos



anteriormente com a mesma porfirina e com outras bactérias Gram (-) e Gram (+). Os fatores de redução registados foram de 4 log em suspensões de *Escherichia coli* (Alves et al., 2009) e 6 log de redução em células vegetativas de *Bacillus cereus* (Oliveira et al., 2009). Relativamente ao fungo, este adsorve mais PS quando está organizado sob a forma de biofilme. No entanto quando comparados os resultados obtidos dos ensaios com células em suspensão e com biofilmes, a *C. albicans* obteve uma inativação máxima aproximadamente de 7 log numa concentração de PS de 20  $\mu\text{M}$ , após 180 minutos de irradiação. Estudos feitos anteriormente com TMPs catiónicas e com outro fungo, nomeadamente com esporos de *Penicillium chrysogenum*, registaram uma inativação de cerca de 4,1 log ao fim de 20 min de irradiação. Nesse estudo as concentrações e a intensidade da luz utilizadas foram mais elevadas, 50  $\mu\text{M}$  e 200  $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ , respetivamente.

Os microrganismos desenvolvidos em biofilme exibem tipicamente resistência acrescida a stress físico-químico relativamente à forma livre. Os resultados obtidos permitem concluir que, embora os biofilmes constituam frequentemente um desafio em termos de suscetibilidade aos agentes químicos antimicrobianos, a porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me tem um potencial como fotossensibilizador para a inativação fotodinâmica de biofilmes de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. No entanto, a resistência acrescida das bactérias a stress físico-químico quando organizadas biofilmes, relativamente à forma livre, resultou também numa menor eficiência de inativação com Tetra-Py<sup>+</sup>-Me.

A inativação fotodinâmica de microrganismos, particularmente a inativação de biofilmes microbianos é uma área de investigação com grandes potencialidades

e, poderá ser num futuro próximo uma alternativa ao uso de antibióticos e a outros desinfetantes. A possibilidade de usar a radiação solar como fonte de luz, alarga as perspectivas de aplicação de estratégias de inativação de biofilmes ambientais a estruturas exteriores. Novos fotossensibilizadores, com maior afinidade para o material biológico e maior rendimento em oxigénio singuleto, podem no futuro ser incorporados em materiais de construção e de acabamento, designadamente, tintas e vernizes, proporcionando a prevenção ou tratamento fotodinâmico do *biofouling*.

## **Capítulo V**

---

**Bibliografía**

---

- Allison, D. G., (2003). The biofilm matrix. *Biofouling*, 19: 139-150.
- Almeida, A., Cunha, A., Gomes. N. C. M, Alves, E., Costa, L., Faustino, M. A. F., (2009). Phage therapy and photodynamic therapy: low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. *Marine Drugs*. 7: 268 – 313
- Almeida, A., Cunha, A., Faustino, M. A. F., Tomé, A. C., Neves, M. G. P. M. S., (2011). in Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications, editado por Hamblin, M. R., Jori, G., Royal Society of Chemistry, Padova, cap. 5: 84-160
- Alves, E., Costa, L., Carvalho, C., Tome, J. P. C., Faustino, M., Neves, M., Tome, A., Cavaleiro, J., Cunha, A., Almeida A., (2009). Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiology*, 9: 70 - 83.
- Arrojado, C., Pereira, C., Tome, J. P. C., Faustino, M A. F., Neves, M. G. P. M. S., Tomé. A.C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha. A., Calado. C., Gomes. N., C., M., Almeida. A., (2011). Applicability of photodynamic antimicrobial chemotherapy as an alternative to inactivate fish pathogenic bacteria in aquaculture systems. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10:1691–1700
- Azeredo, J., Oliveira, R., (2000). The role of exopolymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* in biofilm formation and composition. *Biofouling*, 16: 17 27.
- Bakke, R.; Trulear, M. G.; Robinson, J. A. and Characklis, W. G. (1984). Activity of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Steady State. *Biotechnology and Bioengineering.*, 26: 1418-1424.
- Barbosa, I., Garcia, S., Barbier-Chassefière, V., Caruelle, J-P., Martelly, I., Papy-Garcia, D., (2003). Improved and simple micro assay for sulphated

glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology*, 13: 647–653.

Bott, T., R., (1993). Aspects of biofilme formation and destruction. *Corrosion Reviews*, 11:1-24

Bott, T., R., (1995). Fouling of Heat Echangers. Amsterdam. Netherlands: *Elsevier Science B. V*

Boyd, A., Chakrabarty, A., M., (1994). Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2355-2359

Bryers, J., D., (2000). Biofilm formation and persistence. *In: Biofilms II: Process analysis and applications. Bryers J D*, 45-88.

Bryers, J., D., Ratner, J., P., (2004). Bioinspired implant materials befuddle bacteria. *American Society for Microbiology News*, 70:232–237

Brown, M., R., W., Gilbert, P., (1993). Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *Journal of Applied Bacteriology*, 74: 87S-97

Characklis, W., G., Wilderer, P., A., (1989). Glossary. *In: Structure and function of biofilms. Characklis W. G. Wilderer P. A. (eds)* 369-371.

Characklis, W. G., Marshall, K., C., (1990). Biofilm: A basis for an interdisciplinary approach. *In: Characklis, W. G., Marshall, K. C (eds) Biofilms. John Wiley and Sons Inc. New York*

Chen, C-I., Griebe, T., Srinivasan, R., Swart, P., (2003). Effects of various metal substrat on accumulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and the efficacy of monochloramine as a biocide. *Biofouling*, 7: 241-251

Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M., Beachey, E.H., (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of

staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22: 996–1006.

Christensen, B., E., Characklis, W., G., (1990) Physical and chemical properties of biofilm. *In: Characklis, W. G, Marshall, K. C. eds Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc, 93-130

Cloete, T., E.; Jacobs, L., Brözel, V., S., (1998). The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation*, 9: 23-37

Collins. T., L., Markus. E., A., Hassett. D.J., Robinson. J., B., (2010) The Effect of a Cationic Porphyrin on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Current Microbiology*, 61:411–416

Costerton, J. W.; Irving, R. T. and Chen, K. J. (1981). The Bacterial Glycocalix in Nature and Disease. *Annual Review of Microbiology*, 35:299-304.

Costerton, J., W., Cheng, K., J., Geesey, G., G., Ladd, T., I., Nickel, J., C., Dasgupta, M., Marrie, T., J., (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*. 41: 435-464

Costerton, J. W. Stewart, P. S.; Stoodley, P., (2005a). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*, 13: 34-40

Daniels, R., Vanderleyden, J., Michiels, J., (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 28: 261-289

Davies, D., G., Parsek, M., R., Pearson, J., P., Iglewski, B., H., Costerton, J., W., Greenberg, E., P., (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280: 295–298

Decho, A.W. (1999). Microbial extracellular polymeric substances – Characterization, structure and function editado por Wingender, j., Neu, T. R., Flemming, H.C., Library of Congress Cataloging, Berlin, cap.9: 155–170

- Demidova, T., N., Hamblin, M., R., (2005). Photodynamic Inactivation of *Bacillus* Spores, Mediated by Phenothiazinium Dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6918-6925
- Dias, N., Nicolau, A., Carvalho, G. S., Mota, M., Lima, N. (1999). Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presence of toxicants. *Journal Basic Microbiology*. 39: 103–108
- Dickschat, J., (2010). Quorum sensing and bacterial biofilms. Review. *Natural Product Reports*, 27: 343–369
- Dignac, M.-F., Urbain, V., Rybacki, D., Bruchet, A., Snidaro, D., Scribe, P., (1998). Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure. *Water Science and Technology* 38: 45-53
- Donlan, R., M.; Costerton, J., W., (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15: 167-193
- Donlan, R., M., (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8: 881-890
- Drenkard, E., Ausubel, F. M. (2002). *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* , 416: 740-743
- Fai, P. B., Grant, A. (2009). A rapid resazurin bioassay for assessing the toxicity of fungicides. *Chemosphere*, 74:1165–1170
- Flemming, H. C. (1991). Biofouling in water treatment. *Heidelberg, Springer-Verlag*, 47-80
- Flemming, H.-C., (1993). Biofilms and Environmental Protection. *Water Science and Technology*, 27 (7-8):1-10
- Flemming, H.-C. (1996). The forces that keep biofilms together. *In: Biodeterioration and Biodegradation, DECHEMA Monographien* 133: 311-317

- Flemming, H-C., Wingender, J. (1999). Extracellular polymeric substances (EPS): the biofilme construction material. Workshop. Bern: EDMZ, 2-18
- Freimoser, F. M., Jakob. C. A., Aebi, M., e Tuor. U. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay Is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (8): 3727–3729
- Fuqua, C., Greenberg, E. P. (2002). Listening in on bacteria acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology* 3: 685-695
- Gaylarde, C. C.; Morton, L. H. G. (1999). Deteriogenic biofilms on buildings and their control: a review. *Biofouling*, 14 (1): 59-74
- Geesey, G. G. (1982). Microbial exopolymers: ecological and economic considerations. *ASM News* 48: 9-14
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D. e Sand, W. (1998). Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bleaching. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2743-2747
- Gomes, M. C., S. M. Woranovicz-Barreira, (2011). "Photodynamic inactivation of *Penicillium chrysogenum* conidia by cationic porphyrins." *Photochemical & Photobiological Sciences* 10: 1735-1743.
- Hamblin, M. R., Hasan, T., (2004). Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochemistry and Photobiology*, 3: 436 - 450
- Harbron, R. S., Kent C. A. (1988). Aspects of cell adhesion. In: NATO ASI séries Vol. 145. Melo L. F. Bott T. R. and Bernardo C. A. (eds).125-140
- Hawser, S P., Douglas, L. J. (1994). Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infection Immunity*, 62(3):915-921
- Heinzel, M. (1998). Phenomena of biocide resistance in microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41: 225-234



- Higgins M. J., Novak J. T. (1997). Characterization of exocellular protein and its role in biofloculation. *Journal of Environmental Engineering*, 123: 479-485
- Horan, N. J., Eccles C. R. (1986). Purification and characterization of intracellular polysaccharide from activated sludges. *Water Research*, 20: 1427-1432
- Hughes K. A., Sutherland I. W., Jones M. V. (1998a). Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology*, 144: 3039-3047
- Jahn A., Nielsen P. H. (1998). Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Water Science and Technology*, 37: 17-24
- Johansen, C., Falholt, P., Gram, L. (1997). Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 9: 3724-3728
- Jori G, Brown SB. (2004). Photosensitised inactivation of microorganisms. *Photochemistry and Photobiology*, 3: 403–405.
- Jori, G., C. Fabris, M. Soncin, S. Ferro, O. Coppellotti, D. Dei, L. Fantetti, G. Chiti and G. Roncucci (2006). Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers in Surgery and Medicine*, 38: 468-481
- Junter, G.-A., Coquet L., Vilain S., Jouenne T. (2002). Immobilized-cell physiology: current data and the potentialities of proteomics. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 201-212
- Kharidia, R., J.F. Liang, (2011). The Activity of a Small Lytic Peptide PTP-7 on *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Journal of Microbiology*, 49(4): 663-668
- Kostaki, M.; Chorianopoulos, N., Braxou, E., Nychas, G., Giaouris, E., (2012). Differential Biofilm Formation and Chemical Disinfection Resistance of Sessile Cells of *Listeria monocytogenes* Strains under Monospecies and Dual-

- Species (with *Salmonella enterica*) Conditions, *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8):2586
- Li, X., Yan, Z., Xu, J., (2003). Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology* 149: 353–362
- Lin, H.Y., Chen, C.T., Huang, C.T. (2004). Use of merocyanine 540 for photodynamic inactivation of staphylococcus aureus planktonic and biofilm cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11): 6453-6458
- Lopes, S. P., Cerib, H., Azevedo, N. F., Pereira, M. O., (2012). Antibiotic resistance of mixed biofilms in cystic fibrosis: impact of emerging microorganisms on treatment of infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40:260–263
- Louvado, A., Coelho, F., Domingues, P., Santos, A.L., Gomes, N.C.M., Almeida, A., Cunha, A. (2012). Surfactant-Resistant Pseudomonads from the Estuarine Surface Microlayer. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(3):283-291
- Luksiene, Z., (2005). Inactivation of possible fungal food contaminants by photosensitization. *Food Technology and Biotechnology*, 43(4): 335-341.
- Mantareva V, 2011). Non-aggregated Ga(III)-phthalocyanines in the photodynamic inactivation of planktonic and biofilmcultures of pathogenicmicroorganisms. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10: 91-102.
- Mariscal, A., Lopez-Gigosos, R., M., Carnero-Varo, M., Fernandez-Crehuet, J., (2009). Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm, *Applied and Environmental Microbiology* 82:773–783
- Mattila-Sandholm, T. and Wirtanen, G. (1992). Biofilm Formation in the Industry: a Review. *Food Reviews International.*, 8, 573-603
- McLean, R.J.C., Bates, C.L., Barnes, M.B., McGowin, C.L., Aron, G.M., (2004). Methods of studying biofilms. *Microbial Biofilms*. ASM Press.

- Melo, L. F. (1994). "Biofilmes e o Controlo da Poluição". *Boletim de Biotecnologia*, 48: 16-25
- Miller, A. Z., Laiz, L., Gonzalez, J. M., Dionísio, A., Macedo, M. F., Saiz-Jimenez, C., (2008). Reproducing stone monuments photosynthetic-based colonization under laboratory conditions. *Science of the total environment*, 405: 278-285
- Mireles, J. R., Toguchi, A., & Harshey, R. M. (2001). Salmonella enterica serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183: 5848–5854
- Morton, L. H. G.; Greenway, D. L. A.; Gaylarde, C. C.; Surman, S. B.(1998) Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *Int. Biodeterior Biodegr.* 41, 247-259
- Mossman, T., (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55 –63
- Neu, T. R.; van der Mei, H. C. and Busscher, H. J. (1992). Biofilms Associated with Health. In: Melo, L. F., (Eds). *Biofilms-Science and Technology*. NATO ASI Séries, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 21-34
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., (2000). Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267: 5421–5426
- Oliveira, A., Almeida, A. Carvalho, C. M. B. Tomé, J. P. C. Faustino, M. A. F. Neves, M. G. P. M. S. Tomé, A. C. Cavaleiro J. A. S. Cunha Â. (2009). Porphyrin derivatives as photosensitizers for the inactivation of Bacillus cereus endospores. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 1986 - 1995.
- O'Toole, G.; Kaplan, H. B.; Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development.. *Annual Review Microbiology*, 54: 49-79

- Palomino, J.C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., Portaels, F., (2002). Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46: 2720–2722
- Parsek M. R. and Greenberg E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology* 13: 27-33.
- Peeters, E., Nelis, H. J., Coenye, Tom. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, 72: 157–165
- Pereira M. O. and Vieira M. J. (2001). Effects of the interactions between glutaraldehyde and the polymeric matrix on the efficacy of the biocide against *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Biofouling*, 17: 93-101
- Rao D, Webb J. S., Kjelleberg S. (2005). Competitive interactions in mixed species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:1729 –1736
- Reddy, V.,N., Rekha, R., K., Chandana, G., Sehrawat. S. (2009). Photodynamic Therapy. Review. *Indian Journal of Dental Advancements*, 1: 46-50
- Richards, J., J., Melander, C., (2009). Controlling Bacterial Biofilms, *ChemBioChem*, 10, 2287- 2294
- Sandberg, M., E., Schellmann. D., Brunhofer, G., Erker, T., Busygin, I., Leino. R., Vuorela. P., M., Fallarero. A. (2009). Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay. *Journal of Microbiological Methods*, 78: 104–106
- Schachter B. (2003). Slimy business – the biotechnology of biofilms. *Nature Biotechnology*, 21: 361-365
- Simões, M., Simões, L., C., Vieira, M.,J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology*, 43: 573–583

- Stewart P. S. Grab L. and Diemer J. A. (1998). Analysis of biocide transport limitation in an artificial biofilm system. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 495-500
- Strathmann, M., Wingender, J., Flemming, H.C., (2002). Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods*, 50: 237–248
- Sutherland I. W. (2001). The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, 9: 222-227
- Tavares. A., Carvalho. C., M., B., Faustino, M A. F., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, J., Tomé. A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha. A., Gomes. N. C. M., Alves, E., Almeida. A., (2009). Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. *Marine Drugs*, 8: 91-105
- Tavares, A., Dias S., R., Carvalho, C., M., Faustino, M., A., Tomé, J., P., Neves, M., G., Tomé, A., C., Cavaleiro, J., A., Cunha, Â., Gomes, N., C., Alves, E., Almeida, A., (2011). Mechanisms of photodynamic inactivation of a Gram-negative recombinant bioluminescent bacterium by cationic porphyrins. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10: 1659-1669.
- Tizzard, A., C., Bergsma, J., H., Lloyd-Jones, G., (2006). A resazurin-based biosensor for organic pollutants. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 759–763
- Toté, K., Berghe, D., V., Maes, L., Cos, P., (2007). A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms, *Letters in Applied Microbiology* 46: 249–254
- Tournu, H., Dijck, P., V., (2011). *Candida* Biofilms and the Host: Models and New Concepts for Eradication, *International Journal of Microbiology*

- Wainwright, M. (1998), Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 13-28
- Wainwright, M., (2002). Pathogen inactivation in blood products. *Current Medicinal Chemistry*, 9(1): 127-143
- Wimpenney, J. W. T., Peters, A. e Scourfield, M. A. (1993). *The Physiology and biochemistry of biofilme*. In: Characklis, W. G. e Wilderer, P. A. eds. *Structure and Function of Biofilms*. Dahlem Workshop, John Wiley and Sons, Inc. 111-127
- Wingender J. Neu T. R. and Flemming H-C. (1999) What are bacterial extracellular polymeric substances?. *In: Microbial extracellular polymeric substances – characterization, structure and function*. Wingender J. Neu T. R. and Flemming H.-C. (eds).1-19
- Wirtanen, G. (1995). Biofilm formation and its elimination from food processing equipment. *VTT Publications*, Espoo, Finland
- Xavier, J., B., Picioreanu, C., Abdul Rani, S., van Loosdrecht, M., C., M., Stewart, P., S., (2005). Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix – a modelling study. *Microbiology*, 151: 3817–3832
- Yang L., (2011). Current understanding of multi-species biofilms. *International Journal of oral science*, 3:74–81
- Zhao T. Doyle M. P. and Zhao P. (2004). Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3996-4003