

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE

**CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES PRODUZIDOS POR MICRO-ORGANISMOS
ISOLADOS DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAL DA BAÍA BABITONGA**

MICHELE MORAIS OURIQUES

JOINVILLE / SC

2019

MICHELE MORAIS OURIQUES

**CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES PRODUZIDOS POR MICRO-ORGANISMOS
ISOLADOS DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAL DA BAÍA BABITONGA**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde e Meio
Ambiente, da Universidade da
Região de Joinville - UNIVILLE.
Orientadora: Profa. Dra. Regina
Maria Miranda Gern.
Coorientadora: Profa. Dra. Andréa
Lima dos Santos Schneider

JOINVILLE / SC

2019

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

O93c	Ouriques, Michele Morais Caracterização de biofilmes produzidos por micro-organismos isolados de sedimentos de manguezal da Baía Babitonga/ Michele Morais Ouriques; orientadora Dra. Maria Regina de Miranda Gern; coorientadora Andréa Lima dos Santos Schneider. – Joinville: UNIVILLE, 2019. 108 p.: il. ; 30 cm Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville) 1. Biofilmes. 2. Biopolímeros. 3. Ecologia dos manguezais. 4. Babitonga, Baía de (SC). I. Gern, Maria Regina de Miranda (orient.). II. Schneider, Andréa Lima dos Santos (coorient.). III. Título. CDD 579.17
------	--

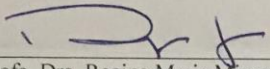
Termo de Aprovação

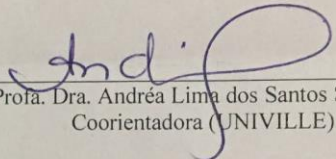
“Caracterização de Biofilmes produzidos por Microrganismos Isolados de Sedimentos de Manguezal da Baía Babitonga”

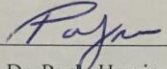
por

Michele Morais Ouriques

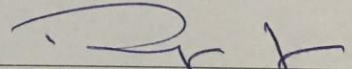
Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestra em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

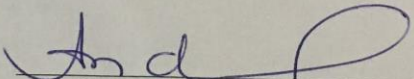

Prof. Dra. Regina Maria Miranda Gern
Orientadora (UNIVILLE)

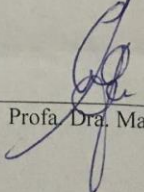

Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Coorientadora (UNIVILLE)

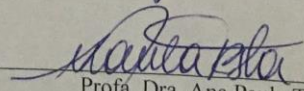

Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:


Prof. Dra. Regina Maria Miranda Gern
Orientadora (UNIVILLE)


Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Coorientadora (UNIVILLE)


Prof. Dra. Marcia Margarete Meier
(UDESC)


Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
(UNIVILLE)

Joinville, 29 de abril de 2019

Dedico este como todos os momentos importantes de minha vida a Sophia, Luna e Luiza presentes em cada minuto dos meus dias, encorajando-me sempre que o cansaço me desestimulava.

Aos meus pais, Pedro e Ana sempre torcendo e comemorando comigo cada uma de minhas conquistas.

Aos meus amigos Thais e Lucas, cuja parceria e compreensão nos dois anos de construção desse trabalho foram um conforto nos dias difíceis.

AGRADECIMENTOS

À orientadora, Profa. Dra. Regina Maria Miranda Gern pela competência, paciência, pelo carinho dedicado durante todo tempo de desenvolvimento deste projeto. Obrigado pela confiança, por acreditar que eu poderia realizar este trabalho.

À Coorientadora Profa. Dra. Andrea Lima dos Santos Schneider, também pela confiança, pela paciência e por estar sempre disposta a me ouvir e ajudar sempre que a procurei.

A profa. Dra. Marcia L. Lange Silveira por ter me acompanhado tão generosamente no laboratório durante umas das etapas deste trabalho.

Às Profas. Dra. Ana Paula Testa Pezzin e Dra. Marcia Margarete Meier pelas valiosas contribuições na defesa dessa dissertação.

Aos parceiros de laboratório e também amigos, queridos, que acompanharam a minha trajetória desde muito: Andriele, Leonardo, Aline, Victoria.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Aos professores do curso de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente, pelos quais eu tenho muito respeito e carinho pelo conhecimento que dedicam a seus alunos.

“Não existe nada semelhante a uma boa influência.... Toda influência é imoral – imoral do ponto de vista científico...Porque influenciar alguém é lhe entregar a própria alma. A pessoa não pensa seus pensamentos naturais, nem arde com suas paixões naturais. Suas virtudes não são as verdadeiras. Seus pecados, se é que existem pecados, são de empréstimo. Ela se torna o eco da música de outro, desempenha um papel que não foi escrito para ela.”

Oscar Wilde, 1890.

RESUMO

A Baía Babitonga, localizada ao norte do Estado de Santa Catarina, abriga a maior parte da floresta de manguezal da região Sul do Brasil e embora seja reconhecida sua relevância ecológica, poucos estudos exploram a microbiota da região. Como produto do seu metabolismo, muitos micro-organismos produzem compostos extracelulares como, por exemplo, as matrizes poliméricas que compõem os biofilmes. O biofilme apresenta relação com a patogenicidade, degradação de compostos orgânicos e materiais sintéticos, atuando na biorremediação. Este trabalho teve por objetivo identificar e isolar micro-organismos produtores de biofilme a partir de sedimentos do manguezal da Baía Babitonga e a caracterização dos mesmos. Para a ativação dos micro-organismos, amostras do sedimento de cada manguezal estudado foram inoculadas em meio líquido caldo marinho contendo glicose como única fonte de carbono. As culturas obtidas dos meios de enriquecimento foram inoculadas por esgotamento em placas de Petri contendo o meio caldo marinho adicionado de ágar e glicose (CMGA); meio ágar nutriente (AN) e ágar nutriente adicionado de cloreto de sódio (ANS). Após esse período, uma alçada de cada colônia de micro-organismos foi inoculada em tubos de ensaio contendo caldo marinho (CM); caldo marinho adicionado de glicose (CMG); e meio caldo nutriente (CN) com incubação estática a 30 °C, por 12 dias. Formaram biofilme 43 colônias cultivadas em meio CMG, 37 em meio CM, e 12 em meio CN, variando na coloração, aspecto e consistência do biofilme produzido. Considerando os biofilmes que apresentaram as melhores características em termos de espessura e resistência, seis amostras foram submetidas à identificação taxonômica por técnicas de biologia molecular. Os resultados mostraram a presença das espécies: *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Lodderomyces elongisporus*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Meyerozyma guilliermondii*, *Enterococcus faecalis*, *Carnobacterium divergens*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* e *Leuconostoc mesenteroides*. O teste de suscetibilidade antimicrobiana revelou que *L. pseudomesenteroides* possui suscetibilidade intermediária aos antibióticos eritromicina, ciproflaxin, norfloxacin e resistência antimicrobiana aos antibióticos penicilina e rifamicina. *E. faecalis* demonstrou suscetibilidade intermediária para ciproflaxin, norfloxacin, ripamcina e resistência ao antibiótico eritromicina. *C. tropicalis* demonstrou suscetibilidade intermediária para itraconazol. Os biofilmes produzidos pelos isolados foram secos a 60 °C e submetidos à análise da composição monossacarídica e a testes de caracterização por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), microscopia eletrônica de varredura (MEV) análise termogravimétrica (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC). Em relação aos monossacarídeos presentes nos biofilmes, apenas glicose (em média, 76%) e manose (em média, 40,3%) foram detectados. As análises de FTIR, RMN de ¹H, MEV, TGA e DSC demonstraram que apesar da heterogeneidade de micro-organismos demonstrada pelo teste de identificação taxonômica, os biofilmes produzidos apresentaram características similares, indicando que apenas um dos micro-organismos presente, *Candida tropicalis*, é produtor desses biofilmes.

Palavras – chave: manguezal, biofilme, biopolímero, matriz polimérica extracelular (EPS), *Enterococcus faecalis*, *Carnobacterium divergens*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides*.

Abstract

The Babitonga Bay, located in the north of the state of Santa Catarina, houses most of the mangrove forest in southern Brazil, and although it is recognized by its ecological relevance, very few studies explore the microbiota of the region. As a product of their metabolism, many microorganisms produce extracellular compounds, such as polymer matrixes that compose the biofilms. The biofilm is related to the pathogenicity, degradation of organic compounds and synthetic materials, acting on bioremediation. The goal of this work was to identify and isolate biofilm producing microorganisms from mangrove sediments of the Babitonga Bay, as well as their characterization. For the activation of the microorganisms, sediment samples from each mangrove studied were inoculated in Marine Broth containing glucose as the only source of carbon. The cultures obtained from the enrichment media were inoculated in Petri dishes containing Marine Broth medium added of agar and glucose (CMGA); Agar Nutrient medium (AN) and Agar Nutrient added of sodium chloride (ANS). After incubation, one loop of each microorganism colony was inoculated in test tubes containing Marine Broth (CM); Marine Broth added of glucose (CMG); and Nutrient Broth medium (CN). The tubes were maintained static, at 30 °C for 12 days. Biofilm was formed by 43 colonies cultivated in CMG, 37 in CM, and 12 in CN medium, varying in coloring, appearance and consistency of the biofilm produced. Considering the biofilms that presented the best characteristics in terms of thickness and resistance, six samples were submitted to taxonomic identification by molecular biology techniques. The results showed the presence of the following species: *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Lodderomyces elongisporus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Enterococcus faecalis*, *Carnobacterium divergens*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* and *Leuconostoc mesenteroides*. The antimicrobial susceptibility test revealed that *L. pseudomesenteroides* has intermediate susceptibility to the antibiotics erythromycin, ciproflaxin, norfloxacin and antimicrobial resistance to antibiotics penicillin and rifamcin. *E. faecalis* demonstrated intermediate susceptibility to ciproflaxin, norfloxacin, ripamycin, and antibiotic resistance to erythromycin. *C. tropicalis* demonstrated intermediate susceptibility to itraconazole. The biofilms produced by the isolates were dried at 60 °C and subjected to monosaccharide composition analysis and characterization tests by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), nuclear magnetic resonance of hydrogen spectroscopy (NMR), scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetric analysis (TGA) and differential exploratory calorimetry (DSC). Regarding the monosaccharides present in the biofilms, only glucose (76% on average) and mannose (on average, 40.3%) were detected. The FTIR, ¹HNMR, MEV, TGA and DSC analyzes demonstrated that despite the heterogeneity of microorganisms in the samples, the biofilm produced had similar characteristics, indicating that only one of the microorganisms, *Candida tropicalis*, is the producer of these biofilms.

Keywords: mangrove, biofilm, biopolymer, extracellular polymer substance (EPS), *Enterococcus faecalis*, *Carnobacterium divergens*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização geográfica da BAÍA Babitonga.	23
Figura 2 - Mecanismo de formação de biofilme na interface sólido-líquido.	27
Figura 3 - Modelo de formação de Biofilmes ILA.	29
Figura 4 - Modelo de resistência a antibióticos baseado na sobrevivência de células do biofilme.	31
Figura 5 - Fluxograma da metodologia aplicada no estudo.	37
Figura 6 - Área de estudo.	38
Figura 7 - Procedimento de Coleta do sedimento.	39
Figura 8 - Esquema do processo de ativação em meio de cultivo líquido	40
Figura 9 - Esquema do processo de isolamento dos micro-organismos	41
Figura 10 - Tubos de ensaio com formação de biofilme na interface líquido/ar das amostras nos meios de cultivo CM e CMG.	48
Figura 11 - Biofilmes produzidos na superfície líquido/ar pelas amostras selecionadas cultivadas em meio CMG	50
Figura 12 - Perfil microbiológico de espécies bacterianas produtoras de biofilmes por amostra.	51
Figura 13 - Perfil microbiológico de espécies fúngicas produtoras de biofilmes por amostra	51
Figura 14 - Halos de inibição ao redor dos discos de difusão impregnados dos antibióticos AMP, CIP, CLO, FOS, ERI, LNZ, NIT, NOR, PEN, RIF, TEC, TET e VAN em placa de Petri inoculada com <i>E. faecalis</i>	56
Figura 15 - Halos de inibição ao redor dos discos de difusão impregnados dos antibióticos AMP, CIP, CLO, FOS, ERI, LNZ, NIT, NOR, PEN, RIF, TEC, TET e VAN em placa de Petri inoculada com <i>L. pseudomesenteroides</i>	56
Figura 16 - Halos de inibição ao redor dos discos de difusão impregnados dos antibióticos AB, ICZ e FLU em placa de Petri inoculada com <i>C. tropicalis</i>	57
Figura 17 - Micrografias obtidas por MEV da superfície dos biofilmes formados61	
Figura 18 - Micrografias obtidas por MEV da superfície dos biofilmes formados contendo bactérias (CMG2, CMG6, CMG8). Ampliações de 150x (A, D, G) 1.000x (B, E, H) e 10.000x (C, F, I).	62

Figura 19 - Micrografias ampliadas em 1.000x de biofilmes de <i>Candida tropicalis</i> . Biofilme produzido em meio CMG a 30 °C/ 288 h (A). Biofilme produzido em meio YNB (Yeast Nitrogen Base) a 37 °C/ 48 por Al-Fattani e Douglas (2006) (B).....	64
Figura 20 - Espectro de FTIR das amostras de biofilme desidratado.....	65
Figura 21 - Estrutura química da glucosamina (A) e N-Acetilglucosamina (B)	67
Figura 22 - Espectros de ^1H RMN (600 MHz) dos biofilmes das amostras CMG4, CMG5, CMG9, CMG2, CMG6, CMG8 em DMSO-D6	68
Figura 23: Curvas térmicas obtidas por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) das amostras de biofilme (CMG2, CMG4, CMG5, CMG6 e CMG8).....	73

LISTA DE QUADROS E TABELA

Quadro 1 - Patologias relacionadas com a presença de biofilmes e seus respectivos agentes microbiológicos.....	36
Tabela 1 - Colônias de micro-organismos encontrados em cada amostra de manguezal utilizando os meios de cultivo CMGA (Caldo Marinho Glicose Ágar), NA (Ágar Nutriente) e ANS (Ágar Nutriente Sódio) para isolamento.....	46
Tabela 2 - Valores da média $\pm$ desvio-padrão das medidas dos halos de inibição ao redor dos discos de difusão impregnados dos antibióticos AMP, CIP, CLO, FOS, ERI, LNZ, NIT, NOR, PEN, RIF, TEC, TET e VAN em placas de Petri inoculadas com <i>L. pseudomesenteroides</i> e <i>E. faecalis</i>	57
Tabela 3 - Valores da média $\pm$ desvio-padrão das medidas dos halos de inibição ao redor dos discos de difusão impregnados dos antibióticos AB, ICZ e FLU em placa de Petri inoculada com <i>C. tropicalis</i>	58
Tabela 4 – Comprimento de onda (cm^{-1}) e atribuições referentes aos biofilmes produzidos.....	66
Tabela 5 - Percentual de perda de massa, temperatura máxima de degradação ($T_{\text{máx}}$) e percentual de resíduo gerado para os cinco estágios térmicos (E1, E2, E3, E4 e E5) observados nas curvas obtidas por meio da análise termogravimétrica das amostras de biofilme CMG2, CMG4, CMG5, CMG6, CMG8 e CMG9.....	70
Tabela 6 - Valores de temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e as entalpias correspondentes (ΔH_m) obtidas dos três eventos térmicos apresentados nas curvas da Figura 25 para as amostras de biofilme CMG2, CMG4, CMG5, CMG6 e CMG8.....	72
Tabela 7 - Monossacarídeos encontrados após hidrólise das amostras dos biofilmes CMG2, CMG4, CMG5, CMG6 e CMG8 e seus respectivos tempos de retenção (t_R) e percentuais na amostra.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMGA - Meio de cultivo caldo marinho adicionado de ágar e glicose

AN – Meio de cultivo ágar nutriente

ANS – Meio de cultivo ágar nutriente adicionado de cloreto de sódio

CM – Meio de cultivo caldo marinho

CMG – Meio de cultivo caldo marinho adicionado de glicose

CN – Caldo Nutriente

FTIR - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

¹H RMN - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

TGA - Análise Termogravimétrica

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

NAC- Espécies do gênero *Candida* que não *C. albicans*

EPS - *Extracellular Polymeric Substance*

ISL -Interface sólido-líquido (biofilme - ISL),

ISA -Interface sólido – ar (biofilme – ISA),

ILL - Interface líquido - líquido (biofilme – ILL)

ILA - Interface líquido - ar (biofilme ILA)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
2.	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3.	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	ECOSSISTEMA MANGUEZAL	19
3.1.1	Importância do ecossistema manguezal.....	20
3.1.2	Microbioma de manguezais.....	21
3.2	BAÍA BABITONGA	22
3.3	BIOFILMES	25
3.3.1	O papel dos biofilmes na patogenicidade	29
3.3.2	Espécies produtoras de biofilmes	33
4.	METODOLOGIA	37
4.1	ÁREA DE ESTUDO	38
4.2	COLETA DAS AMOSTRAS DE SEDIMENTO DE MANGUEZAL	39
4.3	ISOLAMENTO E SELEÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE BIOFILME.....	39
4.3.1	Ativação dos micro-organismos em meio de cultura líquido.....	39
4.3.2	Isolamento dos micro-organismos	40
4.3.3	Seleção de micro-organismos produtores de biofilme.....	41
4.4	IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE BIOFILME	41
4.5	PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DOS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS	42
4.6	CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES.....	43
4.6.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	43
4.6.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	43

4.6.3	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	43
4.6.4	Análise termogravimétrica (TGA)	44
4.6.5	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	44
4.6.6	Composição monossacarídica	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	ISOLAMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS	46
5.2	SELEÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE BIOFILMES....	47
5.3	IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE BIOFILME.....	49
5.4	PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DOS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS	55
5.5	CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES.....	60
5.5.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	60
5.5.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	64
5.5.3	Caracterização por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	68
5.5.4	Análise termogravimétrica (TGA)	69
5.5.5	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	72
5.5.6	Composição monossacarídica	74
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICE A: Características das colônias de micro-organismos isoladas em meio CMGA.....	99
	APÊNDICE B: Características das colônias de micro-organismos isoladas em meio AN.....	100
	APÊNDICE C: Características das colônias de micro-organismos isoladas em meio ANS.....	101
	APÊNDICE D: Características observadas na formação de biofilmes pelos micro-organismos nos meios CMG, CM e o teste de reprodutibilidade em meio CM.....	102

APÊNDICE E: Curvas de A curvas individuais das amostras de biofilme (CMG2, CMG4, CMG5, CMG6, CMG8 e CMG9),.....	103
APÊNDICE F: Curvas de DSC individuais relativas a cada uma das amostras de biofilme	106

1. INTRODUÇÃO

Os manguezais são ecossistemas costeiros característicos de regiões tropicais e subtropicais, sendo uma área de transição entre ambiente terrestre e marinho que sofre interferência do regime de marés (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995). São mundialmente reconhecidos pela alta relevância ecológica, pelo potencial econômico, e pelas atividades socioculturais (EWEL; TWILLEY; ONG, 2006) alcançando um valor econômico anual estimado em mais de US\$ 900.000 por km² (UNEP - WCMC, 2006). A Baía Babitonga, localizada ao norte do Estado de Santa Catarina, abriga cerca de 75% das florestas de manguezal da região Sul do Brasil e embora seja reconhecida sua relevância ecológica, poucos estudos exploram a microbiota da região.

A microbiota dos manguezais apresenta padrões diferenciados, variando conforme a localização geográfica do bosque (NOGUEIRA et al., 2015) suas características naturais (DIAS et al., 2010), intensidade da ação antrópica (CHAKRABORTY et al., 2015; DIAS et al., 2011; PEIXOTO et al., 2011) e a presença de espécies invasoras (SWEETMAN et al., 2010). Em consequência das condições ambientais atípicas, os manguezais apresentam áreas de elevada riqueza natural em termos de biodiversidade microbiológica, os quais são responsáveis pela manutenção do fluxo de carbono e ciclagem de nutrientes nos solos, que ocorre por meio de processos metabólicos dos micro-organismos como a fixação do nitrogênio, amonificação e desnitrificação, solubilização de fosfato, redução de sulfato, fotossíntese e metanogênese (ANDREOTE et al., 2012; SAHOO; DHAL, 2009; TAKETANI et al., 2010). Em função do seu metabolismo, micro-organismos produzem compostos extracelulares, que normalmente conferem vantagens na sua adaptação e desenvolvimento, incluindo antibióticos, enzimas, biopolímeros e biofilmes.

Frequentemente as atividades microbianas ocorrem organizadas em comunidades de diferentes graus de complexidade, podendo estar associadas a superfícies diversas, inseridas em uma matriz exopolissacarídica, compondo dessa forma um biofilme (SCHNEIDER, 2007). A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, fomentando relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (STALDER; TOP, 2016; BALCÁZAR; SUBIRATS; BORREGO, 2015; DONLAN; COSTERON, 2002).

Os biofilmes têm sido amplamente estudados por possuírem relação com a patogenicidade dos micro-organismos (ARAÚJO; HENRIQUES; SILVA, 2017; KUMAR et al., 2017; JOTHIPRAKASAM et al., 2017), com a degradação de compostos orgânicos e materiais sintéticos, com o processo de biorremediação e também no desenvolvimento de substâncias de interesse comercial (KIELISZEK et al., 2017; BEECH, 2004; HOMMEL, 2014; CHAVES, 2004).

Sendo assim, a diversidade microbiana inexplorada dos manguezais e a importância dos biofilmes torna relevante o isolamento de micro-organismos produtores de biofilmes que habitam os sedimentos de manguezal da Baía Babitonga, bem como a caracterização destes biofilmes.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e identificar micro-organismos aeróbios mesófilos produtores de biofilmes em diferentes pontos do manguezal da Baía Babitonga e caracterizar os biofilmes produzidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Isolar micro-organismos aeróbios mesófilos produtores de biofilmes de sedimentos de manguezal da Baía Babitonga coletados na região do Saco do Iperoba, próximo ao Porto de São Francisco do Sul e próximo a residências na Praia do Lixo – São Francisco do Sul;
- II. Identificar os micro-organismos produtores de biofilmes;
- III. Caracterizar a estrutura química e a morfologia dos biofilmes produzidos pelos micro-organismos isolados;
- IV. Avaliar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados que possuem indicativo de patogenicidade.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ECOSSISTEMA MANGUEZAL

Manguezal é por definição um ecossistema costeiro característico de regiões tropicais e subtropicais, sendo uma área de transição entre o ambiente terrestre e marinho, o qual sofre influência direta do regime de marés (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995). Apresentam-se de forma descontínua por todo o globo terrestre e morfologicamente estão associados à região costeira de baixa energia ou a áreas estuarinas, lagunares, baías e enseadas que fornecem a proteção necessária para seu estabelecimento (DIEGUES, 2001).

O grau de desenvolvimento ou de complexidade que um manguezal pode alcançar depende de fatores externos (abióticos) como hidrografia, oceanografia, geologia e salinidade do solo e estes fatores incidem sobre o sistema do manguezal regulando-o (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2016; SOARES et al., 2017). Podem apresentar estrutura caracterizada por um *continuum* de lavado ou mangue o qual considera-se a feição exposta à maior frequência de inundação, com substrato lodoso ou areno-lodoso exposto e *apicum* que pode estar envolvido pela feição de mangue, ou limitando-se a esta em sua porção mais interna atingida pelas águas estuarinas ou marinhas (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2016).

No Brasil, os manguezais abrangem cerca de 1.225.444 ha (PRATES; GONÇALVES; ROSA, 2012), localizando-se desde a foz do rio Oiapoque, no Estado do Amapá (4° 30' latitude Norte), até o Estado de Santa Catarina, tendo como limite sul o município de Laguna, na latitude 28° 30' Sul (SEMADS, 2001), sendo o limite austral deste ecossistema no Oceano Atlântico (IBAMA, 1988). Cerca de 75% dos bosques de manguezal do Estado de Santa Catarina pertencem à região da BAÍA Babitonga, com área aproximada de 6.200 ha em termos de cobertura vegetal.

3.1.1 Importância do ecossistema manguezal

Os manguezais abrigam uma grande diversidade de plantas, artrópodes, moluscos, peixes, aves, apresentando aproximadamente 776 espécies, onde destacam-se as angiospermas do mangue do litoral brasileiro que pertencem a três gêneros, em um total de 6 espécies (SCHAEFFER-NOVELLI, 2002).

A importância dos manguezais pode ser atribuída à diversidade biológica como também à diversidade de bens e serviços que fornecem (EWEL; TWILLEY; ONG, 2006). Em termos de serviços ecossistêmicos, as zonas úmidas intermareais costeiras estão entre os ecossistemas com maior valor econômico, atingindo a oferta anual de serviços estimada em 2007 de US\$ 24,8 trilhões (COSTANZA et al., 2014; DE GROOT et al., 2012). Esses serviços incluem: o fornecimento de *habitat* como criadouro para muitas espécies de peixes, crustáceos e moluscos; proteção para muitos peixes migratórios (DIEGUES, 1988); filtragem de nutrientes e outros poluentes, podendo imobilizar metais pesados nas espécies vegetativas e no solo antes que alcancem o sistema aquático (ALZAHRANI; SELIM; EL-SHERBINY, 2018; CHAI; LI; ZAN, 2017; KELLEWAY et al., 2017); sequestro e armazenamento de carbono (ALONGI, 2014); manutenção da pesca e sustento de comunidades ribeirinhas (BEZERRA, 2008; DA NOBREGA; ROMEU; NISHIDA, 2003), proteção contra danos causados por tempestades, inundações e erosão em grande parte devido à sua capacidade de atenuar ondas (BARBIER, 2009; BROMBERG; SILLIMAN; BERTNESS, 2009; KOCH et al., 2009; VANNUCCI, 2001) e ainda uma variedade de usos recreativos e culturais (KELLEWAY et al., 2017).

Embora exerça funções socioambientais indispensáveis, o ecossistema de manguezal é um dos mais degradados nas zonas costeiras. Estima-se que aproximadamente 25% dos manguezais brasileiros já tenham sido destruídos, apontando para a aquicultura e a especulação imobiliária como suas principais causas de degradação (PRATES; GONÇALVES; ROSA, 2012). Segundo Prates e colaboradores (2012), 75% dos ecossistemas de manguezais estão incluídos em Unidades de Conservação (UC), dos quais 160.648 ha em Unidades de Conservação de Proteção Integral (UCPI) e 759.049 ha em Unidades de Conservação de Uso Sustentável (UCUS).

3.1.2 Microbioma de manguezais

As folhas sob o solo formam uma base importante da cadeia trófica nos ecossistemas de manguezais. Estima-se cerca de 2,5 g/m²-dia de folhas que caem na laguna e são consumidas por bactérias, larvas de camarões e peixes (DIEGUES, 1988). Os sedimentos deste ecossistema são lodosos e, devido à inundação frequente das marés, predominantemente anaeróbicos (FELLER et al., 2010). A água do mar que inunda os manguezais contém maiores quantidades de sulfato, que por sua vez é um dos principais nutrientes das bactérias redutoras presentes nos sedimentos de manguezais e marismas (SARUBO; SCHAEFFER-NOVELLI; LIGNON, 2015).

Como consequência das condições ambientais atípicas os manguezais apresentam manchas de *hotspots* para a diversidade microbiológica, o que é essencial para o funcionamento e manutenção desse ecossistema (ANDREOTE et al., 2012), favorecendo assim sua produtividade (KOMIYAMA; ONG; POUNGPARN, 2008). Nos manguezais tropicais, as bactérias e os fungos constituem 91% da biomassa microbiana total, enquanto que as algas e os protozoários representam apenas 7% e 2%, respectivamente (ALONGI, 1988).

Dentro da microbiota de um manguezal, os fungos são os responsáveis pela mineralização primária da matéria orgânica, resultado do processo de decomposição, sendo esta uma importante fonte de alimento para a macrofauna bêntica (GHIZELINI; HAGLER; MACRAE, 2012). Também são potenciais biorremediadores, degradando contaminantes como óleo e outros derivados de petróleo que frequentemente afetam essas regiões (FASANELLA et al., 2012).

Comparado aos outros grupos da microbiota de manguezais, os fungos possuem maior atividade biológica de compostos secundários (XU; CHEUNG; SHIN, 2014), produzidos para sobrevivência á predadores e infecções, para degradação de componentes vegetais ou adaptação à condições severas no ambiente (THATOI; BEHERA; MISHRA, 2013). Estudando sobre compostos derivados de micro-organismos de manguezal, Xu (2015) lista mais de 300 compostos produzidos por 73 espécies de fungos, sendo que destes apenas 7 eram provenientes dos sedimentos dos manguezais e o restante foi encontrado associado à vegetação do bosque.

Por meio de processos metabólicos como a fixação do nitrogênio, amonificação e desnitrificação, solubilização de fosfato, redução de sulfato, fotossíntese e metanogênese, as bactérias mantêm o fluxo de carbono e ciclagem de nutrientes

nestes solos (SAHOO; DHAL, 2009; TAKETANI et al., 2010). Com isso, transformam a matéria orgânica em fontes de nutrientes que podem ser usados pelas plantas e outros organismos (BASHAN; HOLGUIN, 2002). Como produto do seu metabolismo, os micro-organismos produzem compostos extracelulares, incluindo antibióticos, enzimas e biopolímeros que dão a estes organismos diversas aplicações nas áreas de saúde, farmacologia, biotecnologia, entre outras (BONUGLI-SANTOS et al., 2010; DIAS et al., 2009; GHOSH et al., 2007; ARUMUGAM et al., 2017).

Ismail e colaboradores (2017) investigaram o metagenoma e seu papel ecológico por meio de reconstrução metabólica de uma amostra de sedimento de manguezal a leste da costa da Malásia Peninsular. Os autores encontraram um percentual de 17,68% de micro-organismos pertencentes aos filos Proteobacteria e Acidobacteria. Análises genômicas revelaram que bactérias do filo Acidobacteria isoladas de rochas codificam genes envolvidos na biossíntese de exopolissacarídeos específicos para produção de celulose bacteriana. No entanto, não se pode afirmar ser uma característica geral do filo Acidobacteria, mas sugere-se que há um potencial para formação de biofilmes com resistência à dessecação e facilitando a formação de agregados do solo (KIELAK et al., 2016).

Rocha e colaboradores (2016) relacionaram *microhabitats* dentro de um ecossistema de manguezal com a comunidade bacteriana, destacando a representatividade dos filos Bacteroidetes e Proteobacteria. Dias et al. (2010) estudaram a diversidade bacteriana presente nos sedimentos de um manguezal preservado na Ilha do Cardoso (São Paulo, Brasil). Neste estudo, os autores encontraram uma comunidade bacteriana dominada por Alphaproteobacteria (40,36%), Gammaproteobacteria (19,28%) e Acidobacteria (27,71%), enquanto os componentes menores da assembleia foram afiliados a Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes.

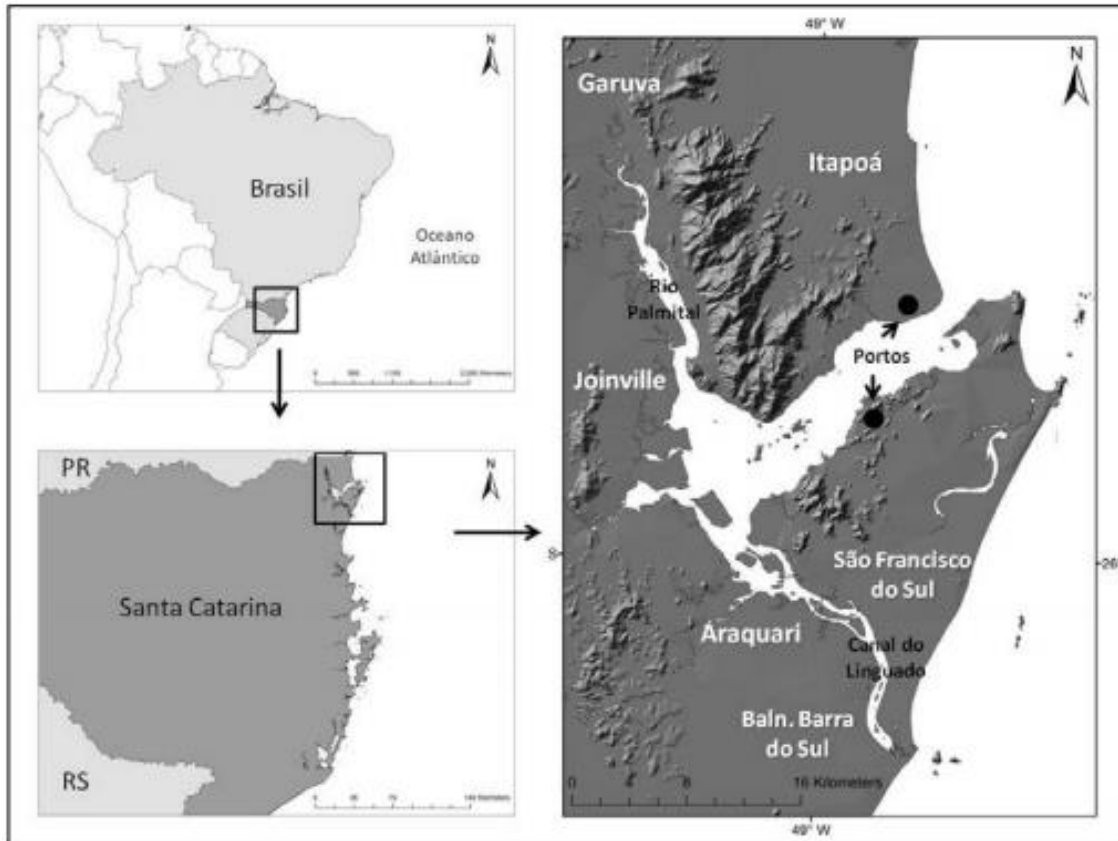
3.2 BAÍA BABITONGA

A Baía Babitonga (Figura 1) é o maior complexo estuarino do litoral de Santa Catarina, compreendendo a uma área de aproximadamente 160 km² de extensão, com uma bacia hidrográfica de mais de 1.560 km² (IBAMA, 1988). Localizada sob as coordenadas geográficas 26°07' e 48°42' Sul (DIEHL; HORN FILHO, 1996), possui

em seu entorno os municípios de Itapoá, Garuva, Joinville, Araquari, São Francisco do Sul e Barra do Sul.

O estuário é coberto por florestas de mangue e importantes remanescentes de Mata Atlântica e restinga, sendo que 75% dos bosques de manguezais do estado de Santa Catarina pertencem à esta região (IBAMA, 1988).

Figura 1 - Localização geográfica da BAÍA Babitonga.



Fonte: Serafini (2012)

Com relação à sua importância ecológica, a Baía Babitonga é destino de aves migratórias neárticas, que encontram refúgio do rigoroso inverno de origem nas planícies de maré no estuário (BISINELA; CREMER; ANDRADE, 2014; GROSE; HILLEBRANT; CREMER, 2017). É a área de vida de espécies ameaçadas como o peixe mero (*Epinephelus itajara*) (GERHARDINGER et al., 2006), como criticamente ameaçado de extinção pela IUCN, sendo protegido no Brasil por meio da Portaria Interministerial nº 13, de autoria dos Ministérios da Pesca e Aquicultura e do Meio Ambiente, até o ano de 2021; o golfinho toninha (*Pontoporia blainvillei*), que consta na lista vermelha da UCN como vulnerável desde 2017, e criticamente ameaçado no livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção; a tartaruga-verde

(*Chelonida mydas*) estando desde o ano de 2004 na lista vermelha como ameaçada e o boto-cinza (*Sotalia guinensis*) espécie considerada vulnerável no livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (CONSEMA/002, 2011).

Ainda sobre a importância ecológica, o estuário constitui um criadouro natural para inúmeras espécies de animais, estabelecendo um local seguro para reprodução, desova e nascimento dos espécimes, principalmente a ictiofauna (COSTA; SOUZA-CONCEIÇÃO, 2009). Essa particularidade reflete diretamente na atividade pesqueira local que conta com a captura de camarões (*Farfantepenaeus paulensis*, *Farfantepenaeus brasiliensis* e *Litopenaeus schimitti*), caranguejos (*Ucides cordatus*), peixes (GERHARDINGER et al., 2006; SOUZA-CONCEIÇÃO et al., 2013; MUNIZ; CUNHA CHAVES, 2008) e ainda o cultivo de moluscos (LOPES et al., 2013; TURECK et al., 2004). Vilar e colaboradores (2011), estudando a assembleia de ictiofauna da Baía Babitonga, registraram 70 espécies pertencentes a 30 famílias, das quais 93,1% dos espécimes coletados se encontravam em estágio juvenil de desenvolvimento, enquanto indivíduos adultos corresponderam a uma parcela de 6,8%. Os resultados encontrados pelos autores ressaltam a importância destas regiões como locais de abrigo, reprodução e crescimento, corroborando também com o potencial econômico, uma vez que os autores destacam que os peixes considerados altamente comerciais dominaram em abundância e número de espécie (84% da abundância total e 41 espécies), seguidos pelos não comerciais (15,3 e 24%) e comerciais (0,05 e 6%).

Sob a ótica de patrimônio histórico cultural, existem registros de mais de 170 sítios arqueológicos pré-coloniais na Baía Babitonga, os quais incluem sítios de pontas, oficinas líticas de polimento, sambaquis com cerâmica, sambaqui fluvial, sítio Guarani, sítios Jê, estruturas subterrâneas, sambaquis a céu aberto e um único sambaqui sob rocha (BANDEIRA et al., 2018). Dentre as ilhas do arquipélago da BAÍA Babitonga, a Ilha da Rita se destaca na história por ter sido base naval durante a Segunda Guerra Mundial, servindo de ponto de abastecimento de água potável, carvão e óleo aos navios.

Devido à sua localização geográfica, ao longo dos anos a região vem sofrendo com a ocupação desordenada, resultando na degradação de seus ecossistemas, especialmente manguezais. A Baía está inserida nos limites do maior polo industrial do Estado de Santa Catarina, na cidade de Joinville; os portos de São Francisco do Sul e Itapoá; e um terminal de transporte de petróleo em São Francisco do Sul, resultando em uma grande pressão antrópica sobre o meio ambiente da região.

Segundo a portaria de nº9, de 23 de janeiro de 2007 do Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2007), a região é candidata à criação de uma área protegida de uso sustentável. A iniciativa se dá pelo ecoturismo na região, pela força da pesca artesanal ainda presente e para a preservação das espécies de importância comercial e ecológica.

3.3 BIOFILMES

Biofilmes podem ser definidos como congregações heterogêneas de micro-organismos ligados a um substrato e envolto por matriz composta de substâncias poliméricas extracelulares (*Extracellular Polymeric Substance* - EPS), a qual é chamada de matriz do biofilme (LAZĂR, 2003). Aproximadamente 10% da composição do biofilme está representado por células de micro-organismos, enquanto que o EPS corresponde a uma proporção de 50 a 90% do total da estrutura (DONLAN; COSTERON, 2002).

A matriz pode ser formada por uma única categoria de EPS ou um conglomerado de diversas EPS's, variando quanto à composição química e suas propriedades físicas, oriundas das células microbianas que compõe o biofilme (DONLAN; COSTERON, 2002; LAZĂR; CHIFIRIUC, 2010; FLEMMING; WINGENDER, 2010). A composição de uma matriz polimérica pode apresentar proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e polissacarídeos, que são dispersos por canais de água. A presença de ductos e canais de água é essencial para a manutenção do biofilme, possibilitando o fluxo de nutrientes e a distribuição dos metabólitos dentro da estrutura polimérica (DONLAN; COSTERON, 2002; FLEMMING; WINGENDER, 2010; DONLAN, 2001; MAYER et al., 1999; BEECH, 2004). Algumas EPS's apresentam propriedades hidrofóbicas, porém a grande maioria expressa caráter anfipático (DONLAN et al.; 2002; AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006). Cada biofilme possui uma estrutura única que está diretamente relacionada com a superfície do substrato, as propriedades da interface, a disponibilidade de nutrientes, a composição da comunidade microbológica, constituição da matriz polimérica e hidrodinâmica em que o biofilme se desenvolve (STEWART; FRANKLIN, 2008).

A colonização da superfície durante a formação do biofilme pode ocorrer na interface sólido-líquido (biofilme - ISL), interface sólido – ar (biofilme – ISA), interface

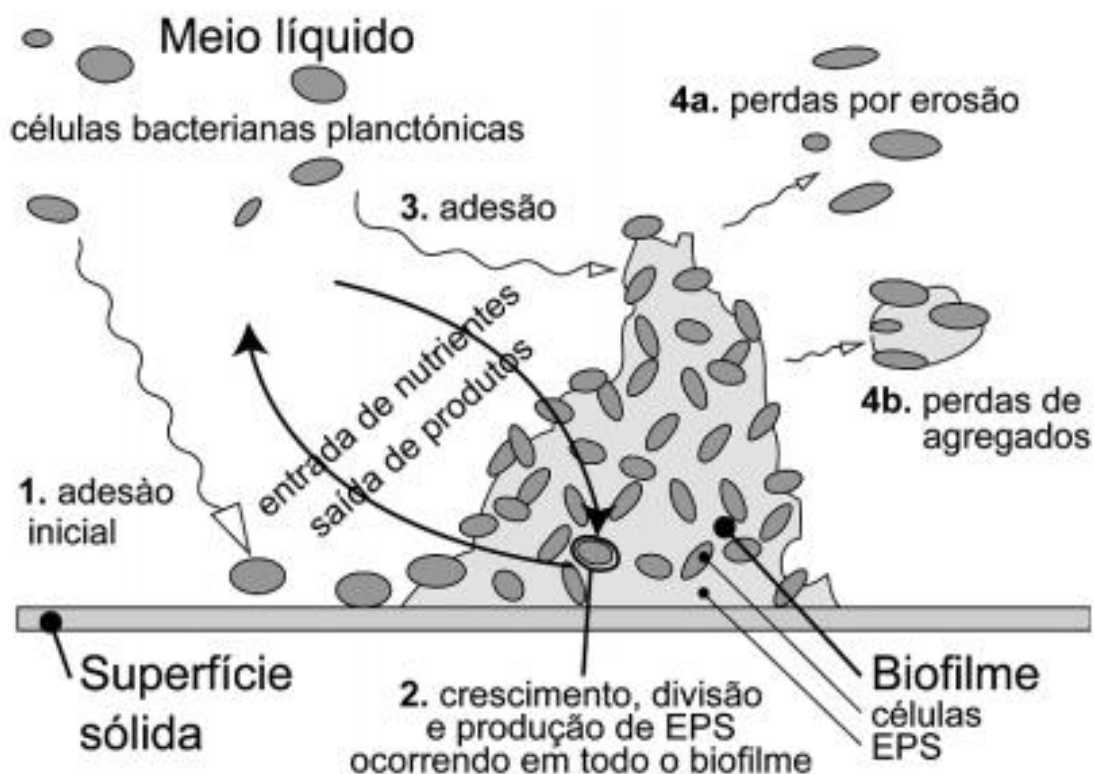
líquido - líquido (biofilme – ILL) e na interface líquido - ar (biofilme ILA). Nesta última, observa-se a formação de película na região do menisco (COSTERTON et al., 1995).

A formação de biofilmes ISL apresenta distintos estágios de desenvolvimento (GHIGO, 2003; STOODLEY et al., 2002). Primeiro, as células dos micro-organismos livres (células planctônicas) entram em contato com uma superfície ou com um micro-organismo já fixado, no qual se aderem e se mantêm irreversivelmente ligadas a essa superfície. Em seguida, as células anexadas produzem EPS e se multiplicam, estabelecendo uma microcolônia, que posteriormente resulta em biofilmes maduros. Esse primeiro estágio de colonização pode ocorrer em um período de poucos dias a meses (LAZĂR, 2003). Embora não seja uma regra, as células do biofilme são fisiologicamente distintas devido à grande variedade de condições encontradas, ocasionada principalmente pela limitação da difusão de nutrientes e oxigênio no interior do biofilme (GHIGO, 2003; STOODLEY et al., 2002).

Após o processo de colonização e de crescimento, o biofilme estabelecido de várias camadas pode ser colonizado por outras espécies microbiológicas incapazes de iniciar a colonização, resultando em um biofilme complexo. A disponibilidade de nutrientes é um fator determinante para o desenvolvimento do biofilme. Quando há redução drástica do nutriente ocorre o desprendimento das células, levando o micro-organismo novamente à forma livre (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000; WATNICK; KOLTER, 2000; LAZĂR, 2003). Cultivos líquidos da levedura *Candida albicans* formam biofilmes ISL densos que variam em espessura de 100 a 600 µm, apresentam pseudo hifas apicais no meio de cultura líquida e hifas invasivas no substrato sólido, aumentando, dessa forma, a espessura e a complexidade do biofilme (LAGREE et al., 2018).

Outros fatores podem provocar o desprendimento do biofilme ou de uma porção das células do mesmo, transcorrendo de forma passiva devido a fatores extrínsecos como cisalhamento, descamação e erosão (RUPP; FUX; STOODLEY, 2005) ou ainda por mecanismos empregados pelas próprias células do biofilme. O mecanismo de formação de biofilmes ISL é ilustrado na Figura 2.

Figura 2 - Mecanismo de formação de biofilme na interface sólido-líquido.



Fonte: Xavier et al. (2003)

Biofilmes em interfaces sólido-líquido ou sólido-ar são extensivamente conhecidos (CONSTANTIN, 2009; MYSZKA; CZACZYK, 2011; O'TOOLE; KOLTER, 1998; LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2012). No entanto, a formação de biofilmes na interface ar-líquido (películas) tem despertado interesse, sendo que esse ambiente permite que os micro-organismos aeróbicos e aeróbicos facultativos tenham acesso ao oxigênio. Estudos com biofilmes ILA têm sido utilizados como modelos para entender a funcionalidade de compostos extracelulares e das estruturas superficiais na formação de biofilmes, como também nas implicações importantes na saúde (WU et al., 2012; CEGELSKI et al., 2009; HOLLENBECK et al., 2014) e a sua aplicação na indústria (MORIKAWA, 2006).

Fatores que levam os micro-organismos a formarem biofilmes ILA não estão totalmente esclarecidos, no entanto alguns autores sugerem que a hidrofobicidade celular, a motilidade flagelar e/ou a síntese de EPS's são elementos que auxiliam as bactérias e outros micro-organismos a permanecerem inseridos na interface

(DONLAN; COSTERON, 2002; VLAMAKIS et al., 2013; YAMAMOTO et al., 2010). Estudos com *Pseudomonas aeruginosa* demonstram que a capacidade da espécie em formar biofilmes espessos em placas de ágar e biofilme ILA está relacionada com a produção de EPS's, incluindo o polissacarídeo Psl (do inglês *Polysaccharide synthesis locus*) e o polissacarídeo Pel (película). Micro-organismos sem expressão de Psl e Pel formam biofilmes e películas imperfeitos (FRIEDMAN; KOLTER, 2004).

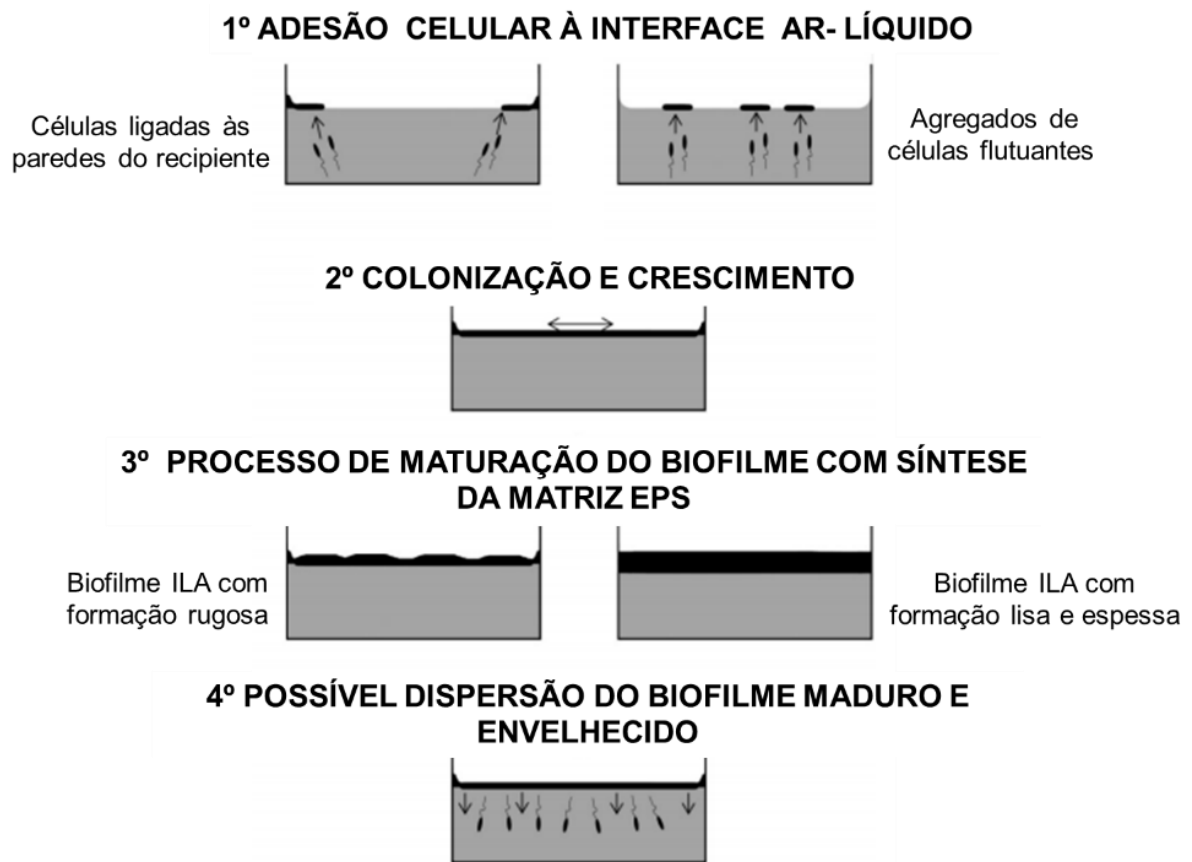
Supõe-se que o biofilme ILA atue como um dispositivo de flutuação, mantendo os micro-organismos na interface líquido-ar, proporcionando acesso a altas concentrações de oxigênio provenientes do ar, e de nutrientes presentes no meio líquido (YAMAMOTO et al., 2010).

Em cultivos sob condições estáticas tem-se como resultado da ação gravitacional a sedimentação das células ao fundo do recipiente de cultivo. Dessa forma, micro-organismos que possuem a capacidade de formar biofilmes ILA apresentam mecanismos que os auxiliam na colonização na interface líquido-ar (ARMITANO; MÉJEAN; JOURLIN-CASTELLI, 2014). Esses mecanismos podem ser em função de: deslocamento da película devido a diferenças de densidade (ZARA et al., 2005; VLAMAKIS et al., 2013) por meio da síntese de compostos tensoativos, surfactantes, matriz EPS hidrofóbica ou que impossibilite a mistura com o meio líquido (MOHITE; PATIL, 2014; ANGELINI et al., 2009; MEDRANO-FÉLIX et al., 2018) ou ainda pela fixação das películas à parede do recipiente de cultivo (ROBERTSON et al., 2013; FIEBIG, 2019).

O modelo de formação de biofilmes ILA proposto por Armitano, Méjean e Jourlin-Castelli (2014) é composto por 4 etapas (Figura 3): 1º - adesão celular à interface líquido - ar, dando origem ao biofilme como estruturas ligadas às paredes do recipiente de cultivo ou como agregados de células flutuantes; 2º - colonização, crescimento e desenvolvimento de um biofilme primariamente tênue; 3º - processo de maturação do biofilme com síntese da matriz EPS e com micro-organismos aderidos, apresentando variadas formas, a qual depende do micro-organismos e das condições do meio de cultivo; 4º - possível dispersão do biofilme maduro e envelhecido (ARMITANO; MÉJEAN; JOURLIN-CASTELLI, 2014).

Em cultivo líquido da espécie *Bacillus subtilis* ocorre o deslocamento das células microbianas até a superfície do líquido, produzindo a matriz extracelular e conseqüentemente o biofilme ILA, podendo ou não aderir à lateral do recipiente (VLAMAKIS et al., 2013).

Figura 3 - Modelo de formação de Biofilmes ILA.



Fonte: Adaptado de Armitano, Méjean e Jourlin-Castelli (2014).

3.3.1 O papel dos biofilmes na patogenicidade

A matriz é responsável por reter os micro-organismos nos biofilmes por meio da adesão a diversos substratos conferindo a estas inúmeras vantagens competitivas, como por exemplo a troca eficiente de nutrientes (HOOPER; GORDON, 2001), resistência a atividades biológicas, químicas e *stress* físico (OTTO, 2014) e a tolerância à ação de surfactantes e compostos desinfetantes (JOHANI et al., 2018). Em alguns casos, o EPS possui a capacidade de sequestrar cátions, metais e toxinas, podendo ainda proporcionar proteção contra radiações ultravioleta, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação (KYAW, 2008).

Das funções atribuídas aos biofilmes, a resistência a substâncias antibióticas é considerada de extrema importância, devido à relação com a patogenicidade. A

resistência aos antibióticos por parte dos biofilmes pode ser relacionada a atuação do EPS como barreira física para difusão, sustentando grande parte das substâncias antibióticas, como também pela interação química sequestrando os antimicrobianos hidrofílicos e carregados positivamente (NICHOLS et al., 1988; BALCÁZAR; SUBIRATS e BORREGO, 2015).

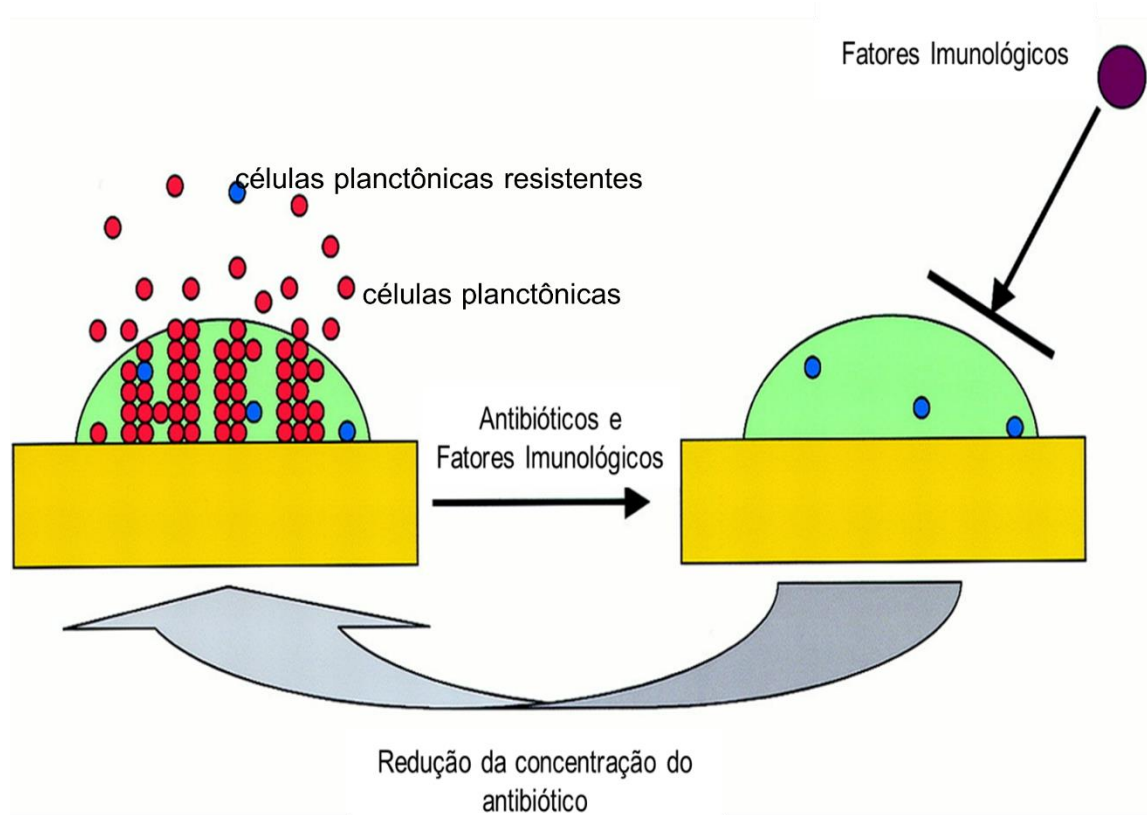
Juntamente com a proteção física da matriz EPS ao antibiótico, o biofilme promove a transferência horizontal de genes por meio da troca de material genético dos micro-organismos, contribuindo para a disseminação de genes de resistência para múltiplos agentes antimicrobianos (STALDER; TOP, 2016; BALCÁZAR; SUBIRATS; BORREGO, 2015). Em um estudo sobre o papel protetor das substâncias poliméricas extracelulares Wang e colaboradores (2018) observaram por meio da análise espectral que as proteínas dominaram as interações entre EPS e antibióticos e que o percentual da concentração total de antibióticos adsorvidos no EPS representou 14,5% para sulfametizol, 88,2% tetraciclina e 13,1% norfloxacin, no estágio de biodegradação do biofilme. As taxas respiratórias e atividades enzimáticas foram inferiores para o biofilme sem a presença da matriz EPS quando expostos a antibióticos, e ainda o sequenciamento genético demonstrou que a comunidade bacteriana para este biofilme apresentou maior sensibilidade ao contato com os antibióticos. O acúmulo de antibióticos no EPS foi responsável pela redução da toxicidade direta dos micro-organismos e pela redução na diversidade microbiana e o aumento na abundância de espécies com maior tolerância aos antibióticos.

Quando biofilmes resistentes são desagregados, as células microbiológicas livres apresentam suscetibilidade aos tratamentos com antibióticos, corroborando com a concepção de que a proteção do biofilme ocorre pela limitação do transporte de substâncias antibióticas (DAVIES et al., 1998). Os micro-organismos presentes em um biofilme possuem resistência antimicrobiana aumentada em até 1000 vezes quando comparados com as células de micro-organismos livres (KAALI, STRMBERG e KARLSSO, 2011; CERI et al., 1999; MAH e O'TOOLE, 2001).

Outro fator que contribui para a resistência antimicrobiana é a dificuldade do reconhecimento dos biofilmes pelo sistema imunológico do hospedeiro, devido a presença do EPS. Desta forma, garante a proteção das células no interior do biofilme contra a ação de anticorpos, radicais livres e outros compostos reativos produzidos para o combate de infecções (BRYERS, 2008). As células microbianas sobreviventes são responsáveis pelo desenvolvimento de novos biofilmes logo que houver a redução

da concentração do antibiótico ou a interrupção do tratamento com base na aparente ausência de infecção, justificando a dificuldade na eliminação de biofilme (LEWIS, 2000). A Figura 4 exemplifica a dinâmica de sobrevivência dos micro-organismos do biofilme em um sistema *in vivo*, mediante a ação de um antibiótico cíclico.

Figura 4 - Modelo de resistência a antibióticos baseado na sobrevivência de células do biofilme. O tratamento inicial com antibiótico elimina células de micro-organismos livres e grande parte das células presentes no biofilme. O sistema imunológico é capaz de eliminar os micro-organismos remanescentes livres, que não foram eliminados pela ação do antibiótico, porém as células sobreviventes do biofilme são protegidas pela matriz EPS. Após redução da concentração de antibiótico há o desenvolvimento de um novo biofilme pelos micro-organismos sobreviventes.



Fonte: Adaptado de Lewis (2001).

Aproximadamente 60 a 80% das infecções no organismo humano estão relacionadas com a presença de biofilme (COSTERTON et al., 1995). Nesse contexto de interações micro-organismo-hospedeiro, os biofilmes proporcionam aos micro-organismos um ambiente de baixa proteção por parte do hospedeiro, contribuindo significativamente para o desenvolvimento da infecção (SONNENBURG; ANGENT; GORDON, 2004). A capacidade da síntese de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* influencia diretamente na patogênese em hospedeiros

suscetíveis. Aghamali e colaboradores (2018) demonstraram que os genes PA2070 e PA5033 estão associados à resistência antimicrobiana específica ao biofilme de *P. aeruginosa*, os quais apresentaram maior nível de expressão nas células do biofilme, quando comparadas com as células livres.

Muitos estudos relacionam genes de fator de virulência com a capacidade de formação de biofilmes pelas espécies microbiológicas (MARYAM et al., 2014; NIU et al., 2016; RAHIMI et al., 2018; YEH; WANG; LAN, 2018; HEIDARI et al., 2018). A relação significativa entre a formação de biofilmes e a presença dos genes do fator de virulência, *gelE* responsável para produção da enzima gelatinase e o gene *esp* responsável pela produção da proteína de superfície extracelular em bactérias do gênero *Enterococcus* foram observadas por Rahimi e colaboradores (2018). Os autores mencionam a capacidade de formação de biofilme de 91,5% para *E. faecalis* e 58,7% para *E. faecium*. A prevalência dos genes *gelE* e *esp* foi de 81,9% e 79,5% em *E. faecalis* e 76,5% e 58,8% em *E. faecium*, nesta ordem. Destaca-se que 54,3% e 56,6% dos produtores de biofilme com melhor espessura, apresentaram os genes de virulência *gelE* e *esp* respectivamente, enquanto, entre os não produtores de biofilme, apenas 6,2% dos isolados possuíam o gene *gelE* e 9,2% portavam gene *esp*.

Os fatores de virulência de *Candida albicans* incluem morfogênese de hifas leveduriformes, adesinas associadas à superfície celular, troca fenotípica, hidrolases secretadas e formação de biofilme (BROWN et al., 2014; MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

Yeh e colaboradores (2018) caracterizaram as funções do gene *Aro1* quanto a integridade da parede celular, formação de biofilme e a virulência de *C. albicans*, evidenciando que a deleção do gene em cepas de *C. albicans* alteraram as propriedades e a arquitetura da parede celular, resultando na maior adesão da levedura a superfícies, como também o aumento da formação de biofilme. Apesar de a deleção do gene *Aro1* aumentar a síntese de biofilmes o mesmo reduziu o potencial da virulência de *C. albicans*, aplicada a um modelo de infecção *in vivo* com *Galleria mellonella*.

Estudos sobre a composição bioquímica da matriz EPS de *C. albicans* demonstraram a presença de um complexo de manana-glucana único (MGCx), o qual é composto de três blocos de construção dos polissacarídeos α -1,6-manano, β -1,6- e β -1,3-glucanos (DOMINGUEZ et al., 2018; ZARNOWSKI et al., 2014). A presença desses polissacarídeos unidos extracelularmente e formando um complexo na matriz

EPS de *C. albicans* contribui para o sequestro de antifúngicos, e consequentemente levando a resistência antimicrobiana (MITCHELL; ZARNOWSKI; ANDES, 2016; NETT et al., 2010). A característica de reter antimicrobianos na matriz EPS é comumente observada nas espécies do gênero *Candida* (MITCHELL et al., 2013). Embora a composição do biofilme das espécies desse gênero apresente variações, Dominguez e colaboradores (2018) comprovaram que cada uma das espécies estudadas pelos autores (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*) sintetizaram um complexo extracelular MGCx, sendo que as diferenças estruturais nas cadeias laterais ramificadas dependem de enzimas de modificação únicas, as quais são específicas de cada espécie. Ainda sobre a composição estrutural da matriz EPS de *C. albicans* é possível afirmar a presença de glicoproteínas e polissacarídeos neutros, aproximadamente 458 proteínas, lipídios os quais incluem glicolipídeos neutros e polares e esfingolipídios, ácidos nucleicos, fósforo, ácido urônico e hexosamina (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006; ZARNOWSKI et al., 2014).

Já a matriz EPS de *Aspergillus fumigatus* possui em sua composição estrutural carboidratos como galactosaminagalactanos (GAG), α -1,3 glucano, monossacarídeos, proteínas as quais em sua maioria são antígenos e hidrofobinas, lipídios, melanina, polióis e ácidos nucleicos (GRAVELAT et al., 2013). Lee e colaboradores (2015) associaram o polissacarídeo galactosaminagalactano a atividade protetora contra antifúngicos em espécies do gênero *Aspergillus*.

Existem muitas hipóteses sobre a alta resistência de biofilmes à agentes antibióticos, e o seu potencial de virulência. Como discutido no tópico anterior, os biofilmes comumente apresentam características microbiológicas, químicas e morfológicas heterogêneas, portanto, os mecanismos que lhe conferem resistência e virulência são igualmente variados e particulares, atribuindo ainda mais a importância no desenvolvimento de estudos sobre esse assunto.

3.3.2 Espécies produtoras de biofilmes

A presença de biofilmes pode ser atribuída de forma benéfica ou prejudicial a vários setores como: médico, industrial, alimentício, ambiental e tecnológico.

Para a indústria alimentícia, o desenvolvimento de micro-organismos na superfície de alimentos, é uma das principais causas de deterioração e perdas de produtos processados e *in natura*, relacionados principalmente com a formação de

biofilmes ISL e ISA. Em grande parte dos surtos de intoxicação alimentar, parece haver associação com a presença dos biofilmes (ZOTTOLA, 2001). Os gêneros *Vibrio*, *Listeria*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Aeromonas* e *Pseudomonas* são conhecidos por serem formadores de biofilme em processamento de carnes, peixes e frutos do mar (RAJKOWSKI, 2009; FARUQUE et al., 2006; ENOS-BERLAGE et al., 2004; KOGURE; IKEMOTO; MORISAKI, 1998). Biofilme de *Streptococcus thermophilus* foi encontrado próximo do efluente de leite pasteurizado (BRABES et al., 2004). É possível verificar a presença de biofilmes no abastecimento de água natural e industrial, mesmo que o teor de nutrientes seja considera baixo. Gêneros de bactérias como *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* e *Achromobacter* podem ser encontrados na água potável (MATTILA-SANDHOLM; WIRTANEN, 1992).

No que se refere a formação de biofilmes ILA (película), o interesse comercial pela indústria de alimentos está direcionado principalmente aos benefícios, sendo os biofilmes e/ou derivados produzidos em função de suas propriedades nutritivas e pelo sabor agradável. A celulose bacteriana é um dos maiores exemplos de biofilmes bacterianos com amplo interesse comercial, podendo ser consumido o biofilme (sobremesa nata de coco) (ZHANG et al., 2017) ou derivados de seu cultivo, como a produção de emulsificantes, gelificantes, bebidas fermentadas (vinho, vinagre, Kombucha) (ESA; TASIRIN; RAHMAN, 2014; SHI et al., 2014; MOHITE; PATIL, 2014; SHARMA et al., 2019; KAPP; SUMNER, 2019). A celulose bacteriana é produzida por vários gêneros bacterianos: *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Sarcina*, seja isoladamente ou em conjunto com outros micro-organismos como ocorre na produção de biofilme do Kombucha (SHI et al., 2014; FORESTI; VÁZQUEZ; BOURY, 2017). A espécie *Komagataeibacter xylinus* é considerada cepa modelo amplamente utilizada em pesquisa e produção comercial (SHI et al., 2014).

Outro exemplo de biofilme com ampla aplicação são os biofilmes de pululana produzidos em larga escala por micro-organismos como: *Aureobasidium* spp, *Cytaria* spp, *Teloschistes flavicans*, *Rhodototula bacarum* e *Cryphonectria parasítica* (SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017). Biofilmes de pululana produzidos pela levedura *Aureobasidium pullulans* demonstraram capacidade de proteger frutas cítricas da ação deterioradora do fungo *Geotrichum citri-aurantii* (KLEIN; KUPPER, 2018).

Na área ambiental os biofilmes possuem importante atuação na biorremediação de efluentes industriais, removendo poluentes orgânicos e inorgânicos de águas e solos contaminados. São exemplos de micro-organismos com potencial de biorremediação: *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Pseudomonas pseudoalcaligenes* para a remoção de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em solos (SINGH; PAUL; JAIN, 2006; MANGWANI; KUMARI; DAS, 2017); *Acinetobacter* sp na biodegradação de benzeno (KOTOKY et al., 2017); *Candida* sp como produtor de biossurfactantes (SANTOS et al., 2017).

Em relação à área médica, biofilmes são citados em sua grande maioria como agentes patogênicos. O Quadro 1 traz uma síntese de patologias relacionadas com a presença de biofilmes e seus respectivos agentes microbiológicos. No entanto a interação de biofilmes com hospedeiro pode apresentar vantagens para os indivíduos que os mantêm, como abordado por Tytgat e colaboradores (2019). Os autores citam a importância da presença de biofilme no apêndice para a saúde humana, inferindo que este órgão, mesmo localizado no trato intestinal, está protegido do peristaltismo e em contato com contaminantes do fluxo fecal, tornando-o um local apropriado para a conglomeração de bactérias comensais. Acredita-se que o biofilme do apêndice proteja seus membros da colonização por patógenos e que em situações de redução drástica da microbiota intestinal, seja devido a exposição ao patógeno, infecção e ou tratamento com antibióticos, o apêndice pode auxiliar a restabelecer a microbiota saudável (SMITH et al., 2017; RANDAL et al., 2007).

Quadro 1 - Patologias relacionadas com a presença de biofilmes e seus respectivos agentes microbiológicos.

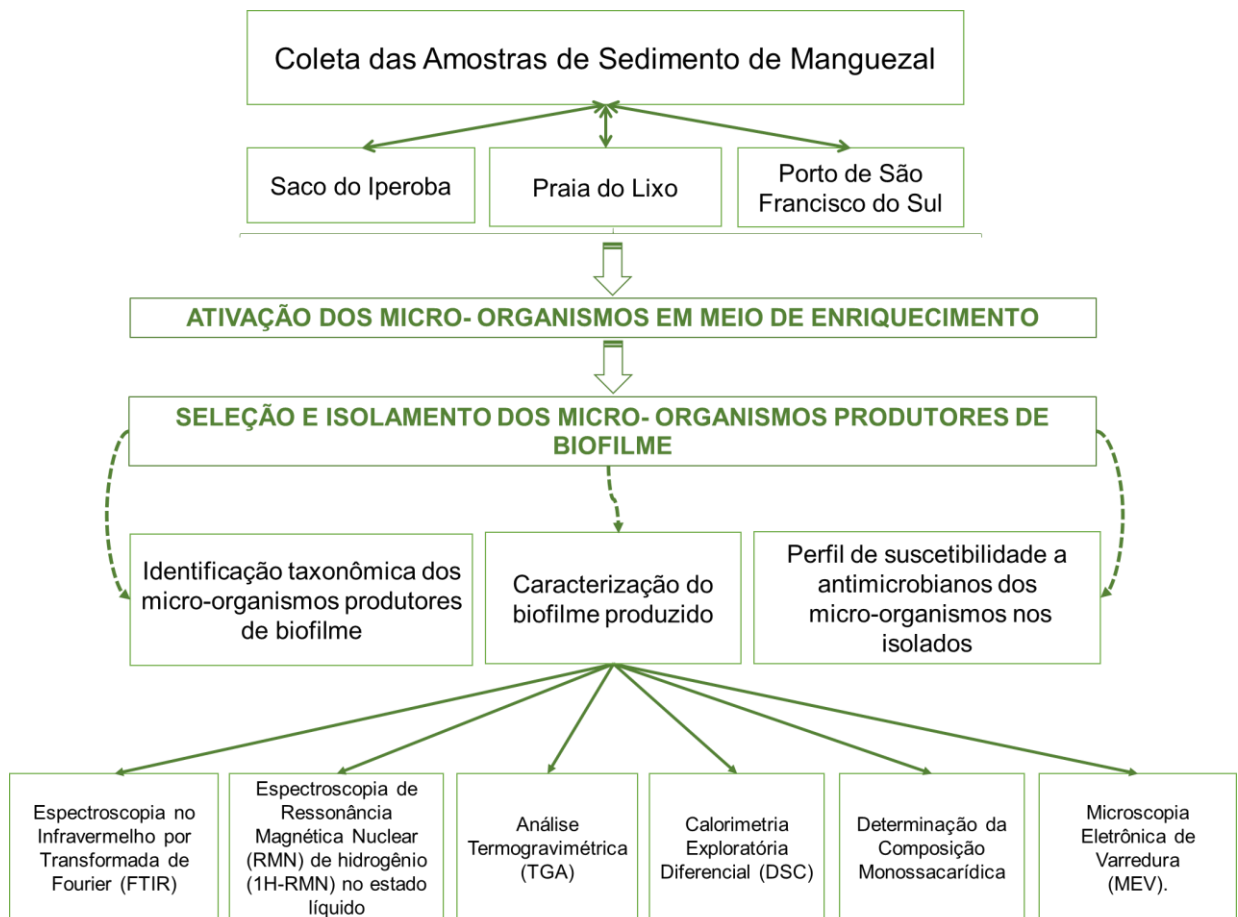
INFECÇÃO/SÍTIO	AGENTE CAUSADOR
Cáries dentárias	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Bifidobacterium</i> sp, <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Actinomyces viscosus</i>
Cateteres venosos central	<i>Sthaphylococcus coagulase</i> negativos, <i>Sthaphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Candida</i> sp
Dispositivos intrauterinos	<i>Sthaphylococcus epidermidis</i> , <i>Enterococcus</i> sp, <i>Streptococcus b</i> – hemolítico, <i>Lactobacillus</i> sp
Endocardite (válvulas mecânicas)	<i>Sthaphylococcus epidermidis</i> , <i>Sthaphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> sp, <i>Enterococcus</i> sp, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida</i> sp, <i>Aspergillus</i> sp
Esôfago (em aidéticos)	<i>Candida</i> sp
Enxertos vasculares	<i>Sthaphylococcus aureus</i> , <i>Sthaphylococcus coagulase</i> negativos, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , outros Gram-negativos
Lentes de contato e intraoculares	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia marcescens</i> e cocos Gram-positivos
Osteomielite	<i>Sthaphylococcus aureus</i>
Otite média	<i>Sthaphylococcus aureus</i>
Peritonite (cateteres de diálise peritoneal)	<i>Sthaphylococcus aureus</i> , <i>Candida</i> sp, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> outros Gram-negativos
Prostatites	<i>Escherichia coli</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Mycoplasma</i> sp
Próteses ortopédicas	<i>Sthaphylococcus aureus</i> e <i>Sthaphylococcus epidermidis</i>
Trato respiratório	<i>Streptococcus pneumoniae</i> e bacilos Gram-negativos
Trato respiratório (em fibrose cística)	<i>Sthaphylococcus aeruginosa</i> e <i>Burkholderia cepacia</i>
Trato urinário (cateteres urinários)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Candida</i> sp, <i>Klebsiella pneumoniae</i> e outros Gram-negativos
Tubos endotraqueais	Gram-negativos entéricos, <i>Staphylococcus</i> sp, <i>Streptococcus</i> spp.; <i>Enterococcus</i> spp.
Vagina	<i>Candida</i> spp.

Fonte: Adaptado de Stoica et al. (2017)

4. METODOLOGIA

Para o desenvolvimento deste estudo foram realizadas coletas do sedimento em três pontos amostrais localizados no manguezal da Baía Babitonga, seguido da seleção e isolamento dos micro-organismos produtores de biofilme e posteriormente a identificação taxonômica destes e a caracterização do biofilme produzido. O fluxograma na Figura 5 expõe as etapas aplicadas no estudo.

Figura 5 - Fluxograma da metodologia aplicada no estudo.

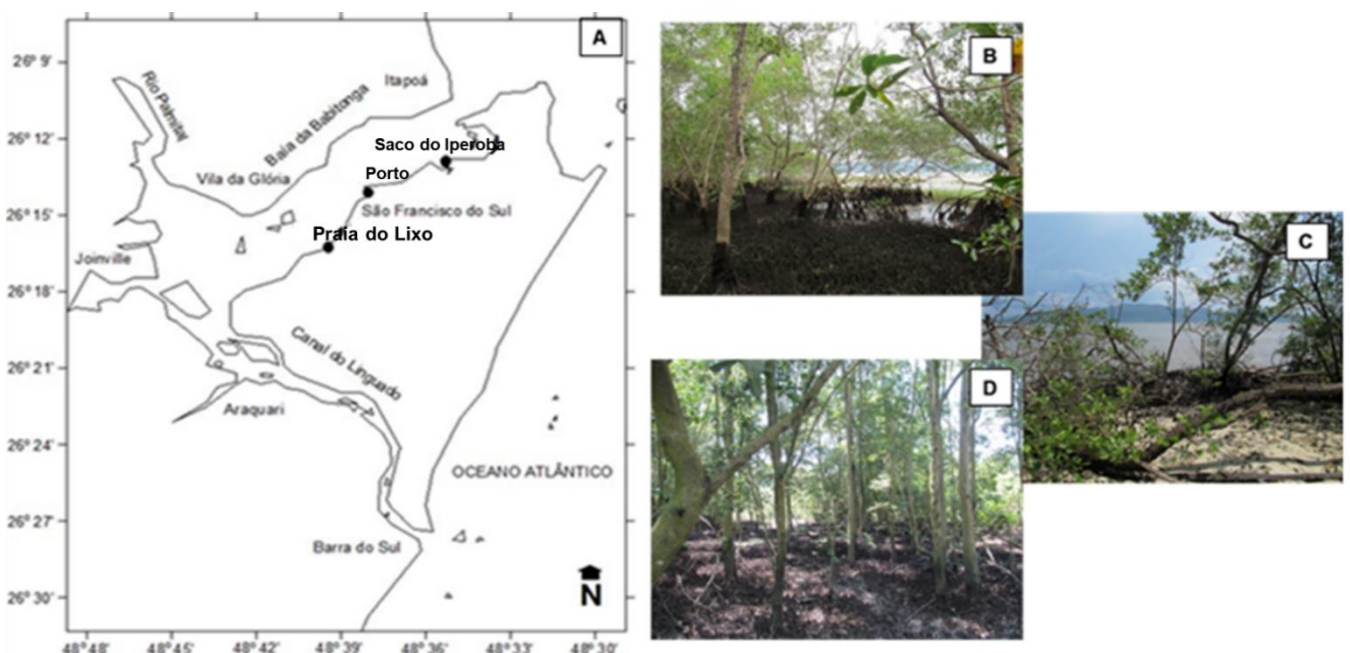


4.1 ÁREA DE ESTUDO

Foram selecionados três pontos amostrais localizados no manguezal da Baía Babitonga, localizada sob as coordenadas geográficas 26°07' e 48°42' sul (DIEHL; HORN FILHO, 1996). Os pontos selecionados para este estudo estão localizados na mesma margem da Baía Babitonga, a fim de minimizar os efeitos de possíveis diferenças de salinidade pela ação das marés e aporte dos rios, sendo a influência ambiental a mais semelhante possível (Figura 6 A).

O primeiro ponto amostral selecionado está localizado na região do Saco do Iperoba (S26° 12.907' W048° 35.661), apresentando baixa supressão da vegetação, não integrando moradias em seu entorno, sendo o bosque com o menor impacto ambiental das áreas selecionadas para este estudo (Figura 6B). O segundo ponto amostral localiza-se na Praia do Lixo (S26° 15.701' W048° 38.852), que recebe influência de construções residenciais e do despejo constante de efluente doméstico (Figura 6C). O último ponto encontra-se próximo ao Porto de São Francisco do Sul (S26° 14.431' W048° 38.272) (Figura 6D), uma área com intenso fluxo de embarcações e na qual ocorrem dragagens a cada 22 meses (PETCON, 2003).

Figura 6 - Área de estudo. [A] Imagem do mapa da Baía da Babitonga – Santa Catarina, com a localização dos pontos selecionados para amostragem. Fonte: Dr. Luciano Lorenzi. [B] Fotografia do bosque selecionado no Saco do Iperoba. [C] Fotografia do bosque selecionado na Praia do Lixo. [D] Fotografia do bosque selecionado próximo ao Porto de São Francisco do Sul.



Fonte das fotografias: Dr. Luciano Lorenzi [A] Mariana Serwy Oortman [B,C,D].

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE SEDIMENTO DE MANGUEZAL

De cada ponto amostral foram retiradas três amostras da camada superficial do sedimento (0-10 cm) para análise da comunidade microbiana. Cada amostra foi obtida por amostrador de 10 cm, com 7 cm de diâmetro, introduzido no sedimento do manguezal (Figura 7A) e retirado contendo o material a ser analisado. Para reduzir a ação da variabilidade do ambiente, cada amostra foi composta de três sub-amostras homogeneizadas *in situ* em frascos plásticos (Figura 7B) e armazenadas em tubos Falcon de 50 mL devidamente etiquetados (Figura 7C). Após o armazenamento e identificação, as amostras foram imediatamente transportadas para congelamento a - 80 °C, até a sua utilização, a fim de evitar a perda do material bacteriológico.

Figura 7 - Procedimento de Coleta do sedimento. [A] Processo da retirada do sedimento utilizando amostrador. [B] Material utilizado na homogeneização das sub - amostras. [C] Sedimento devidamente armazenados em tubos Falcon.



Fonte das fotografias: Manoela L. P. Miranda

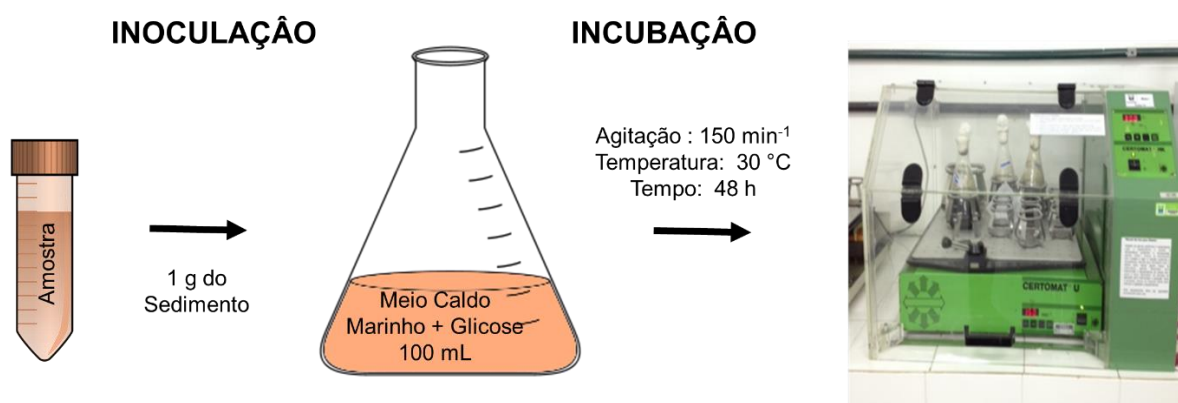
4.3 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE BIOFILME

4.3.1 Ativação dos micro-organismos em meio de cultura líquido

Para a ativação dos micro-organismos aeróbios mesófilos presentes nas amostras de sedimento coletadas foi utilizada a técnica de enriquecimento de culturas desenvolvida por Costa e colaboradores (2009). Frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultivo Caldo Marinho (*DIFCO*) foram autoclavados (121 °C, 1 atm) e inoculados com 1 g de cada amostra retirada dos pontos selecionados para este estudo (Saco do Iperoba, Praia do Lixo e Porto de São

Francisco). Em seguida, os frascos foram incubados sob agitação orbital de 150 min⁻¹, em temperatura de 30 °C, por 48 h, para o crescimento dos micro-organismos (Figura 8). A temperatura e a agitação foram definidas de forma a proporcionar a seleção de micro-organismos aeróbios mesófilos. Como fonte de carbono foi utilizada glicose na concentração de 20 g/L.

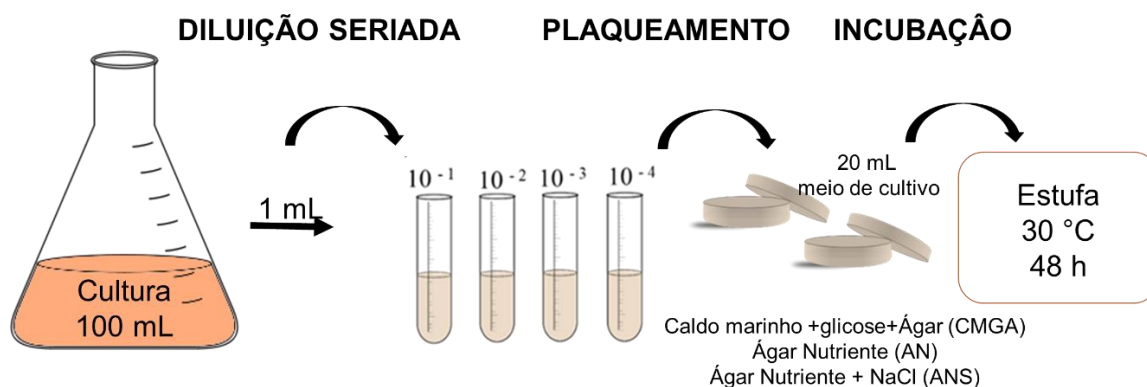
Figura 8 - Esquema do processo de ativação em meio de cultivo líquido



4.3.2 Isolamento dos micro-organismos

1 mL das culturas obtidas no meio de enriquecimento reportado no item 4.3.1 foram submetidos a diluição seriada (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} e 10^{-4}) em solução salina 0,9%. As suspensões celulares diluídas foram inoculadas em duplicatas por meio do método de estriamento, em placas de Petri contendo diferentes meios de cultivo, com o objetivo de verificar o melhor meio para o crescimento dos micro-organismos (Figura 9). Foram utilizados os seguintes meios de cultivo: caldo marinho adicionado de ágar (20 g/L) e glicose (20 g/L) (CMGA); Agar Nutriente (23 g/L) (AN); e Agar Nutriente (ANS) adicionado de cloreto de sódio na concentração de 19,45 g/L, a mesma encontrada do meio caldo marinho (CM), mantendo dessa forma a salinidade na qual os micro-organismos se desenvolveram. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h. As colônias isoladas foram identificadas morfológicamente quanto ao tamanho (pequena, média ou grande), à forma (irregular, redonda ou puntiforme), à borda (lisa, lobada ou ondulada), à estrutura (lisa ou rugosa), à cor (sem cor, levemente branca e branca) e quanto ao aspecto (viscosa, leitosa, opaca ou úmida).

Figura 9 - Esquema do processo de isolamento dos micro-organismos



4.3.3 Seleção de micro-organismos produtores de biofilme

Tubos de ensaio de 20 mL contendo 10 mL de meio de cultivo líquido Caldo marinho adicionado de 20 g/L de glicose (CMG), Caldo Marinho (CM) e Caldo Nutriente (CN) foram esterilizados em autoclave a 121 °C, 1 atm, por 20 min. Em seguida, os tubos foram inoculados com duas alçadas de cada colônia de micro-organismo isolado conforme descrito no item 4.3.2 e incubados estaticamente em estufa a 30 °C, por 12 dias, a fim de verificar a formação de biofilme na interface líquido - ar. Após o período de incubação, os tubos de ensaio que apresentaram melhor formação de biofilme foram selecionados para identificação genética dos micro-organismos. A película formada na interface líquido - ar do caldo de cultivo foi retirada do tubo de ensaio e tratada com uma solução 0,1 N de NaOH a 80 °C, por 60 min, para a dissolução dos micro-organismos. Após, a película foi lavada com água destilada até a neutralização, e seca em estufa a 60 °C por 2 h (DONINI et al., 2010) e então armazenadas em um dessecador para as análises de caracterização físico-química.

4.4 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE BIOFILME

A identificação das colônias foi realizada pela empresa Neoprospecta Microbiome Technologies SA. Os principais marcadores utilizados nesta identificação são os genes rRNA 16S para identificação taxonômica de bactérias e o marcador ITS

(Internal Transcribed Spacer) para a identificação de fungos. Após a extração do DNA seguiram-se dois passos de preparo molecular das amostras onde foram introduzidos tags no material genético purificado. Estes tags têm a finalidade de prover, posteriormente, a separação das amostras dentro do fluxo de análise computacional. A etapa seguinte ao preparo molecular foi a realização do sequenciamento de DNA utilizando a plataforma de sequenciamento de nova geração “MiSeq” da Illumina. Posteriormente, os dados foram processados por um software Epiome e carregados em uma plataforma específica para análise e interpretação dos resultados (CHRISTOFF et al., 2017).

4.5 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DOS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS

Os micro-organismos isolados com indicação de patogenicidade pela literatura foram submetidos à avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos. Determinou-se o perfil de suscetibilidade de bactérias de acordo com a metodologia de Bauer (1966). Os micro-organismos isolados foram cultivados em meio CMGA por 48 h, a 30 °C. Após este período, ajustou-se a cultura de cada micro-organismo para 0.5 da escala MacFarland, e em seguida aplicou-se em diversas direções com a ajuda de um swab sobre a placa de Petri contendo ágar Müller-Hinton. Após esse procedimento, discos de difusão impregnados dos antibióticos: ampicilina 10 µg (AMP), ciprofloxacina 5 µg (CIP), clorafenicol 30 µg (CLO), fosfomicina 200 µg (FOS), eritromicina 15 µg (ERI), linezolida 30 µg (LNZ), nitrofurantoína 300 µg (NIT), norfloxacina 10 µg (NOR), penicilina 10 µg (PEN), rifampicina 5 µg (RIF), teicoplanina 30 µg (TEC), tetraciclina 30 µg (TET) e vancomicina 30 µg (VAN), foram distribuídos sobre a placa e estas armazenadas em estufa a 30 °C, por 24 h para a medida do diâmetro dos halos de inibição.

Para fungos, a preparação do inóculo e o teste de suscetibilidade foram realizados de acordo com o documento M44-A2 (CLSI, 2010). O inóculo foi preparado selecionando-se cinco colônias com diâmetro de aproximadamente 1 mm, a partir de culturas de 24 ou 48 h (dependendo da espécie fúngica), incubadas a 35 °C. A cultura de cada micro-organismo foi ajustada para 0.5 da escala MacFarland, e em seguida espalhada em diversas direções com a ajuda de um swab sobre a placa de Petri contendo ágar Müller-Hinton suplementado com 2% de glicose. Após o procedimento,

discos contendo os antibióticos anfotericina B 100 µg (AB), itraconazol 10µg (ICZ) e fluconazol 25 µg (FLU) foram distribuídos sobre a placa e estas armazenadas em estufa a 35 °C por 24 ou 48 h e, após esse período, o diâmetro dos halos de inibição foi medido.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES

4.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), fragmentos dos biofilmes secos (60 °C, estufa com circulação forçada de ar) foram fixados em um suporte metálico e recobertos com uma fina camada de ouro, utilizando-se um metalizador de amostras BAL-TEC SCD 050 e foram observados ao microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6400) do laboratório da Universidade Estadual de Santa Catarina – UDESC. Foram realizadas micrografias na superfície das amostras nas ampliações de 150, 1000, 5000 10000 e 35000 vezes.

4.6.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As películas secas foram submetidas a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) com o objetivo de caracterizar os grupos funcionais presentes na estrutura do biofilme formado. As análises de FTIR foram realizadas em um equipamento *Frontier* da *Perkin Elmer* alocado no Laboratório de Análises Instrumentais II da Universidade da Região de Joinville, utilizando o método de Reflexão Total Atenuada (ATR), de 4.000 a 1000 cm⁻¹, com 32 varreduras.

4.6.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

As películas também foram submetidas à espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (¹H-RMN) no estado líquido, dissolvidos em solvente. O biofilme foi extraído com dimetilsulfóxido (DMSO) deuterado a 70 °C. Foi utilizado o equipamento de RMN 600 MHz, marca *BRUCKER*, *Ultrashield* e realizadas pela Universidade Regional de Blumenau - FURB.

4.6.4 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada com intuito de avaliar a estabilidade térmica dos biofilmes. Para esta análise utilizou-se o equipamento TGA-Q50 da marca *TA Instruments* no Laboratório de Laboratório de Análise Instrumentais II da Universidade da Região de Joinville. Os biofilmes secos foram aquecidos a uma faixa de temperatura de 25 a 600 °C a 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio. Os parâmetros experimentais foram ajustados no *software TA - Universal Analysis 2000* e representados graficamente para interpretação.

4.6.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise de calorimetria exploratória diferencial foi realizada para a avaliação da quantidade de calor absorvido e liberado pelos biofilmes durante a ocorrência de eventos térmicos. Consistiu na identificação da temperatura de transição vítrea (T_g), de cristalização (T_c), de fusão (T_m) e grau de cristalinidade (X_c). O equipamento utilizado para a análise foi o DSC-Q20, marca *TA Instruments*, sob fluxo de nitrogênio no Laboratório de Laboratório de Análise Instrumentais II da Universidade da Região de Joinville. Cada amostra de biofilme foi colocada em um recipiente de alumínio com fechamento hermético e colocado no porta-amostras do equipamento. Este foi aquecido de 25 a 200 °C a uma taxa de 10 °C/min. Os parâmetros experimentais foram ajustados no *software TA Universal Analysis* e representados graficamente para interpretação.

4.6.6 Composição monossacarídica

Para a análise de composição monossacarídica foram pesados 1 mg de cada uma das amostras de biofilmes secos e dos monossacarídeos utilizados como padrão (glicose, xilose, manose, arabinose, galactose) sendo, então, submetido à hidrólise ácida com 1 mL de solução de ácido trifluoracético (TFA) 1 M, a 100 °C, por 12 horas (GORIN et al., 1996). Após hidrólise ácida, o excesso de ácido foi removido por evaporação seguido da adição de 1 mL de água destilada e boroidreto de sódio (NaBH_4) até atingir pH 9-10, deixando reagir por 24 h à temperatura ambiente, para

ocorrer a redução. Após esse período, foi adicionado ácido acético PA até atingir pH 3 e o conteúdo foi evaporado em rotaevaporador a vácuo a 50 °C até secar. Em seguida, foi adicionado 4 mL de metanol e o conteúdo evaporado em rotaevaporador a vácuo a 40 °C, sendo esta parte do processo repetida por 3 vezes, a fim de promover a remoção do borato de trimetila. Após, foi adicionado 300 µL de piridina e 300 µL de anidrido acético e mantido por 12 h para ocorrer a acetilação (WOLFROM; THOMPSON, 1963). Os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio PA e a fase clorofórmica foi lavada com sulfato de cobre 5% para a eliminação da piridina residual. A fase clorofórmica foi filtrada e a evaporação ocorreu à temperatura ambiente. Os acetatos de alditóis foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). A análise foi realizada em Cromatógrafo Gasoso da marca *Agilent*, modelo 7890A, conectado a um espectrômetro de massa da marca *Agilent*, modelo 5975 no Laboratório de Análises Instrumentais I da Universidade da Região de Joinville. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida DB-225 (30 m x 0,25 mm) e hélio ultrapuro, a um fluxo de 1 mL/min, como gás de arraste, aplicando-se um gradiente linear de temperatura de 50 a 220 °C (taxa de aquecimento de 40 °C/ min) para análise qualitativa.

5 . RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS

Dos três meios de cultivo utilizados para o isolamento dos micro-organismos das amostras de manguezal, o meio correspondente ao caldo marinho adicionado de glicose e ágar (CMGA) foi o que obteve maior número de colônias de micro-organismos, totalizando 45 colônias, seguido pelos meios de cultivo ágar nutriente (AN) com 33 colônias e ágar nutriente salino (ANS) com 26 colônias de micro-organismos. Considerando os três meios de isolamento, foram obtidas 104 colônias de micro-organismos.

As amostras dos locais denominados “Praia do Lixo” e “Iperoba” apresentaram maior número de colônias quando cultivados no meio CMGA, seguido pelo meio AN, no qual obteve-se o mesmo número de micro-organismos para ambos os pontos amostrais. As amostras obtidas na “Praia do Lixo” apresentaram o mesmo número de colônias quando cultivadas em meio ANS e AN, porém neste último o número de colônias obtido da amostra “Iperoba” foi menor. Um maior número de colônias foi registrado com as amostras obtidas do “Porto” cultivadas em meio AN, seguido do meio ANS e meio CMGA. O total de colônias encontradas em cada ponto amostral nos diferentes meios de cultura está apresentado na Tabela 1. A diferenciação das colônias considerou os critérios: tamanho, forma, borda, estrutura, cor e aspecto das colônias nos diferentes meios de cultivo conforme apresentado nos Apêndices A, B e C.

Tabela 1 - Colônias de micro-organismos encontrados em cada amostra de manguezal utilizando os meios de cultivo CMGA (Caldo Marinho Glicose Ágar), NA (Ágar Nutriente) e ANS (Ágar Nutriente Sódio) para isolamento.

NÚMERO DE COLÔNIAS POR PONTO AMOSTRAL			
PONTO AMOSTRAL	MEIO CMGA	MEIO AN	MEIO ANS
Porto	9	13	10
Praia do Lixo	15	10	10
Iperoba	21	10	6
Total	45	33	26

5.2 SELEÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE BIOFILMES

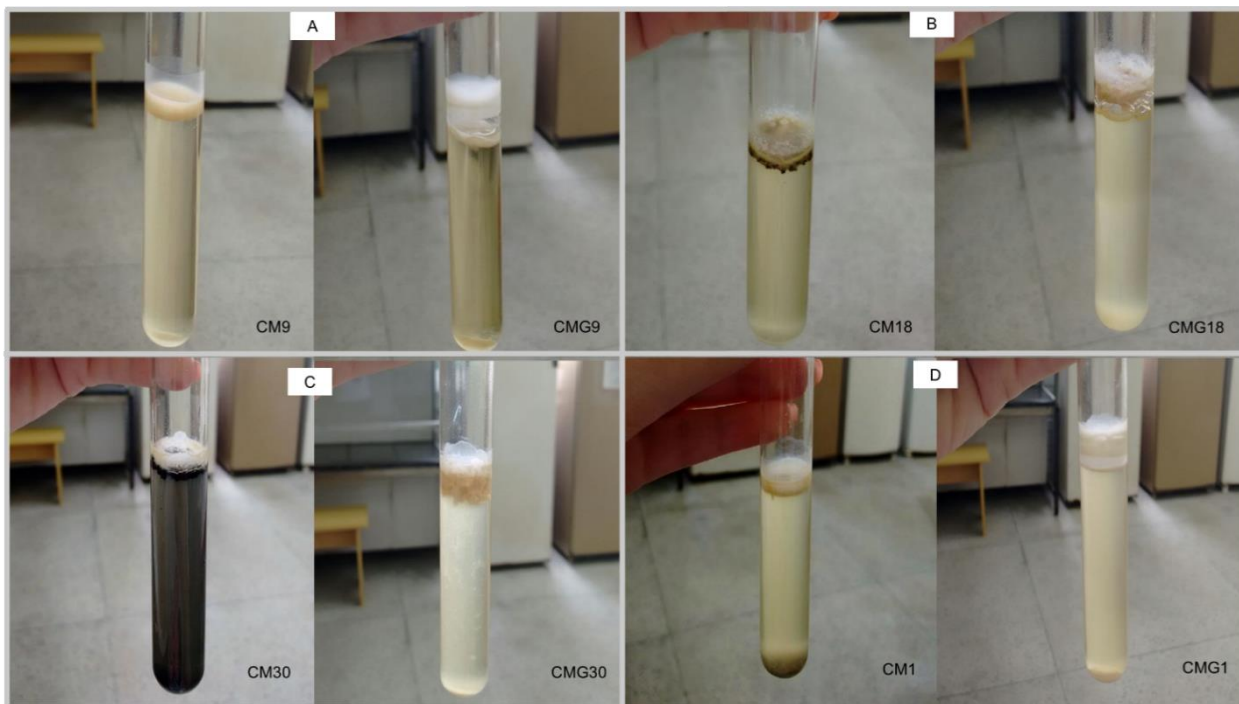
Para o teste de formação de biofilmes foram descartadas as 26 colônias de micro-organismos isoladas a partir do meio ANS, devido aos resultados inferiores no número de colônias obtidas em comparação aos meios AN e CMGA. As colônias de micro-organismos nomeadas de CMG12 e CMG20, obtidas no meio CMGA, não apresentaram desenvolvimento de biofilme nos repiques de manutenção de seu cultivo, desta maneira foram excluídos deste teste e posteriores.

Foram utilizados três meios de cultivo líquido para verificar o desenvolvimento dos biofilmes, sendo eles: caldo marinho adicionado de glicose (CMG) e caldo marinho (CM) para os micro-organismos selecionados em CMGA e caldo nutriente (CN) para os micro-organismos selecionados em placas com AN.

Todas as 43 colônias de micro-organismos cultivados em tubos de ensaio com meio líquido CMG formaram biofilme na interface líquido/ar, variando na coloração (transparente, branco), aspecto (liso e rugoso), e consistência (fragmentado, frágil, consistente, espesso).

No meio CM, alguns tubos de ensaio apresentaram escurecimento da coloração do meio de cultivo em 24 h após incubação, como também a formação de partículas e biofilme ILA no mesmo tom, em 14 dias de incubação. Dessa forma, com a intenção de verificar a reprodutibilidade das características distintas observadas, o experimento foi repetido com as 43 colônias isoladas. No primeiro teste, foram constatados 23 tubos de ensaio com formação de biofilme ILA. Na reprodução do experimento, 37 tubos de ensaio apresentaram a formação de biofilme. Os biofilmes formados apresentaram variação na coloração (sem coloração, branco, branco com partículas, cinza e preto), aspecto (liso, reticulado, particulado, rugoso) e consistência (fragmentado, frágil, consistente, espesso). Ressalta-se que os micro-organismos aplicados no teste de biofilme ILA dos meios CM e CMG foram isolados do meio CMGA e o desenvolvimento do biofilme ILA em ambos os meios demonstra que a fonte de carbono glicose não foi um fator determinante na produção do biofilme, como exemplificado na Figura 10 A. A variação no formato dos biofilmes formados em meio CM e CMG é apresentada na Figura 10 B, C e D.

Figura 10 - Tubos de ensaio com formação de biofilme na interface líquido/ar das amostras nos meios de cultivo CM e CMG. [A] Formação do biofilme das amostras CM9 e CMG9, não apresentando diferença na coloração do meio de cultivo. [B] Diferença na formação do biofilme das amostras CM18 e CMG18, com a presença de partículas pretas no biofilme da amostra CM18. [C] Diferença na formação do biofilme e na coloração do meio de cultivo das amostras CM30 e CMG30. [D] Diferença na formação da coloração do meio de cultivo das amostras CM1 e CMG1, apresentando um precipitado com coloração escura na amostra CM1.



Das 33 colônias de micro-organismos cultivadas em tubos de ensaio contendo caldo nutriente (CN), 12 formaram películas. Não houve variação em cor, aspecto e consistência nas películas formadas neste meio. Todos os biofilmes se apresentaram com transparência e extremamente frágeis, rompendo-se com o manuseio do tubo de ensaio. Como o meio Caldo Nutriente é composto apenas por extrato de carne, extrato de levedura e peptona, sem a adição de uma fonte de carbono específica, pode-se sugerir que a ausência de glicose tenha sido responsável pela fragilidade dos biofilmes formados neste meio, uma vez que os monossacarídeos são precursores dos polissacarídeos constituintes da matriz extracelular do biofilme. Weerasekera et al. (2016) cultivando *C. tropicalis* em meio RPMI 1640, pobre em glicose (2 g/L), observaram que o biofilme formado era desprovido de hifas, com aumento da densidade de blastosporos e desenvolvimento de microcolônias e, surpreendentemente, os biofilmes também não possuíam matriz, contrariando os relatos de vários trabalhos.

No Apêndice D são apresentadas as características observadas na formação de biofilmes pelos micro-organismos nos meios CMG, CM, e o teste de reprodutibilidade em meio CM.

5.3 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE BIOFILME

Embora as amostras de micro-organismos oriundas do sedimento dos três manguezais (Porto, Iperoba e Praia do lixo) tenham produzido biofilmes ILA (Apêndice D), para dar seguimento a este estudo foram selecionadas 6 amostras a partir do manguezal denominado “Porto”, as quais apresentaram maior consistência dos biofilmes formados. As 43 amostras microbiológicas obtidas nesse trabalho como formadoras de biofilme, foram conservadas em criogenia, para estudos posteriores.

As seis amostras selecionadas (CMG2, CMG4, CMG5, CMG6, CMG8 e CMG9) apresentaram visualmente a produção de um biofilme bem desenvolvido na interface líquido - ar cujas colônias formadas divergiam em aparência entre si, sendo tratadas como compostas por diferentes micro-organismos, foram submetidas a identificação por técnica de biologia molecular para bactérias, que utiliza como marcador a região V3-V4 do gene 16S rRNA, e para leveduras para os quais foram utilizados os marcadores da região do ITS1. Estes biofilmes apresentaram melhores características em termos de espessura e resistência (Figura 11).

O teste genético determinou o perfil microbiológico heterogêneo das amostras analisadas. As amostras CMG2, CMG6, CMG8 eram constituídas de quatro espécies bacterianas (*Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Carnobacterium divergens*), e cinco espécies de leveduras (*Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Lodderomyces elongisporus*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Meyerozyma guilliermondii* (syn. *Candida guilliermondii*). As amostras CMG4, CMG5 e CMG9, eram constituídas por duas espécies de leveduras (*Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*). O perfil microbiológico das amostras pode ser verificado nas Figuras 12 e 13.

De acordo com os resultados apresentados nas Figuras 12 e 13, observa-se que as amostras são formadas por comunidades de micro-organismos, não

encontrando-se colônias completamente isoladas. No entanto, o perfil microbiológico das espécies bacterianas demonstrou que *Enterococcus faecalis* foi prevalente nas amostras CMG6 e CMG2 enquanto *Leuconostoc pseudomesenteroides* prevaleceu na amostra CMG8. Para o perfil microbiológico das espécies fúngicas, *Candida tropicalis* prevaleceu nas seis amostras. Dentre as seis amostras, a amostra CMG8 destaca-se por apresentar maior diversidade microbiológica contando com a presença de três espécies bacterianas e cinco espécies fúngicas.

Figura 11 - Biofilmes produzidos na superfície líquido/ar pelas amostras selecionadas cultivadas em meio CMG, após 12 dias. [A] CMG4 [B] CMG5 [C] CMG9 [D] CMG6 [E] CMG8 [F]CMG2.

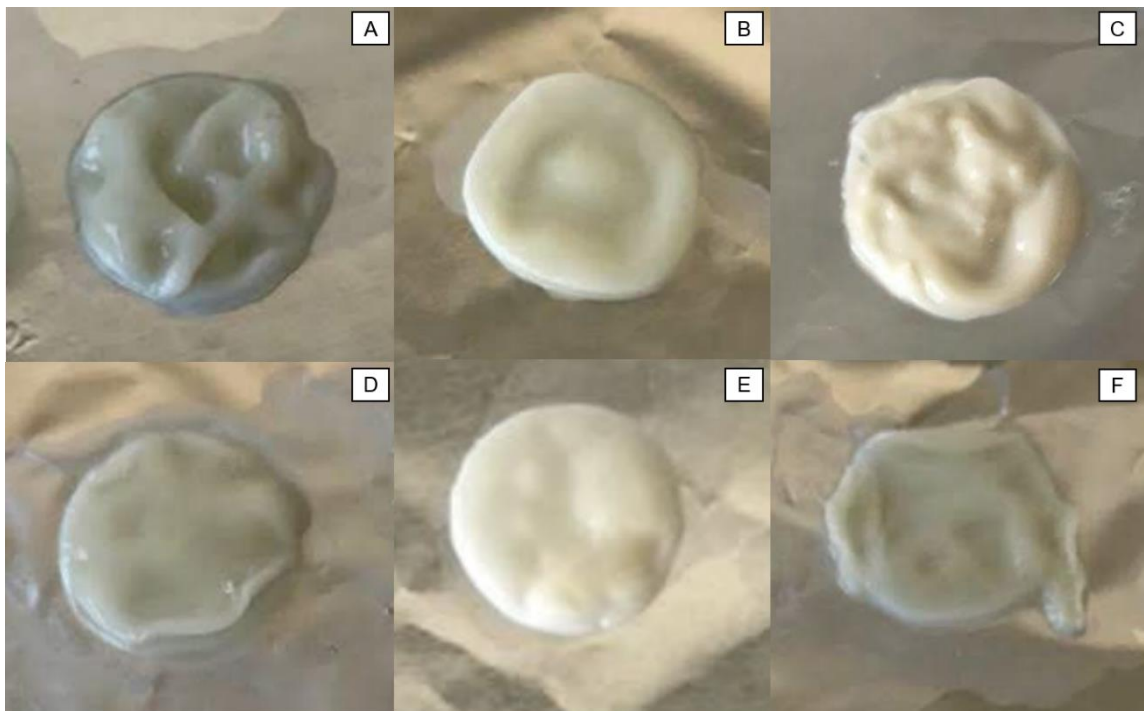


Figura 12 - Perfil microbiológico de espécies bacterianas produtoras de biofilmes por amostra.

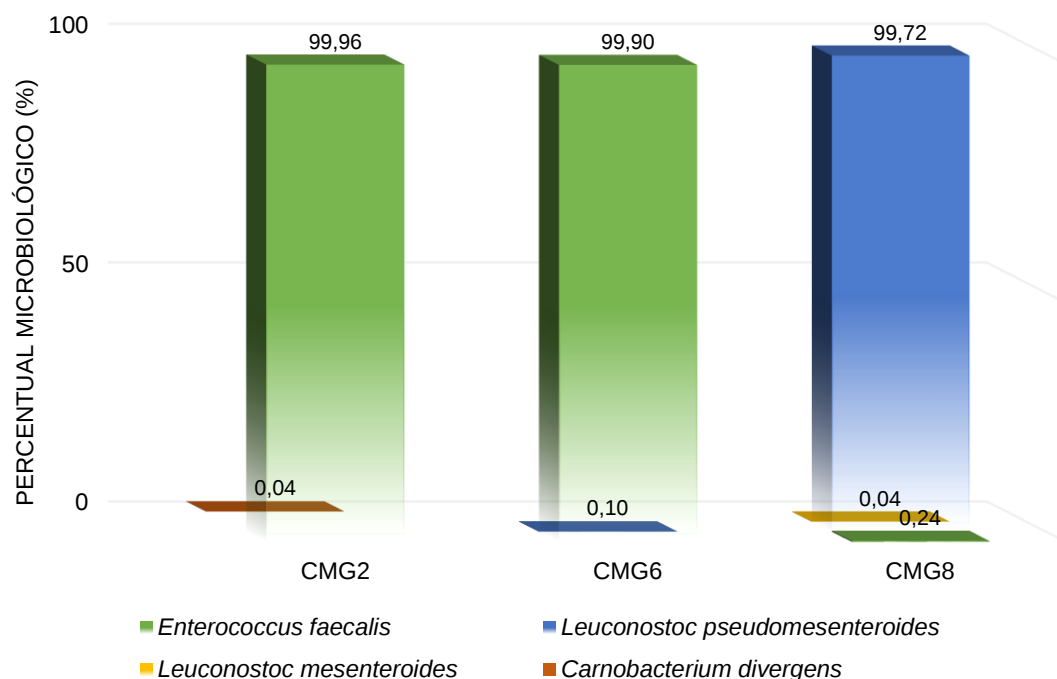
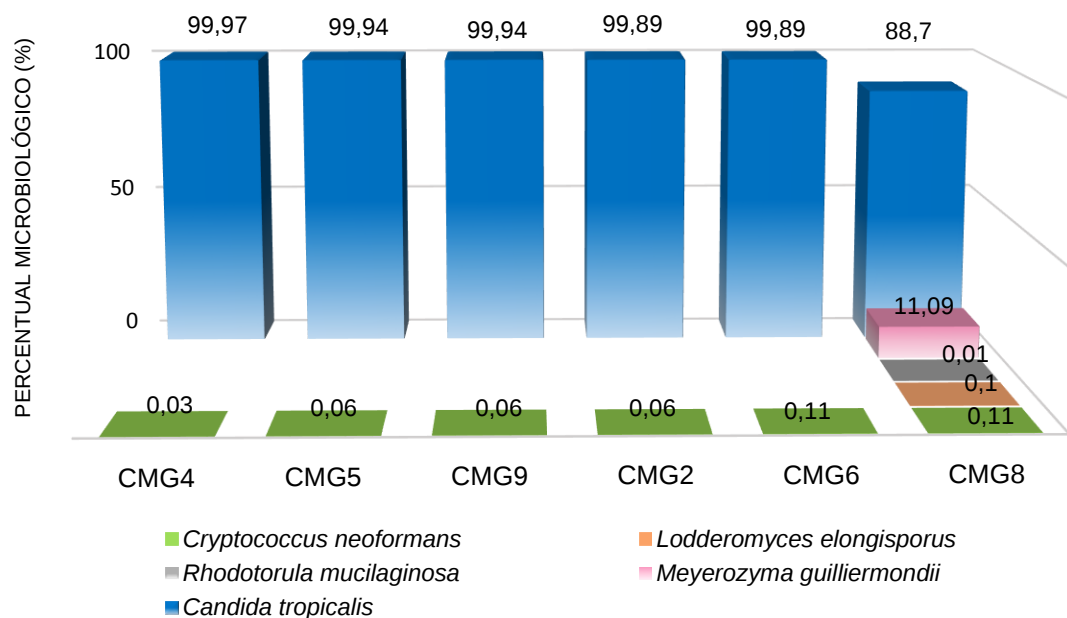


Figura 13 - Perfil microbiológico de espécies fúngicas produtoras de biofilmes por amostra



Na literatura o gênero *Candida* é frequentemente associado à produção de biofilmes, sendo este um dos mecanismos responsáveis pelo potencial de virulência e a resistência a antimicrobianos dessa levedura (ARAÚJO; HENRIQUES; SILVA, 2017; KUMAR et al., 2017; JOTHIPRAKASAM et al., 2017). A formação de biofilmes

de *Candida* spp. é constantemente observada em dispositivos médicos (KOJIC; DAROUICHE, 2004). Por este motivo, encontram-se inúmeros trabalhos focados na relação da produção de biofilmes com as patogenias (CAPOTE-BONATO et al., 2018; TYTGAT et al., 2018; HOOPER; GORDON, 2001), e também estudos que visam a eliminação de biofilmes de *Candida* spp., seja alterando o seu genótipo com a finalidade de impedir a formação do biofilme como pela desestruturação da biomassa do biofilme (YEH; WANG; LAN, 2018).

Fernandes, Silva e Henriques (2015) relatam a incapacidade da Anfotericina B em prevenir a formação de biofilme de espécies de *C. tropicalis* e como o antibiótico não possui atividade sobre as células de *C. tropicalis* quando estas estão inseridas no biofilme pré-formado. Os autores ressaltam que a presença de Anfotericina B levou a um aumento significativo da produção de biofilme devido a um acréscimo no número de proteínas totais. Shin e colaboradores (2002) demonstraram em seus estudos cultivando diferentes espécies do gênero *Candida* em Caldo Sabouraud Dextrose (SDB) acrescido de 8% de glicose (concentração final) que *C. tropicalis* apresentou a maior capacidade para produção de biofilme, dentre as espécies estudadas.

Meyerozyma guilliermondii corresponde a forma teleomorfa do complexo *Candida guilliermondii*. Das espécies que compõem o complexo são consideradas patogênicas para humanos: *C. guilliermondii* stricto sensu, *Meyerozyma guilliermondii*, *C. fermentati*, *Meyerozyma caribbica* como a forma teleomorfa de *C. fermentati*, e *C. carpophila*. Não foram encontrados estudos que citassem a formação de biofilmes produzidos por isolados de *M. guilliermondii*, porém biofilmes de *C. guilliermondii sensu stricto*, *C. fermentati* foram estudados por Marcos-Zambrano e colaboradores (2017). Os autores realizaram a caracterização microbiológica dos isolados do complexo *C. guilliermondii*, descrevendo também os fatores de risco e desfechos de 22 pacientes com candidemia causada pelo complexo de *C. guilliermondii*.

Devido as características fisiológicas e morfológicas semelhantes àquelas que são observadas em espécies de *Candida* spp., a levedura *Lodderomyces elongisporus* inicialmente foi classificada como teleomorfo de *Candida parapsilosis* (HAMAJIMA et al., 1987; DÖĞEN et al., 2017). Após análises de sequenciamento multigênico com espécies de *Candida* e espécies relacionadas, foi demonstrado que *L. elongisporus* está intimamente relacionada com o gênero *Candida*, o que lhe garantiu a inserção no clado onde encontram-se algumas espécies desse gênero (*C. parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *C. albicans* e *C. dubliniensis*), porém as suas

características foram distintas o suficientes para a reclassificação definitiva como espécie *L. elongisporus* (DIEZMANN et al., 2004; LOCKHART et al., 2008). Apesar das semelhanças com a *Candida parapsilosis*, a levedura *L. elongisporus* quando cultivada em meio de cultura líquido não apresenta a formação de biofilme ILA (KURTZMAN, 2011).

Assim como o gênero *Candida*, a espécie *Cryptococcus neoformans* tem importância reconhecida pela patogenicidade. Martinez e Casadevall (2015) relataram a produção de biofilme por *C. neoformans* em superfícies de poliestireno, polivinil, vidro e policarbonato. Pessoa, Silva e Gomes (2012) demonstraram o predomínio de *Cryptococcus gattii* (14%) na formação de biofilme em superfície de poliestireno a 37 °C quando comparados aos resultados de biofilme para isolados de *C. neoformans* (11%). Espécies criptocócicas produtoras de biofilme demonstram baixa suscetibilidade a antibióticos como anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol, indicando que para essas espécies assim como para *Candida* spp a presença do biofilme constitui um fator de proteção a ação de substâncias antibióticas (COUTINHO, 2006; MARTINEZ; CASADEVALL, 2006).

Rhodotorula mucilaginosa é considerada uma espécie de levedura oportunista, e os quadros infecciosos que possuem o gênero *Rhodotorula* como agente etiológico demonstram relação direta com a condição de imunossupressão dos pacientes, seja em decorrência do uso de corticosteroides, à neutropenia, à Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) ou ainda desnutrição (CHITASOMBAT et al., 2012; TUON; COSTA, 2008). A presença de cateter venoso central é considerado fator de risco comum para o desenvolvimento das patologias por *Rhodotorula* spp, principalmente devido ao potencial de formação de biofilmes, dificultando o tratamento (SARDI et al., 2014). Nunes e colaboradores (2013) investigaram o perfil de suscetibilidade a antifúngicos e formação de biofilme de isolados clínicos e ambientais de espécies de *Rhodotorula*. No ensaio de formação de biofilme, os autores observaram que *R. mucilaginosa* e *R. minuta* exibiram maior capacidade de formação de biofilme em comparação com as espécies *R. glutinis*, *R. dairenensis* e *R. slooffiae*. Os isolados clínicos de *R. mucilaginosa* apresentaram maior formação de biofilme em comparação aos isolados ambientais.

Das espécies bacterianas encontradas nesse trabalho, há relatos da capacidade de *E. faecalis* produzir biofilmes *in vitro*, tanto para isolados clínicos, quanto para isolados fecais (TOLEDO-ARANA et al., 2001; DALE et al., 2017;

GUERREIRO-TANOMARU et al., 2013; GHORBANZADEH et al., 2018). O biofilme de *E. faecalis* se desenvolve de forma que suas células bacterianas estabelecem estruturas multicelulares coesas de difícil remoção pelo sistema imunológico, dificultando atividade dos agentes antimicrobianos (MCHUGH et al., 2004). Segundo Mohamed e colaboradores (2006) moléculas de adesão celular como SAG (*surface antigens*) foram relatadas em *Enterococcus* spp, sendo responsáveis pela ligação ao colágeno de células eucarióticas e fornecendo pontos focais para agregação e aderência a células eucarióticas, levando à formação de biofilme.

Carnobacterium divergens, *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc pseudomesenteroides* são espécies bacterianas lácticas, por vezes associadas à degradação de alimentos. Espécies de *Leuconostoc* spp existem naturalmente nos alimentos e são importantes nas indústrias de chucrute, leite e vinho, devido ao seu papel na fermentação (WINN; ALLEN; JAND, 2006).

Condições ambientais hostis favorecem fenômenos de interação por meio da formação de lodo ou glicocalix na presença de sacarose e minerais, resultando em um biofilme com função de proteção das células de *Leuconostoc* spp contra agentes nocivos (KIM; THOMAS; FOGLER, 2000). A produção de biofilmes por uma espécie mutante de *L. mesenteroides* foi reportada por Leathers e Côté (2008). Os autores relataram que o biofilme pode ter aplicação biotecnológica para produção contínua da enzima glucanasucrase. Paulo e colaboradores (2012) utilizando uma cepa de *L. pseudomesenteroides* observaram que foram produzidos dois tipos de EPS, caracterizados como polímeros de dextranas, enfatizando as ligações α (1 $\rightarrow$ 6).

Algumas espécies do gênero *Leuconostoc* possuem atividade anti-biofilme, como relatado por Kang e colaboradores (2007) que constataram a redução da formação de biofilmes de espécies mutantes de *Streptococcus* spp. Abid e colaboradores (2018) comprovaram que o EPS de *L. pseudomesenteroides* inibiu de adesão máxima contra *Escherichia coli* em 90% e para biofilmes de *E. faecalis* o percentual de inibição foi de 88%, enquanto *Leuconostoc citreum* demonstrou a maior atividade anti-biofilme contra *Staphylococcus aureus* (86,9%).

Kiran e colaboradores (2015) demonstraram que EPS de *E. faecalis* (50 μ g) reduziram 78% da formação de biofilme por *C. albicans* quando comparado ao antibiotico fluconazol (50 mg). Na concentração de 250 μ g de EPS, os autores observaram redução do biofilme em 98%, enquanto o medicamento de referência fluconazol (250 mg) foi eficaz na redução da cobertura do biofilme para 83%. Na

literatura não há descrição da produção de biofilmes pela espécie *Carnobacterium divergens*, há no entanto relatos de ação anti-biofilme em função da presença de bacteriocinas (SANTOS; NARDI DRUMMOND; DIAS-SOUZA, 2017).

Com exceção das espécies *C. divergens* e *L. elongisporus* todas as espécies restantes identificadas possuem potencial para produção de biofilmes. Curiosamente as amostras CMG2 e CMG6 apresentam na sua composição bactérias relacionadas à atividade anti-biofilme, *C. divergens* e *L. Pseudomesenteroides*, respectivamente. Em função de as proporções de *C. divergens* (0,04%) e *L. pseudomesenteroides* (0,10%) serem consideravelmente baixas quando comparados ao percentual de *E. faecalis* (99,03% em CMG2 e 99,90% em CMG6) sugere-se que não houve ação anti-biofilme pela presença dessas espécies durante a formação do biofilme. Considerando que *Candida tropicalis* é a espécie prevalente em elevado percentual nas 6 amostras, propõe-se que os biofilmes ILA sejam formados por esta levedura.

5.4 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DOS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS

Dos micro-organismos que compõem as matrizes dos biofilmes neste trabalho, foram selecionados os isolados bacterianos *E. faecalis*, *L. pseudomesenteroides*, e o isolado fúngico *C. tropicalis* para avaliação quanto à sensibilidade aos antimicrobianos. A seleção destes micro-organismos se deu em função dos relatos na literatura que discorrem sobre a patogenicidade de cada espécie. Para as espécies bacterianas foram testados discos de difusão impregnados dos antibióticos: ampicilina 10 µg (AMP), ciprofloxacina 5 µg (CIP), clorafenicol 30 µg (CLO), fosfomicina 200 µg (FOS), eritromicina 15 µg (ERI), linezolida 30 µg (LNZ), nitrofurantoína 300 µg (NIT), norfloxacina 10 µg (NOR), penicilina 10 µg (PEN), rifampicina 5 µg (RIF), teicoplanina 30 µg (TEC), tetraciclina 30 µg (TET) e vancomicina 30 µg (VAN). Para a espécie fúngica foi verificada a sensibilidade à anfotericina B 100 µg (AB), itraconazol 10 µg (ICZ) e fluconazol 25 µg (FLU).

A formação de halos de inibição ao redor dos discos de difusão impregnados de antimicrobianos pode ser visualizada nas Figuras 14, 15 e 16 para *E. faecalis*, *L. pseudomesenteroides* e *C. tropicalis*, respectivamente. Os resultados do teste de suscetibilidade a antimicrobianos podem ser verificados na Tabela 2 para *E. faecalis* e *L. pseudomesenteroides* e na Tabela 3 para *C. tropicalis*.

Figura 14 - Halos de inibição ao redor dos discos de difusão impregnados dos antibióticos AMP, CIP, CLO, FOS, ERI, LNZ, NIT, NOR, PEN, RIF, TEC, TET e VAN em placa de Petri inoculada com *E. faecalis*.

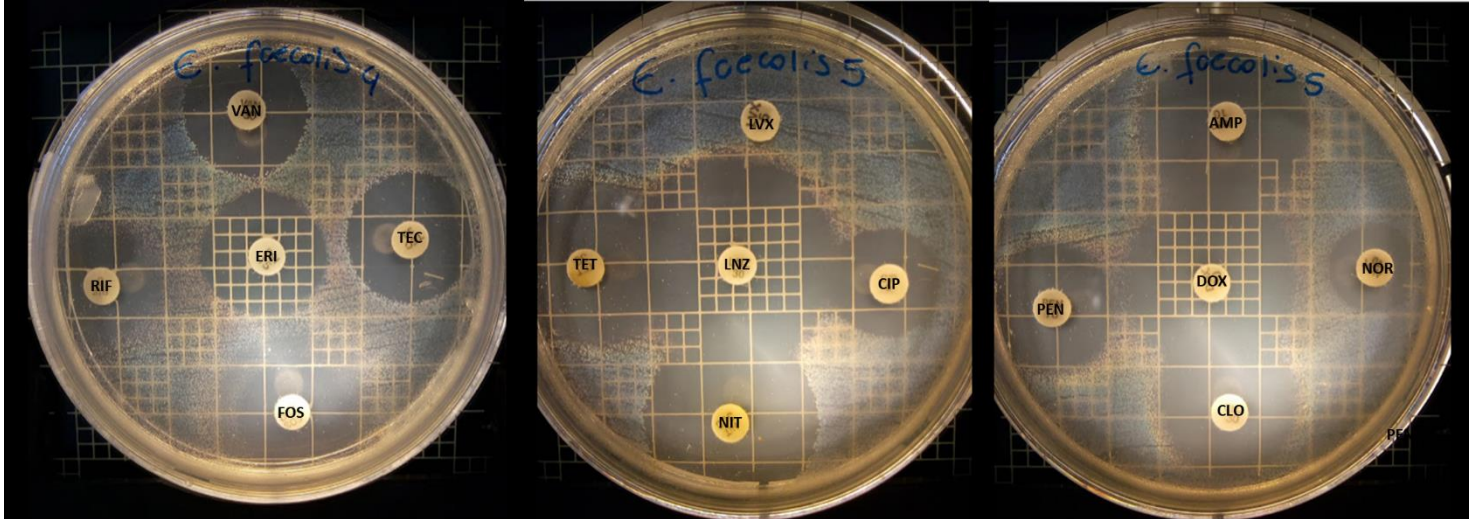


Figura 15 - Halos de inibição ao redor dos discos de difusão impregnados dos antibióticos AMP, CIP, CLO, FOS, ERI, LNZ, NIT, NOR, PEN, RIF, TEC, TET e VAN em placa de Petri inoculada com *L. pseudomesenteroides*.

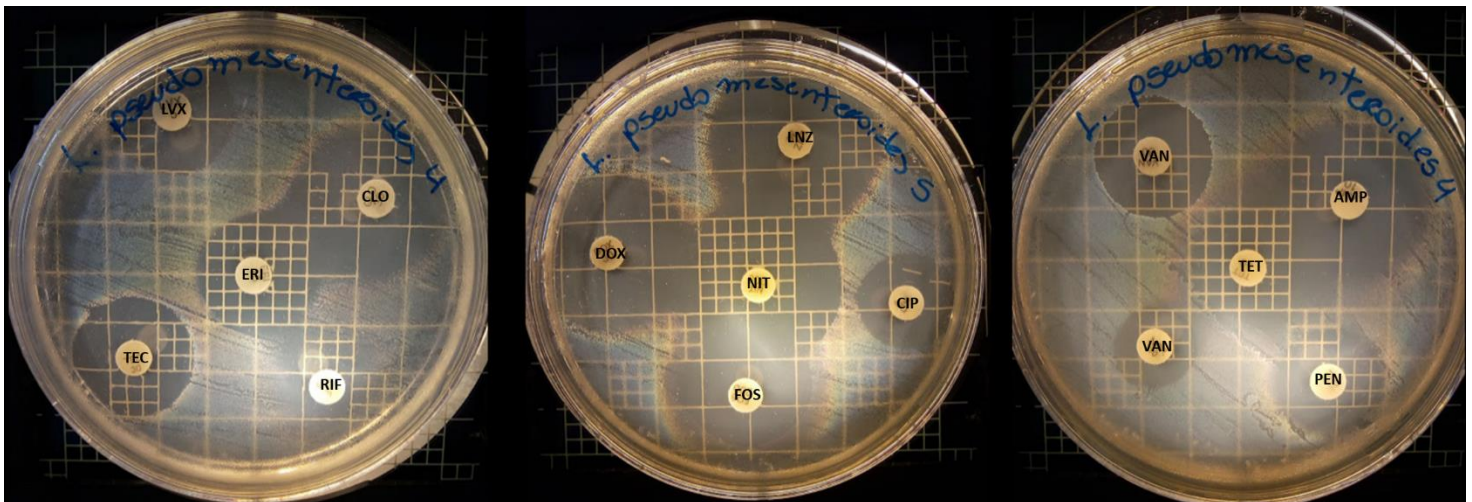


Figura 16 - Halos de inibição ao redor dos discos de difusão impregnados dos antibióticos AB, ICZ e FLU em placa de Petri inoculada com *C. tropicalis*.

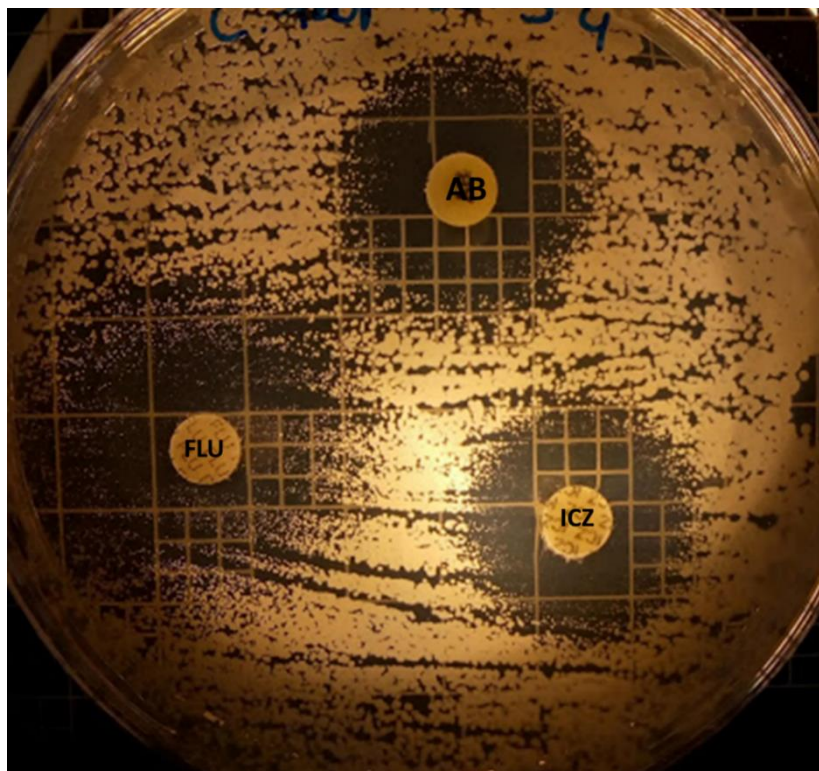


Tabela 2 : Valores da média $\pm$ desvio-padrão das medidas dos halos de inibição ao redor dos discos de difusão impregnados dos antibióticos AMP, CIP, CLO, FOS, ERI, LNZ, NIT, NOR, PEN, RIF, TEC, TET e VAN em placas de Petri inoculadas com *L. pseudomesenteroides* e *E. faecalis*.

Antibiótico	<i>L. pseudomesenteroides</i>		<i>E. faecalis</i>	
	Halos de inibição (mm)	Suscetibilidade	Halos de inibição (mm)	Suscetibilidade
AMP 10 µg	29,2 $\pm$ 1,5	S	24,7 $\pm$ 1,7	S
CIP 5 µg	17,0 $\pm$ 1,7	I	18,6 $\pm$ 2,3	I
CLO 30 µg	24,5 $\pm$ 0,5	S	25,0 $\pm$ 1,6	S
ERI 15 µg	19,4 $\pm$ 1,1	I	19,2 $\pm$ 1,5	I
FOS 200 µg	27,4 $\pm$ 1,8	S	24,2 $\pm$ 1,5	S
LNZ 30 µg	30,5 $\pm$ 0,6	S	34,6 $\pm$ 1,3	S
NIT 300 µg	30,2 $\pm$ 0,5	S	31,2 $\pm$ 1,5	S
NOR 10 µg	14,4 $\pm$ 1,5	I	15,8 $\pm$ 1	I
PEN 10 µg	23,5 $\pm$ 0,7	R	19,2 $\pm$ 0,9	S
RIF 5 µg	16,7 $\pm$ 1	R	17,5 $\pm$ 2,3	I
TEC 30 µg	20,7 $\pm$ 0,5	S	21,5 $\pm$ 1,3	S
TET 30 µg	23,7 $\pm$ 2,3	S	27,0 $\pm$ 2,6	S
VAN 30 µg	20,0 $\pm$ 1	S	20,7 $\pm$ 0,5	S
S – suscetível		I – suscetibilidade intermediária	R - resistente	

Tabela 3 Valores da média $\pm$ desvio-padrão das medidas dos halos de inibição ao redor dos discos de difusão impregnados dos antibióticos AB, ICZ e FLU em placa de Petri inoculada com *C. tropicalis*.

<i>Candida tropicalis</i>		
Antifúngico	Halos de inibição (mm)	Suscetibilidade
AB 100 μ g	13,5 $\pm$ 2,4	S
ICZ 10 μ g	18,0 $\pm$ 2,4	I
FLU 25 μ g	25,0 $\pm$ 0	S
S – suscetível	I – suscetibilidade intermediária	R - resistente

Os pontos de ruptura microbiológicos foram definidos por meio do protocolo elaborado pela *Clinical Laboratory Standard Institute* – CLSI (CLSI, 2011) utilizando *Enterococcus* spp como padrão para *E. faecalis*, *Staphylococcus* spp. para *L. pseudomesenteroides* e *Candida* spp para *C. tropicalis* seguindo o protocolo M27-A2, elaborado pela CLSI (NCCLS, 2004). A CLSI (2011) não informa a descrição dos pontos de ruptura para teste de suscetibilidade com espécies *Leuconostoc* spp, dessa forma optou-se por considerar valores sugeridos pelo CLSI (2011) para *Staphylococcus* spp., conforme verificado na literatura (CASADO MUÑOZ et al., 2014).

A espécie *L. pseudomesenteroides* demonstrou suscetibilidade intermediária para os antibióticos ERI, CIP e NOR, e resistência antimicrobiana para PEN e RIF. *E. faecalis* apresentou suscetibilidade intermediária para CIP, NOR e RIF, e resistência antimicrobiana ao antibiótico ERI. Os isolados bacterianos *L. pseudomesenteroides* e *E. faecalis* apresentaram-se suscetíveis aos antibióticos restantes. *Candida tropicalis* apresentou suscetibilidade intermediária para ICZ, sendo sensível aos antifúngicos AB e FLU.

A espécie *E. faecalis* possui resistência intrínseca aos antibióticos cefalosporinas, aminoglicosídeos, clindamicina, quinupristina-daftopriostina, trimetropin, trimetropin-sulfametoxazol e ácido fusídico (LECLERCQ et al., 2013). Algumas estirpes de *E. faecalis* podem apresentar resistência à vancomicina, sendo a clinicamente mais relevante mediada pelo gene VanA e VanB, as quais são codificadas por plasmídeos que substituem o terminal Alanil-D-Alanina no peptideoglicano por D-Alanina-D- Lactato (D-Ala-D-Lac). Esta substituição reduz a ligação dos precursores de peptideoglicano ao alvo. Cepas produtoras de VanA exibem resistência à vancomicina e teicoplanina, enquanto as cepas produtoras de VanB geralmente permanecem suscetíveis a teicoplanina devido à falta de indução

do operon de resistência. Outras enzimas Van de menor prevalência são VanD, VanE, VanG, VanL, VanM e VanN, sendo descritos em *E. faecalis* ao apresentarem baixo nível de resistência à vancomicina e sensibilidade à teicoplanina. Esses genes estão presentes em elementos genéticos móveis e podem ser adquiridos por outras espécies de enterococos sensíveis e por outras bactérias Gram-positivas ou são constitutivos do enterococo (WERNER, 2012; LECLERCQ et al., 2013).

Hörner e colaboradores (2006) analisaram o perfil de sensibilidade de 233 isolados do gênero *Enterococcus* no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), sendo que do total, 32 pertenciam a pacientes ambulatoriais e 201 a pacientes internados. Considerando a suscetibilidade antimicrobiana da espécie *E. faecalis*, os autores demonstraram sensibilidade para Levofloxacin em 124 dos isolados, 3 apresentaram suscetibilidade intermediária e o total de 75 isolados foram resistentes; para Ciprofloxacina, 113 isolados foram suscetíveis, 15 apresentaram resistência intermediária e 70 foram resistentes; 38 isolados foram suscetíveis ao antibiótico Norfloxacin, 8 intermediários e 26 resistentes, e Rifampicina apresentou 87 suscetíveis, 41 intermediários e 70 com resistência antimicrobiana ao antibiótico.

Segundo Leclercq e colaboradores (2013) cepas de *Leuconostoc* spp apresentam resistência intrínseca à vancomicina e a teicoplanina, porém o isolado de *L. pseudomesenteroides* identificado neste trabalho não apresentou essa característica no teste de suscetibilidade antimicrobiana, apresentando-se resistente à penicilina e rifampicina.

Espécies do gênero *Leuconostoc* são moderadamente resistentes à penicilina, com a Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando de 0,03 a 2 µg/mL, e em 90% dos isolados observa-se uma CIM <1 µg/mL (FLORESCU et al., 2008). No entanto, muitos isolados apresentam-se tolerantes à penicilina com CIM >32 µg/mL (HASLAM; GEME, 2017).

Swenson, Facklam e Thornsberry (1990) determinaram a suscetibilidade de 24 agentes antimicrobianos em 85 cepas de bactérias Gram-positivas nos gêneros *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactobacillus* utilizando caldo de microdiluição e 10 agentes por difusão em disco. Dentre os resultados obtidos pelos autores, foi demonstrado que cepas de *Leuconostoc* spp apresentaram sensibilidade moderada na presença do antibiótico PEN, correspondendo a 6% de suscetibilidade em uma CIM na faixa de 2,5 a 2,0 µg/mL. Nesse mesmo trabalho os autores mostram que a espécie *Leuconostoc pseudomesenteroides* obteve alcance de CIM em uma faixa de

0,12 e 0,5 µg/mL. Vay e colaboradores (2007) estudando a suscetibilidade antimicrobiana intrínseca de organismos não enterocócicos Gram-positivos demonstraram a sensibilidade de *Leuconostoc mesenteroides* à ripamcina, e resistência ao mesmo antibiótico para dois isolados de *Leuconostoc lactis*. Para o antibiótico CIP os autores verificaram a suscetibilidade intermediária para as espécies *L. mesenteroides* e *L. lactis*.

A atividade antimicrobiana *in vitro* do fluconazol contra espécies de *Candida* é variável. Pode-se citar que *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* tendem a ter CIMs relativamente baixas, enquanto CIMs para *C. glabrata* tendem a ser maiores. No entanto a espécie *C. krusei* é reconhecida por sua resistência ao fluconazol (NCCLS, 2002). Dados epidemiológicos de 31 países coletados no ano de 2013 demonstraram que entre 1846 isolados clínicos do gênero *Candida* que apresentam resistência à fluconazol, 11,6% correspondem a espécie *Candida tropicalis* e 11,9% à *Candida glabrata* (CASTANHEIRA et al., 2016).

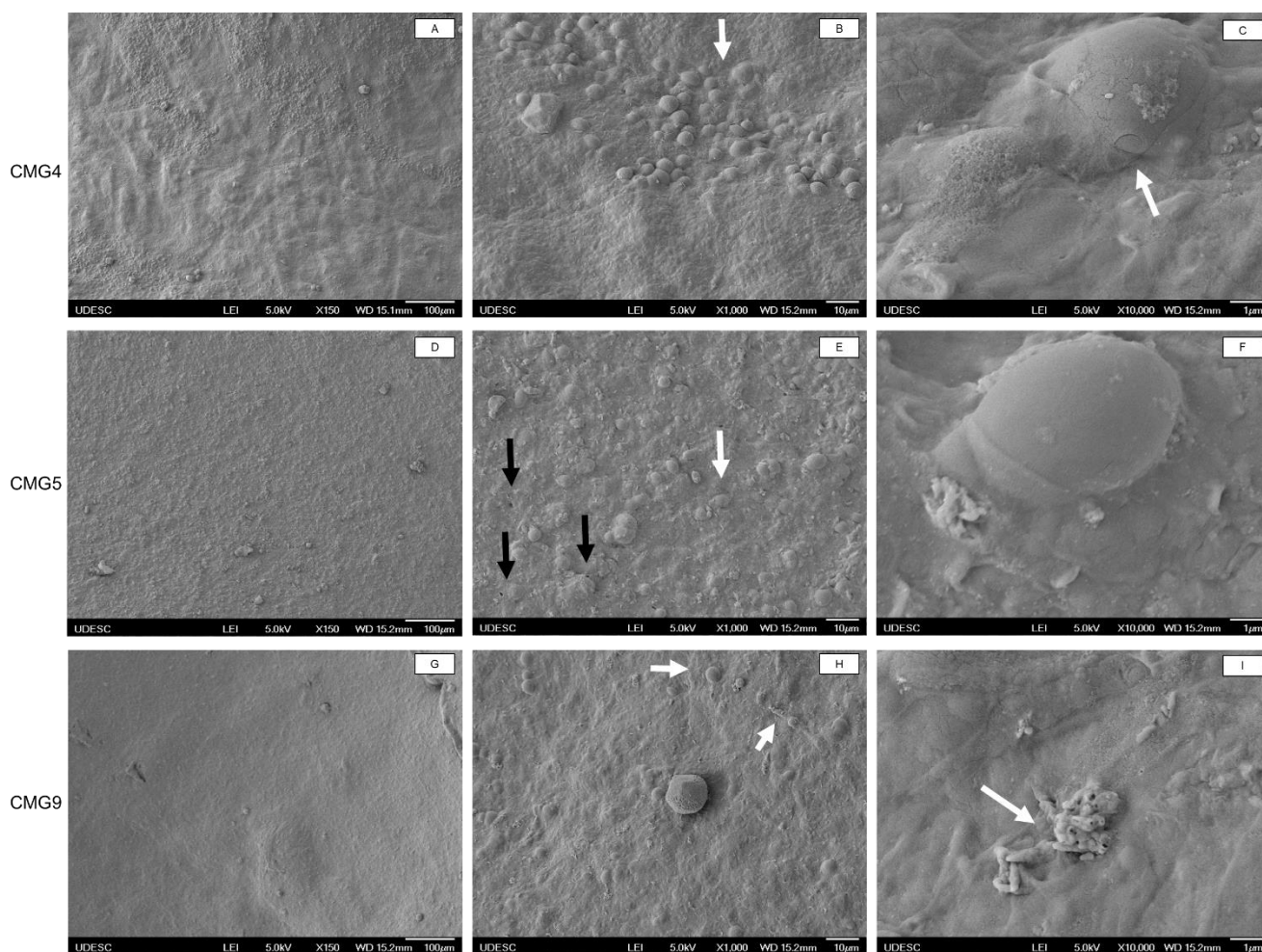
5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES

5.5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias obtidas por MEV demonstraram grande semelhança na morfologia entre os biofilmes produzidos pelas diferentes amostras, apresentando baixa ou nenhuma porosidade e com pouca variabilidade de rugosidade (Figuras 17 e 18). Apesar da semelhança entre as imagens observadas, nota-se a presença marcante de células em formato oval na superfície biofilme nas amostras CMG4, CMG5 e CMG9. Nas imagens com ampliação de 1.000x (Figura 17B, 17E e 17H), para as amostras citadas é possível observar por meio da indicação das setas na cor branca, formas ovais inseridas e encobertas pelo EPS. Essa característica do biofilme pode ser verificada de forma detalhada nas amostras CMG4 e CMG5 com ampliação de 10.000x (Figura 17C e 17F). Sugere-se, pelo tamanho e pela forma oval, que essas células sejam leveduras que compõem juntamente com o EPS o biofilme. Na Figura 17C nota-se na célula de levedura da amostra CMG4 a presença nítida de cicatriz de brotamento da levedura, indicado pela seta branca. Ainda, na ampliação de 10.000x para a amostra CMG9 (Figura 17I), observa-se por meio da indicação de seta de cor branca, estruturas com formato alongado e com interior vazio, e na de 1000x (Figura

17H) verifica-se outra estrutura, apresentando forma arredondada e com porosidade (setas pretas) observadas nas micrografias (Figura 17E e 17H).

Figura 17- Micrografias obtidas por MEV da superfície dos biofilmes formados pelas amostras contendo leveduras (CMG4, CMG5, CMG9). Ampliações de 150x (A, D, G) 1.000x (B, E, H) e 10.000x (C, F, I).

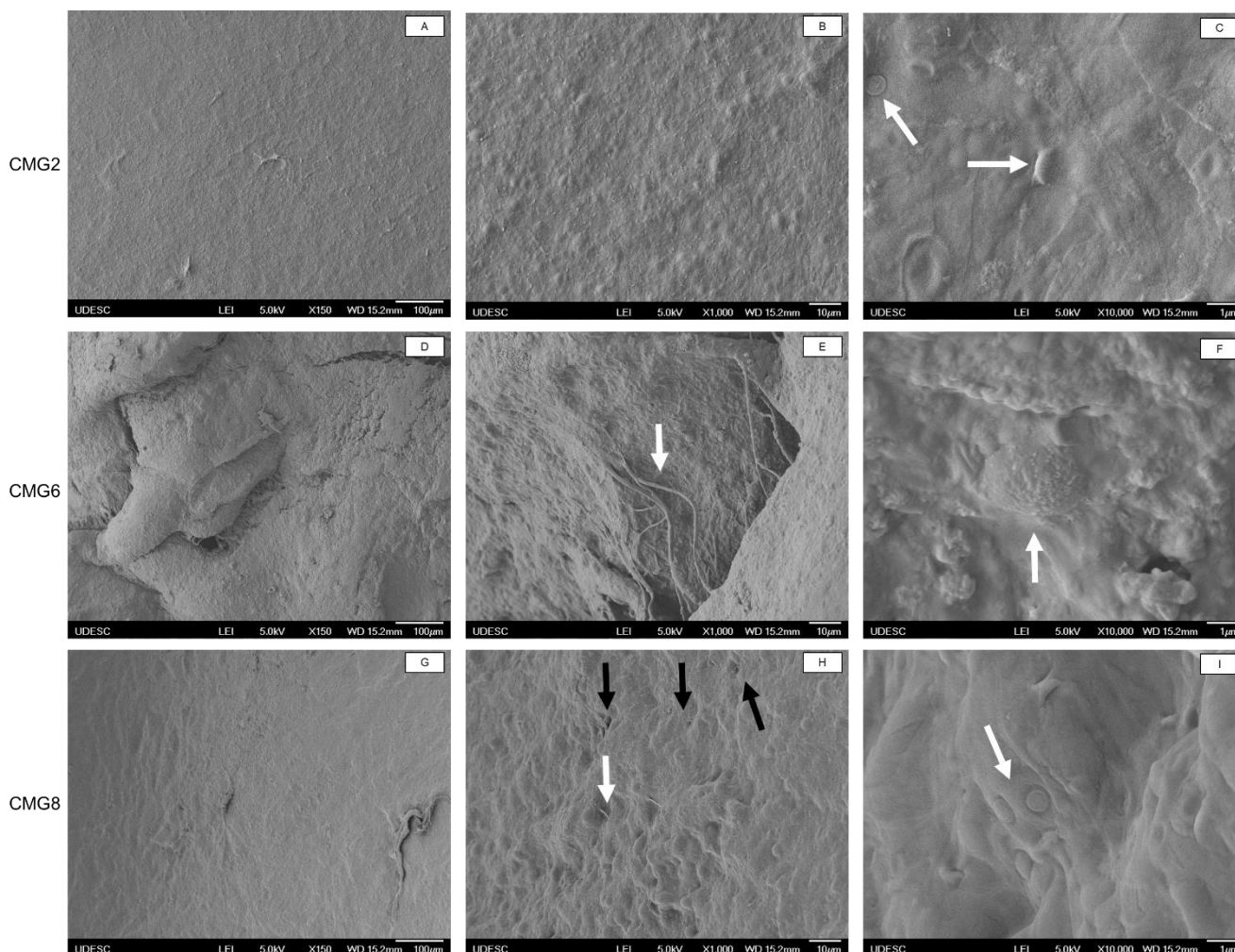


Comparada com as demais amostras, as culturas de CMG6 e CMG8 (Figura 18D, 18E, 18G e 18H) apresentaram maior rugosidade. A amostra CMG6 exibe formação semelhante a fibras (seta branca) característica observada apenas nessa amostra, e apresentada com ampliação de 1000x na Figura 18E. Indícios de que estrutura semelhante se repete na amostra CMG8 está indicado pela seta de cor branca na ampliação 1000x na Figura 18H.

Diferente das amostras anteriores os biofilmes produzidos por CMG2, CMG6 e CMG8, apresentaram células em forma de bacilos (amostra CMG 2) e forma de cocos (amostras CMG2 e CMG8), sendo facilmente identificadas pelas setas brancas na

ampliação de 10.000x nas figuras 18C e 18I, confirmando a adesão das espécies bacterianas ao biofilme.

Figura 18 - Micrografias obtidas por MEV da superfície dos biofilmes formados contendo bactérias (CMG2, CMG6, CMG8). Ampliações de 150x (A, D, G) 1.000x (B, E, H) e 10.000x (C, F, I).

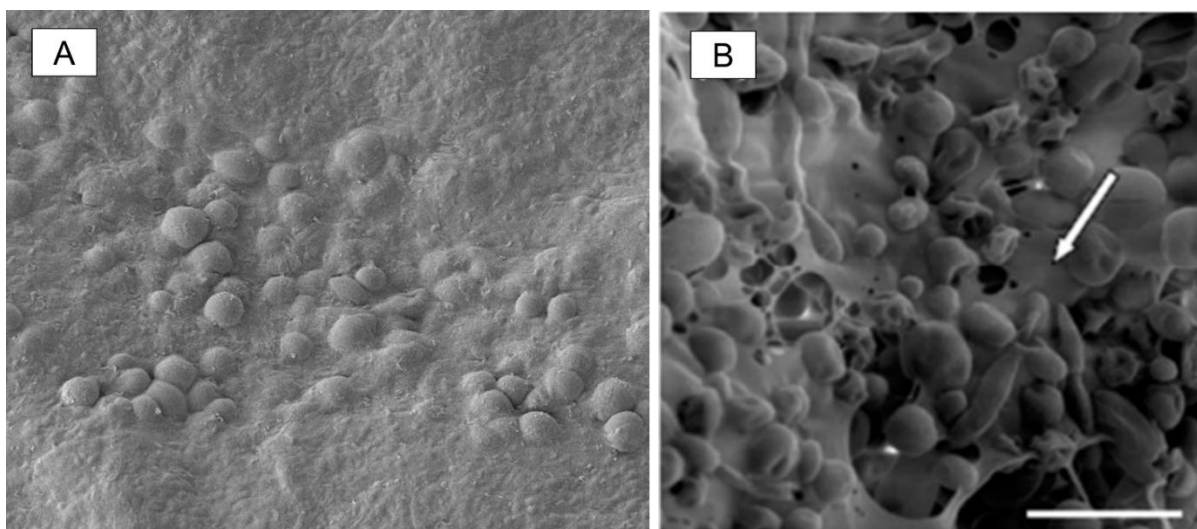


Bizerra e colaboradores (2008) observaram que durante o crescimento e maturação do biofilme de *C. tropicalis* em interface sólido-líquido de um cateter de PVC por 48 h, houve a produção expressiva de pseudohifas pelo micro-organismo. O mesmo também foi constatado por Fernandes, Silva e Henriques (2015) utilizando microplacas com cultivo líquido com a finalidade de verificar a influência da matriz polimérica na resistência a antibióticos da espécie de *C. tropicalis*. Os autores demonstraram por meio de micrografias de MEV a presença maciça de formações de pseudohifas de *C. tropicalis*. Comportamento semelhante foi relatado por Barbieri e colaboradores (2014) que investigaram a capacidade de adesão *in vitro* de

Streptococcus mutans e *Candida albicans* ao substrato em interface sólido líquido. Os autores demonstraram por meio de micrografias de MEV a acentuada morfologia filamentosa das células de *Candida*, constatando também que as estruturas filamentosas da levedura forneceram suporte de aderência, contribuindo para a adesão de *Streptococcus mutans* no biofilme. Parahitiyawa e colaboradores (2006) demonstram, em seu estudo sobre produção de biofilme de *C. tropicalis* em poliestireno, que a espécie pode formar grandes coagregados de microcolônias de blastosporos de *Candida* sp com uma camada de EPS envolvendo as leveduras. Os autores usaram em seus testes o meio Yeast Nitrogen Base (YNB) suplementado com glicose, diferente dos meios de cultivo deste trabalho. No entanto, a característica de microcolônias envoltas no biofilme podem ser observadas, mesmo que ausente a formação de blastosporos.

Al-Fattani e Douglas (2006) observaram através de micrografias que os biofilmes de *C. tropicalis* sintetizaram grandes quantidades de material extracelular, mesmo durante o crescimento sob condições estáticas, destacando que grande parte das células estavam quase escondidas pela matriz envolvente. Apesar da diferença no tempo de cultivo, a micrografia apresentada pelos autores, se assemelha a encontrada neste trabalho. O biofilme de *C. tropicalis* produzido pelos autores foi incubado por 48 h a 37 °C, enquanto os biofilmes apresentados neste trabalho foram incubados durante 12 dias (288 h) a 30 °C, o que poderia justificar a maior compactação do material extracelular. A figura 19 compara micrografias do biofilme obtido por Al-Fattani e Douglas (2006) (figura 19B) com o observado neste trabalho (figura 19A), ambas na ampliação de 1.000x.

Figura 19 - Micrografias ampliadas em 1.000x de biofilmes de *Candida tropicalis*. Biofilme produzido neste trabalho em meio CMG a 30 °C/ 288 h (A). Biofilme produzido em meio YNB (Yeast Nitrogen Base) a 37 °C/ 48 por Al-Fattani e Douglas (2006) (B).



As micrografias dos biofilmes produzidos por *Cryptococcus* sp não apresentaram formas filamentosas da levedura, apesar de ser relatado em literatura que a espécie é capaz de formar filamentos. Observa-se nos trabalhos de Martinez (2015), Brilhante et al. (2015) e Martinez e Casadevall (2007) que a estrutura do biofilme apresenta regiões complexas internas de células metabolicamente ativas entrelaçadas com estrutura exopolissacarídica, chegando a espessura de um biofilme maduro de aproximadamente 55 μm .

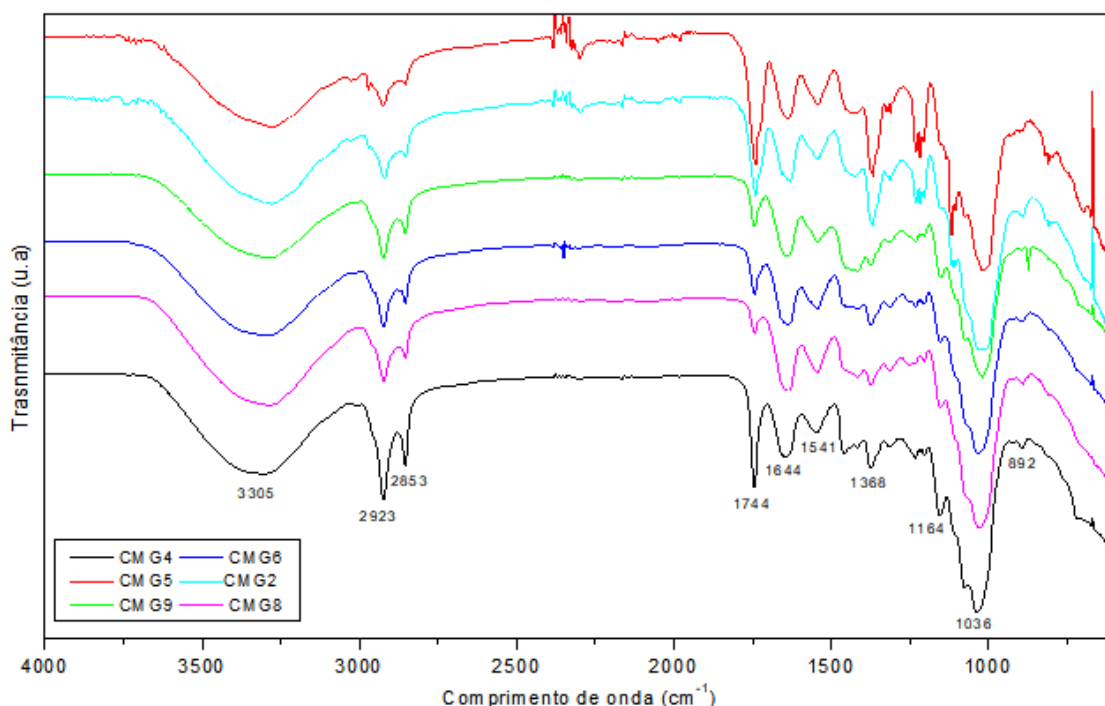
Neste trabalho, de modo geral, os biofilmes produzidos são bastante similares, tanto na análise visual (Figura 11) quanto nos detalhes da estrutura observados as micrografias (Figura 17 e 18). Dessa forma, considera-se que todos os biofilmes apresentam um micro-organismo produtor em comum, este sendo *Candida tropicalis*, a qual pode ser identificada em todas as amostras em quantidades superiores a 88%, (Figuras 12 e 13).

5.5.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier tiveram como objetivo a identificação de grupamentos funcionais, visando a caracterização do possível biopolímero (ou substância polimérica extracelular). Os espectros estão apresentados na Figura 20. Observa-se que as bandas de absorção

nos diferentes comprimentos de ondas são similares em todas as amostras, sugerindo a existência de uma única substância polimérica, possivelmente produzida pelo mesmo micro-organismo (*Candida tropicalis*), corroborando com os resultados observados ao MEV.

Figura 20 - Espectro de FTIR das amostras de biofilme desidratado



O grupamento hidroxila (-OH) geralmente aparece entre 3.650 e 3.584 cm^{-1} , entretanto, quando o mesmo participa de ligações de hidrogênio, ocorre a absorção em bandas mais baixas, tipicamente entre 3.550-3.200 cm^{-1} , sugerindo que ocorra uma possível interação entre as cadeias poliméricas através de ligações de hidrogênio. Em amostras sólidas, é possível observar absorção do grupamento amida entre 3.350 e 3.180 cm^{-1} , sugerindo uma provável sobreposição das bandas de hidroxilas e amidas na banda de absorção de 3.305 cm^{-1} (essa sobreposição é observada no espectro apresentado na Figura 20) (SILVERSTEIN et al., 2010).

As deformações decorrentes das vibrações típicas do estiramento (C-H) ocorrem em 2.926 e 2.853 cm^{-1} , além da absorção em 1.459 cm^{-1} indicar deformações (-CH₂-). Este estiramento ocorre em uma faixa aproximadamente constante (DYER, 1977; SILVERSTEIN et al., 2010). A absorção entre 1.870 e 1.540 cm^{-1} tem origem na deformação da ligação do grupo carbonila (C=O), portanto a absorção em

1.744 cm^{-1} indica um grupamento carbonila (C=O). A banda de absorção próxima à 1.375 cm^{-1} origina-se da deformação das ligações (-C-H-) do grupamento metila.

A banda observada em torno de 1.036 cm^{-1} corresponde a deformação do grupo funcional éter (C-O-C) e segundo Abid e colaboradores (2018) a zona de absorção entre 1.200 e 950 cm^{-1} é conhecida como a digital dos polissacarídeos no espectro de FTIR, podendo ser observada com clareza no espectro obtido neste trabalho (Figura 20). As amidas primárias e secundárias têm uma ou mais bandas entre 1.650 e 1.515 cm^{-1} , além da deformação fora do plano do grupo N-H entre 800 e 666 cm^{-1} (SILVERSTEIN et al., 2010).

Os principais comprimentos de ondas associados aos grupos funcionais dos biofilmes analisados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Comprimento de onda (cm^{-1}) e atribuições referentes aos biofilmes produzidos

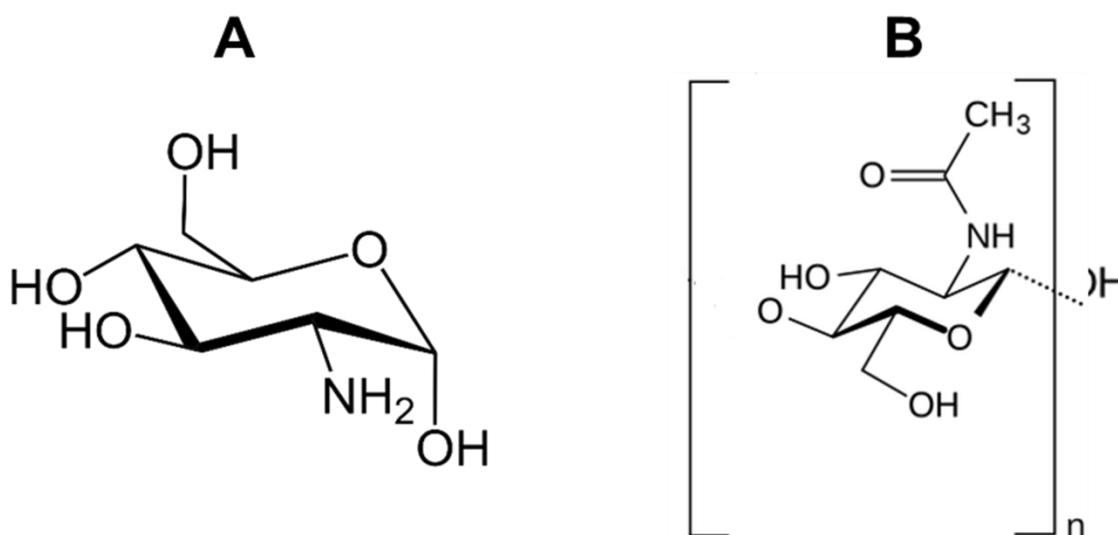
COMPRIMENTO DE ONDA (cm^{-1})	ATRIBUIÇÕES
3305	Deformação axial OH
2923	Estiramentos C-H
2853	
1744	Estiramento C=O
1644	Deformações de NH e NH ₂
1541	
1459	Deformação angular -CH ₂ -
1368	Deformação -C-H-
1036	Deformação C-O-C
892	Deformação fora do plano NH

Al-Fattani e Douglas (2006) caracterizaram o material da matriz do biofilme formado por *Candida tropicalis* e *Candida albicans* em tiras de PVC (submersas no meio de cultivo). Os micro-organismos foram cultivados em meio YNB suplementado de glicose, incubados na temperatura de 37 °C, por 48 h, sobre agitação de 60 rpm. O exopolissacarídeo produzido foi isolado e então caracterizado por meio de análises químicas. O material produzido por *Candida tropicalis* consistiu principalmente de

hexosamina (27,4%), pequenas concentrações de carboidratos (3,3%) e proteínas (3,3%).

A partir do espectro de FTIR apresentado na Figura 20 e das análises realizadas por Al-Fattani e Douglas (2006), infere-se que o biofilme produzido é possivelmente uma derivação de uma hexosamina como, por exemplo, a molécula de glucosamina. A estrutura química da glucosamina é apresentada na Figura 21A. Observa-se que a molécula de glucosamina não apresenta o grupamento carbonila (C=O) ou o grupamento amida e sim, um grupamento amina, logo, sugere-se que o monômero formador da matriz do biofilme seja um derivado da glucosamina, possivelmente a N-Acetilglucosamina. A N-Acetilglucosamina (GlcNAc) é quimicamente obtida da junção entre glucosamina e o ácido acético, sendo considerada um monossacarídeo derivado da glicose. A estrutura química da GlcNAc está apresentada na Figura 21B. A GlcNAc é um monômero de vários polissacarídeos tais como a quitina, a quitosana, o ácido hialurônico e a mureína (conhecida também como peptidoglicano) (CHEN et al., 2010).

Figura 21 - Estrutura química da glucosamina (A) e N-Acetilglucosamina (B)



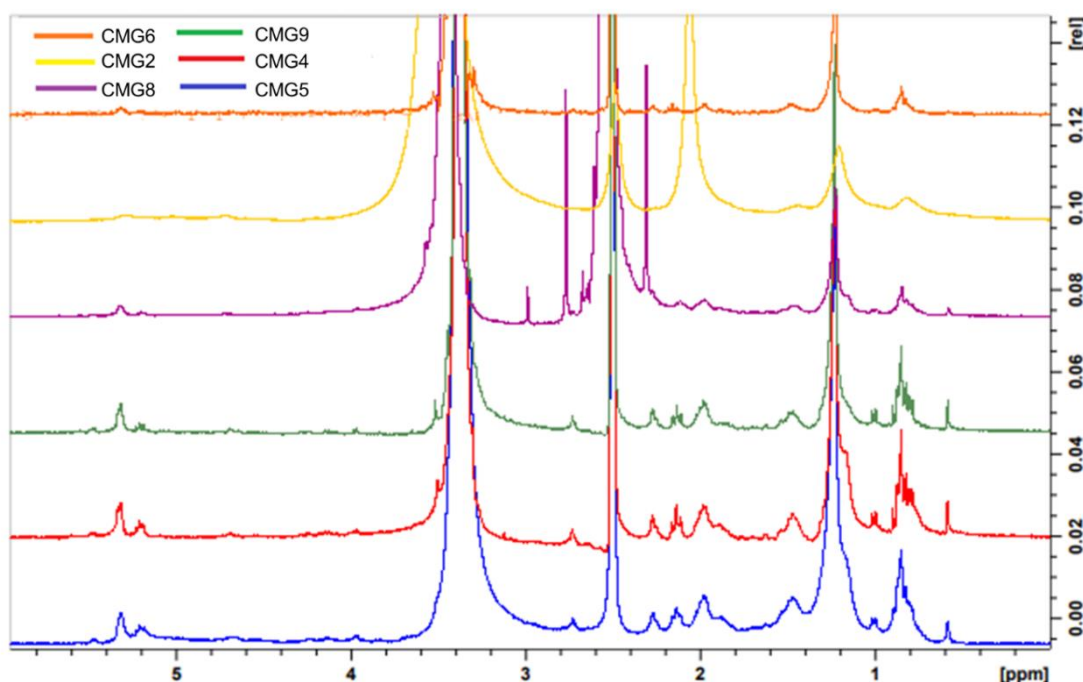
Fonte: Adaptado de Souza (2015)

Herdyastuti e Cahyaningrum (2017) analisaram a GlcNAc derivada da degradação enzimática da quitina amorfa, e obtiveram um espectro de FTIR similar ao observado na Figura 20 deste presente trabalho.

5.5.3 Caracterização por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ^1H -RMN apresentaram alta similaridade, assim como dos espectros obtidos de FTIR (Figura 22). O espectro de ^1H -RMN é apresentado na Figura 22.

Figura 22 - Espectros de ^1H RMN (600 MHz) dos biofilmes das amostras CMG4, CMG5, CMG9, CMG2, CMG6, CMG8 em DMSO-D6



Na região do espectro entre 3,1 e 4,5 ppm ocorreu sinais dos prótons ligados aos carbonos C2-C6. Essa banda é geralmente mal resolvida devido à sobreposição de deslocamentos químicos (WANG et al., 2013). Os espectros de polissacarídeos geralmente apresentam regiões anoméricas entre 4,5 a 5,5 ppm, estas devido aos prótons anoméricos (do carbono anomérico) dos monômeros. Foram visualizados (Figura 16) dois sinais entre 5,4 e 5,2 ppm referentes a ligações alfa. O sinal obtido em 2,50 ppm refere-se ao solvente dimetilsulfóxido – D6 parcialmente substituídos por íons hidrogênio e o sinal em aproximadamente 3,3 ppm corresponde à água resultante de umidade na amostra ou presente no DMSO-D6 (CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES). Na região 4,79 observa-se o sinal correspondente ao grupo amina.

5.5.4 Análise termogravimétrica (TGA)

A Figura 23 apresenta as curvas resultantes da análise termogravimétrica dos biofilmes formados pelas seis amostras selecionadas. As curvas individuais para cada uma das amostras de biofilme (CMG2, CMG4, CMG5, CMG6, CMG8 e CMG9), estão apresentadas no Apêndice E. A partir das curvas, foi possível obter o percentual de perda de massa e a respectiva temperatura máxima de degradação da amostra, bem como o percentual de resíduo resultante da degradação após o final do processo de análise (1000 °C), em cinco estágios distintos. Os dados obtidos das curvas estão compilados na Tabela 5.

Figura 23 - Curva TGA de biofilmes formados pelas amostras CMG2, CMG4, CMG5, CMG6, CMG8 e CMG9

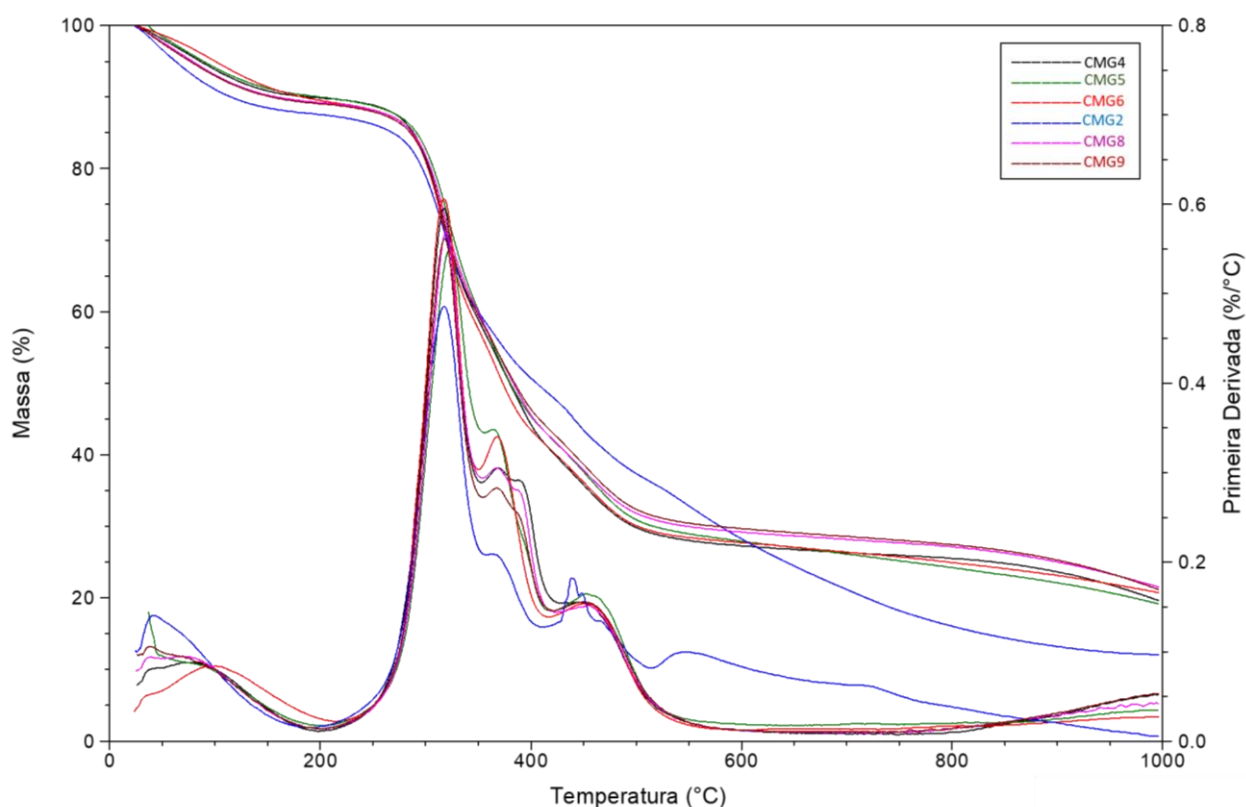


Tabela 5 - Percentual de perda de massa, temperatura máxima de degradação ($T_{\text{máx}}$) e percentual de resíduo gerado para os cinco estágios térmicos (E1, E2, E3, E4 e E5) observados nas curvas obtidas por meio da análise termogravimétrica das amostras de biofilme (CMG2, CMG4, CMG5, CMG6, CMG8 e CMG9).

	AMOSTRAS					
	CMG2	CMG4	CMG5	CMG6	CMG8	CMG9
Perda de massa E1 (%)	12,2	10,1	10,0	10,8	10,8	10,9
Perda de massa E2 (%)	29,0	31,6	31,9	31,3	30,3	31,0
Perda de massa E3 (%)	9,2	19,3	16,0	16,7	17,2	15,2
Perda de massa E4 (%)	12,9	12,8	15,0	13,5	13,2	14,1
Perda de massa E5 (%)	24,1	6,5	7,9	6,9	7,0	7,7
$T_{\text{máx}}$ E2 (°C)	316	319	322	317	320	318
$T_{\text{máx}}$ E3 (°C)	366	369	367	368	368	368
$T_{\text{máx}}$ E4 (°C)	438	449	453	454	457	451
Resíduo (%)	12,4	19,6	19,2	20,8	21,5	21,2

De acordo com a Tabela 5, o primeiro estágio (E1) caracterizou-se por perda de massa variando de 10,0 (CMG5) a 12,2% (CMG2), que acontece no início do processo de aquecimento (0 a 200 °C) (Figura 23) não sendo possível, no entanto, afirmar com precisão o valor da $T_{\text{máx}}$ de degradação. De acordo com a literatura (CHEN; ZHENG; ZHU, 2012) este primeiro estágio corresponde ao percentual de umidade do polímero, a que pode-se atribuir aos processos endotérmicos de distribuição de água na biomassa, sendo eles a perda de massa das moléculas de água fracamente ligadas (hidratação) e à perda de massa de moléculas de água fortemente ligadas (dehidroxilação) (MÜLLER; VILLALBA; ANAISSI, 2014). No segundo evento térmico (E2), verifica-se a maior perda de massa das amostras de biofilme, com valores variando de 29 (CMG2) a 31,9% (CMG5), que acontece com temperaturas máximas de degradação ($T_{\text{máx}}$) variando de 316 (CMG2) a 322 °C (CMG5). Na sequência, ocorrem mais dois eventos, nos quais são encontradas perdas de massa que variam de 9,2 (CMG2) a 19,5% (CMG4) em E3 e de 12,8 (CMG4) a 15,0% (CMG5) em E4.

Ressalta-se que para a amostra CMG2, foi observada uma grande variação em termos de perda de massa em relação às demais amostras (média de 16,9%) indicando diferenças na composição do biofilme formado nesta amostra. Em relação às temperaturas máximas de degradação, estas variaram de 366 a 369 °C em E3 e de 438 a 459 °C em E4. Em E5 ocorre o último estágio de degradação do material, com perda de massa entre 6,5 (CMG4) e 24,1% (CMG2) mostrando novamente uma

grande variação da perda de massa da amostra CMG2 em relação à média (7,2%). Ao final do processo, a média de resíduo gerado é de 20,46%, se não considerarmos a amostra CMG2, a qual produziu apenas 12,4% de resíduo.

O teor de umidade dos biofilmes avaliados demonstra a característica higroscópica do polímero, a qual pode estar relacionada à presença de alto nível de molécula de água interagindo com o grupo carboxila (KUMAR et al., 2004; ISMAIL e NAMPOOTHIRI, 2010). Selvi, Banerjee e Das (2015) analisaram a eficiência da degradação do antibiótico cefdinir por biofilmes de *Candida* sp em matrizes simples e híbridas e como parte dos seus resultados os autores realizaram a análise termogravimétrica dos biofilmes. Os autores atribuíram a perda de massa de 4% à presença de umidade na temperatura entre 22 °C e 100 °C, perda de massa de aproximadamente 12% a 234 °C, indicando estabilidade de 88% até atingir a temperatura 234 °C, e quando aquecido a temperaturas mais elevadas de até 700 °C, o composto se decompõe até uma perda de massa total de 65%, restando 35% de resíduos, valor superior à quantidade de resíduos observados nesse trabalho. Os resultados observados neste trabalho foram diferentes dos encontrados por Selvi, Banerjee e Das (2015), podendo destacar que os biofilmes desenvolvidos por *C. tropicalis* neste estudo apresentaram valores de perda de massa por umidade, decomposição e valores de $T_{máx}$ superiores, como também maior número de eventos relatados, sendo citados pelos autores até três eventos, enquanto que neste foram observados cinco.

Em relação ao alto teor de resíduo gerado (em média, 20%), este provavelmente constitui-se de material inorgânico, o que poderia ser explicado pelo fato de o biofilme ter sido produzido em meio de cultivo caldo marinho, com alta concentração de sais (aproximadamente 20 g/L de NaCl, entre outros sais). Parte dos sais não consumidos pelos micro-organismos podem ter sido capturados pelos poros do biofilme, integrando a matriz polimérica. Além disso, a possível composição em fosfatos também pode fazer parte do resíduo. Gea e colaboradores (2011) ao observaram o valor do resíduo cerca de 34% para biofilmes de celulose bacteriana não tratado, os autores explicaram o elevado valor, pela presença de compostos de fósforo como impurezas iniciais, o que poderia vir aumentar consideravelmente a formação de carvão.

Corroborando com as demais análises de caracterização dos biofilmes realizadas neste trabalho, a semelhança no perfil termogravimétrico novamente

sugere que as amostras analisadas, com exceção da CMG2, são constituídas do mesmo material. De uma maneira geral, algumas hipóteses podem ser formuladas. A alta temperatura de degradação térmica dos eventos E2, E3 e E4 (316 a 357 °C) sugere tratar-se da degradação de polímeros. Como são observados três eventos térmicos principais, pode-se afirmar que o biofilme é formado por uma mistura de substâncias, podendo tratar-se de um polímero heterogêneo constituído de carboidrato associado à proteínas e lipídeos, ou ainda uma mistura da matriz polimérica com os constituintes da biomassa celular que ficou presa a esta matriz, conforme observado nas micrografias obtidas por MEV (Figura 17 e 18).

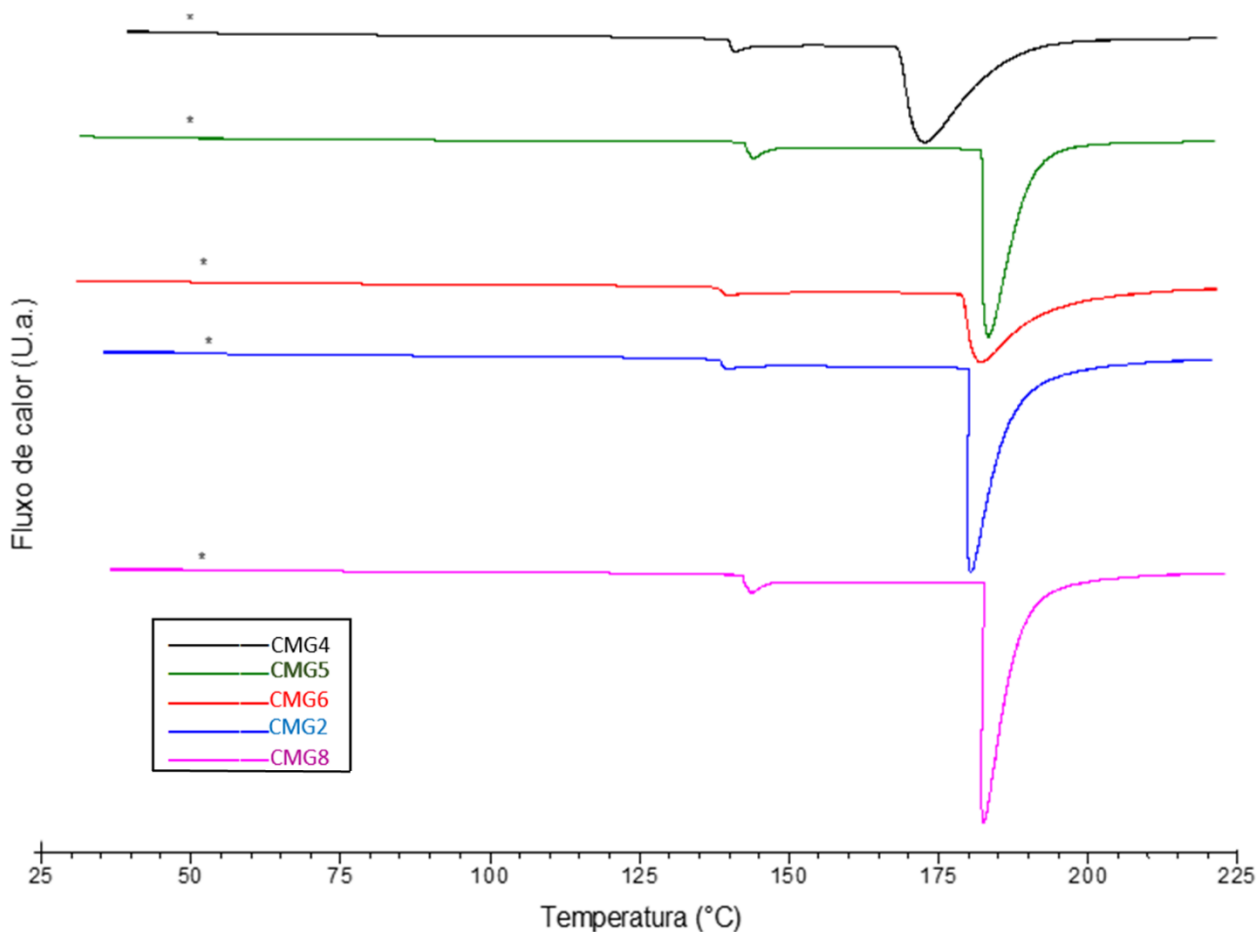
5.5.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A Figura 24 apresenta as curvas térmicas obtidas por calorimetria exploratória diferencial (DSC) das amostras de biofilme. As curvas de DSC individuais relativas a cada uma das amostras de biofilme (CMG2, CMG4, CMG5, CMG6 e CMG8) estão apresentadas no Apêndice F. Os valores de temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e as entalpias de fusão (ΔH_m) correspondentes obtidas das curvas apresentadas na Figura 24 são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e as entalpias correspondentes (ΔH_m) obtidas dos três eventos térmicos apresentados nas curvas da Figura 25 para as amostras de biofilme (CMG2, CMG4, CMG5, CMG6 e CMG8)

Amostra	T_g (°C)	T_{m1} (°C)	ΔH_{m1} (J/g)	T_{m2} (°C)	ΔH_{m2} (J/g)	T_{m3} (°C)	ΔH_{m3} (J/g)
CMG2	53	nd	nd	140	5,8	180	191,8
CMG4	50	126	0,2	141	3,8	173	174,0
CMG5	50	nd	nd	144	6,9	182	163,2
CMG6	52	122	0,2	140	3,6	182	134,8
CMG8	52	Nd	nd	144	6,6	182	172,4

Figura 24: Curvas térmicas obtidas por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) das amostras de biofilme (CMG2, CMG4, CMG5, CMG6 e CMG8).



*T_g

De acordo com o observado na Tabela 6, as amostras analisadas apresentam um perfil bastante similar. A temperatura de transição vítrea (T_g) varia de 50 a 53 °C e pode ser observada como um sutil deslocamento na linha de base, em todas as amostras. Na sequência, mais três eventos térmicos podem ser observados na Figura 24. O primeiro é caracterizado por um pico endotérmico indicando a fusão do material, em temperaturas (T_{m1}) de 126 e 122 °C para CMG4 e CMG6, respectivamente e variação de entalpia (ΔH_{m1}) de 0,2 para ambas as amostras. Para as amostras CMG2, CMG5, e CMG8, não foi possível observar este evento.

Um segundo pico endotérmico de fusão é observado, com temperaturas (T_{m2}) variando de 140 (CMG2 e CMG6) a 144 °C (CMG5 e CMG8) e variação de entalpia (ΔH_{m2}) na faixa de 3,6 (T6a) a 6,9 J/g (CMG5). O terceiro e último pico endotérmico

ocorre com temperaturas de fusão (T_{m3}) variando de 173 (CMG4) a 182 °C (CMG5, CMG6 e CMG8) e com variação de entalpia (ΔH_{m3}) na faixa de 134,8 (CMG6) a 191,8 J/g (CMG2). Este pico, estreito e de grande amplitude, permite afirmar tratar-se da fusão de um componente altamente cristalino que compõe o biofilme. Ainda, esta análise corrobora com a análise termogravimétrica realizada (Figura 23) mostrando que o biofilme não é constituído de uma substância pura, mas sim de uma mistura de pelo menos três substância principais ou ainda de um polímero heterogêneo como uma glicoproteína, por exemplo, cujos constituintes têm perfis térmicos diferentes.

5.5.6 Composição monossacarídica

Os biofilmes foram hidrolisados e os monossacarídeos resultantes foram reduzidos a acetato de auditol e analisados por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (GC-MS), utilizando como padrões os monossacarídeos arabinose, galactose, glicose, manose e xilose acetilados. Em todas as amostras analisadas (CMG2, CMG4, CMG5, CMG6, CMG8), apenas glicose e manose foram detectados, sugerindo que o polímero presente na matriz extracelular do biofilme seja uma glicomanana. A amostra CMG9 não pode ser caracterizada em função do volume de amostra obtido ser insuficiente para a técnica. A Tabela 7 apresenta os resultados encontrados.

Tabela 7 Monossacarídeos encontrados após hidrólise das amostras de biofilmes (CMG2, CMG4, CMG5, CMG6, CMG8) e seus respectivos tempos de retenção (t_R) e percentuais na amostra.

	Glicose		Manose	
	%	t_R	%	t_R
CMG2	50,5	10,667	49,5	9,692
CMG4	100	10,671	nd	-
CMG5	100	10,665	Nd	-
CMG6	68	10,662	32	9,686
CMG8	60,6	10,669	39,4	9,686
nd – não detectado				

Observa-se que as amostras formadas por espécies fúngicas (CMG4 e CMG5) apresentaram apenas o monossacarídeo de glicose, enquanto as amostras constituídas por bactérias e leveduras (CMG2, CMG6, CMG8) apresentaram a monossacarídeos de manose e glicose.

Zarnowski e colaboradores (2014) estudaram a composição química da matriz do biofilme de *C. albicans* e encontraram 55% de proteínas, 25% de carboidratos, 15% de lipídeos e 5% de ácidos nucleicos. Foram identificados três polímeros diferentes, os quais parecem interagir fisicamente. Destes, o mais abundante incluiu uma manana de ligações 1,6 com ramificações 1,3 (87%) associado a uma glucana não ramificada de ligações 1,6 (13%), num aparente complexo Manana-Glucana (MGCx) constituindo característica marcante ao biofilme de *C. albicans*.

Dominguez e colaboradores (2018) averiguaram a conservação e divergência na estrutura do complexo Manana-Glucana (MGCx) da matriz de biofilme de *Candida* spp. Os autores destacam que MGCx isolados das matrizes de biofilme de espécies de *Candida* não-albicans (NAC) constituíram 13,5% em *C. tropicalis*, 34,8% em *C. parapsilosis* e 17,0% em *C. glabrata*.

Em análise de cromatografia gasosa, Dominguez et al. (2018) revelou a relação de manana e glucana na matriz de cada biofilme *Candida* NAC, encontrando razões manano/glucana de 64:25 para *C. tropicalis*, 83:12 para *C. parapsilosis* e 93: 7 para *C. glabrata*. Os resultados apresentados pelos autores afirmam que há a produção de um MGCx por cada espécie de *Candida* NAC. Estas podem apresentar características estruturais distintas em que a divergência estrutural e molecular na montagem da matriz é sugerida por diferenças sutis na ramificação da matriz, como também na ausência do envolvimento de ortólogos da enzima de modificação da matriz.

Os resultados encontrados nesse trabalho foram diferentes do observado por Dominguez et al. (2018) em relação as razões manano/glucana para *C. tropicalis*. ressaltando que os biofilmes analisados não são de cepas microbiológicas isoladas, diferente dos autores citados. A variação da composição monossacarídica (glicose em biofilmes constituídos por espécies de leveduras e manose e glicose em biofilmes compostos de bactérias e leveduras) pode ser um indicativo que apesar de o esqueleto principal da matriz apresentar alta similaridade nas características

morfológicas (MEV, Biofilme) e químicas (FTIR, RMN, TGA, DSC) há a participação ativa dos membros microbiológicos que compõem a matriz do biofilme.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo selecionar amostras de micro-organismos produtores de biofilmes a partir de sedimentos de manguezal da Baía Babitonga. Durante a seleção dos micro-organismos produtores de biofilmes foram obtidos micro-organismos e biofilmes com características distintas, dos quais para o seguimento deste trabalho foram selecionados seis isolados que apresentaram melhor consistência. Vale ainda ressaltar que embora não utilizados nesse estudo, os micro-organismos foram conservados sob temperaturas negativas, estando disponível para investigações futuras, havendo a possibilidade de averiguar outras características e potencialidade dos biofilmes de origem de manguezal.

Os isolados microbianos produtores de biofilmes foram identificados por técnica de biologia molecular utilizando os marcadores rRNA 16S e a região ITS do rRNA revelando a presença das bactérias *Carnobacterium divergens*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc pseudomesenteroides* e as leveduras *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Lodderomyces elongisporus*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Meyerozyma guilliermondii* (syn. *Candida guilliermondii*). O teste de suscetibilidade a antimicrobianos realizado com *Candida tropicalis*, *Enterococcus faecalis* e *Leuconostoc pseudomesenteroides* revelou suscetibilidade intermediária aos antibióticos ERI, CIP e NOR; suscetibilidade intermediária para CIP, NOR e RI; e resistência antimicrobiana ao antibiótico ER para *E. faecalis*. *Candida tropicalis* demonstrou suscetibilidade intermediária para ICZ.

As análises de caracterização dos biofilmes utilizando MEV, FTIR, 1H-RMN, TGA e DSC revelaram que os biofilmes apresentam características em comum, sendo possivelmente formados pela mesma substância polimérica. Os espectros de 1H-RMN revelaram regiões anoméricas clássicas de polissacarídeos, e a possível ligação de tipo alfa, e bandas de absorção no espectro de FTIR foram similares aos da molécula N-Acetilglucosamina, sendo este um possível monômero do biopolímero. No entanto, a composição monossacarídica diferente das outras análises de caracterização apresentou diferenças entre as amostras de biofilmes testados. Amostras compostas por espécies fúngicas (CMG4 e CMG5) foram constituídas integralmente de glicose, enquanto as amostras que apresentaram em sua composição bactérias e leveduras (CMG2, CMG6 e CMG8) foram constituídas de

monômeros de glicose e manose. Como descrito anteriormente na literatura, a presença desses dois monômeros é comum em biofilmes produzidos por *Candida* spp, formando o complexo de Manana-Glucana (MGCx) da matriz, o qual pode apresentar variações dependendo da espécie que a produz. Considerando que cada uma das matrizes de biofilmes aqui estudadas é composta por percentuais microbiológicos variados, sugere-se que a composição estrutural das matrizes seja composta de Manana-Glucana (MGCx) e devido as interações entre as espécies que compõem os biofilmes é possível verificar particularidades nos biofilmes analisados.

REFERÊNCIAS

- ABID, Yousra et al. Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 719–728. 2018.
- AGHAMALI, Mina et al. Evaluation of two novel biofilm-specific antibiotic resistance genes in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Gene Reports**, v. 13, p. 99–103. 2018.
- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 999–1008. 2006.
- ALONGI, D. M. Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. **Microbial Ecology**, v. 15, n. 1, p. 59–79, 1988.
- ALONGI, D. M. Carbon cycling and storage in mangrove forests. **Annual review of marine science**, v. 6, p. 195–219, 2014.
- ALZAHIRANI, D. A.; SELIM, E. M.; EL-SHERBINY, M. M. Ecological assessment of heavy metals in the grey mangrove (*Avicennia marina*) and associated sediments along the Red Sea coast of Saudi Arabia. **Oceanologia**, v. 60, n. 4, p. 513–526. 2018.
- ANDREOTE, et al. The Microbiome of Brazilian Mangrove Sediments as Revealed by Metagenomics. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 38600, 2012.
- ANGELINI, T. E. et al. *Bacillus subtilis* spreads by surfing on waves of surfactant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 43, p. 18109–13. 2009.
- ARAÚJO, D.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Portrait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Network Genes. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 62–75. 2017.
- Architecture and physiology of microbial biofilms. In: Iazăr, v.; in: Chifiriuc, M. C. **Romanian archives of microbiology and immunology**. [s.l.]: Cantacuzino institute bucharest, 2010. v. 69. p. 95–104.

ARMITANO, J.; MÉJEAN, V.; JOURLIN-CASTELLI, C. Gram-negative bacteria can also form pellicles. **Environmental Microbiology Reports**, v. 6, n. 6, p. 534–544, 2014.

ARUMUGAM, T. et al. Screening of novel actinobacteria and characterization of the potential isolates from mangrove sediment of south coastal India. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 225–233, 2017.

BALCÁZAR, J. L.; SUBIRATS, J.; BORREGO, C. M. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1216, p. 1–9, 31. 2015.

BANDEIRA, D. R. et al. Resultados preliminares da pesquisa no sambaqui sob rocha Casa de Pedra, São Francisco do Sul, Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 13, n. 1, p. 207–225, 2018.

BARBIER, E. B. Ecosystems as Natural Assets. **Foundations and Trends in Microeconomics**, v. 4, n. 8, p. 611–681, 2009.

BARBIERI, Dicler S.V. et al. Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, v. 59, n. 9, p. 887–896.2014.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. **Trees**, v. 16, n. 2–3, p. 159–166, 2002.

BEECH, Iwona B. Corrosion of technical materials in the presence of biofilms—current understanding and state-of-the art methods of study. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 53, n. 3, p. 177–183. 2004.

BEZERRA, F. J. O bosque de mangues e a pesca artesanal no Distrito de Acupe (Santo Amaro, Bahia): uma abordagem etnoecológica. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 30, n. 3. 2008.

BISINELA, G. C.; CREMER, M. J.; ANDRADE, T. R. *Egretta caerulea* no ninhal do rio Pedreira, Santa Catarina Introdução Material e Métodos. **Biotemas**, v. 27, p. 109–121, 2014.

BIZERRA, F. C. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 3, p. 442–450. 2008.

BONUGLI-SANTOS, R. C. et al. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 32–37, 2010.

BRILHANTE, Raimunda Sâmia Nogueira et al. Simvastatin inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* and *Cryptococcus* species. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 5, p. 459–465. 2015.

BROMBERG, G. K.; SILLIMAN, B.R.; BERTNESS, M.D. Centuries of Human-Driven Change in Salt Marsh Ecosystems. **Annual Review of Marine Science**, v. 1, n. 1, p. 117–141, 2009.

BROWN, A. J. P. et al. Stress adaptation in a pathogenic fungus. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 1, p. 144–155. 2014.

BRYERS, J. D. Medical biofilms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 1, p. 1–18. 2008.

CAPOTE-BONATO, Francieli et al. Murine model for the evaluation of candiduria caused by *Candida tropicalis* from biofilm. **Microbial Pathogenesis**, v. 117, p. 170–174. 2018.

CASADO MUÑOZ, M. C. et al. Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented Aloreña table olives throughout fermentation process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 172, p. 110–118. 2014.

CASTANHEIRA, M. et al. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 85, n. 2, p. 200–204. 2016.

CEGELSKI, L. et al. Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 12, p. 913–919, 2009.

CERI, H. et al. The Calgary Biofilm Device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1771–1776, 1999.

CHAI, M.; LI, R.; ZAN, Q. Effects of mangrove plants on heavy metal risk in sediment

based on SEM–AVS analysis. **Regional Studies in Marine Science**, v. 13, p. 12–18. 2017.

CHAKRABORTY, A.; et. al. Changing bacterial profile of Sundarbans, the world heritage mangrove: Impact of anthropogenic interventions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 593–610, 2015.

CHAVES, L C D. **Estudo da Cinética de Formação de Biofilmes em Superfícies em Contacto com Água Potável**. 2004. 156 f. Universidade do Minho, Braga, 2004.

CHEN, D.; ZHENG, Y.; ZHU, X. Determination of effective moisture diffusivity and drying kinetics for poplar sawdust by thermogravimetric analysis under isothermal condition. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 451–455. 2012.

CHITASOMBAT, M.N. et al. Rare opportunistic (non-Candida, non-Cryptococcus) yeast bloodstream infections in patients with cancer. **Journal of Infection**, v. 64, n. 1, p. 68–75. 2012.

CONSTANTIN, O. E. Bacterial Biofilms Formation At Air Liquid Interfaces. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 5, p. 18–22, 2009.

COSTA, M.D.P.; SOUZA-CONCEIÇÃO, J.M. Composição e abundância de ovos e larvas de peixes na baía da Babitonga, Santa Catarina, Brasil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, n. 3, p. 372–382, 2009.

COSTANZA, R. et al. Changes in the global value of ecosystem services. **Global Environmental Change**, v. 26, p. 152–158. 2014.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microscopy**, v. 49, p. 711–745, 1995.

DA NOBREGA, A; ROMEU, R.; NISHIDA, A. K. Aspectos socioeconômicos e percepção ambiental dos catadores de caranguejo-uçá *Ucides cordatus cordatus* (L. 1763) (decapoda, brachyura) do estuário do Rio Mamanguape, nordeste do Brasil. **Interciencia**, v. 28, n. 1, p. 36–43, 2003.

DALE, Jennifer L. et al. Restructuring of *Enterococcus faecalis* biofilm architecture in response to antibiotic-induced stress. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 3, n. 1, p. 15. 2017.

DAVIES, D. G. et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, n. 5361, p. 295–298, 1998.

DE GROOT, R. et al. Global estimates of the value of ecosystems and their services in monetary units. **Ecosystem Services**, v. 1, n. 1, p. 50–61. 2012.

DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D.; ANDREOTE, F. D; TAKETANI, R. G.; TSAI, S. M; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S. Archaeal communities in the sediments of three contrasting mangroves Archaeal communities in the sediments of three contrasting mangroves. **Journal of Soils and Sediments**, v. 11, p. 1466–1476, 2011.

DIAS, A; C. F. et al. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 1305–1311, 2009.

DIAS, A.C.F. et al. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 4, p. 541–551, 2010.

DIEGUES, A. C. **O mito moderno d a natureza intocada**. 4. ed. São Paulo: Annablume, 2001.

DIEGUES, A. C. S. **Diversidade biológica e culturas tradicionais litorâneas: o caso das comunidades caiçaras**. São Paulo: NUPAUB-USP, Série Documentos e Relatórios de Pesquisa, n.5, 1988.

DIEHL, F.L.; HORN FILHO, N.O. Compartimentação geológico-geomorfológica da zona litorânea e planície costeira do Estado de Santa Catarina. **Notas Técnicas**, v. 9, p. 39–50, 1996.

DIEZMANN, S. et al. Phylogeny and Evolution of Medical Species of *Candida* and Related Taxa: a Multigenic Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5624–5635. 2004.

DÖĞEN, A. et al. MTL genotypes, phenotypic switching, and susceptibility profiles of *Candida parapsilosis* species group compared to *Lodderomyces elongisporus*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e018265. 2017.

DOMINGUEZ, E. et al. Conservation and Divergence in the *Candida* Species Biofilm Matrix Mannan-Glucan Complex Structure, Function, and Genetic Control. **mBio**, v. 9, n. 2. 2018.

DONINI, I. A. N. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, p. 165–178, 2010.

DONLAN R. M.; COSTERON J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms Rodney. **Clinical Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 167–193, 2002.

DONLAN, Rodney M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 8, p. 1387–1392, 2001.

ENOS-BERLAGE, J. L. et al. Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1160–1182. 2004.

ESA, F.; TASIRIN, S. M.; RAHMAN, N. A. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 113–119, 2014.

EWEL, K. C.; TWILLEY, R. R.; ONG, J.E. Different Kinds of Mangrove Forests Provide Different Goods and Services. **Global Ecology and Biogeography Letters**, v. 7, n. 1, p. 83, 2006.

FARUQUE, S. M. et al. Transmissibility of cholera: In vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 16, p. 6350–6355. 2006.

FASANELLA, C. C. et al. The selection exerted by oil contamination on mangrove fungal communities. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 223, n. 7, p. 4233–4243, 2012.

FELLER, I. C. et al. Biocomplexity in mangrove ecosystems. **Annual review of marine science**, v. 2, p. 395–417, 2010.

FERNANDES, Tânia; SILVA, Sónia; HENRIQUES, Mariana. *Candida tropicalis* biofilm's matrix—involvement on its resistance to amphotericin B. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 83, n. 2, p. 165–169. 2015.

FIEBIG, A. The role of caulobacter cell surface structures in colonization of the air-liquid interface. **Public Health**, v. 4800, n. 3, p. 148–155, 2019.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews**

Microbiology, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.

FLORESCU, D. et al. *Leuconostoc* Bacteremia in Pediatric Patients With Short Bowel Syndrome. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 27, n. 11, p. 1013–1019. 2008.

FORESTI, M.L.; VÁZQUEZ, A.; BOURY, B. Applications of bacterial cellulose as precursor of carbon and composites with metal oxide, metal sulfide and metal nanoparticles: A review of recent advances. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 447–467. 2017.

FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Two Genetic Loci Produce Distinct Carbohydrate-Rich Structural Components of the. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 14, p. 4457–4465, 2004.

GEA, S. et al. Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9105–9110. 2011.

GERHARDINGER, L. C. et al. Conhecimento ecológico local de pescadores da Baía Babitonga, Santa Catarina, Brasil: Peixes da família Serranidae e alterações no ambiente marinho. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 28, n. 3, p. 253–261, 2006.

GHIGO, J.M. Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? **Research in Microbiology**, v. 154, n. 1, p. 1–8, 2003.

GHORBANZADEH, Abdollah et al. Evaluation of the antibacterial efficacy of various root canal disinfection methods against *Enterococcus faecalis* biofilm. An ex-vivo study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 24, p. 44–51. 2018.

GHOSH, A. et al. Bacterial diversity of East Calcutta Wet Land Area: Possible identification of potential bacterial population for different biotechnological uses. **Microbial Ecology**, v. 54, n. 3, p. 452–459, 2007.

GORIN, P. A.J. et al. Characterization of carbohydrate components of an unusual hydrogel formed by seed coats of *Magonia pubescens* (Tingui). **Carbohydrate Research**, v. 282, n. 2, p. 325–333. 1996.

GRAVELAT, F. N. et al. *Aspergillus galactosaminogalactan* mediates adherence to

host constituents and conceals hyphal β -glucan from the immune system. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 8, p. e1003575, 2013.

GROSE, A. V.; HILLEBRANT, C. C.; CREMER, M. J. Diversidade e abundância sazonal da avifauna em duas planícies de maré no estuário da baía da Babitonga, norte de Santa Catarina. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 103, n. 1, p. 5–11, 2017.

GUERREIRO-TANOMARU, Juliane Maria et al. Comparative Analysis of Enterococcus faecalis Biofilm Formation on Different Substrates. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 3, p. 346–350. 2013.

HAMAJIMA, K. et al. Deoxyribonucleic acid base composition and its homology between two forms of *Candida parapsilosis* and *Lodderomyces elongisporus*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 299–302, 1987.

HASLAM, D. B.; GEME, J. W. **Other Gram-Positive, Catalase-Negative Cocci: Leuconostoc and Pediococcus Species and Other Genera**. Fifth Edit ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2017.

HEIDARI, H. et al. Characterization of virulence factors, antimicrobial resistance patterns and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. strains isolated from corneal infection. **Journal Français d'Ophtalmologie**, v. 41, n. 9, p. 823–829. 2018.

HERDYASTUTI, N.; CAHYANINGRUM, S. E. Analysis of N-acetylglucosamine from enzymatic degradation of amorphous chitin. **Rasayan Journal of Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 226–233, 2017.

HOLLENBECK, E. C. et al. Molecular determinants of mechanical properties of *V. cholerae* biofilms at the air-liquid interface. **Biophysical Journal**, v. 107, n. 10, p. 2245–2252, 2014.

HOMMEL, R. K. Candida: Introduction. **Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition**, v. 1, p. 367–373, 2014.

HOOPER, Lora V; GORDON, Jeffrey I. Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. **SCIENCE**, v. 292, n. 5519, p. 1115–1119, 2001.

HÖRNER, R. et al. Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de Enterococcus isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. **Jornal Brasileiro de Patologia e**

Medicina Laboratorial, v. 41, n. 6, p. 391–395, 2006.

HOYLE, B. D.; JASS, J.; COSTERTON, J.W. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 26, n. 1, p. 1–5. 1990.

IBAMA. **Proteção e Controle de Ecossistemas Costeiros**. Brasília: IBAMA. Coleção Meio Ambiente, Série Estudos de Pesca, 1988.

ISMAIL, B.; NAMPOOTHIRI, K. M. Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. **Archives of Microbiology**, v. 192, n. 12, p. 1049–1057. 2010.

ISMAIL, Z. et al. Tropical mangrove swamp metagenome reveals unusual abundance of ecologically important microbes. **Current Science**, v. 112, n. 8, p. 1698–1703, 2017.

JOHANI, Khalid et al. Characterization of microbial community composition, antimicrobial resistance and biofilm on intensive care surfaces. **Journal of Infection and Public Health**, v. 11, n. 3, p. 418–424. 2018.

JOTHIPRAKASAM, V. et al. *Candida tropicalis* biofilm inhibition by ZnO nanoparticles and EDTA. **Archives of Oral Biology**, v. 73, p. 21–24. 2017.

KAALI, P.; STRMBERG, E.; KARLSSO, S. Prevention of Biofilm Associated Infections and Degradation of Polymeric Materials Used in Biomedical Applications. **Biomed. Eng. Trends Mater. Sci.** [S.l.]: InTech, 2011. p. 513–540.

KANG, Mi-Sun et al. Effect of *Leuconostoc* spp. on the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 45, n. 4, p. 291–6. 2007.

KAPP, J. M.; SUMNER, W. Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. **Annals of Epidemiology**, v. 30, p. 66–70. 2019.

KELLEWAY, J. J. et al. Review of the ecosystem service implications of mangrove encroachment into salt marshes. **Global Change Biology**, v. 23, n. 10, p. 3967–3983, 2017.

KIELAK, A. M. et al. The ecology of Acidobacteria: Moving beyond genes and genomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–16, 2016.

KIELISZEK, Marek et al. Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: A review. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 185–198, 2017.

KIM, D.-S.; THOMAS, S.; FOGLER, H. S. Effects of pH and Trace Minerals on Long-Term Starvation of *Leuconostoc mesenteroides*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 976–981. 2000.

KIRAN, G. Seghal et al. Characterization of an exopolysaccharide from probiont *Enterobacter faecalis* MSI12 and its effect on the disruption of *Candida albicans* biofilm. **RSC Advances**, v. 5, n. 88, p. 71573–71585, 2015.

KLEIN, M. N.; KUPPER, K. C. Biofilm production by *Aureobasidium pullulans* improves biocontrol against sour rot in citrus. **Food Microbiology**, v. 69, p. 1–10. 2018.

KOCH, Evamaria W et al. Non-linearity in ecosystem services: temporal and spatial variability in coastal protection. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 7, n. 1, p. 29–37. 2009.

KOGURE, K.; IKEMOTO, E.; MORISAKI, H. Attachment of *Vibrio alginolyticus* to glass surfaces is dependent on swimming speed. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 4, p. 932–937, 1998.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. Candida Infections of Medical Devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 255–267. 2004.

KOMIYAMA, A.; ONG, J. E.; POUNGPARN, S. Allometry, biomass, and productivity of mangrove forests: A review. **Aquatic Botany**, v. 89, n. 2, p. 128–137, 2008.

KOTOKY, R. et al. Biodegradation of Benzo(a)pyrene by biofilm forming and plant growth promoting *Acinetobacter* sp. strain. **Environmental Technology & Innovation**, v. 8, p. 256–268. 2017.

KUMAR, A. et al. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 8, p. 481–489, 2017.

KUMAR, C. G. et al. Characterization of an extracellular biopolymer flocculant from a haloalkalophilic *Bacillus* isolate. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, n. 8, p. 837–843. 2004.

KURTZMAN, C. P. *Lodderomyces van der Walt* (1971). **The Yeasts**. [S.I.]: Elsevier, 2011. p. 561–563.

LAGREE, K. et al. Microscopy of fungal biofilms. **Current Opinion in Microbiology**,

v. 43, p. 100–107, 2018.

LAZĂR, V. **Aderenta Microbiana**. [S.l.]: Academiei Romane, 2003.

LEATHERS, Timothy D.; CÔTÉ, Gregory L. Biofilm formation by exopolysaccharide mutants of *Leuconostoc mesenteroides* strain NRRL B-1355. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 6, p. 1025–1031. 2008.

LECLERCQ, R. et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 2, p. 141–160. 2013.

LEE, M.J. et al. The Fungal Exopolysaccharide Galactosaminogalactan Mediates Virulence by Enhancing Resistance to Neutrophil Extracellular Traps. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 10. 2015.

LEWIS, K. Programmed Death in Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 503–514. 2000.

_____. Riddle of Biofilm Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 999–1007. 2001.

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 2, p. 171–178. 2012.

LOCKHART, S. R. et al. *Lodderomyces elongisporus* Masquerading as *Candida parapsilosis* as a Cause of Bloodstream Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 374–376. 2008.

LOPES, G. R. et al. Growth of *Crassostrea gasar* cultured in marine and estuary environments in Brazilian waters. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 975–982, 2013.

MAH, T. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34–39. 2001.

MANGWANI, N.; KUMARI, S.; DAS, S. Marine Bacterial Biofilms in Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Under Terrestrial Condition in a Soil Microcosm. **Pedosphere**, v. 27, n. 3, p. 548–558. 2017.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J. et al. *Candida guilliermondii* Complex Is Characterized

by High Antifungal Resistance but Low Mortality in 22 Cases of Candidemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 7. 2017.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* Biofilm Formation Depends on Surface Support and Carbon Source and Reduces Fungal Cell Susceptibility to Heat, Cold, and UV Light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4592–4601, 15 jul. 2007.

_____. *Cryptococcus neoformans* Cells in Biofilms Are Less Susceptible than Planktonic Cells to Antimicrobial Molecules Produced by the Innate Immune System. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6118–6123. 2006.

MARTINEZ, Luis R.; CASADEVALL, Arturo. Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 3. 2015.

MARYAM, D. et al. The interactions between *esp*, *fsr*, *gelE* genes and biofilm formation and pfge analysis of clinical *Enterococcus faecium* strains. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 2, p. 129–137. 2014.

MATTILA-SANDHOLM, T.; WIRTANEN, G. Biofilm formation in the industry: A review. **Food Reviews International**, v. 8, n. 4, p. 573–603. 1992.

MAYER, C. et al. The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, n. 1, p. 3–16. 1999.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–128. 2013.

MCHUGH, C et al. pH Required to Kill *Enterococcus faecalis* in Vitro. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 4, p. 218–219. 2004.

MEDRANO-FÉLIX, J. A. et al. Characterization of biofilm formation by *Salmonella enterica* at the air-liquid interface in aquatic environments. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 190, n. 4, p. 221. 2018.

MICHELATO GHIZELINI, Angela; CRISTINA SANTANA MENDONÇA-HAGLER, Leda; MACRAE, Andrew. Microbial diversity in brazilian mangrove sediments - A mini review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1242–1254, 2012.

MITCHELL, K. F. et al. Role of Matrix β -1,3 Glucan in Antifungal Resistance of Non-albicans *Candida* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1918–1920. 2013.

MITCHELL, K. F.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D. R. Fungal Super Glue: The Biofilm Matrix and Its Composition, Assembly, and Functions. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 9. 2016.

MOHAMED, Jamal A. et al. Pleiotrophic Effects of 2 *Enterococcus faecalis* *sagA* –Like Genes, *salA* and *salB*, Which Encode Proteins That Are Antigenic during Human Infection, on Biofilm Formation and Binding to Collagen Type I and Fibronectin. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 2, p. 231–240. 2006.

MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 101–110, mar. 2014.

MORIKAWA, M. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 1, p. 1–8, 2006.

MÜLLER, M.; VILLALBA, J. C.; ANAISSI, F. J. Decomposição térmica (TG-DTA) de sais de ferro $[\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ e $[\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}]$ com análise morfológica e química do produto final. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 35, n. 1, p. 9. 2014.

MUNIZ, E. R.; CUNHA CHAVES, T. P. Condição reprodutiva da betara preta, *Menticirrhus americanus* (Teleostei, sciaenidae), na pesca realizada no litoral norte de Santa Catarina, Brasil. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 30, n. 4, p. 339–344, 2008.

MYSZKA, K.; CZACZYK, K. Bacterial Biofilms on Food Contact Surfaces - a Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 61, n. 3, p. 173–180, 2011.

NCCLS. **Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline- CCLS document M44-A (ISBN 1-56238-532-1)**. 2. ed. Pennsylvania: [s.n.], 2004. v. 23.

NETT, J. E. et al. Role of Fks1p and Matrix Glucan in *Candida albicans* Biofilm Resistance to an Echinocandin, Pyrimidine, and Polyene. **Antimicrobial Agents and**

Chemotherapy, v. 54, n. 8, p. 3505–3508. 2010.

NICHOLS, W. W. et al. Inhibition of Tobramycin Diffusion by binding to Alginate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 4, p. 518–523, 1988.

NIU, H. et al. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme and virulence genes among enterococci with high-level aminoglycoside resistance in Inner Mongolia, China. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 691–696. 2016.

NOGUEIRA, V. L.R.; ANDREOTE, F. D.; COLARES, G. B.; MELO, V. M.M.; AGNEZ-LIMA, L.F.; ANGELIM, A. L.; CANTÃO, M. E.; NORMANDO, L.R.O.; ROCHA, L.L. Microbiomes and potential metabolic pathways of pristine and anthropized Brazilian mangroves. **Regional Studies in Marine Science**, v. 2, p. 56–64, 2015.

NUNES, J. M. et al. Molecular Identification, Antifungal Susceptibility Profile, and Biofilm Formation of Clinical and Environmental *Rhodotorula* Species Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 382–389. 2013.

O' TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. BIOFILM FORMATION AS MICROBIAL DEVELOPMENT. **Annual Reviews Microbiology**, v. 54, p. 49–79, 2000.

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

OTTO, M. Physical stress and bacterial colonization. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 6, p. 1250–1270, 2014.

PARAHITIYAWA, N. B. et al. Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device. **APMIS**, v. 114, n. 4, p. 298–306. 2006.

PAULO, Elinalva M. et al. Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 strain. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 2, p. 495–508. 2012.

PEIXOTO, R et al. Bacterial communities reflect the spatial variation in pollutant levels in Brazilian mangrove sediment. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 99, p. 341–354, 2011.

PESSOA, Cláudia Cristina Brito; SILVA, Silvia Helena Marques da; GOMES, Fabíola

Silveira. Produção de fatores de virulência in vitro por isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de origem clínica em Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 59–65. 2012.

PETCON. **Atualização do Plano de Desenvolvimento e Zoneamento do Porto de São Francisco do Sul**. . Brasília, DF: [s.n.], 2003.

PRATES, A. P. L.; GONÇALVES, M. A.; ROSA, M. R. **Ministério do Meio Ambiente. Panorama da conservação dos ecossistemas costeiros e marinhos no Brasil**. Brasília: MMA, 2012.

RAHIMI, N. et al. Presence of virulence factor genes (gelE and esp) and biofilm formation in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from urinary tract infection in Isfahan, Iran. **Gene Reports**, v. 13, p. 72–75. 2018.

RAJKOWSKI, K. T. **Biofilms in the food and beverage industries**. [S.l.]: Woodhead Publishing, 2009.

RANDAL, R. B. et al. Biofilms in the large bowel suggest an apparent function of the human vermiform appendix. **Journal of Theoretical Biology**, v. 249, n. 4, p. 826–831. 2007.

ROBERTSON, M. et al. Air–liquid interface biofilm formation by psychrotrophic pseudomonads recovered from spoilt meat. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 1, p. 251–259. 2013.

ROCHA, L. L. et al. Distinct Habitats Select Particular Bacterial Communities in Mangrove Sediments. **International Journal of Microbiology**, v. 2016, p. 1–6, 2016.

RUPP, C. J.; FUX, C. A.; STOODLEY, P. Viscoelasticity of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to fluid shear allows resistance to detachment and facilitates rolling migration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 2175–2178, 2005.

SAHOO, K; DHAL, N K. Potential microbial diversity in mangrove ecosystems : a review. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 38, n. 2, p. 249–256, 2009.

SANTOS, D.K. F. et al. Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 20–2. 2017.

SANTOS, Estuarina. Pesca Artesanal De Siris (Crustacea , Decapoda , Portunidae) Na Região. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 1, p. 7–19, 2001.

SANTOS, V.L.; NARDI DRUMMOND, R.M.; DIAS-SOUZA, M.V. Bacteriocins as Antimicrobial and Antibiofilm Agents. **Curr. Dev. Biotechnol. Bioeng.** [S.l.]: Elsevier, 2017. p. 403–436.

SARDI, J. C. O. et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 22–29. 2014.

SARUBO, S.C.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; LIGNON M. C. Monitoramento dos ecótonos entre manguezal e marisma e entre manguezal e vegetação de restinga. In: TURRA, A.; R., DENADAI M (Org.). . **Protoc. para o Monit. habitats bentônicos costeiros – Rede Monit. Habitat Bentônicos Costeiros – ReBentos**. São Paulo: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 2015. p. 137–144.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Manguezal: ecossistema que ultrapassa suas próprias fronteiras. In: **Congresso Nacional de Botânica**. 2002.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Manguezal ecossistema entre a terra e o mar**. São Paulo: Caribbean Ecological Research, 1995.

SCHMIDT, A. J. et al. Climate changes in mangrove forests and salt marshes. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 64, n. 2, p. 37–52, 2016.

SCHNEIDER, R. P. A microbiologia. **SBM- Sociedade Brasileira de Microbiologia**, v. 2, p. 4–12, 2007.

SELVI, A.; BANERJEE, M.; DAS, N. Degradation of cefdinir from pharmaceutical wastewater using immobilized Candida sp. SMN04 and biofilm formed on gravels. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 10, p. 73–79, 2015.

SEMADS. **Manguezais: Educar Para Proteger**. Rio de Janeiro: FEMAR: SEMADS, 2001.

SERAFINI, T. Z. **Limites e possibilidades para a construção da gestão compartilhada da pesca marinha-estuarina: estudo de caso do sistema socioecológico pesqueiro da Baía da Babitonga-SC**. 2012. 271 f. Universidade Federal do Paraná, 2012.

SHARMA, A. et al. Commercial application of cellulose nano-composites – A review. **Biotechnology Reports**, v. 21, p. e00316, mar. 2019.

SHI, Z. et al. Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 539–545, mar. 2014.

SHIN, Jong Hee et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1244–8. 2002.

SINGH, R.; PAUL, D.; JAIN, R. K. Biofilms: implications in bioremediation. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 389–397. 2006.

SMITH, H. F. et al. Morphological evolution of the mammalian cecum and cecal appendix. **Comptes Rendus Palevol**, v. 16, n. 1, p. 39–57. 2017.

SOARES, M. L. G. et al. Mangrove forests associated with salt flats: A case study from southeast Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 65, n. 2, p. 102–115, 2017.

SONNENBURG, Justin L; ANGENENT, Lergus T; GORDON, Jeffrey I. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? **Nature Immunology**, v. 5, n. 6, p. 569–573. 2004.

SOUZA-CONCEIÇÃO, J. M. et al. O papel de praias estuarinas como habitats para peixes em um ambiente subtropical Brasileiro. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 8, n. 3, p. 121–131, 2013.

STALDER, T; TOP, E. Plasmid transfer in biofilms: a perspective on limitations and opportunities. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 2, n. 16022. 2016.

STEWART, P; S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 199–210. 2008.

STOICA, P. et al. Overview of biofilm-related problems in medical devices. **Biofilms Implant. Med. Devices**. [S.l.]: Elsevier, 2017. p. 3–23.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as Complex Differentiated Communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187–209, 2002.

SUGUMARAN, K.R.; PONNUSAMI, V. Review on production, downstream processing and characterization of microbial pullulan. **Carbohydrate Polymers**, v. 173, p. 573–591. 2017.

SWEETMAN, A. K.; MIDDELBURG, J. J.; BERLE, A. M.; BERNARDINO, A. F.; SCHANDER, C.; DEMOPOULOS, A. W.J.; SMITH, C. R. Impacts of exotic mangrove forests and mangrove deforestation on carbon remineralization and ecosystem functioning in marine sediments. **Biogeosciences**, v. 7, p. 2129–2145, 2010.

SWENSON, J. M.; FACKLAM, R. R.; THORNSBERRY, C. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 4, p. 543–549, 1990.

TAKETANI, R. G.; YOSHIURA, C. A.; DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D.; TSAI, S. M. Diversity and identification of methanogenic archaea and sulphate-reducing bacteria in sediments from a pristine tropical mangrove. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, n. 4, p. 401–411, 2010.

TAKETANI, R. G.; YOSHIURA, C. A.; DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D.; TSAI, S. M. Diversity and identification of methanogenic archaea and sulphate-reducing bacteria in sediments from a pristine tropical mangrove. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 97, n. 4, p. 401–411, 2010.

THATOI, H.; BEHERA, B. C.; MISHRA, R. R. Ecological role and biotechnological potential of mangrove fungi: a review. **Mycology**, v. 4, p. 54–71, 2013.

TOLEDO-ARANA, A et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 10, p. 38–45. 2001.

TUON, F. F.; COSTA, S. F. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 25, n. 3, p. 135–40, 30. 2008.

TURECK, C. R. et al. Avaliação do crescimento em *Crassostrea gigas* (molusca, bivalve) cultivadas na Baía da Babitonga, litoral norte do Estado de Santa Catarina. **Saúde e Meio Ambiente**, v. 5, p. 1–15, 2004.

TYTGAT, H. L.P. et al. Bowel Biofilms: Tipping Points between a Healthy and Compromised Gut? **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 17–25. 2019.

UNEP -WCMC. **In the front line: shoreline protection and other ecosystem services from mangroves and coral reefs**. Cambridge: UNEP -WCMC, 2006.

VANNUCCI, M. What is so special about mangroves? **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, n. 4, p. 599–603, 2001.

VAY, C. et al. Antimicrobial susceptibility of non-enterococcal intrinsic glycopeptide-resistant Gram-positive organisms. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, n. 2, p. 183–188. 2007.

VILAR, C. C.; SPACH, H. L.; SOUZA-CONCEIÇÃO, J. M. Fish assemblage in shallow areas of baía da babitonga, Southern Brazil: Structure, spatial and temporal patterns. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 6, n. 4, p. 303–319, 2011.

VLAMAKIS, H. et al. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 157–168. 2013.

WANG, Longfei et al. Responses of biofilm microorganisms from moving bed biofilm reactor to antibiotics exposure: Protective role of extracellular polymeric substances. **Bioresource Technology**, v. 254, p. 268–277. 2018.

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

WEERASEKERA, M. M.; WIJESINGHE, G. K.; JAYARATHNA, T. A.; GUNASEKARA, C. P.; FERNANDO, N.; KOTTEGODA, N.; SAMARANAYAKE, L. P. Culture media profoundly affect *Candida albicans* and *Candida tropicalis* growth, adhesion and biofilm development. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 111, n. 11, p. 697-702, 2016.

WINN, W.C.; ALLEN, S.D.; JAND, W. The gram positive cocci. **Koneman's Color Atlas Textb. Diagnostic Microbiol.** 6. ed. Baltimore: LWW, 2006. p. 706.

WU, C. et al. Quantitative analysis of amyloid-integrated biofilms formed by uropathogenic *Escherichia coli* at the air-liquid interface. **Biophysical Journal**, v. 103, n. 3, p. 464–471, 2012.

XAVIER, J. B. et al. Biomatemática -Modelação da estrutura de Biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, v. 76, p. 2–13, 2003.

XU, Jing. Bioactive natural products derived from mangrove-associated microbes. **RSC Advances**, v. 5, n. 2, p. 841–892, 2015.

XU, W. Z.; CHEUNG, S. G.; SHIN, P. K. S. Structure and taxonomic composition of free-living nematode and macrofaunal assemblages in a eutrophic subtropical harbour, Hong Kong. **Marine Pollution Bulletin**, v. 85, n. 2, p. 1–10, 2014.

YAMAMOTO, K. et al. Determinative Factors of Competitive Advantage between Aerobic Bacteria for Niches at the Air-Liquid Interface. **Microbes and Environments**, v. 25, n. 4, p. 317–320, 2010.

YEH, Ying-Chieh; WANG, Hung-Yen; LAN, Chung-Yu. Candida albicans Aro1 affects cell wall integrity, biofilm formation and virulence. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 51, n. 2, p. 159–286. 2018.

ZARA, S. et al. Model for Air-Liquid Interfacial Biofilm Formation by. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 2934–2939, 2005.

ZARNOWSKI, R. et al. Novel Entries in a Fungal Biofilm Matrix Encyclopedia. **mBio**, v. 5, n. 4, 5 ago. 2014.

ZHANG, J. et al. Dynamic profile of the microbiota during coconut water pre-fermentation for nata de coco production. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 87–93. 2017.

ZOTTOLA, E. A. Reflections on Salmonella and Other “Wee Beasties” in Foods. **Food technology**, v. 55, n. 9, p. 60–67, 2001.

APÊNDICE A: Características das colônias de micro-organismos isoladas em meio CMGA.

Origem	Código	Tamanho	Forma	Borda	Estrutura	Cor	Aspecto
PORTO	CMG1	Média	Irregular	Lobada	Lisa	Levemente Branca	Viscosa
	CMG2	Pequena	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Úmida
	CMG3	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Levemente Branca	Úmida
	CMG4	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Levemente Branco	Leitosa
	CMG5	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Viscosa
	CMG6	Média	Irregular	Lisa	Lisa	Branco	Leitosa
	CMG7	Grande	Irregular	Lobada	Lisa	Sem Cor	Mucosa
	CMG8	Pequena	Puntiforme	Lisa	Lisa	Sem Cor	Úmida
	CMG9	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Leitosa
PRAIA DO LIXO	CMG10	Pequena	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Úmida
	CMG11	Média	Irregular	Lobada	Lisa	Branca	Viscosa
	CMG12	Pequena	Redonda	Lisa	Lisa	Sem Cor	Úmida
	CMG13	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Sem Cor	Viscosa
	CMG14	Média	Irregular	Lobada	Lisa	Sem Cor	Viscosa
	CMG15	Grande	Irregular	Lisa	Lisa	Branca	Opaca
	CMG16	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Leitosa
	CMG17	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Sem Cor	Viscosa
	CMG18	Grande	Irregular	Lobada	Lisa	Sem Cor	Mucosa
	CMG19	Média	Redonda	Ondulado	Rugosa	Branca	Opaca
	CMG20	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Viscosa
	CMG21	Média	Irregular	Lobada	Lisa	Levemente Branca	Viscosa
	CMG22	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Leitosa
	CMG23	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Úmida
	CMG24	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Viscosa
IPEROBA	CMG25	Média	Irregular	Lobada	Lisa	Branca	Achatada
	CMG26	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Viscosa
	CMG27	Pequena	Redonda	Lisa	Lisa	Sem Cor	Úmida
	CMG28	Pequena	Puntiforme	Lisa	Lisa	Branca	Úmida
	CMG29	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Levemente Branca	Opaca
	CMG30	Média	Irregular	Lisa	Lisa	Branca	Viscosa
	CMG31	Média	Irregular	Lisa	Lisa	Sem Cor	Opaca
	CMG32	Grande	Irregular	Lobada	Lisa	Sem Cor	Mucosa
	CMG33	Grande	Irregular	Lisa	Lisa	Sem Cor	Viscosa
	CMG34	Média	Irregular	Lisa	Lisa	Sem Cor	Viscosa
	CMG35	Média	Irregular	Ondulada	Lisa	Branca	Opaca
	CMG36	Pequena	Puntiforme	Lisa	Lisa	Sem Cor	Úmida
	CMG37	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Leitosa
	CMG38	Grande	Irregular	Lisa	Lisa	Branca	Viscosa
	CMG39	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Levemente Branca	Viscosa
	CMG40	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Sem Cor	Mucosa
	CMG41	Pequena	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Opaca
	CMG42	Média	Irregular	Ondulada	Lisa	Branca	Opaca
	CMG43	Pequena	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Úmida
	CMG44	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Sem Cor	Mucosa
	CMG45	Pequena	Puntiforme	Lisa	Lisa	Sem Cor	Úmida

APÊNDICE B: Características das colônias de micro-organismos isoladas em meio AN

Origem	Código	Tamanho	Forma	Borda	Estrutura	Cor	Aspecto
PORTO	AN1	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Leitosa
	AN2	Grande	Irregular	Lobada	Lisa	Branca	Opaca
	AN3	Pequena	Puntiforme	Lisa	Lisa	Sem Cor	Úmida
	AN4	Média	Irregular	Lisa	Lisa	Amarela	Leitosa
	AN5	Grande	Irregular	Ondulada	Lisa	Branca	Viscosa
	AN6	Média	Irregular	Lisa	Lisa	Branca	Opaca
	AN7	Pequena	Puntiforme	Lisa	Lisa	Amarela	Úmida
	AN8	Grande	Irregular	Ondulada	Lisa	Branca	Leitosa
	AN9	Média	Irregular	Lisa	Lisa	Branca	Leitosa
	AN10	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Mucosa
	AN11	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Amarela	Viscosa
	AN12	Pequena	Puntiforme	Lisa	Lisa	Branca	Úmida
	AN13	Média	Irregular	Ondulada	Rugosa	Branca	Opaca
PRAIA DO LIXO	AN14	Grande	Irregular	Lobada	Lisa	Sem Cor	Leitosa
	AN15	Pequena	Puntiforme	Lisa	Lisa	Branca	Úmida
	AN16	Pequena	Puntiforme	Lisa	Lisa	Amarela	Úmida
	AN17	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Viscosa
	AN18	Pequena	Puntiforme	Lisa	Lisa	Sem Cor	Úmida
	AN19	Média	Irregular	Ondulada	Lisa	Amarela	Opaca
	AN20	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Viscosa
	AN21	Grande	Irregular	Lobada	Lisa	Branca	Viscosa
	AN22	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Leitosa
	AN23	Média	Irregular	Ondulada	Lisa	Branca	Úmida
IPEROBA	AN24	Média	Irregular	Lisa	Lisa	Branca	Viscosa
	AN25	Pequena	Puntiforme	Lisa	Lisa	Branca	Úmida
	AN26	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Opaca
	AN27	Pequena	Puntiforme	Lisa	Lisa	Amarela	Úmida
	AN28	Média	Irregular	Lobada	Lisa	Branca	Opaca
	AN29	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Leitosa
	AN30	Média	Irregular	Lobada	Rugosa	Branca	Opaca
	AN31	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Leitosa
	AN32	Grande	Irregular	Lobada	Lisa	Sem Cor	Opaca
	AN33	Grande	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Viscosa

APÊNDICE C: Características das colônias de micro-organismos isoladas em meio ANS

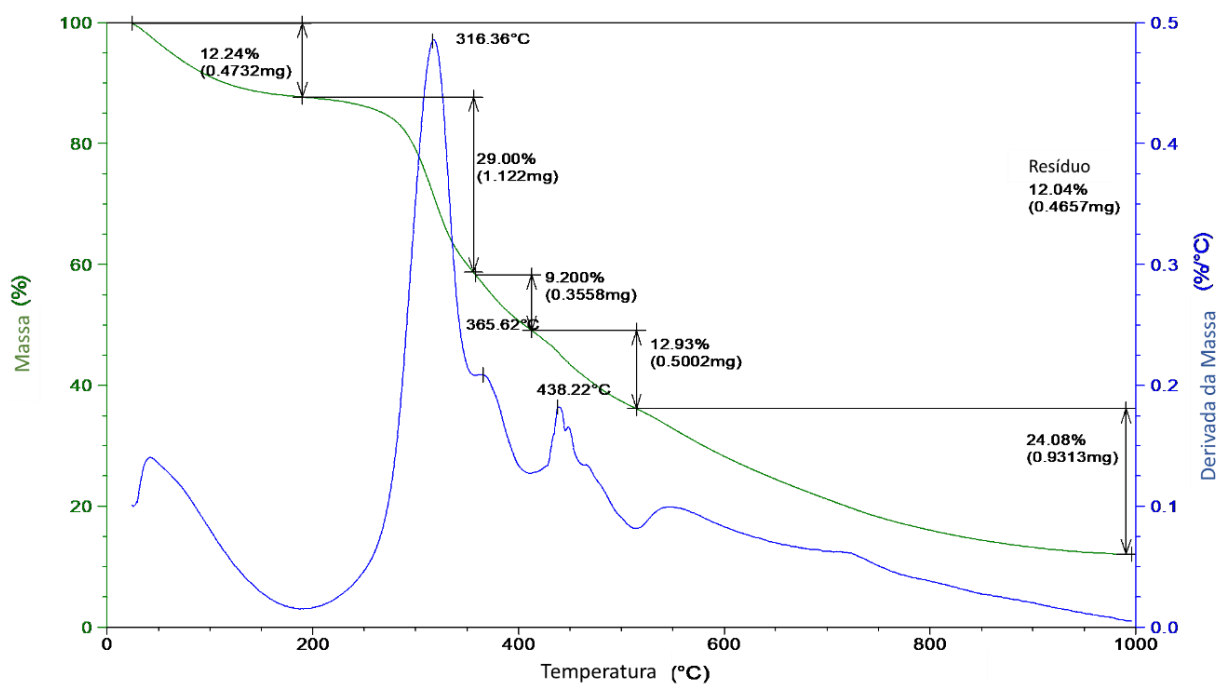
Origem	Código	Tamanho	Forma	Borda	Estrutura	Cor	Aspecto
PORTO	ANS1	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Sem Cor	Mucosa
	ANS2	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Opaca
	ANS3	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Viscosa
	ANS4	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Amarela	Viscosa
	ANS5	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Viscosa
	ANS6	Pequena	Redonda	Lisa	Lisa	Sem Cor	Úmida
	ANS7	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Leitosa
	ANS8	Média	Irregular	Ondulada	Lisa	Branca	Viscosa
	ANS9	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Sem Cor	Leitosa
	ANS10	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Mucosa
PRAIA DO LIXO	ANS11	Grande	Irregular	Ondulada	Lisa	Sem Cor	Leitosa
	ANS12	Pequena	Puntiforme	Lisa	Lisa	Branca	Úmida
	ANS13	Pequena	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Opaca
	ANS14	Grande	Irregular	Ondulada	Lisa	Sem Cor	Opaca
	ANS15	Média	Irregular	Lisa	Lisa	Branca	Úmida
	ANS16	Pequena	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Úmida
	ANS17	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Leitosa
	ANS18	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Sem Cor	Viscosa
	ANS19	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Amarela	Leitosa
	ANS20	Média	Irregular	Lobada	Lisa	Branca	Opaca
IPEROBA	ANS21	Grande	Irregular	Lobada	Lisa	Branca	Viscosa
	ANS22	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Branca	Úmida
	ANS23	Média	Redonda	Lisa	Lisa	Amarela	Úmida
	ANS24	Média	Irregular	Lobada	Lisa	Branca	Viscosa
	ANS25	Pequena	Puntiforme	Lisa	Lisa	Branca	Úmida
	ANS26	Pequena	Redonda	Lisa	Lisa	Amarela	Úmida

APÊNDICE D: Características observadas na formação de biofilmes pelos micro-organismos nos meios CMG, CM e o teste de reprodutibilidade em meio CM.

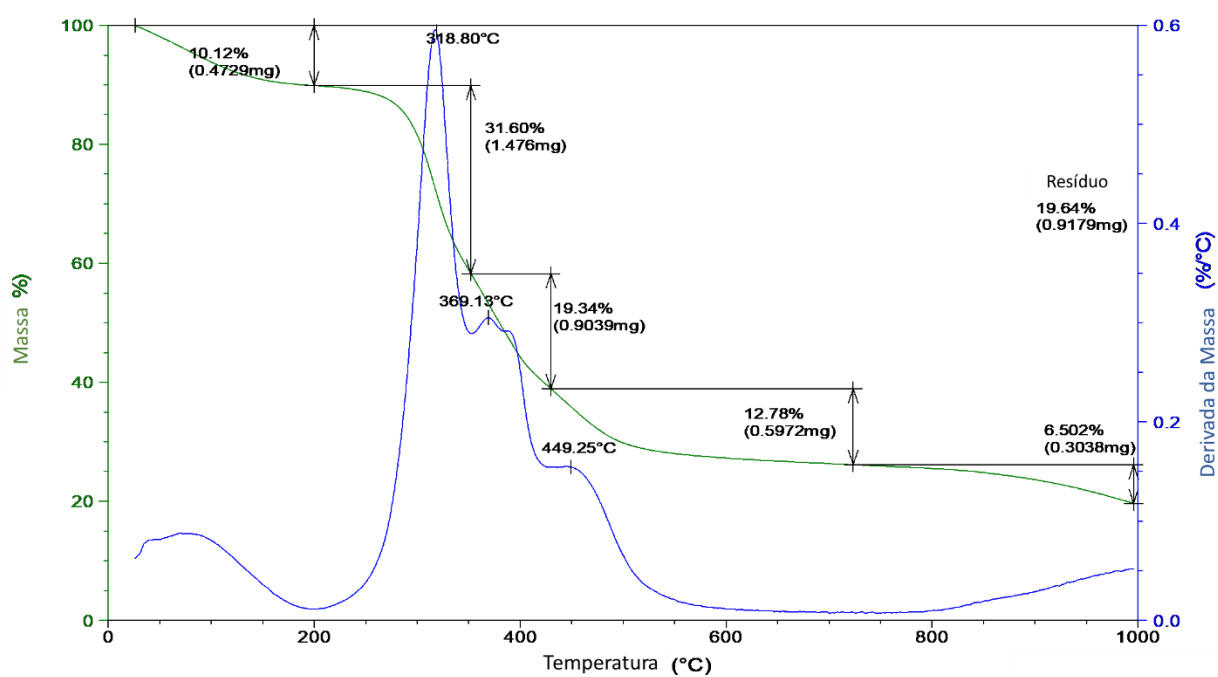
COLÔNIA	MEIO CM (Caldo Marinho)				MEIO CM (replicado)				MEIO CMG (Caldo Marinho mais Glicose)				
	Código	Cor do Meio	Cor da película	Apresentação	Consistência	Cor do meio	Cor da película	Apresentação	Consistência	Cor do meio	Cor da película	Apresentação	Consistência
PORTO	CMG1	Normal	Branco	Liso	Fragil	Normal	Branco	Liso	Fragil	Normal	Sem cor	Liso	Fragil
	CMG2	Normal	X	X	X	Normal	X	X	X	Normal	Branco	Liso	Consistente
	CMG3	Normal	X	X	X	Normal	X	X	X	Normal	Branco	Liso	Fragil
	CMG4	Normal	X	X	X	Normal	Branco	Liso	Fragil	Normal	Branco	Liso	Consistente
	CMG5	Normal	X	X	X	Normal	Branco	Liso	Fragil	Normal	Branco	Liso	Consistente
	CMG6	Normal	X	X	X	Normal	X	X	X	Normal	Branco	Liso	Consistente
	CMG7	Normal	X	X	X	Normal	Branco	Liso	Fragil	Normal	Branco	Liso	Fragmentado
	CMG8	Normal	X	X	X	Normal	Branco	Liso	Fragil	Normal	Branco	Liso	Consistente
	CMG9	Normal	X	X	X	Normal	Branco	Liso	Fragil	Normal	Branco	Liso	Consistente
	CMG10	Normal	Branco	Particulado	Fragmentado	Normal	Branco	Particulado	Fragmentado	Normal	Branco	Liso	Fragmentado
	CMG11	Esuro	Cinza	Liso	Fragil	Normal	Branco	Liso	Fragil	Normal	Branco	Liso	Fragil
	CMG13	Esuro	X	X	X	Normal	Amarelo	Liso	Fragil	Normal	Branco	Liso	Fragil
	CMG14	Normal	X	X	X	Normal	Amarelo	Liso	Esposso	Normal	Branco	Liso	Fragmentado
	CMG15	Esuro	Cinza	Liso	Fragil	Normal	Branco com partículas pretas	Particulado	Fragmentado	Normal	Branco	Liso	Fragil
PRAIA DO LIXO	CMG16	Esuro	Branco com partículas pretas	Rugosa	Consistente	Normal	Branco	Liso	Fragil	Normal	Branco	Liso	Fragil
	CMG17	Normal	X	X	X	Normal	X	X	X	Normal	Branco	Liso	Fragil
	CMG18	Esuro	Branco com partículas pretas	Particulado	Esposso	Normal	Branco com partículas pretas	Particulado	Esposso	Normal	Branco	Rugosa	Fragmentado
	CMG19	Normal	Branco com partículas pretas	Liso	Consistente	Normal	Branco com partículas pretas	Liso	Consistente	Normal	Branco	Liso	Fragil
	CMG21	Normal	Cinza	Liso	Fragil	Normal	Sem cor com partículas pretas	Particulado	Fragil	Normal	Branco	Liso	Fragmentado
	CMG22	Esuro	Preto	Liso	Consistente	Normal	Sem Cor	Liso	Fragmentado	Normal	Branco	Rugosa	Esposso
	CMG23	Normal	X	X	X	Normal	Sem cor	Liso	Normal	Normal	Branco	Liso	Fragil
	CMG24	Esuro	Preto	Liso	Consistente	Normal	Amarelo	Liso	Esposso	Normal	Branco	Liso	Fragil
	CMG25	Esuro	Preto	Particulado	Consistente	Normal	Amarelo	Particulado	Fragmentado	Normal	Branco	Rugosa	Esposso
	CMG26	Normal	X	X	X	Normal	Branco	Liso	Fragmentado	Normal	Branco	Liso	Fragil
	CMG27	Normal	Branco	Liso	Fragil	Normal	Branco	Particulado	Fragil	Normal	Branco	Liso	Fragil
	CMG28	Esuro	Branco com partículas pretas	Particulado	Esposso	Normal	Sem cor	Liso	Fragil	Normal	Branco	Liso	Fragil
	CMG29	Normal	X	X	X	Normal	Sem cor	Liso	Consistente	Normal	Branco	Liso	Fragil
	CMG30	Esuro	Branco com partículas pretas	Liso	Fragil	Esuro	Preto	Particulado	Esposso	Normal	Branco	Rugosa	Esposso
P.ERÓBA	CMG31	Normal	X	X	X	Esuro	Preto	Particulado	Consistente	Normal	Branco	Rugosa	Esposso
	CMG32	Normal	Branco	Liso	Fragil	Normal	Branco	Liso	Fragil	Normal	Branco	Rugosa	Fragmentado
	CMG33	Normal	Branco	Liso	Fragil	Normal	Branco	Liso	Fragil	Normal	Branco	Rugosa	Fragmentado
	CMG34	Normal	X	X	X	Normal	X	X	X	Normal	Branco	Rugosa	Esposso
	CMG35	Esuro	Branco	Liso	Fragil	Normal	Branco	Liso	Fragil	Normal	Branco	Liso	Fragil
	CMG36	Esuro	Sem cor	Liso	Fragil	Normal	Branco	Liso	Fragmentado	Normal	Branco	Rugosa	Fragil
	CMG37	Esuro	Branco	Liso	Fragil	Normal	Branco com partículas pretas	Particulado	Consistente	Normal	Branco	Rugosa	Fragmentado
	CMG38	Esuro	Preto	Particulado	Consistente	Normal	Branco com partículas pretas	Particulado	Consistente	Normal	Branco	Rugosa	Esposso
	CMG39	Normal	X	X	X	Normal	Sem cor	Liso	Fragmentado	Normal	Branco	Liso	Fragil
	CMG40	Normal	Sem cor	Liso	Fragil	Normal	Sem cor	Liso	Fragil	Normal	Branco	Liso	Fragil
	CMG41	Esuro	Branco com partículas pretas	Liso	Fragmentado	Normal	Branco com partículas pretas	Liso	Fragil	Normal	Branco	Liso	Fragil
	CMG43	Normal	Sem cor	Liso	Fragil	Normal	Sem cor	Liso	Fragil	Normal	Branco	Liso	Fragmentado
	CMG44	Normal	X	X	X	Normal	Branco	Particulado	Consistente	Normal	Branco	Rugosa	Fragmentado
	CMG45	Normal	Sem cor	Liso	Fragil	Normal	Branco com partículas pretas	Particulado	Consistente	Normal	Branco	Rugosa	Fragil

APÊNDICE E: Curvas de A curvas individuais das amostras de biofilme (CMG2, CMG4, CMG5, CMG6, CMG8 e CMG9),

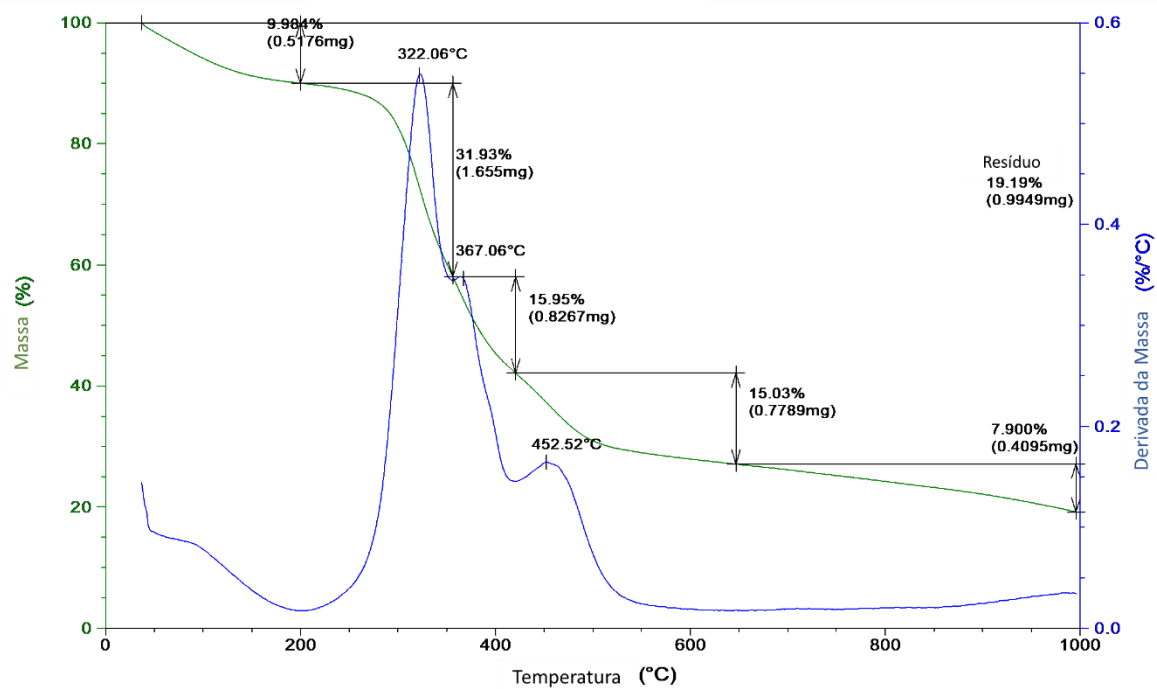
CMG2



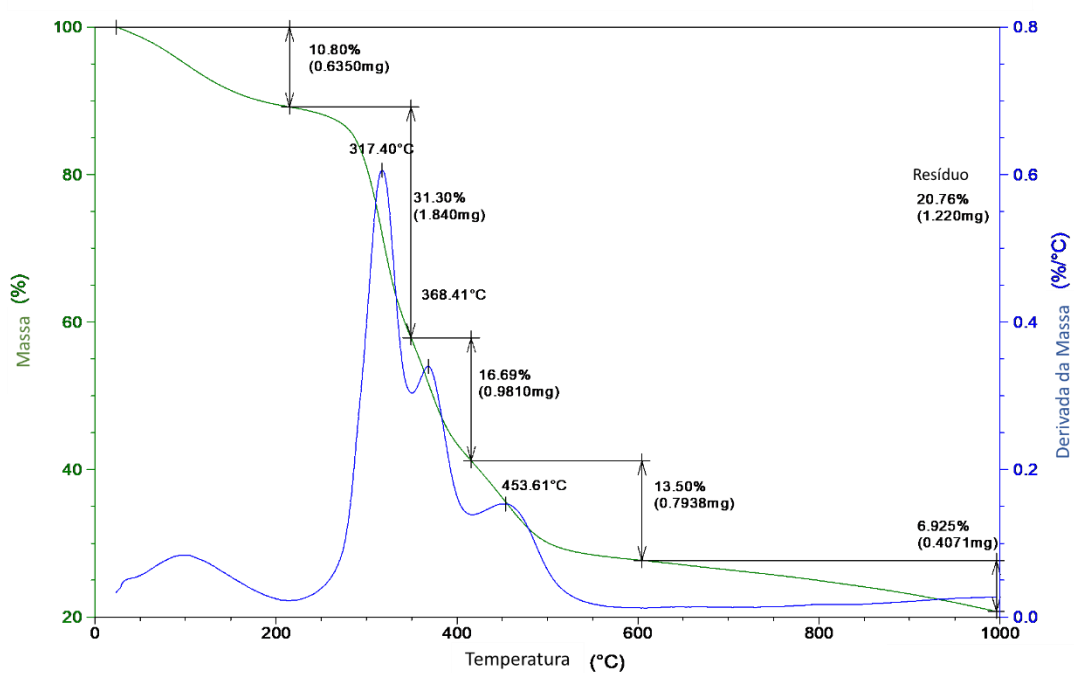
CMG4



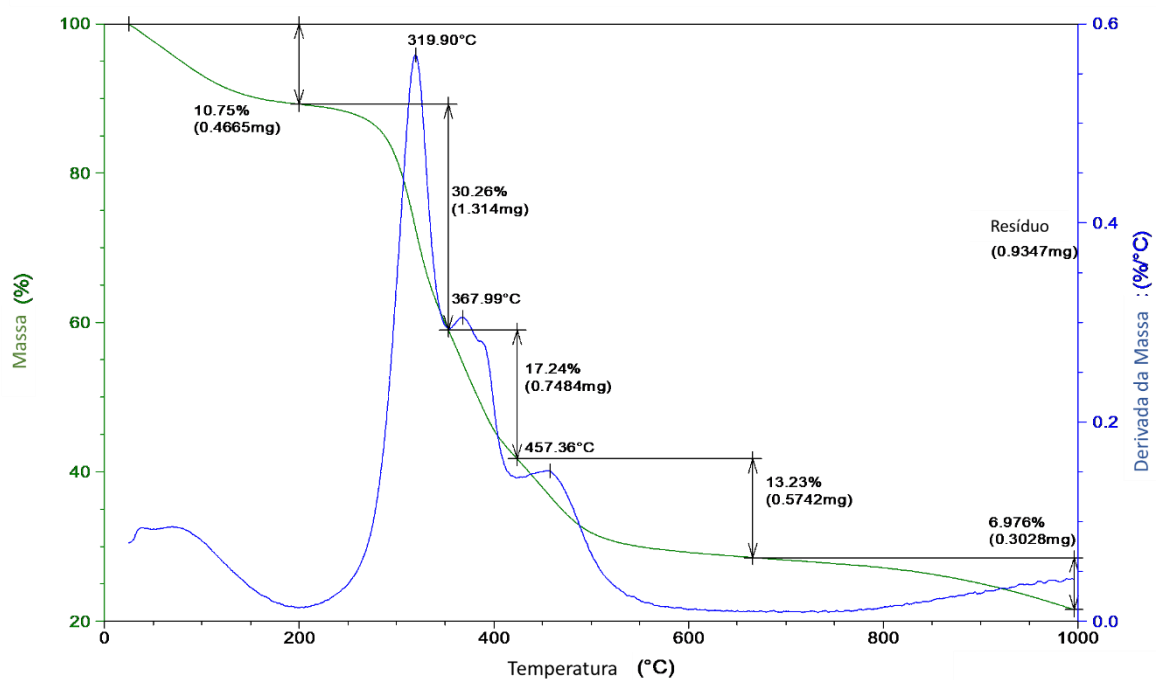
CMG5



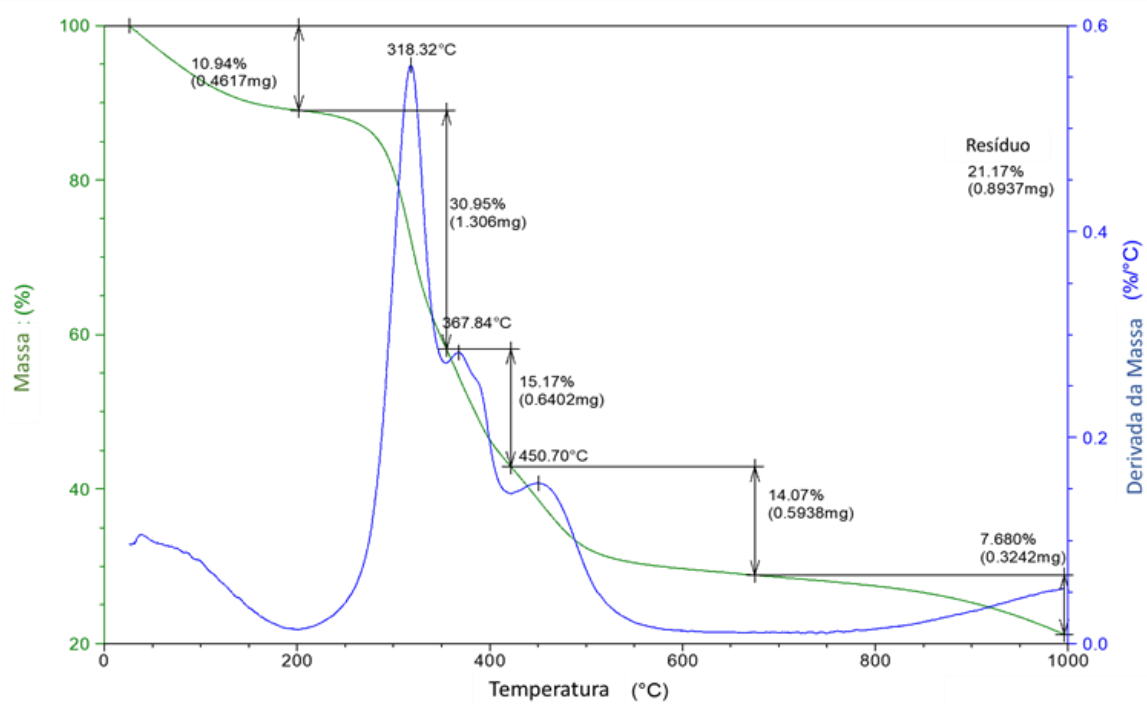
CMG6



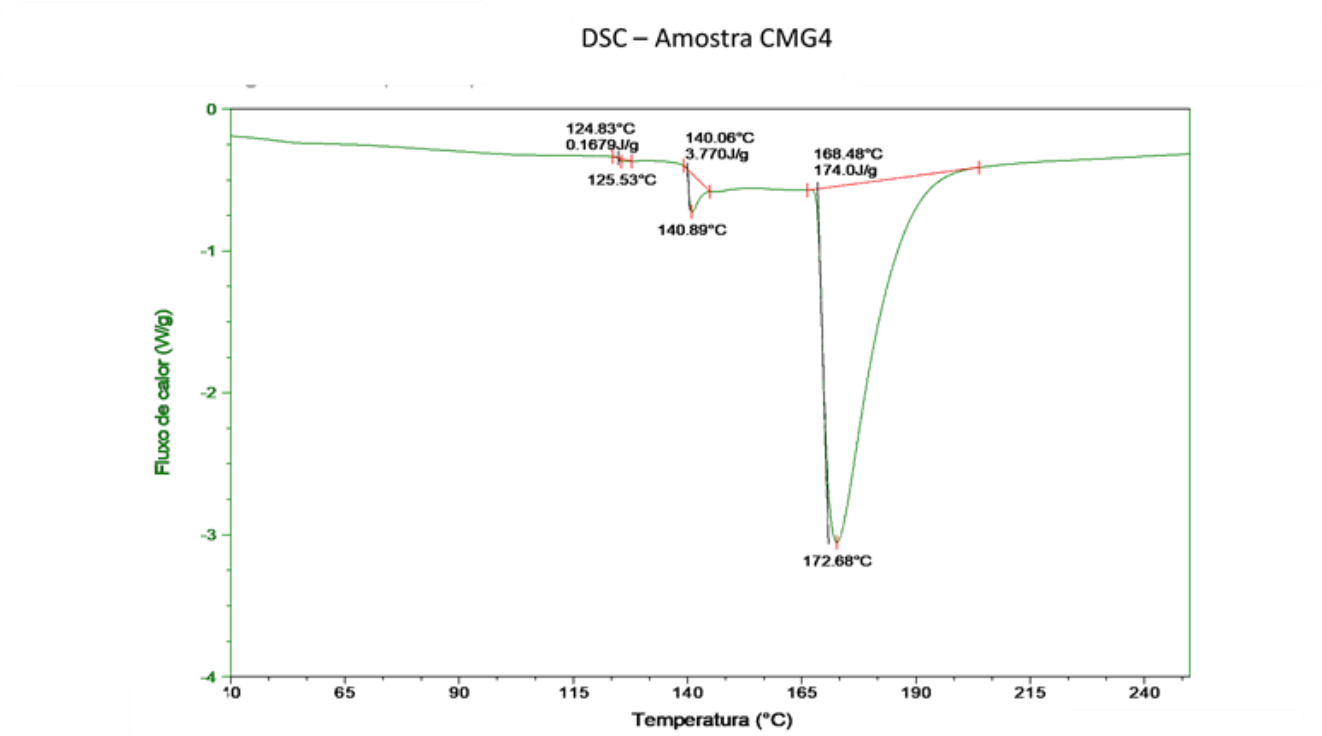
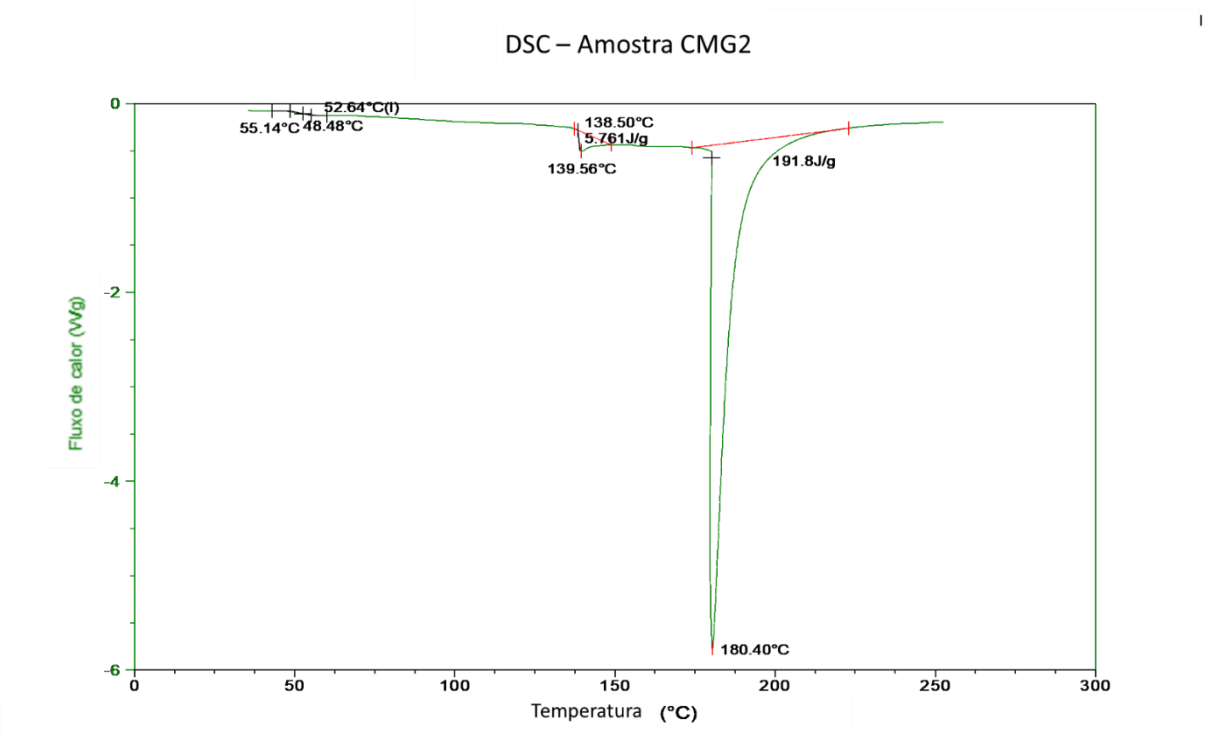
CMG8



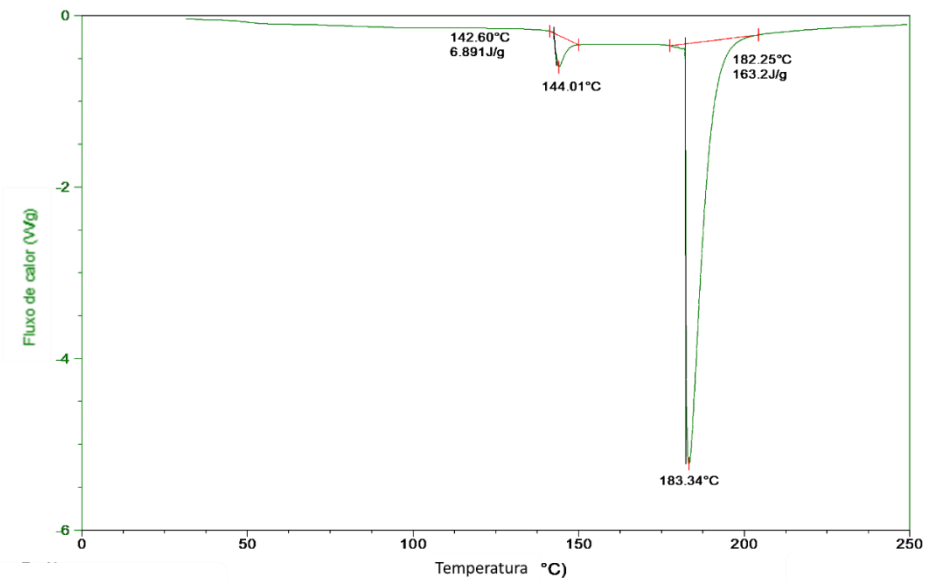
CMG9



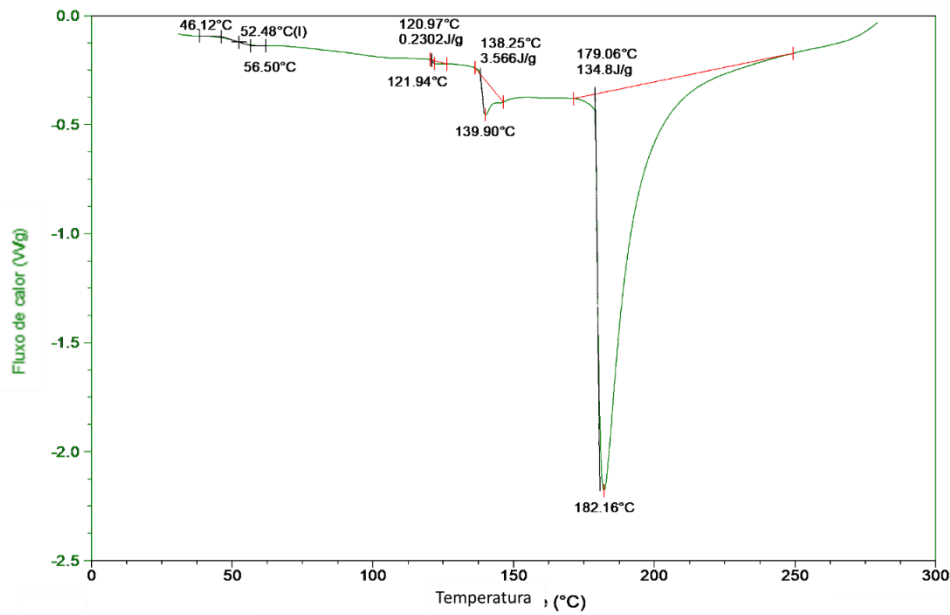
APÊNDICE F: Curvas de DSC individuais relativas a cada uma das amostras de biofilme



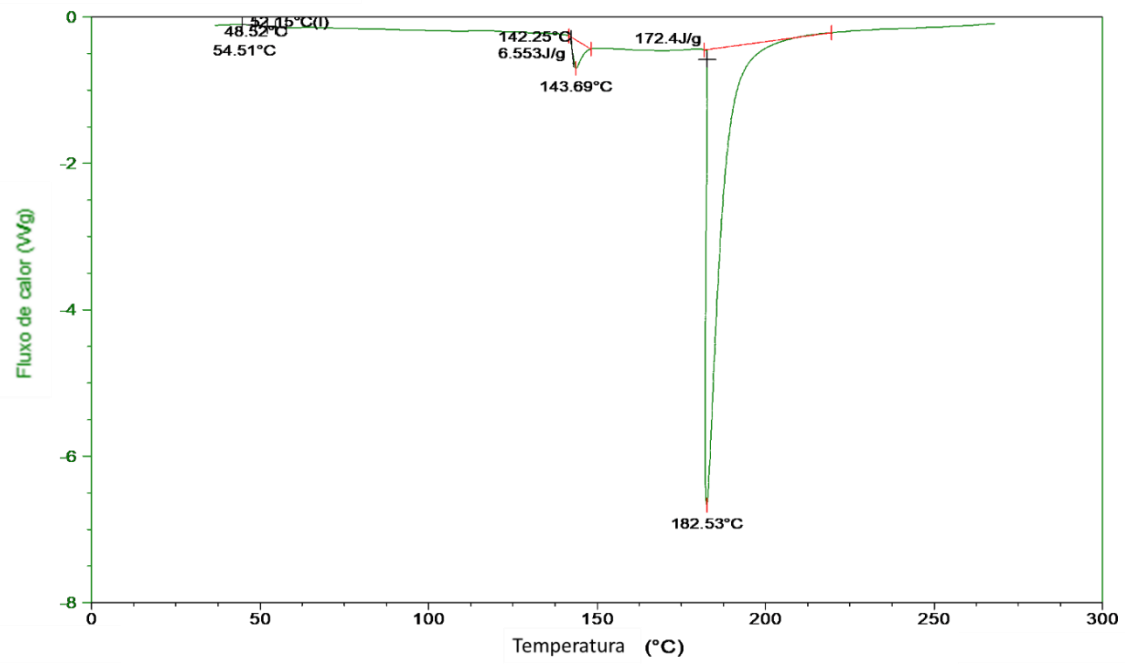
DSC – Amostra CMG5



DSC – Amostra CMG6



DSC – Amostra CMG8



AUTORIZAÇÃO

Nome do autor: Michele Morais Ouriques

RG: 5606055a

Título da Dissertação: CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES PRODUZIDOS POR MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAL DA BAÍA BABITONGA

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da dissertação de minha autoria.

Joinville, 12 de março de 2020.

michele morais Ouriques
Assinatura do aluno^a