

UM ESTUDO SOBRE OS IMPACTOS DOS BIOFILMES MICROBIANOS NAS INDÚSTRIAS

Carlos Cezar de Mascarenhas Filho¹, Ana Júlia Golvêa Alves², Merícia Harumi Hirano³, Carlos Cezar de Mascarenhas

Universidade de São Paulo/Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Av. Duque de Caxias do Norte, 225, Campus USP – Pirassununga/SP, mascarenhas@usp.br¹, ana.julia.alves@usp.br², mericia.hirano@usp.br³

Universidade Estadual Paulista/Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Av. Dr. Ariberto Pereira da Cunha, 333, Guaratinguetá/SP, mascarenhas.sp@gmail.com

Resumo - O conceito de biofilme tem emergido gradualmente de estudos científicos durante longo período de tempo, porém, nas últimas duas décadas, essa concepção tem avançado consideravelmente. Dentre os tipos de biofilmes, os microbianos tem sido alvo de grande interesse da comunidade científica, se tratando de um ecossistema microbiano complexo e dinâmico, onde os microrganismos de forma organizada aderem a diversos tipos de superfícies ou se estabelecem suspensas em solução. Após a aderência às superfícies, as células começam a se multiplicar, e nesse meio podem estar envolvidas por uma matriz polimérica, formada a partir das células microbianas. Os biofilmes possuem um caráter protetor aos microrganismos, tornando assim uma fonte resistente de contaminação, de modo a muitas vezes não respondendo á tratamento de remoção como, alteração de pH, radiação ultravioleta, variação da pressão osmótica e também contra agentes antimicrobianos. O presente estudo por meio de uma pesquisa de referencial teórica, busca compreender os impactos causados pelos biofilmes microbianos nas indústrias.

Palavras-chave: Biofilme Microbiano, Impactos na indústria, biodegradação, biocorrosão.

Área do Conhecimento: Engenharias

Introdução

Estima-se que atualmente os impactos causados por biofilmes estejam estimados em torno de 1% do PIB em países industrializados.

A formação de biofilmes microbianos atinge desde edificações até super-petroleiros, proporcionando assim, uma manutenção periódica para fazer a remoção e o tratamento do local atingido.

Nas indústrias o principal fator de prejuízo se encontra nos trocadores de calor, visto que sua formação rápida faz com que esses trocadores aumentem sua resistência á transferência de calor, pois uma camada espessa de biofilme impede o processo normal de troca.

Biofilmes microbianos possuem a característica de realizar a biodegradação, realizando a biocorrosão de superfícies metálicas e em especial encanamentos e a biodegradação de rochas, pedras e construções.

Com base nos presentes prejuízos nas indústrias ocasionados por biofilmes microbianos, o atual estudo resultou de uma pesquisa bibliográfica que visa explicar a cerca dos microrganismos formadores de biofilmes e sua ocorrência nas indústrias.

Metodologia Científica

Realizou-se uma pesquisa de referencial teórico, utilizando como base as principais bibliografias encontradas acerca do assunto para fundamentar os objetivos deste estudo. Procurou-se através da revisão da literatura, fundamentar a pesquisa sobre os impactos acarretados pela formação dos biofilmes microbianos nas indústrias.

Tipos de Biofilmes

Os biofilmes podem ser produzidos a partir de polissacarídeos (celulose, carboidrato, gomas, etc.) ou proteínas (gelatina, glúten, etc.), e ser de origem animal, vegetal ou microbiano. Entre as variedades de biofilmes, há uma classe que foi definida como comestíveis e biodegradáveis.

Os biofilmes podem ser classificados, quanto sua origem, de duas maneiras: naturais ou sintéticos. Os naturais são formados a partir da aglomeração de microrganismos que estão dispostos em uma superfície coberta por água e unidos devido à secreção de uma substância viscosa, como exemplo o limbo. Quando estas superfícies estão em contato direto com a água e expostas à radiação solar, acarretam aos microrganismos características que os classificam como fototróficos ou fotossintetizante, ou seja, organismos capazes de converter luz em

ATP, energia eletromagnética (luz) em ATP necessário para seu desenvolvimento. Já os sintéticos, são feitos a partir de polissacarídeos, como por exemplo, amido e pectina; Ou proteínas, como glúten e gelatina.

Biofilme Microbiano - Histórico

A microbiologia tradicional caracterizou durante muitos anos as células encontradas em suspensões como planctônicas. Algumas destas bactérias planctônicas estudadas tinham a capacidade de aderir em superfícies, formando “colônias”, biofilmes. Inicialmente, as observações de biofilmes foram realizadas por Antonie van Leeuwenhoek que, estudando amostras de dente, em seu microscópio, notou mais fragmentos de células agregadas do que planctônicas. A capacidade das bactérias de formar comunidades complexas e viver preferencialmente em agregados foi estudada desde os tempos de Robert Koch (CAIXETA, 2008).

Porém, a primeira publicação detalhada que descreve biofilmes foi descrita por Zobell em 1943, onde o autor iniciou estudos sobre a adesão de bactérias marinhas em cascos de navios principalmente e em diferentes tipos de superfície que incluíam vidro, metal e plástico que estavam submersas (LUCCHESI, 2006; CAIXETA, 2008).

Técnicas de microscopia mais sofisticadas e efetivas foram empregadas por Costerton em 1978, o qual verificou que a maioria dos microrganismos nos ambientes naturais se encontrava em comunidades fixa a uma superfície, e não na forma dispersa em suspensão. Aos microrganismos aderidos foi atribuído o nome de biofilme, composto por células microbianas de fisiologia distinta, chamadas sésseis. Os microrganismos precursores da formação de biofilmes, denominados planctônicos, são encontrados em suspensão, o que os torna mais sensíveis a agressões ambientais que em sua forma sésseis. Apesar disto, os microrganismos planctônicos foram, durante muitos anos, referência para a seleção de agentes antimicrobianos (CAPELLETTI, 2006).

A partir de então, o conceito de biofilme avançou e pesquisas vêm sendo realizadas em muitas áreas relacionadas com a ecologia microbiana. A microbiologia moderna, portanto, se preocupa em estudar os mecanismos fisiológicos e de controle entre as formas microbiana planctônicas (livre) e sésseis (biofilme), principalmente devido à grande importância nas atividades humanas, à qual pode trazer tanto benefícios quanto malefícios. Hoje, acredita-se que 90% das bactérias encontradas na natureza estão na forma de biofilmes (CAIXETA, 2008; CAPELLETTI, 2006; KYAW, ____).

Definição

Biofilme microbiano é um complexo ecossistema microbiano, altamente dinâmico que atua de maneira coordenada, aderidas as superfícies bióticas e/ou abióticas (sésseis) ou suspensas em solução (planctônicas), cujas células podem ou não estar envolvidas por uma matriz de exopolímeros (polissacarídeos, proteínas, lipídeos), podendo ser formada a partir de uma única ou de múltiplas espécies (SCHNEIDER, 2007; KYAW____).

É importante ressaltar que biofilmes microbianos são produzidos por culturas puras de bactérias e por consórcios de microrganismos, que podem incluir fungos, protozoários e algas. Células individuais ou planctônicas suspensas na água ou em ambientes gasosos não atendem ao critério da fixação da posição espacial relativa, pois o movimento Browniano, a difusão e a turbulência do meio contribuem para o deslocamento aleatório contínuo destas células (SCHNEIDER, 2007).

Os biofilmes mais comuns na natureza são heterogêneos, compostos por duas ou mais espécies, podendo os produtos do metabolismo de uma espécie auxiliar o crescimento das outras e a adesão de uma dada espécie fornecer ligandos que promovem a ligação de outras. Inversamente, a competição pelos nutrientes e a acumulação de metabólitos tóxicos produzidos pelas espécies colonizadoras poderão limitar a diversidade de espécies num biofilme (LUCCHESI, 2006; CAIXETA, 2008).

O tipo e a disponibilidade dos substratos são tidos como fatores que, também, podem afetar o crescimento microbiano nos ecossistemas naturais e artificiais. Esses influenciam a proliferação de determinados microrganismos, contribuem para o desfecho da competição entre as diferentes espécies e, conseqüentemente, para a determinação das características das comunidades microbianas (CAPELLETTI, 2006).

Dentre todos os microrganismos, são as bactérias que, em condições favoráveis, mais freqüentemente produzem biofilme, ainda que algumas apresentem, naturalmente, uma maior aptidão que outras. Seus reduzidos tamanhos, elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio circundante são as principais características que as tornam excelentes organismos capazes de colonizar qualquer superfície, até mesmo em condições extremas. Alcaligenes, Bacillus, Enterobacter, Flavobacterium, Pseudomonas e Staphylococcus são gêneros de bactérias freqüentemente encontrados em biofilmes. (CAPELLETTI, 2006)

Segundo Machado (2005) estima-se que mais do que 90% dos microrganismos vivem sob a forma de biofilmes e praticamente não existe nenhuma superfície que não possa ser ou vir a ser colonizada por bactérias.

Caracterização

Existem três tipos de biofilme microbiano, o biofilme aderido a um substrato, o biofilme em suspensão e o biofilme de subsolo.

Depois de várias investigações, foi possível afirmar que existem, no mínimo, três estruturas diferentes de biofilme. A primeira é a tradicional, plana, visão homogênea da estrutura do biofilme. A segunda, denominada de “Modelo do Mosaico Heterogêneo”, foi descoberta utilizando-se microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC), para examinar amostras crescidas em superfícies internas de sistema de distribuição de água. O terceiro tipo de biofilme representa o modelo na forma de cogumelo ou tulipa, com estrutura porosa e canais capilares de água, por onde ocorre a distribuição de nutrientes e água (CAIXETA, 2008).

Os biofilmes são constituídos, basicamente, por microrganismos, água, material polimérico extracelular (polissacarídeos, proteínas, lipídeos) e resíduo do ambiente colonizado, embebidos numa matriz polimérica e aderidos a uma superfície sólida, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada contendo exopolissacarídeos e pequenos canais, abertos por entre as microcolônias (CAPELLETTI, 2006).

A água é a parte mais significativa da massa total do biofilme, variando entre 70 a 97%, ou mais, da massa total. Já os microrganismos representam somente uma pequena parte da massa e do volume de um biofilme (menos de 10%), embora excretem as substâncias poliméricas que representam a fração dominante da matéria orgânica seca do biofilme (Tabela 1) (CASALINI, 2008).

A estrutura unificadora e protetora dos biofilmes é denominada matriz extracelular ou exopolissacarídeo (EPS), a qual é formada em parte pelas próprias células e em parte por componentes do ambiente, como proteínas, detritos e matéria inorgânica, portanto é de composição heterogênea e complexa. Embora, sejam os polissacarídeos a prevalecer, a EPS pode também ser constituída por proteínas, ácidos nucleicos, glicoproteínas e fosfolipídios (CAPELLETTI, 2006; LUCCHESI, 2006).

Exopolissacarídeos (EPS) são considerados componentes importantes que determinam a estrutura e a integridade funcional do biofilme microbiano, agregado pela formação tridimensional, com aspecto de gel, de alta hidratação e canais localizados na matriz do

biofilme, em que os microrganismos são imobilizados. Além de agir como adesivo e barreira defensiva, protegendo as células para que não sejam arrastadas pelo fluxo de substâncias, auxiliando a célula a resistir a condições de estresse múltiplo, tais como a diminuição e a exaustão de nutrientes e água, a presença de biocidas e outros agentes antimicrobianos e condições ambientais. Em alguns casos, o EPS é capaz de seqüestrar cátions, metais e toxinas, conferindo, também, proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação (BOARI, 2008; CAIXETA, 2008).

Tabela 1: Composição da matriz do biofilme

Componente	Porcentagem na matriz
Água	até 97%
Células microbianas (muitas espécies)	2-5%
Polissacarídeos (homo e heteropolissacarídeos)	1-2%
Proteínas (incluindo enzimas)	Menor que 1-2%
DNA e RNA	Menor que 1-2%
Íons	Livre

Processo de Formação

O processo de Formação inicia-se com um colonizador primário, que adere a uma superfície, geralmente contendo proteínas ou outros compostos orgânicos. Este se desenvolve, originando microcolônias que sintetizam uma matriz exopolissacarídica (EPS), que passam a atuar como substrato para a aderência de microrganismos, os colonizadores secundários. Estes, por sua vez, podem se aderir diretamente aos colonizadores primários, ou promoverem a formação de coagregados com outros microrganismos e então se aderirem aos colonizadores primários (KYAW, _____).

O acúmulo de biofilme em superfícies é um fenômeno natural que acontece em meios aquosos e resulta de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem simultaneamente. (MACHADO, 2005)

Na Figura 1 estão esquematizadas as diferentes etapas de formação de biofilme:

- Etapa 1- Transporte de células livres do meio líquido para uma superfície sólida e sua subsequente fixação;
- Etapa 2- Crescimento e divisão de células fixas à custa de nutrientes provenientes do

líquido circundante, conjuntamente com a produção e excreção de EPS;

- Etapa 3- Fixação de células bacterianas flutuantes (e outras partículas), contribuindo para a acumulação do biofilme;
- Etapa 4- Liberação de material celular por vários tipos de mecanismos: (a) erosão superficial (perda de células individuais), (b) descolamento ("sloughing off"), (c), abrasão e (d) ataque por predadores.

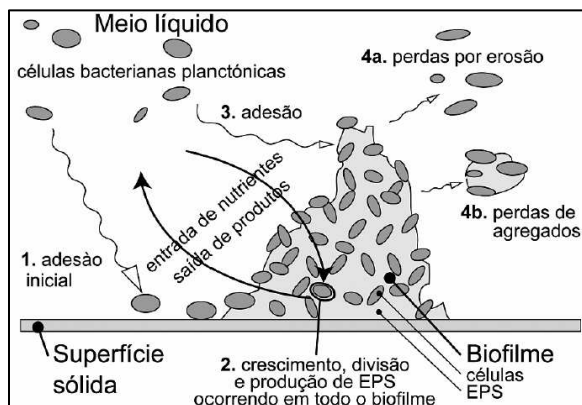


Figura 1- Etapas de formação de um biofilme
Fonte: adaptado de Xavier *et al.*, 2003

Uma das primeiras teorias foi descrita por Marshall em 1971, o qual sugeriu que a formação do biofilme é um processo que acontece em duas fases. A primeira, quando o processo ainda é reversível, em virtude da adesão do microrganismo na superfície, que ocorre por forças de Van der Waals, atração eletrostática e interações hidrofóbicas. Nesse estágio, a bactéria apresenta movimento browniano, podendo simplesmente, ser removida por rinsagem. Na segunda fase, por meio de interações dipolo-dipolo, ligações iônicas e covalentes, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, ocorrem a interação física da célula com a superfície, com a síntese de material extracelular da natureza polissacarídica ou protéica, produzida pela bactéria, que é chamada matriz de glicocálix. Nesse momento, as fímbrias poliméricas ligam à célula bacteriana ao substrato, dificultando a remoção do biofilme, sendo necessário adotar forças mecânicas, como raspagens ou lavagem (CAIXETA, 2008).

Acredita-se que a formação de biofilmes esteja associada, por exemplo, à proteção contra o ambiente, ou seja, bactérias em um biofilme encontram-se abrigadas e em relativa homeostase, graças à presença da matriz exopolissacarídica, que contém vários componentes como o exopolissacarídeo, proteínas, ácidos nucléicos, entre outros. Ao que parece, o exopolissacarídeo (EPS) têm diferentes estruturas e funções, dependendo das

comunidades e/ou condições ambientais. Este polímero pode impedir fisicamente a penetração de agentes antimicrobianos no biofilme, principalmente aqueles hidrofílicos e carregados positivamente. Em alguns casos o EPS é capaz de seqüestrar cátions, metais e toxinas. Por estas razões, os biofilmes podem corresponder a excelentes mecanismos de transferência de metais nos ecossistemas, pois vários organismos marinhos pastadores se alimentam de biofilmes. Foi também descrito que o EPS teria papel de proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação (KYAW, ____).

Impactos na Indústria

Biofilmes são responsáveis pela maior parte das interferências causadas por microrganismos em processos tecnológicos. O termo genérico para definir camadas biológicas indesejáveis que se formam em superfícies é biofouling. Esses efeitos em processos industriais incluem: aumento da resistência à troca de calor, aumento do coeficiente de fricção, entupimento de membranas e filtros, a mobilização de metais e de acidez através da ação de biofilmes microbianos sobre resíduos de mineração (drenagem ácida) e a contaminação de alimentos (SCHNEIDER, 2007).

Na indústria alimentícia, a adesão de microrganismos à superfície de equipamentos utilizados para o processamento de alimentos resulta em graves problemas, uma vez que o biofilme microbiano tem o potencial de atuar como fonte crônica de contaminação por patógenos que pode comprometer a qualidade do alimento e representar graves riscos à saúde do consumidor. Além disso, pode ocasionar prejuízos financeiros à indústria, em virtude da diminuição do vida-de-prateleira dos produtos alimentícios (CAIXETA, 2008).

Biofilmes são importantes agentes de biodeterioração e de biocorrosão. Os impactos econômicos causados por biofilmes são estimados em 1% do PIB em países industrializados e podem ser classificados nas seguintes categorias: superdimensionamento de processos ou estruturas para compensar efeitos deletérios de biofilmes, custos de medidas de controle de biofilmes (sistemas de limpeza química ou mecânica, biocidas, etc.), custos de interrupção da produção ou de redução da eficiência de processos, aumento da incidência de doenças (inclusão de patógenos em biofilmes de sistema de distribuição de água ou de torres de resfriamento) (SCHNEIDER, 2007).

Freqüentemente, os biofilmes são relacionados a diversos problemas tais como o processo de corrosão microbiologicamente induzido em tubulações, equipamentos e peças metálicas, contaminação em indústrias de alimentos e em

sistemas de água, doenças periodontais e infecções hospitalares relacionadas à biomateriais. (CAPELLETTI, 2006).

Quando indesejavelmente instalados em uma planta industrial, os biofilmes contribuem para contaminação de muitas áreas de processo, pois representa fontes de liberação e disseminação de microrganismos que podem deteriorar produtos, causando prejuízos financeiros e retrabalho, situação esta que pode ser prevenida e/ou controlada. No entanto, sua remoção representa um desafio, principalmente no que diz respeito à determinação do tipo e da dosagem adequada de biocida para este fim. Frequentemente, a abordagem para a resolução deste problema é empírica (CAPELLETTI, 2006).

Controle e Manejo de Biofilmes

Medidas de controle ou manejo de biofilmes visam à formação de biofilmes abaixo de patamares que causam perdas significativas de materiais ou de eficiência de processos. As medidas de manejo de biofilmes visam à redução de um dos dois principais fatores responsáveis pela sua formação: redução da carga de células (inóculo) e/ou da quantidade de matéria orgânica biodegradável (alimento dos organismos do biofilme).

Medidas de controle de biofilmes incluem: redução do aporte de células (pré-tratamento convencional da água por coagulação/decantação/filtração de areia ou multimídia ou pré-tratamento avançado com membranas filtrantes, em alguns poucos casos é viável esterilizar a água); redução do aporte de nutrientes através de tratamento da água em biorreatores projetados para remoção dos componentes que permitem o crescimento de biofilmes; desenvolvimento de superfícies não-adesivas (a falta de conhecimento sobre a composição química dos pontos de contato entre os polímeros adesivos de microrganismos e biofilmes, a provável grande biodiversidade destes polímeros e a formação de filmes condicionantes podem inviabilizar o desenvolvimento destas superfícies); remoção periódica de biofilmes por meios mecânicos ou químicos; redução do número de organismos viáveis em biofilmes através da adição de biocidas (uma das principais estratégias de manejo de biofilmes adotadas na prática, mas de impacto ambiental considerável, pois as águas contaminadas com biocidas geralmente não são tratadas antes do descarte no meio ambiente) (SCHNEIDER, 2007).

Biofilmes microbianos são extremamente resistentes a biocidas devido a fatores estruturais e fisiológicos. A matriz do biofilme é o mais importante fator de resistência estrutural. Ao penetrar no interior do biofilme, biocidas oxidantes

como o cloro, por exemplo, entram em contato primeiro com a matriz onde são oxidados e inativados. Esta classe de biocidas geralmente não penetra além da camada superficial de 100 a 200 μm do biofilme. Biocidas não-oxidantes podem ser imobilizados na matriz por adsorção química, tornando-os inócuos para as bactérias.

Fatores fisiológicos de resistência de organismos do interior do biofilme incluem a resistência devido ao crescimento lento em condições de limitação de nutrientes, a recuperação de organismos injuriados, o acúmulo de subprodutos finais de fermentação na zona anaeróbia do biofilme, que incluem através da estrutura e reage preferencialmente com biocidas oxidantes, a biodegradação de biocidas para os quais existem enzimas biodegradadoras e formação de células persistentes no interior do biofilme.

Células persistentes a biocidas é um fenômeno observado somente em biofilmes. Estas células são organismos resistentes aos biocidas mesmo após exposição a doses muito elevadas dos componentes aplicados por tempos longos, que inativa mais de 99% das células do biofilme.

A persistência destas células não está baseada em mutação genética, mas em um processo fisiológico ainda pouco conhecido (SCHNEIDER, 2007).

Em um biofilme, as bactérias podem ser 1000 vezes mais resistentes a um antibiótico, quando comparadas às mesmas células planctônicas, embora os mecanismos envolvidos nesta resistência sejam ainda pouco conhecidos. Dentre os possíveis mecanismos, acredita-se que possa haver a inativação da droga por polímeros ou enzimas extracelulares, ou a ineficiência da droga em decorrência de taxas de crescimento muito lentas no interior dos biofilmes. (MACHADO, 2005)

Infecções associadas à biofilmes geralmente são de natureza recorrente, visto que a terapia antimicrobiana convencionais elimina predominantemente as formas planctônicas, deixando as células sésseis livres para se reproduzir e propagar no biofilme após o tratamento. Para tornar o quadro ainda mais grave, as bactérias presentes nos biofilmes encontram-se mais protegidas contra o sistema imune do hospedeiro. (MACHADO, 2005)

A existência de uma matriz a envolver e proteger os microrganismos apresenta dois principais inconvenientes:

- Introdução de resistências adicionais ao transporte de substâncias e metabolitos resultantes da atividade celular;
- Desvio do substrato para a produção dos EPS em detrimento da produção de células.

Esses inconvenientes traduzem-se, por vezes, numa redução da taxa específica de crescimento dos microrganismos inseridos no biofilme, relativamente à dos mesmos em suspensão.

Discussão

Os biofilmes podem ser investigados para a prevenção de sua formação, controle ou erradicação, e a utilização de biocidas é freqüentemente considerada. O uso destes, portanto, é de grande importância e requer minuciosa determinação quanto à concentração apropriada para aplicação. Dosagens abaixo do nível necessário causam falsa segurança, seleção de microrganismos e, conseqüentemente a ocorrência de surtos de contaminação, enquanto que, acima do necessário, além dos aspectos econômicos, há a problemática de toxicidade ocupacional entre os envolvidos com a manipulação do produto (CAPELLETTI, 2006).

A prevenção do desenvolvimento de biofilmes é especialmente importante, pois é atualmente constatado e aceito que os microrganismos que o constituem são de difícil erradicação. Tal fato é, em parte, atribuído à matriz extracelular, por esta funcionar como uma barreira protetora contra fatores agressivos externos, dificultando o transporte do agente antimicrobiano até as células. De acordo com Heinzl (1998), microrganismos residentes em biofilmes protegem-se também dos efeitos tóxicos dos biocidas por sua inativação através de enzimas e de outros metabólitos que degradam ou neutralizam tais produtos, o que acarreta uma redução da quantidade de biocida disponível para atuar nos microrganismos. Não obstante, a menor eficiência dos processos de controle na formação de biofilmes freqüentemente é atribuída, com imprecisão, exclusivamente ao desenvolvimento de resistência microbiológica, quando muitas vezes a causa do problema pode estar vinculada à inadequada aplicação dos biocidas (CAPELLETTI, 2006).

Considerações Finais

Notoriamente, os biofilmes possuem uma grande relevância nos estudos científicos, onde estes estão relacionados à patogenicidades. É inevitável considerar que os prejuízos acarretados pela formação de biofilmes microbianos são relativamente significativos na economia global, principalmente nas circunstâncias atuais, onde a necessidade das empresas em conquistarem a alta qualidade e produtividade tem se tornado um dos grandes alvos de discussão no setor produtivo.

Obstantemente, os biofilmes microbianos, apesar de sua formação ser um processo natural e conhecido, para sua maior utilização em benefício

mútuo, deve se aprimorar o conhecimento acerca do seu processo de formação e de seu controle de disseminação.

Referências Bibliográficas

- BOARI, C. A. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- CAIXETA, D. S. Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- CAPELLETTI, R. V. Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- CASALINI, J. Biofilmes Microbianos na Indústria de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2008.
- KYAW, C. M. Biofilme Microbianos – UNB. Disponível em: <http://vsites.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.html>. Acesso em: 25 fev. de 2010.
- LUCCHESI, E. G. Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes *in vitro* e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- MACHADO, S.M.O. Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controle da formação de biofilmes indesejáveis. Tese de Mestrado em Tecnologia do Ambiente – Universidade de Minho, 2005.
- SCHNEIDER, R. P. Biofilmes Microbianos. Microbiologia em Foco. n 2, vol 1, p 4 – 12. 2007.
- SOBRAL, P. J. A.; CHUZEL, G., (Ed.). Workshop sobre polímeros. Pirassununga: FZEA, 1997. p.23-27.
- XAVIER, G. A.; RODRIGUES, A. S. L.; LUCAS, A. S.; CUNHA FILHO, N. A.; PAPPEN, F. G.; FARIAS, N. A. R. Ectoparasitos de cães urbanos e rurais da região de Pelotas, RS. In: Congresso de Iniciação Científica e Encontro de Pós-Graduação, 15., 2006, Pelotas. Anais do XV Congresso de Iniciação Científica e VIII Encontro de Pós-Graduação, 2006.