

UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

TÂMILLY LANNAY RIBEIRO DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO IMPRESSO EM 3D PARA
ESTUDO DO BIOFILME DE *STAPHYLOCOCCUS SPP.***

Barreiras – BA

2023

TÂMILLY LANNAY RIBEIRO DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO IMPRESSO EM 3D PARA
ESTUDO DO BIOFILME DE *STAPHYLOCOCCUS SPP.***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal
do Oeste da Bahia, como requisito
parcial para obtenção do Diploma de
Graduação no Curso de Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dra Mary Hellen Fabres Klein

Barreiras – BA

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

S719 Souza, Tâmilly Lannay Ribeiro de.

Desenvolvimento de dispositivo impresso em 3D para estudo do biofilme de *Staphylococcus spp.* / Tâmilly Lannay Ribeiro de Souza. – 2023.

47.

Orientador: Profª Dra. Mary Hellen Fabres Klein.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) –. Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. Barreiras, BA, 2023.

1. *Staphylococcus spp.* 2. Patogenicidade. 3. Biofilme. 4. Impressão 3D. I. Klein, Mary Hellen Fabres. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia - Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. III. Título.

CDD 579.353

Biblioteca Universitária de Barreiras - UFOB

TÂMILLY LANNAY RIBEIRO DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO IMPRESSO EM 3D PARA
ESTUDO DO BIOFILME DE *STAPHYLOCOCCUS SPP.***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal do
Oeste da Bahia, como requisito parcial para
obtenção do Diploma de Graduação no
Curso de Farmácia.

Aprovado em 08 de dezembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente
 **MARY HELLEN FABRES KLEIN**
Data: 20/12/2023 12:22:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Mary Hellen Fabres Klein
(Orientadora)

Documento assinado digitalmente
 **GIOVANA DAMASCENO SOUSA**
Data: 19/12/2023 17:09:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Giovana Damasceno Sousa
(Membro)

Documento assinado digitalmente
 **KLEYMILSON DO NASCIMENTO SOUZA**
Data: 19/12/2023 23:00:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Kleymilson do Nascimento Souza
(Membro)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero expressar minha imensa gratidão a Deus, pois sem a Sua orientação e força, não teria sido possível concluir esta jornada acadêmica.

Ao meu amado pai João José (*in memoriam*) e à minha mãe Laudicelia, dedico palavras de agradecimento que mal expressam o quanto sou grata. Mãe, sua dedicação, amor incondicional e apoio constante foram meu pilar durante todos esses anos.

A minha querida prima Juremá Ariana, obrigado por estar ao meu lado, apoiando-me em cada passo desta jornada, sou verdadeiramente abençoada por tê-la.

Ao meu querido namorado Pedro Daniel, sua paciência, incentivo e compreensão foram essenciais para meu sucesso.

A minha orientadora, Prof. Dra. Mary Hellen Fabres Klein gostaria de expressar minha imensa gratidão por sua dedicação excepcional ao longo do processo de conclusão do meu trabalho de curso. Suas orientações sábias, paciência e o tempo generosamente dedicado foram fundamentais para o sucesso desta jornada acadêmica.

Aos meus amigos, verdadeiros companheiros de todas as horas, agradeço por compartilharem risadas, lágrimas e momentos inesquecíveis. A amizade de vocês tornou esta jornada mais leve e significativa.

A Universidade Federal do Oeste da Bahia por possibilitar um ensino de qualidade e a minha formação.

Aos professores Giovana Damasceno Sousa e Kleymilson do Nascimento Souza por aceitarem o convite para compor a banca examinadora da minha monografia.

Por fim, a mim mesma expresso um agradecimento sincero. Em meio às desavenças e desafios, encontrei força interior para seguir em frente, perseverar e alcançar este momento tão almejado.

RESUMO

O biofilme é definido como uma matriz de substâncias polimérica extracelular que encobre uma comunidade bacteriana aderida a uma superfície biótica ou abiótica, e desempenha um papel importante na persistência de infecções recalcitrantes. Bactérias produtoras de biofilme são preocupantes para a saúde mundial, como exemplo, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, que são os principais patógenos isolados em infecções hospitalares, e geralmente são necessários tratamentos difíceis e caros. A prevenção e tratamento de biofilmes têm sido alvo de pesquisas nas últimas décadas, entretanto os dispositivos atuais para esse estudo não mimetizam de maneira adequada a exposição do biofilme ao medicamento, *in vivo* o biofilme pode se formar em regiões mais protegidas, como dentro de glândulas ou ossos, dificultando a difusão e acesso dos medicamentos utilizados para o tratamento. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo desenvolver um dispositivo impresso em 3D para auxiliar no estudo do biofilme que se forma em regiões mais protegidas. O dispositivo foi desenhado digitalmente de forma a se encaixar no poço de uma placa onde foi feito o crescimento bacteriano. Para impressão tridimensional foi selecionada a tipologia de preenchimento gyroid com densidades de 20% (Gyr 20), 40% (Gyr 40) e 60% (Gyr 60). Foi observado que o biofilme estafilocócico se forma de maneira adequada nos dispositivos, apresentando uma maior produção de biofilme na densidade de 60%. Ainda se observou que há uma redução do biofilme de *S. aureus* ATCC 29213 aderido ao poço conforme o aumento da densidade de preenchimento do dispositivo utilizado. Dessa forma, pode-se concluir que o dispositivo 3D desenvolvido é útil para o estudo do biofilme formado por espécies estafilocócicas. Com isso, novos estudos podem ser conduzidos avaliar o efeito de novos tipos e densidades de preenchimento dos protótipos e tipos de filamento sobre a quantidade de biofilme formado, além da sua utilização para seleção de compostos com atividade antibiofilme para estudo do biofilme.

Palavras-chave: Estafilococos; Patogenicidade; Biofilme; Impressão 3D.

ABSTRACT

Biofilm is defined as a matrix of extracellular polymeric substance that covers a bacterial community adhered to a biotic or abiotic surface, and plays an important role in the persistence of recalcitrant infections. Biofilm-producing bacteria are of concern to global health, such as *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, which are the main pathogens isolated in hospital infections, and difficult and expensive treatments are generally required. The prevention and treatment of biofilms have been the subject of research in recent decades, however current devices for this study do not adequately mimic the exposure of biofilm to medication, in vivo the biofilm can form in more protected regions, such as within glands or bones, making it difficult to disseminate and access the medicines used for treatment. Therefore, this work aimed to develop a 3D printed device to assist in the study of biofilm that forms in more protected regions. The device was digitally designed to fit into the well of a plate where bacterial growth took place. For three-dimensional printing, the gyroid filling typology was selected with densities of 20% (Gyr 20), 40% (Gyr 40) and 60% (Gyr 60). It was observed that staphylococcal biofilm forms adequately on the devices, showing greater biofilm production at a density of 60%. It was also observed that there is a reduction in the biofilm of *S. aureus* ATCC 29213 adhered to the well as the density of the device used increases. Therefore, we can conclude that the 3D device developed is useful for studying the biofilm formed by staphylococcal species. Therefore, new studies can be conducted to evaluate the effect of new types and filling densities of prototypes and filament types on the amount of biofilm formed, in addition to their use for selecting compounds with antibiofilm activity for studying biofilm.

keywords: Staphylococci; Pathogenicity; Biofilm; 3D printing.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Agr	Gene regulador acessório
3D	três dimensões
SUS	Sistema Único de Saúde
UFOB	Universidade Federal do Oeste da Bahia
CoNS	Estafilococos coagulase-negativos
CoPS	Estafilococos coagulase-positivos
PBS	Tampão salina fosfato
PIA	Polissacarídeo de adesão intercelular
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
TSB	Caldo soja tripticaseína
μ	Velocidade de crescimento bacteriano
PSM	Modulinas solúveis em fenol
Fn	Fibronectina
Fg	Fibrinogênio
Vn	Vitronectina
DNAe	DNA extracelular
EPS	Produção de exopolissacarídeos
Gry	Gyroid (formação geométrica de preenchimento)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho original dos dispositivos utilizando o software Tinkercad.

Figura 2 - Impressora Ender 7 durante o processo de impressão 3D dos dispositivos.

Figura 3 - Dispositivos 3D impressos nas densidades de 20%, 40% e 60% de preenchimento Gyroid.

Figura 4 - Dispositivos 3D acoplados a placa de 96 poços

Figura 5 - Dispositivos com densidade estrutural de 20%, 40%, e 60% da tipologia Gyroid, observados antes (A) e após (B) o processo de esterilização por calor úmido.

Figura 6 - Dispositivos visualizados no microscópio com densidade estrutural de 20%, 40%, e 60% da tipologia Gyroid, observados antes (A, B, C) e após (D, E, F) o processo de esterilização por calor úmido.

Figura 7 - Dispositivos impressos 3D (A), (B), (C) sem a formação de biofilme. Dispositivos (D), (E) e (F) após a formação e coloração do biofilme por *Staphylococcus epidermidis*.

Figura 8 - Dispositivos (A), (B), (C) sem a formação de biofilme. Dispositivos (D), (E) e (F) após a formação e coloração do biofilme por *Staphylococcus aureus*.

Figura 9 - Formação de biofilme nos dispositivos observados microscópicamente na lateral. Dispositivos na densidade 20% (A), 40% (B) e 60% (C) sem a formação de biofilme. Dispositivos na densidade 20% (D), 40% (E) e 60% (F) após a formação e coloração do biofilme formado por *Staphylococcus aureus*. Dispositivos na densidade 20% (G), 40% (H) e 60% (I) após a formação e coloração do biofilme formado por *Staphylococcus epidermidis*.

Figura 10 - Biofilme formado por *Staphylococcus epidermidis* nos poços da placa e nos dispositivos.

Figura 11 - Biofilme formado por *Staphylococcus aureus* nos poços da placa e nos dispositivos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1 Gênero <i>Staphylococcus</i>	12
2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.1.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	15
2.2 Biofilme estafilocócico e infecções relacionadas	16
2.3 Impressão 3D	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Materiais	21
4.2 Métodos	22
4.2.1 Microrganismos e condições de cultivo	22
4.2.2 Preparo do dispositivo	22
4.2.4 Análises estatísticas	24
5 RESULTADOS	24
6 DISCUSSÃO	33
7 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

O biofilme é uma matriz polimérica protetora composta por polissacarídeos, proteínas e DNA recombinante que recobre uma comunidade bacteriana aderida a uma superfície biótica ou abiótica (Lister; Horswill, 2014). Este fator de virulência contribui com a adesão e colonização do tecido hospedeiro, que protege a bactéria do sistema imune e da ação de antibióticos. Bactérias formadoras de biofilme são difíceis de erradicar pois se tornam menos susceptíveis à terapia antimicrobiana convencional, o que favorece o desenvolvimento de infecções crônicas e agudas (Hall; Mah, 2017). Além disso, a formação de biofilme é ainda mais preocupante quando há colonização de implantes médicos, cateteres e biomateriais (Pantanella *et al.*, 2013).

As pesquisas por compostos antibiofilme geralmente são realizadas utilizando placas de poliestireno que possuem uma superfície plana o que não simula de maneira adequada a exposição do biofilme ao composto que está sendo testado. Sabe-se que *in vivo* o biofilme pode se formar em regiões mais protegidas, como dentro de glândulas ou cavidades ósseas, dificultando a difusão e acesso dos medicamentos utilizados para o tratamento, podendo levar a infecções recalcitrantes.

Embora alguns desses estudos se relacionam bem com os dados obtidos de modelos *in vivo* (Ponde *et al.*, 2021), tais dispositivos não são eficientes em mimetizar as condições *in vivo*, como a complexidade do ambiente que envolve tecido hospedeiro e difusão de nutrientes (Andes *et al.*, 2004). Para isso, é mais adequado o desenvolvimento de um dispositivo que forme canais internos onde o biofilme possa se desenvolver e assim favorecer os estudos da dinâmica da difusão de compostos e para a seleção eficiente de drogas antibiofilme.

Dentro dessa premissa, a tecnologia de impressão tridimensional surge como uma opção no desenvolvimento desses dispositivos para estudo do biofilme e busca de drogas antibiofilme. Isso porque a impressora 3D opera com uma variedade de tamanho entre as camadas permitindo a formação de poros e criando uma rugosidade superficial que pode fornecer um ambiente ideal para a propagação, fixação inicial de bactérias e formação dos biofilmes, permitindo uma melhor simulação da difusão de nutrientes e compostos bioativos no interior

do biofilme (Hall *et al.*, 2021). Dessa forma, este trabalho visou desenvolver um dispositivo impresso em 3D para avaliar a sua aplicação na formação do biofilme por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Gênero *Staphylococcus*

As bactérias pertencentes ao gênero dos *Staphylococcus* são classificadas em cocos Gram-positivos com cerca de 0,5 a 1,0 μm de diâmetro, pertencem a classe Bacilli, ordem Bacillales e família *Staphylococcaceae*, anaeróbios facultativos, não formam esporos, imóveis, catalase positiva e se organizam em diversas formas, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, e em agregados parecidos com cachos de uvas (Lisowska-Lysiak *et al.*, 2018). Essas bactérias são halotolerantes, e possuem temperatura ótima para crescimento de 37°C, porém suportam temperaturas entre 6,5°C até 46°C (Onyango *et al.*, 2012).

Os estafilococos fazem parte da microbiota de humanos e animais, podendo colonizar pele, membranas mucosas, cavidades nasais, trato gastrointestinal e urinário (Otto, 2018). As espécies de *Staphylococcus* possuem a capacidade de causar infecções como dermatite, abscessos, furunculose, furúnculos, foliculite, impetigo ou mastite, e também causam outras doenças mais graves, como doença estafilocócica oriunda de alimentos, síndrome do choque tóxico, e síndrome da pele escaldada estafilocócica (Lisowska-Lysiak *et al.*; 2021).

Atualmente o gênero *Staphylococcus* é composto por 47 espécies e 27 subespécies (Becker *et al.*, 2014). De maneira geral, os estafilococos são divididos em dois grupos com base na produção da enzima coagulase, são os estafilococos coagulase-positivos (CoPS) e estafilococos coagulase-negativos (CoNS). Os estafilococos coagulase-positivos são representados por microorganismos patogênicos como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus pseudintermedius* (Heilmann *et al.*, 2019). O principal representante desse grupo é *Staphylococcus aureus* que possui maior relevância médica e está associado a infecções hospitalares simples agudas e crônicas (Otto, 2018).

Os estafilococos coagulase-negativos compreendem espécies como: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus lugdunensis* e *Staphylococcus Schleiferi* (Heilmann *et al.*, 2019). O

Staphylococcus epidermidis é o principal representante do CoNS, que desempenha um papel duplo, como parte da microbiota humana, mas também como um potencial patógeno oportunista em determinadas situações (Brown; Horswill, 2020).

O gênero *Staphylococcus* apresenta uma gama de fatores de virulência, que incluem uma infinidade de toxinas, fatores de evasão imune e uma alta quantidade de fatores protéicos e não proteicos que permitem a invasão e colonização do hospedeiro durante a infecção (Kwiecinski *et al.*, 2020). Os estafilococos coagulase-negativos são considerados oportunistas e menos patogênicos por apresentarem uma gama menor de fatores de virulência (Becker *et al.*, 2014). Mas, apesar disso, esses microrganismos são capazes de formar biofilmes, produzir bacteriocinas e enterotoxinas que favorecem para sua virulência (Cheung *et al.*, 2021).

Os mecanismos de virulência de *Staphylococcus* são controlados de maneira direta ou indiretamente por uma ampla rede de sistemas regulatórios. Dentre esses, destaca-se o sistema regulador de genes acessórios (Agr) *quorum sensing* (QS), que tem como princípio a produção de moléculas sinalizadoras, possibilitando a comunicação entre as bactérias, e posteriormente utilizam o biofilme como um depósito para novas infecções em partes do corpo (Yarwood; Schilcher, 2003).

2.1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva em formato de cocos, agrupada em cachos que produz o pigmento carotenóide estafiloxantina que dá a coloração amarelada que caracteriza esta espécie. Este patógeno coloniza cerca de 30% da população e possui grande relevância clínica devido a sua grande capacidade de causar infecções (Howden, 2023). *S. aureus* é o agente causador de muitas doenças em humanos e animais, e a gravidade varia desde infecções mais simples até infecções graves que podem levar à morte do hospedeiro (Piewngam, Otto, 2020).

Em condições favoráveis, *S. aureus* produz toxinas, que se consumidas através de alimentos contaminados, originam doenças graves como a síndrome

do choque tóxico, e a síndrome da pele escaldada, (Fischer; Otto; Cheung, 2018). Além disso, há também toxinas secretadas em grandes quantidades que podem danificar a membrana biológica tecidual, e causar infecções categorizadas em dois grupos principais: as infecções da pele e dos tecidos moles (SSTIs), que se apresentam como dermatite, abscessos, furunculose, furúnculos e foliculite; e as doenças estafilocócicas transmitidas por alimentos, que representam condições mais graves, como a síndrome do choque tóxico e a síndrome da pele escaldada estafilocócica (Otto 2014).

As infecções por *S. aureus* são de natureza complexa devido à expressão de fatores de virulência e pela frequente resistência a antibióticos, sendo a *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) a mais importante clinicamente (Mottola *et al.*, 2016). As infecções causadas por MRSA levam a um aumento na taxa de morte, na incidência de doenças e no tempo de internação hospitalar, em comparação com aquelas provocadas por *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA), devido a capacidade de serem resistentes à maioria dos antibióticos β -lactâmicos, mas também a uma ampla gama de outros antimicrobianos, tornando as infecções difíceis de erradicar e muito caras de tratar (Silva *et al.*, 2021).

Além da resistência a antimicrobianos, as infecções estafilocócicas são agravadas pela gama de fatores de virulência expressas por *S. aureus* (Lister *et al.*, 2014). A síntese de enzimas como adesinas, hemolisinas, toxinas, proteases e a formação de biofilme favorecem a patogenicidade do *S. aureus* e complicam as infecções, dificultando o tratamento (Cheung *et al.*, 2021). O biofilme formado por *S. aureus* está relacionado a diversos tipos de infecção como feridas crônicas, infecções gastrointestinais e genitourinárias e osteomielite, e há também as infecções relacionadas a dispositivos médicos como infecções de implantes ortopédicos, mamários e válvulas cardíacas (Del Pozo, 2018; Oliveira *et al.*, 2018; Arciola *et al.*, 2018).

2.1.2 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis é uma bactéria Gram-positiva, coagulase negativa e apresenta coloração esbranquiçada. *S. epidermidis* faz parte da microbiota normal da pele, sendo a espécie estafilocócica mais frequentemente isolada do epitélio humano (Otto, 2009). Em seu nicho natural, *S. epidermidis* possui importância significativa para a homeostase corporal, entretanto, em condições específicas, pode se tornar virulento, e causar uma série de infecções, principalmente em pessoas com fatores predisponentes e sendo a espécie mais frequentemente relacionada a infecções hospitalares associadas a implantes médicos (Nguyen; Park; Otto, 2017).

Um aumento da quantidade de *S. epidermidis* na pele pode causar doenças de pele como dermatites, caspa e rosácea. As infecções mais graves se iniciam pelo rompimento da barreira cutânea através da inserção de cateteres, por exemplo, que abre caminho para a entrada da bactéria na corrente sanguínea (Severn; Horswill, 2023). *S. epidermidis* é o agente causador de mais de 20% dos casos de sepse em pacientes internados na UTI nos Estados Unidos (Otto, 2018). Além disso, esse patógeno é muito eficiente em colonizar os dispositivos implantados e formar biofilme, levando ao desenvolvimento de infecções em próteses ortopédicas, enxertos vasculares, válvulas cardíacas dentre outros (Severn; Horswill, 2023; Otto, 2009).

Embora *S. epidermidis* possua uma quantidade menor de fatores de virulência se comparada com *S. aureus*, estes fatores exercem a função dupla de infecção e comensalismo (Severn; Horswill, 2023). Os principais fatores de virulência de *S. epidermidis* são o biofilme e toxinas (Otto, 2009). Toxinas como a cisteína protease EcpA atuam na degradação de proteínas que mantêm a barreira epitelial, abrindo caminho para a entrada da bactéria no tecido hospedeiro. Normalmente, esse tipo de fator de virulência está relacionado com o excesso de *S. epidermidis* na pele como por exemplo nas dermatites (Cau *et al.*, 2021). Já o biofilme está relacionado com a colonização do tecido hospedeiro e com o recobrimento de superfícies abióticas como as dos implantes médicos (Severn; Horswill, 2023; Otto, 2009). A presença do biofilme maduro leva ao desenvolvimento de infecções crônicas, podendo resultar em amputação de

membros, devido a ineficiência dos tratamentos medicamentosos (Nguyen; Park; Otto, 2017).

2.2. Biofilme estafilocócico e infecções relacionadas

O biofilme é definido como uma comunidade de microrganismos em volta de uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, que podem se aderir a um meio vivo ou não vivo (Roy *et al.*, 2018). Sabe-se que o biofilme é composto por mistura complexa e altamente polar de biomoléculas, incluindo proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídeos, sendo considerado o principal fator de virulência que contribui para a patogenicidade do microrganismo (Vestby *et al.*, 2020).

O desenvolvimento do biofilme estafilocócico se divide em 3 etapas, são elas: fixação inicial, maturação e dispersão do biofilme. Primeiramente a fixação se inicia da interação das proteínas da matriz humana, como fibronectina (Fn), fibrinogênio (Fg), vitronectina (Vn), etc; com as adesinas bacterianas que irão promover a adesão à superfície biótica ou abiótica (Otto, 2018). Os MSCRAMMs (componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva) representam a família mais crucial de proteínas de ligação estafilocócicas expressas na superfície (Andrade *et al.*, 2023). Após a adesão bacteriana, haverá a formação de microcolônias, DNA extracelular (eDNA) e produção de exopolissacarídeos (EPS), essa etapa é mediada pela produção de polissacarídeo de adesão intercelular (PIA) (Nguyen; Nguyen; Otto, 2020). O biofilme maduro possui estrutura similar a torres que são intercaladas por pequenos canais, que transportam nutrientes, água e resíduos necessários a camadas mais espessas. (Paharik; Horswill, 2016). A última etapa envolve a dispersão do biofilme por meio da produção e liberação de proteases e nucleases, que degradam a matriz do biofilme. Essa ação interrompe as interações covalentes, possibilitando a infecção e infecção em novos tecidos (Jamal *et al.*, 2018).

Acredita-se que o biofilme esteja relacionado com aproximadamente 65% de todas as infecções causadas por bactérias (Jamal *et al.*, 2018). As doenças decorrentes da formação de biofilme podem ser divididas em doenças relacionadas a dispositivos médicos e doenças não relacionadas a dispositivos

médicos. Doenças sem relação com o implante de dispositivos médicos como, por exemplo, infecção das vias aéreas, cáries, periodontites, otites, infecções urinárias, ocorrem quando o patógeno coloniza e forma o biofilme sobre o tecido hospedeiro. Já nas doenças relacionadas a dispositivos médicos, há a inserção de um material abiótico no paciente, como marca-passo, cateteres e próteses. Essa superfície abiótica é colonizada e há a formação biofilme levando a infecção (Del Pozo, 2018)

Staphylococcus aureus e *Staphylococcus epidermidis* são os principais microrganismos encontrados em ocorrências decorrentes de dispositivos médicos, como próteses articulares ou dispositivos cardiovasculares, bem como em outras infecções, como endocardite e meningite. As infecções articulares periprotéticas (IAP) representam a principal complicação em artroplastias de joelho e quadril, afetando de 1% a 3% dos pacientes implantados (Buttner; Mack; Rohde, 2015). As infecções hospitalares relacionada a dispositivos médicos pode ter três possíveis motivos: contaminação microbiana, sistema imune comprometido próximo ao local do dispositivo, sistema imune sistêmico deficiente devido a comorbidades; quando os motivos em potencial estão presentes, a contaminação microbiana é o fator com maior contribuição, isso pode ser explicado pela preferência das bactérias em formar biofilme em estruturas rígidas como dispositivos médicos ou ossos (Stewart, Bjornholt, 2020). A osteomielite é uma doença óssea que pode ser causada por bactérias ou fungos, sendo a bacteriana a mais recorrente. Essa infecção pode ocorrer de duas maneiras: por contaminação externa ou através da corrente sanguínea. A infecção na forma exógena geralmente está associada a dispositivos de fixação interna. Já na forma hematogênica, os microrganismos são transportados pelo sangue e se alojam nos ossos (Zimmerli; Sendi, 2017)

A ruptura da pele e a inserção de dispositivos médicos proporciona oportunidade para que esse microrganismo acesse o tecido hospedeiro, causando diversas lesões nos tecidos anatômicos (Gordon; Lowy, 2008). Quando há a inserção de um dispositivo médico, este será revestido por plasma e por proteínas da matriz extracelular, estabelecendo uma condição favorável para a formação do biofilme no protótipo implantado (Agarwal; Singh; Jain, 2010). Esse ambiente favorável à colonização bacteriana, pode resultar em infecções persistentes e de difícil tratamento, resultando em dor, irritação

localizada e, em casos mais graves, falha do implante, e por vezes a única solução é a remoção e substituição do dispositivo contaminado (Schilcher; Horswill, 2020). Um dos possíveis agravos decorrentes de infecções bacterianas, é uma infecção generalizada ocasionada pela entrada de fragmentos soltos do biofilme na corrente sanguínea (Kleinschmidt *et al.*, 2015). As bactérias responsáveis por causar sepse no paciente possuem diversos mecanismos de virulência como produção de enzimas antioxidantes, hemolisinas, exo e endotoxinas, exopolímeros, respiração versátil e outros meios para debilitar o sistema imune do paciente e prolongar a permanência da bactéria (Minasyan, 2019).

O caráter crônico da infecção e a dificuldade no tratamento das infecções decorrentes do biofilme se deve ao fato que as células bacterianas imersas no biofilme são mais resistentes a condições de ambientais hostis, como falta de nutriente, e dessecação, além de serem mais resistente ao sistema imunológico do hospedeiro, e aos tratamentos antibacterianos, e por consequência são mais difíceis de tratar (Roy *et al.*, 2018). Segundo Bianchera e colaboradores (2020), um dos motivos que pode explicar a dificuldade do sistema imune do hospedeiro em agir, é que apesar do biofilme ser identificado por células fagocíticas, a substância polimérica extracelular protege as bactérias de sua atividade impossibilitando a detecção de opsoninas na parede celular bacteriana, posteriormente quando as colônias se tornam maiores, o engolfamento pelos fagócitos é dificultado, isso resulta no atraso da resposta imune e em uma fagocitose frustrada, seguido por degranulação e acúmulo local de citocinas pró-inflamatórias que aumentam ainda mais a inflamação e danificam o tecido hospedeiro.

O biofilme estafilocócico é robusto, e dificulta a penetração de antibióticos até as camadas bacterianas mais profundas, ocasionando uma exposição variada dos antimicrobianos ao biofilme (Lisowska-Lysiak *et al.*; 2021). Além da proteção física, o biofilme estafilocócico apresenta uma maior tolerância aos antimicrobianos devido sua menor taxa metabólica. Essa tolerância induzida pelo biofilme, limita a eficácia da antibioterapia, contribuindo para a recalcitração de infecções. Dessa maneira, o tratamento do biofilme exige uma maior dosagem de agentes terapêuticos para alcançar resultados efetivos, que por vezes resultam em resistência aos antimicrobianos (Vestergaard *et al.*, 2019).

2.3 Impressão 3D

A tecnologia de impressão tridimensional (3D) é uma maneira altamente versátil para a produção de objetos, é definida como uma tecnologia que constrói dispositivos com ampla variedade de tamanhos, camada por camada, feito de plásticos, metal ou outros materiais, a partir de dados computacionais específicos de acordo com a necessidade (Chia; Wu, 2015). Existem vários tipos métodos de impressão 3D: impressão por extrusão – FDM (Fused Deposition Modeling); Estereolitografia – SLA; impressão direta por luz - DLP (direct light processing) e Sintetização Seletiva – SLS (Selective Laser) (Dimitrov *et al.*, 2006). (Wadher *et al.*, 2021).

A técnica de fusão e depósito (FDM) é uma das mais utilizadas, nesse tipo de impressão, os objetos tridimensionais são produzidos pela injeção do polímero termoplástico aquecido enquanto um cabeçote se movimenta e injeta o material em sucessivas camadas na mesa da impressora e definem dimensão e detalhes de texturas a partir de modelos digitais feitos utilizando softwares de modelagem (Poomathi *et al.*, 2020; Sandler *et al.* 2014).

Esses softwares são programas que permitem criar e simular projetos, possibilitando a criação de modelos 3D com componentes pré-definidos ou configurações específicas de circuitos. Dentre os softwares como Blender; Autocad; Inventor; Maya; destaca-se o Tinkercad, um programa gratuito de fácil manuseio com recursos básicos, sendo recomendado para iniciantes (Limatainen *et al.*, 2023). Após projetar um objeto em 3D é preciso utilizar um programa de fatiamento, que é responsável por transformar o modelo em um arquivo digital de formato *. gcode (linguagem de programação da impressora), definir os parâmetros de impressão e características da peça como velocidade de impressão, altura das camadas, porcentagem de preenchimento, perímetros, entre outros (Rilling *et al.*, 2005).

Uma impressora 3D típica opera com 200 µm entre as camadas, e todos os polímeros apresentam uma rugosidade superficial durante a impressão fornecendo um ambiente ideal para a propagação fixação inicial de bactérias e formação do biofilme, devido a aspereza presente nas superfícies dos

dispositivos impressos (Hall *et al.*, 2021). Existe uma gama de diferentes polímeros disponíveis no mercado que podem ser utilizados para a fabricação de dispositivos 3D (Zuniga *et al.* 2015). Dentre os polímeros mais populares utilizados para fins clínicos temos o Políácido Lático (PLA), um polímero atóxico feito a partir do amido de milho ou cana-de-açúcar. As formas mais usuais de PLA na prática médica são o poli (DL-ácido lático), PDLLA, que tem propriedade de menor resistência mecânica e uma degradação mais rápida e o poli (L-ácido lático), PLLA, que possui alta resistência mecânica e degradação prolongada. Dentre essas duas opções, o PLLA destaca-se como melhor escolha nas aplicações estruturais, pois tem uma maior resistência e menor deformação à tensão (Simões; Einloft; Pezzin, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um dispositivo impresso 3D em configuração tridimensional que contenha canais internos para o estudo da formação do biofilme.

3.2 Objetivos específicos

- Desenhar um protótipo impresso em 3D para estudo do biofilme;
- Testar as condições de impressão do protótipo na impressora 3D;
- Avaliar a formação do biofilme estafilocócico no protótipo desenvolvido;
- Comparar a biomassa do biofilme formado em placas de poliestireno e no dispositivo 3D.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Esse trabalho foi realizado na Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB). Todos os métodos foram executados no QuitandaLab, laboratório de prática de microbiologia, e no Laboratório de Doenças Infecciosas e Vetores (LAIVE).

- Impressora 3 D;
- Leitor de microplacas;
- Bactéria *Staphylococcus aureus*;
- Bactéria *Staphylococcus epidermidis*;
- Tubo de ensaio;
- Alça bacteriológica;
- Microtubos;
- Becker;
- Pinça;
- Placas de petri;
- Placas de microtitulação de 96 poços;
- Pipeta automática;
- Ponteira;
- Filamento PLA BASIC;
- Bastão de vidro;
- Meio TSB;
- Capela de exaustão;
- Etanol 95%;
- Cristal violeta;
- Água destilada;
- Tampão salina fosfato;
- Estufa de esterilização e secagem;
- Incubadora;
- Computador;

4.2 Métodos

4.2.1 Microrganismos e condições de cultivo

Para a realização deste trabalho foram utilizadas as cepas referências de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e de *Staphylococcus epidermidis* NRS 101. As bactérias foram cultivadas em meio TSA a 37 °C sem agitação. Para os ensaios de formação de biofilme, foi utilizado o meio TSB, e os estoques foram mantidos a -20°C.

4.2.2 Preparo do dispositivo

O modelo do dispositivo tridimensional para estudo do biofilme foi projetado digitalmente utilizando o software gratuito Tinkercad (<https://www.tinkercad.com/>) que serve como base para as demais etapas. Feita a modelagem, o arquivo em formato *.stl é exportado para o programa Creality Slice 4.8 (<https://creality-slicer.en.uptodown.com>) e transformado em *.gcode (linguagem da máquina). Foi testado a impressão de alguns modelos de dispositivos e com densidades de preenchimento diferentes. Entretanto decidiu-se optar pela tipologia Gyroid, pois resistiu ao método de esterilização, o modelo desenvolvido possui diâmetro da base de 7.50 mm e altura 5.50mm, projetado com 0 camada externa, 0 camada de topo, 4 camadas de base, e com o enchimento de densidade variada (20%, 40% e 60%).

A impressão foi realizada no laboratório Quintadalab da UFOB, utilizando a técnica de fusão e depósito (FDM). As configurações da impressora 3D Creality Ender 7 foram mantidas padronizadas e específicas para o PLA, que é o filamento de escolha. A temperatura do bico é de 220°C, a temperatura da mesa é de 60 °C, com 0,2 mm de espessura da camada. Por fim, foram utilizadas 40 peças de densidade de enchimento de 20% (Gyr 20), 40 peças de densidade de enchimento de 40% (Gyr 40) e 40 peças de densidade de enchimento de 60% (Gyr 60).

4.2.3 Esterilização

O método de esterilização utilizado foi o de calor úmido sob pressão (autoclavagem) e foram utilizadas as seguintes condições de uso: temperatura 120° C e pressão de 3 bar durante 15 minutos.

4.2.4 Quantificação do biofilme

A análise da produção do biofilme foi estimada através da leitura da densidade óptica (DO), realizada em microplacas de poliestireno de 96 poços com fundo chato. Os poços foram preenchidos com 100 µL do inóculo bacteriano de ATCC 29213 e NRS 101 padrão 0,5 McFarland em meio TSB, e em seguida, foram adicionados os dispositivos.

Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C por 20 horas sem agitação. Após o tempo de incubação, os dispositivos foram retirados das placas, e o sobrenadante de cada poço foi retirado cuidadosamente com a ajuda de uma pipeta, e então os poços e os dispositivos foram lavados gentilmente duas vezes em tampão salina fosfato (PBS), secos em temperatura ambiente. Ao microtubo contendo o dispositivo foi adicionado 500 µL de cristal violeta 0,1 %, ao passo que os poços foram corados 100 µL de cristal violeta, e foram incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, os poços e os dispositivos foram lavados duas vezes com solução salina 0,9 % e secos a temperatura ambiente. Para a dissolução do biofilme foram adicionados 200 µL de etanol comercial 95%. Após 15 minutos, a leitura da densidade óptica em 560 nm (DO_{560nm}) foi realizada em leitor de microplacas Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific). Os ensaios foram realizados em triplicata biológica.

4.2.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas e os gráficos apresentados foram feitos utilizando o software Graphpad (v6.0 GraphPad Prism). Os dados foram analisados

utilizando-se o teste ANOVA Two-way seguido pelo pós-teste Bonferroni para comparação entre os grupos.

5 RESULTADOS

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um dispositivo 3D para estudo de biofilme bacteriano produzido por *S. aureus* e *S. epidermidis*. Para isso foi utilizado o software Tinkercad para desenhar o modelo de um dispositivo (FIGURA 1) para ser impresso 3D (Figuras 2 e 3) com as dimensões que permitisse ser acoplado ao poço de uma placa de 96 poços de fundo chato (Figura 4).

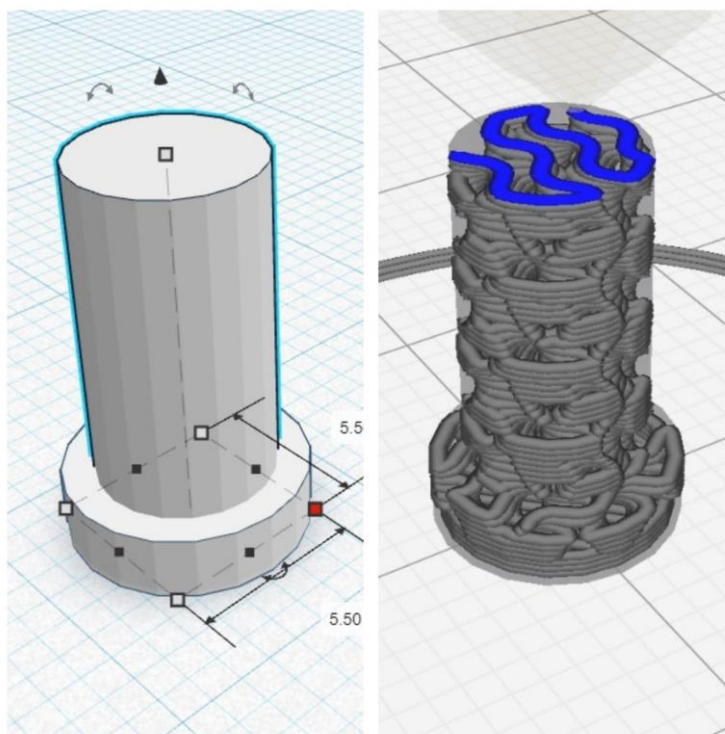


Figura 1- (A) Desenho original do protótipo realizado no software Tinkercad. (B) Estrutura de preenchimento preparada no Creality Slice.

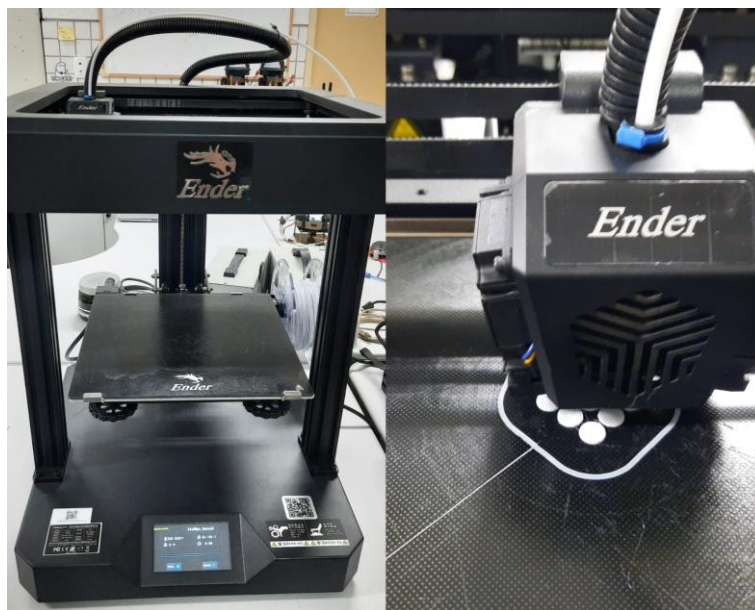


Figura 2 - Impressora Ender 7 durante o processo de impressão 3D dos dispositivos.

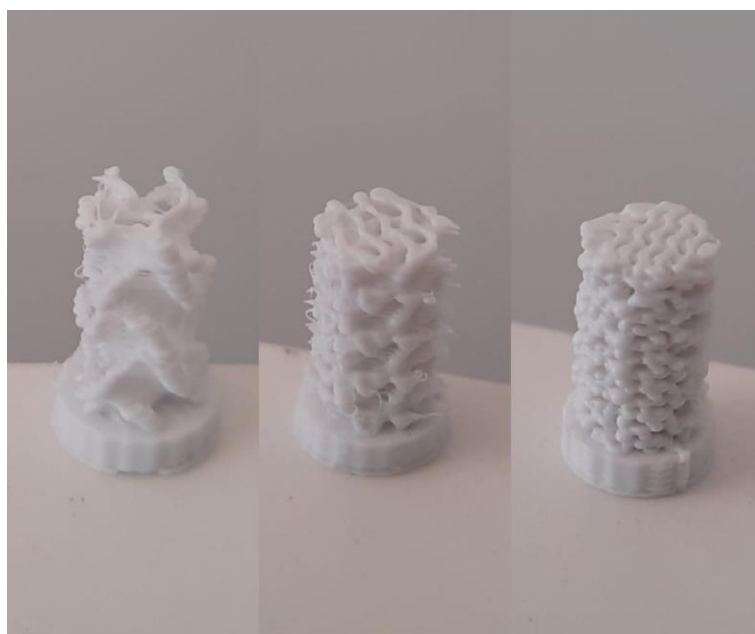


Figura 3 - Dispositivos 3D impressos nas densidades de 20% (Gyr 20), 40% (Gyr 40) e 60% (Gyr 60).



Figura 4 - Dispositivos 3D acoplados a placa de 96 poços.

Para a impressão do dispositivo foi escolhido o filamento de ácido polilático (PLA) que, segundo Ferràs *et al.* (2022), é um dos materiais mais viáveis na construção de biomodelos de dispositivos médicos. Após a impressão, os dispositivos foram esterilizados utilizando o método de calor úmido. Nessa metodologia, os dispositivos foram submetidos a temperaturas que variaram de 120°C a 125°C por um tempo mínimo de 15 minutos. Embora houvesse o risco de fusão ou amolecimento do PLA, não foi observada nenhuma alteração significativa nas estruturas externas e internas das peças (Figura 5). Alguns modelos diferentes do Gyroid foram testados no processo de autoclavagem, mas tornaram-se muito quebradiços após o resfriamento e portanto não foram utilizados nos testes seguintes. O dispositivo fabricado com a densidade estrutural de 20% da tipologia Gyroid, também apresentou uma maior fragilidade quando comparado com as densidades 40% e 60%, mas o manuseio cauteloso possibilitou o uso durante todo o estudo.

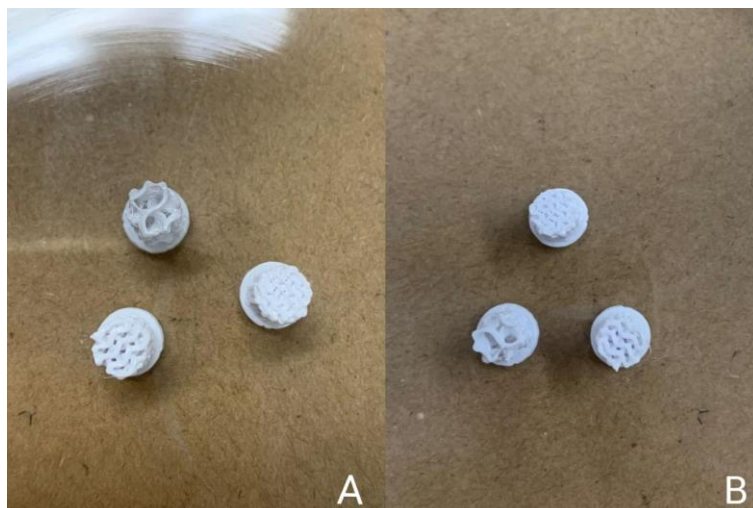


Figura 5 - Dispositivos com densidade estrutural de 20%, 40%, e 60% da tipologia Gyroid, observados antes (A) e após (B) o processo de esterilização por calor úmido.

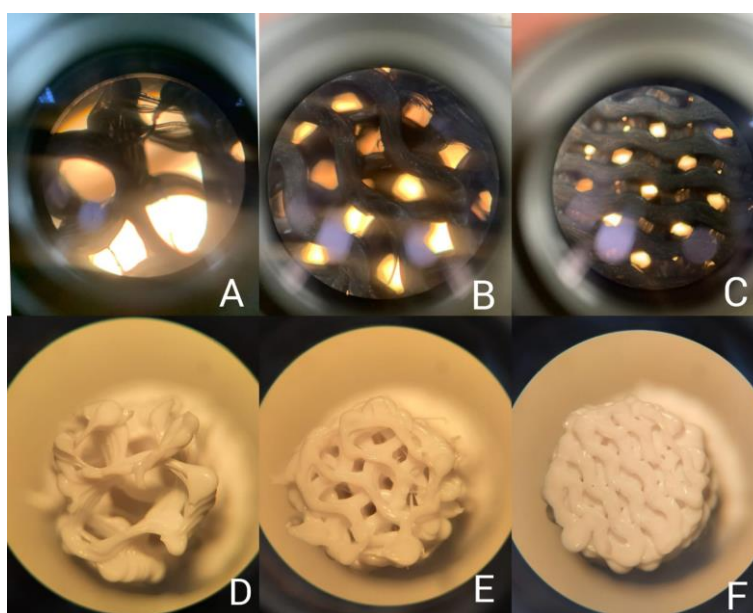


Figura 6- Dispositivos visualizados no microscópio com densidade estrutural de 20%, 40%, e 60% da tipologia Gyroid, observados antes (A, B, C) e após (D, E, F) o processo de esterilização por calor úmido.

Os dispositivos com tipologia Gyroid nas densidades 20, 40 e 60% foram então utilizados para os ensaios biológicos de formação de biofilme pelas espécies *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Neste ensaio, as bactérias foram crescidas nas placas de 96 poços contendo os dispositivos

3D por 20h para permitir a formação do biofilme. O biofilme fixado no fundo dos poços e nos filamentos dos dispositivos foi corado com cristal violeta para visualização e quantificação. Foi possível observar que houve a formação de biofilme nos dispositivos por ambas as espécies (Figura 7, 8 e 9).

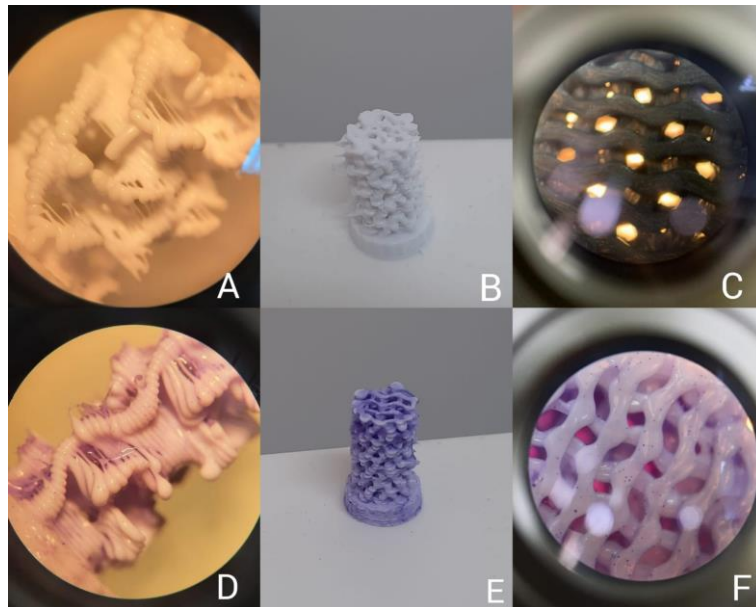


Figura 7: Dispositivos impressos 3D (A), (B), (C) sem a formação de biofilme. Dispositivos (D), (E) e (F) após a formação e coloração do biofilme por *Staphylococcus epidermidis*.

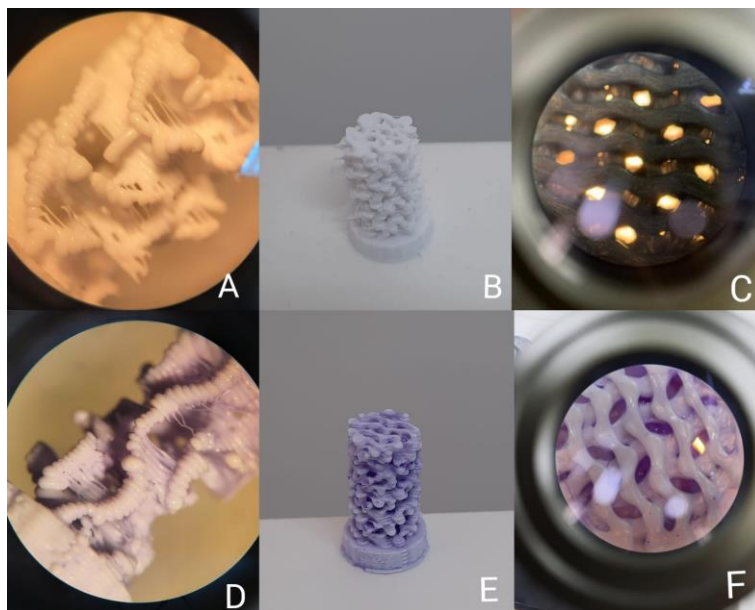


Figura 8: Dispositivos impressos 3D (A), (B), (C) sem a formação de biofilme. Dispositivos (D), (E) e (F) após a formação e coloração do biofilme por *Staphylococcus aureus*.

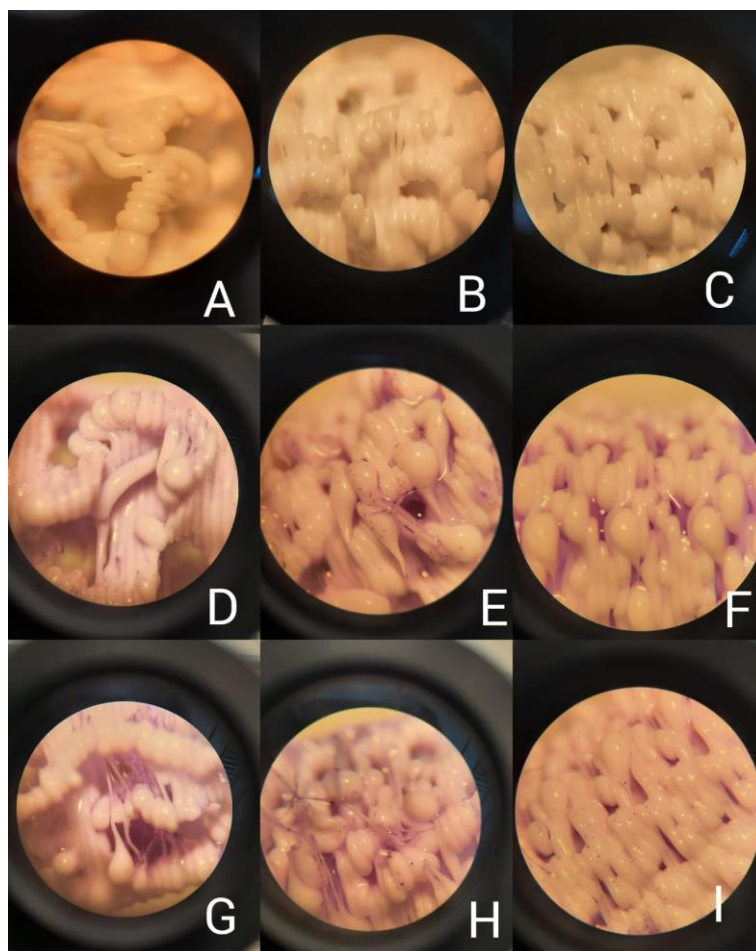


Figura 9: Formação de biofilme nos dispositivos impressos 3D observados microscópicamente na lateral. Dispositivos na densidade Gyroid 20% (A), 40% (B) e 60% (C) sem a formação de biofilme. Dispositivos na densidade Gyroid 20% (D), 40% (E) e 60% (F) após a formação e coloração do biofilme formado por *Staphylococcus aureus*. Dispositivos na densidade Gyroid 20% (G), 40% (H) e 60% (I) após a formação e coloração do biofilme formado por *Staphylococcus epidermidis*.

Para realizar a quantificação da biomassa de biofilme formada em cada uma das condições, foi adicionado etanol comercial para dissolver o cristal violeta impregnado e então realizar a leitura de absorbância em comprimento de onda e 560 nm. Os resultados podem ser observados nas Figuras 9 e 10.

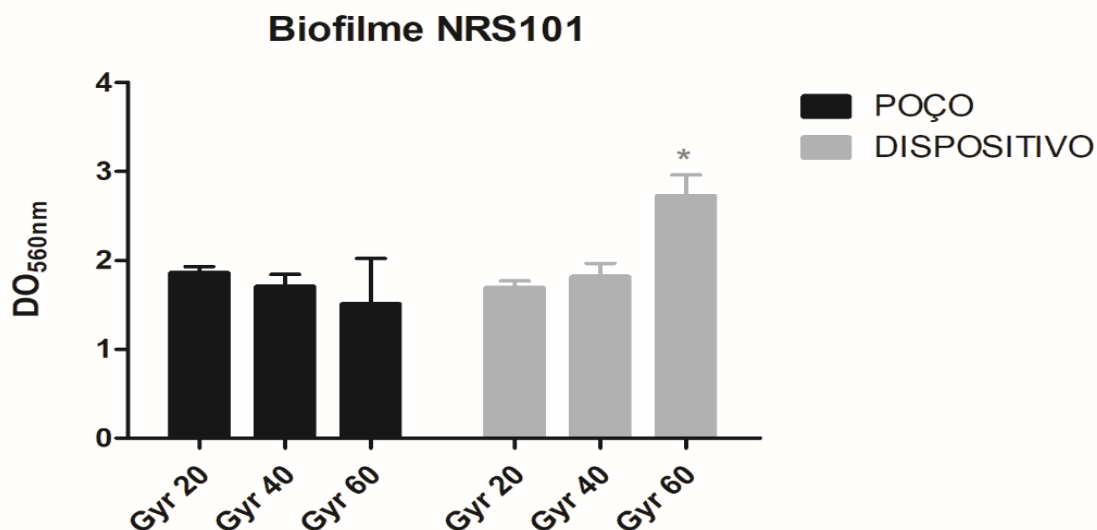


Figura 10 - Biofilme formado por *Staphylococcus epidermidis* nos poços da placa e nos dispositivos.

A figura 5 mostra a formação de biofilme de *S. epidermidis* NRS 101, pode-se observar que houve formação de biofilme tanto no poço quanto no dispositivo e a absorbância DO_{560} variou 1,6 a 1,8, exceto para Gyr 60 que absorveu em torno de 2,7. Não houve diferença na quantidade de biofilme epidermidico formado nos poços e nos dispositivos Gyr 20 e Gyr 40, entretanto, no dispositivo Gyr 60 a formação de biofilme foi estatisticamente maior quando comparado com o poço.

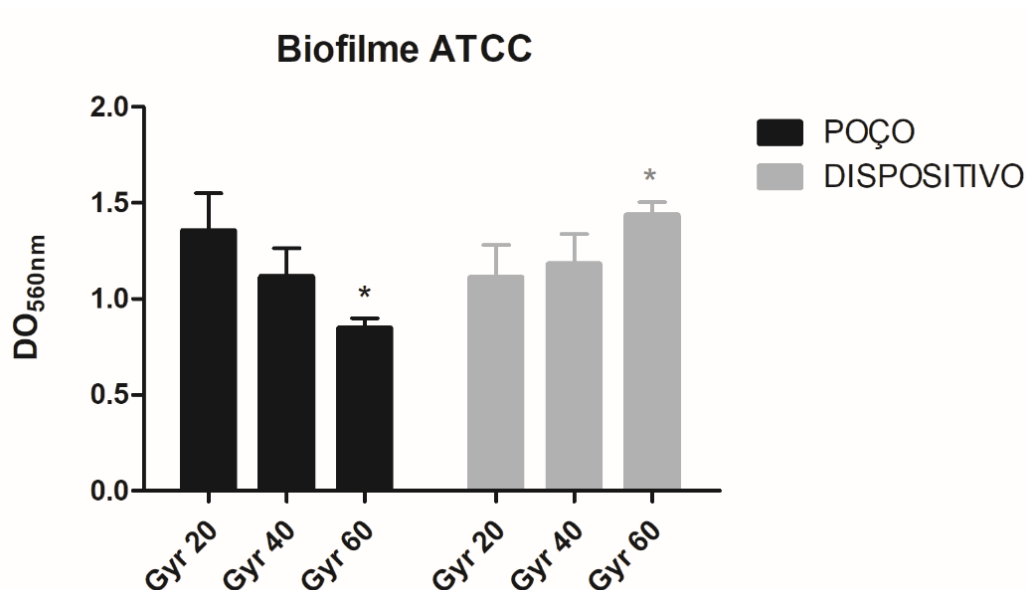


Figura 11 - Biofilme formado por *Staphylococcus aureus* nos poços da placa e nos dispositivos.

Já para a *S. aureus* ATCC 29213 a DO_{560} observada variou entre 1,4 e 0,8 nos poços e de 1,1 a 1,45 para os dispositivos (Figura 1). Esses valores mostram que a NRS 101 tem uma maior capacidade de formação de biofilme, comparada com a ATCC. Além disso, a quantidade de biofilme de *S. aureus* formada no poço foi decrescente conforme a densidade dos dispositivos aumentava. Na figura 11 podemos ver que o poço da placa onde se colocou o dispositivo houve uma redução significativa na produção de biofilme ($DO_{560} = 0,8$), por outro lado o Gyr 60 apresentou a maior quantidade de biofilme ($DO_{560} = 1,45$).

6 DISCUSSÃO

Infecções por biofilme geralmente estão vinculadas a feridas crônicas, dispositivos médicos permanentes, endocardite e podem levar a condições potencialmente fatais como sepse, por isso a presença de biofilme representa uma ameaça significativa à saúde pública, uma vez que essa forma de vida microbiana demonstra resistência tanto aos tratamentos antimicrobianos quanto às defesas naturais do hospedeiro (Otto, 2018; Tolker, 2015). Para se estudar o biofilme *in vitro* existem diversas ferramentas como as placas de microtitulação, dispositivo de Calgary (CBD), ring test, câmara de fluxo, dentre outros (Azeredo *et al.*, 2017).

A placa de microtitulação é o método de alto rendimento mais utilizado mundialmente, isso porque além de realizar inúmeros testes de uma única vez, também é um teste barato. Mas apesar disso, o biofilme não se adere fortemente ao poliestireno, podendo se soltar facilmente, sofre interferência de células que se sedimentam e não é adequado para testes de susceptibilidade a antibióticos e drogas antibiofilme. Para *screening* de compostos contra biofilme ou com ação antimicrobiana se utiliza mais metodologia CBD, que também realiza inúmeros testes de uma vez e minimiza o efeito da sedimentação celular e permite análise da população microbiana que compõe o biofilme. Mas os dispositivos CBD são caros, principalmente quando um material diferente do poliestireno precisa ser utilizado, além disso, para se realizar a avaliação individual dos pinos é necessário quebrar o dispositivo (Azeredo *et al.*, 2017).

Aqui neste trabalho foi desenvolvido um dispositivo 3D que se acopla à microplaca de titulação sem tocar o fundo do poço, minimizando o efeito da sedimentação, e por ser individualizado se torna mais versátil o seu uso. Uma possibilidade é o estudo da difusão de nutrientes e compostos através do biofilme formado dentro dos poros do dispositivo que pode ser acompanhado por meio de cortes e microscopia. Além disso, o uso da tecnologia de impressão 3D possibilita um design e tipo de material diferenciado para cada tipo de estudo a ser realizado.

Os poros presentes nos dispositivos foram planejados de forma a mimetizar condições que podem ser encontradas *in vivo* durante infecções ósseas. Durante a osteomielite, por exemplo, *S. aureus* é capaz de invadir e colonizar rede canalicular óssea onde a bactéria fica protegida pela densa matriz mineral óssea do ataque do sistema imunológico (Bentley *et al.*, 2018; Master *et al.*, 2019). Replicar a estrutura complexa da microarquitetura óssea é desafiador, mas com o auxílio da tecnologia 3D é possível construir estruturas no dispositivo que possam auxiliar nos estudos sobre formação de biofilme nos ossos.

Este dispositivo apresenta uma série de vantagens que visam melhorar a pesquisa nesse campo, como a produção de baixo custo que viabiliza uma abordagem acessível, enquanto a facilidade na fabricação do dispositivo que pode ser feita *in house*, além disso, a facilidade no processo de autoclavagem garante a esterilização adequada do dispositivo. As principais restrições do nosso dispositivo estão associadas à impossibilidade de mostrar ou capturar imagens do biofilme *in vivo* durante seu desenvolvimento e de necessitar de trabalho manual, que demanda uma atenção minuciosa durante o processo.

Os dispositivos desenvolvidos neste estudo foram eficientes em permitir a formação de biofilme pois a absorbância em 560 nm foi superior a 1 (XU *et al.*, 2016). Foi observado também que a quantidade de biofilme formado por *Staphylococcus* aumentou de maneira dependente da densidade de preenchimento do dispositivo. Isso pode ser consequência de os canais internos aumentarem a superfície sulcada e hidrofóbica disponível para a adesão inicial do biofilme em comparação com o poço. Isso está de acordo com o estudo recente realizado por Hall *et al.* (2021) que sugeriram que as propriedades de rugosidade superficial e a hidrofobicidade, desempenham um papel crucial no crescimento de biofilmes de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em materiais à base de ácido polilático impressos.

Uma outra alternativa que explica a maior quantidade de biofilme nos dispositivos Gyr 60 é que nos poros menores pode haver um acúmulo mais rápido sinalizadores de *Quorum sensing* que favorecem a formação do biofilme pois as moléculas ficam impedidas de dispersar tão facilmente no meio de cultura. O sistema de regulação *Quorum sensing* permite que as alterem o comportamento de maneira síncrona a depender da densidade microbiana, além

de regular a produção de proteases e modulinas solúveis em fenol (PSM), que são as principais enzimas para a maturação e desmontagem do biofilme em *S. aureus* e *S. epidermidis* (Schilcher; Horswill, 2020).

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho, apresentamos o desenvolvimento de um dispositivo impresso em 3D para estudo do biofilme estafilocócico. Uma característica importante desse dispositivo é a possibilidade de ser impresso *in house* o que o torna mais barato e versátil. A capacidade de impressão em 3D permite ajustes básicos e personalizados de acordo às necessidades. Os dispositivos desenvolvidos demonstraram eficiência em fornecer um ambiente propício para a formação de biofilme estafilocócico. Além disso, evidenciamos que a densidade de preenchimento do dispositivo exerce influência direta sobre a quantidade de biofilme formado, sendo o dispositivo Gyroid 60 avaliado como a melhor estrutura para o estudo do biofilme, pois a sua maior densidade estrutural consegue mimetizar melhor as estruturas do hospedeiro, onde comumente há formação de biofilme, isso destaca a relevância do parâmetro de densidade de preenchimento no desenvolvimento e controle do experimento. Dessa forma, a combinação da acessibilidade proporcionada pela impressão 3D e dos resultados de formação de biofilme obtidos, novos estudos devem ser conduzidos para testar o efeito de antimicrobianos e moléculas antibiofilme para controle de biofilme estafilocócico.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, Astha; SINGH, Kaleshwar Prasad; JAIN, Amita. Medical significance and management of staphylococcal biofilm. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 2, p. 147-160, 2010. Available at <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19793317/>>

AHMAD-MANSOUR, Nour *et al.* *Staphylococcus aureus* toxins: An update on their pathogenic properties and potential treatments. **Toxins**, v. 13, n. 10, p. 677, 2021. Disponível em < <https://www.mdpi.com/2072-6651/13/10/677>>

ARCIOLA, Carla Renata; CAMPOCCIA, Davide; MONTANARO, Lúcio. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. **Nature reviews microbiology**, vol. 16, no. 7, p. 397-409, 2018. Disponível em <<https://www.nature.com/articles/s41579-018-0019-y>>

ANDES, D. *et al.* Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. **Infection and immunity**, v. 72, n. 10, p. 6023-6031, 2004. Disponível em <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/51490>>

ANDRADE, Stéphanie *et al.* Fighting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with targeted nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 10, p. 9030, 2023. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37240376/>>

AZEREDO, Joana *et al.* Critical review on biofilm methods. **Critical reviews in microbiology**, v. 43, n. 3, p. 313-351, 2017. Disponível em <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1040841X.2016.1208146>>

BARON, Samuel; FONS, Michael; ALBRECHT, Thomas. Viral pathogenesis. **Medical Microbiology. 4th edition**, 1996.. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21413252/>>

BECKER, Karsten; HEILMANN, Christine; PETERS, Georg. Coagulase-negative staphylococci. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 4, p. 870-926, 2014. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25278577/>>

BIANCHERA, Annalisa; BUTTINI, Francesca; BETTINI, Ruggero. Micro/nanosystems and biomaterials for controlled delivery of antimicrobial and anti-biofilm agents. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 30, n. 12, p. 983-1000, 2020. Disponível em <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13543776.2020.1839415>>

BÜTTNER, Henning; MACK, Dietrich; ROHDE, Holger. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 5, p. 14, 2015. Disponível em < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25741476/>>

BROWN, Morgan M.; HORSWILL, Alexander R. *Staphylococcus epidermidis*—Skin friend or foe?. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 11, p. e1009026, 2020. Disponível em < <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1009026>>

CAU, Laura *et al.* The EcpA protease from *Staphylococcus epidermidis* may be a deleterious component of the skin microbiome in atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 3, p. 955-966. e16, 2021. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32634452/>>

CAMARGOS, Mirela Castro Santos *et al.* Disability-free life expectancy estimates for Brazil and Major Regions, 1998 and 2013. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, p. 737-747, 2019. Disponível em < <https://www.scielo.br/j/csc/a/g984nKS3Y4zYsFPmPGJxVgJ/abstract/?lang=en>> Acesso em: 22 jan. 2023

CERGOLE-NOVELLA, Maria C.; PIGNATARI, Antonio CC; GUTH, Beatriz EC. Adhesion, biofilm and genotypic characteristics of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 167-171, 2015. Disponível em < <https://www.scielo.br/j/bjm/a/x9MynDHnYBLcDpFVRsV9jmL/?lang=en>>

CHEUNG, Gordon YC; BAE, Justin S.; OTTO, Michael. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547-569, 2021. Disponível em <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2021.1878688>>

CHIA, Helena N.; WU, Benjamin M. Recent advances in 3D printing of biomaterials. **Journal of biological engineering**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2015. Disponível em <<https://jbioleng.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13036-015-0001-4>>

CORRIGAN, Rebecca M. *et al.* The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. **Microbiology**, v. 153, n. 8, p. 2435-2446, 2007. Disponível em < <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2007/006676-0?crawler=true>>

CLARISSA, Wu Hui-Yan *et al.* Recent advancement in 3-D printing: nanocomposites with added functionality. **Progress in Additive Manufacturing**,

v. 7, n. 2, p. 325-350, 2022. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4392469/>>

DE MESY BENTLEY, Karen L. *et al.* Chronic osteomyelitis with deformation caused by *Staphylococcus aureus* in submicrometric osteocyte canaliculi: case report. **JBJS box connector**, v. 1, pg. e8, 2018. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6681818>>

DIMITROV, Dimitar; SCHREVE, Kristiaan; DE BEER, Neal. Advances in three dimensional printing—state of the art and future perspectives. **Rapid Prototyping Journal**, v. 12, n. 3, p. 136-147, 2006. Disponível em <<https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/13552540610670717/full/html>>.

DEL POZO, Jose Luis. Biofilm-related disease. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 16, n. 1, p. 51-65, 2018. Disponível em <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14787210.2018.1417036>>

FISHER, Emilie L.; OTTO, Michael; CHEUNG, Gordon YC. Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 436, 2018. Disponível em <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00436/full>>

FERRÀS-TARRAGÓ, Joan *et al.* Autoclave sterilization of an in-house 3D printed polylactic acid part: Biological safety and heat-induced deformation. **European Journal of Trauma and Emergency Surgery**, vol. 5, p. 3901-3910, 2022. disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33959787/>>

FRANÇOIS, Patrice; SCHRENZEL, Jacques; GÖTZ, Friedrich. Biology and Regulation of Staphylococcal Biofilm. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5218, 2023. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36982293/>>

GORDON, Rachel J.; LOWY, Franklin D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. Supplement_5, p. S350-S359, 2008. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18462090/>>

JAMAL, Muhsin *et al.* Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, vol. 81, no. 1, pg. October 7th to 11th, 2018. Disponível em <https://journals.lww.com/jcma/fulltext/2018/01000/bacterial_biofilm_and_associated_infections.3.aspx>

KLEINSCHMIDT, Sharon *et al.* *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia. **Future microbiology**, v. 10, n. 11, p. 1859-1879, 2015. Disponível em <<https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fmb.15.98>>

KWIECINSKI, Jakub M.; HORSWILL, Alexander R. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. **Current opinion in microbiology**, v. 53, p. 51-60, 2020. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S136952742030028X>>

LEE, Andie S. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature reviews Disease primers**, v. 4, n. 1, p. 1-23, 2018. Disponível em <<https://www.nature.com/articles/nrdp201833>>

LIMA, Ana Lúcia Lei Munhoz; DE OLIVEIRA, Priscila Rosalba Domingos. Update on infections in joint prostheses. **Brazilian Journal of Orthopedics** (English Edition), v. 6, p. 520-523, 2010. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2255497115302962?via%3Dihub>>

MISHRA, Abhay; SRIVASTAVA, Vivek. Biomaterials and 3D printing techniques used in the medical field. **Journal of Medical Engineering & Technology**, v. 45, n. 4, p. 290-302, 2021. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33929285/>>

MOTTOLA, Carla *et al.* Susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* biofilms in diabetic foot infections. **BMC microbiology**, v. 16, p. 1-9, 2016. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4918071/>> Acesso em: 10 mar. 2023.

NGUYEN, Thuan H.; PARK, Matthew D.; OTTO, Michael. Host response to *Staphylococcus epidermidis* colonization and infections. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 90, 2017. Disponível em <<https://www.nature.com/articles/nrdp201833>>

NGUYEN, Hoai TT; K, Thuan H.; OTO, Michael. The staphylococcal exopolysaccharide PIA – Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization and infection. **Journal of Computational and Structural Biotechnology**, v. 3324-3334, 2020. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33240473/>>

LISOWSKA-ŁYSIAK, Klaudia *et al.* Epidemiology and Pathogenesis of Bloodstream Infections in Humans: a Review. **Polish Journal of Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 13-23, 2021. Disponível em <<https://sciendo.com/article/10.33073/pjm-2021-005>>

LISTER, Jessica L.; HORSWILL, Alexander R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 4, p. 178, 2014. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25566513/>

LIIMATAINEN, Kaisa et al. 3d-printed whole prostate models with tumor hotspots using dual-extruder printer. In: **2019 41st annual international conference of the IEEE engineering in medicine and biology society (EMBC)**. IEEE, 2019. p. 2867-2871. Disponível em <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/8857068/>

MACK, Dietrich et al. Coagulase-negative staphylococci. In: **Biofilms, infection, and antimicrobial therapy**. CRC Press, 2005. p. 127-172. Disponível em <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9781420028232-12/coagulase-negative-staphylococci-dietrich-mack-matthias-horstkotte-holger-rohde-johannes-knobloch>

MCCARTHY, Hannah et al. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 5, p. 1, 2015. Disponível em <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2015.00001/full>

MCGAFFEY, Marissa et al. Manually polishing 3D printed metals produced by laser powder bed fusion reduces biofilm formation. **PloS one**, v. 14, no. 2, p. e0212995, 2019. Disponível em <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0212995>

MINASYAN, Hayk. Sepsis: mechanisms of bacterial injury to the patient. **Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-22, 2019. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30764843/>

NILLES, Julie; WEISS, Johanna; THEILE, Dirk. Crystal violet staining is a reliable alternative to bicinchoninic acid assay-based normalization. **BioTechniques**, v. 73, n. 3, p. 131-135, 2022.

HEILMANN, C.; ZIEBUHR, W.; BECKER, K. Are coagulase-negative staphylococci virulent?. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, no. 9, p. 1071-1080, 2019. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30502487/>

HOWDEN, Benjamin P. et al. *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1-16, 2023. Disponível em <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00852-y>

HUDSON, Michael C.; RAMP, Warren K.; FRANKENBURG, Kelly P. *Staphylococcus aureus* adhesion to bone matrix and bone-associated

biomaterials. **FEMS microbiology letters**, v. 173, n. 2, p. 279-284, 1999. Disponível em <<https://academic.oup.com/femsle/article/173/2/279/620088?login=false>>

HALL JR, Donald C. *et al.* Bacterial biofilm growth on 3D printed materials. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 646303, 2021. Disponível em <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.646303/full#B66>>

HALL, Clayton W.; MAH, Thien-Fah. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, vol. 3, p. 276-301, 2017. Disponível em <<https://academic.oup.com/femsre/article/41/3/276/3089981?login=false>>

OLIVEIRA, Diana; BORGES, Anabela; SIMÕES, Manuel. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. **Toxins**, v. 10, n. 6, p. 252, 2018. Disponível em <<https://www.mdpi.com/2072-6651/10/6/252>>.

OLIVEIRA, WF *et al.* *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections in implants. **Journal of Hospital Infection**, v. 98, no. 2, pg. 111-117, 2018. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0195670117306345>>.

ONYANGO, Laura A. *et al.* Effect of low temperature on growth and ultra-structure of *Staphylococcus* spp. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29031, 2012. Disponível em <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0029031>> Acesso em 25 mai. 2023.

OTO, Michael. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. **Nature reviews microbiology**, vol. 7, no. 8, p. 555-567, 2009. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19609257/>>.

OTTO, Michael. *Staphylococcus epidermidis* pathogenesis. **Staphylococcus epidermidis: Methods and Protocols**, p. 17-31, 2014. Disponível em <https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-736-5_2>

OTTO, Michael. *Staphylococcus aureus* toxins. **Current opinion in microbiology**, v. 17, p. 32-37, 2014. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527413002191>>

OTTO, Michael. Staphylococcal biofilms. **Microbiology spectrum**, v. 6, n. 4, p. 6.4. 27, 2018. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30117414/>>

PAHARIK, Alexandra E.; HORSWILL, Alexander R. The staphylococcal biofilm: adhesins, regulation, and host response. **Virulence mechanisms of bacterial**

pathogens, p. 529-566, 2016. Disponível em <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555819286.ch19>>

PANTANELLA, F. *et al.* Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. **Ann Ig**, v. 25, n. 1, p. 31-42, 2013. Disponível em <http://seu-roma.it/riviste/annali_igiene/open_access/articoli/8ace409bea7945271c2251d0ef793170.pdf>

PANTA, Gopal; RICHARDSON, Ann K.; SHAW, Ian C. Effectiveness of autoclaving in sterilizing reusable medical devices in healthcare facilities. **The Journal of Infection in Developing Countries**, vol. 13, no. 10, p. 858-864, 2019. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32084015/>>

PIEWNGAM, Pipat; OTO, Michael. Probiotics to prevent *Staphylococcus aureus* disease?. **Gut Microbes**, v. 11, no. 1, pg. 94-101, 2020. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30913972/>>

POOMATHI, Nataraj *et al.* 3D printing in tissue engineering: a state of the art review of technologies and biomaterials. **Rapid Prototyping Journal**, v. 26, n. 7, p. 1313-1334, 2020. Disponível em <https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/RPJ-08-2018-0217/full/html?utm_campaign=Emerald_Engineering_PPV_Dec22_RoN>

PONDE, Nicole O. *et al.* Candida albicans biofilms and polymicrobial interactions. **Critical reviews in microbiology**, v. 47, n. 1, p. 91-111, 2021. Disponível em <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1040841X.2020.1843400>>

RAAD, Issam; ALRAHWAN, Amin; ROLSTON, Kenneth. *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. **Books of Infectious Diseases**, v. 26, no. 5, pg. 1182-1187, 1998. Disponível em <<https://academic.oup.com/cid/article/26/5/1182/320935?login=false>>

ROY, Ranita *et al.* Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 522-554, 2018. Disponível em <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2017.1313372>>

RILLING, Juergen; MUDUR, Sudhir P. 3D visualization techniques to support slicing-based program comprehension. **Computers & Graphics**, v. 29, n. 3, p. 311-329, 2005. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0097849305000476>>

XU, Zhenbo *et al.* Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification. **Current microbiology**, v. 73, p. 474-482, 2016. Disponível em <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-016-1081-1>>

ZIMMERLI, Werner; SENDI, Parham. Infecções por biofilme ortopédico. **Apmis**, v. 4, pág. 353-364, 2017. Disponível em <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/apm.12687>>

ZUNIGA, Jorge *et al.* Cyborg beast: a low-cost 3d-printed prosthetic hand for children with upper-limb differences. **BMC research notes**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2015. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25601104/>>

SANDLER, Niklas *et al.* Towards fabrication of 3D printed medical devices to prevent biofilm formation. **International journal of pharmaceutics**, v. 459, n. 1-2, p. 62-64, 2014. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378517313009691>>

SEVERN, Morgan M.; HORSWILL, Alexander R. *Staphylococcus epidermidis* and its dual lifestyle on skin health and infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 97-111, 2023. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36042296/>>

SCHILCHER, Katrin; HORSWILL, Alexander R. Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 3, p. 10.1128/mmbr. 00026-19, 2020. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32792334/>>

SIMÕES, Marcelo Simoni; EINLOFT, Sandra Maria Oliveira; PEZZIN, Ana Paula Testa. In Vitro Degradation of Bioresorbable Poly (L-Lactide) Implant for Lumbar Spine Arthrodesis. **JBNC-BRAZILIAN JOURNAL OF NEUROSURGERY**, v. 4, p. 208-214, 2010. Disponível em <https://www.researchgate.net/profile/A-Pezzin/publication/332204188_Degradacao_In_Vitro_de_Implante_Biorreabsorvivel_em_Poli_L-Lactide_para_Artrodese_de_Coluna_Lombar/links/5cab5a1a299bf118c4bad79e/Degradacao-In-Vitro-de-Implante-Biorreabsorvivel-em-Poli-L-Lactide-para-Artrodese-de-Coluna-Lombar.pdf>

SILVA, Vanessa *et al.* Biofilm formation of multidrug-resistant MRSA strains isolated from different types of human infections. **Pathogens**, v. 10, n. 8, p. 970, 2021. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34451434/>>

SOLANO, Cristina; ECHEVERZ, Maite; LASA, Iñigo. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Current opinion in microbiology**, v. 18, p. 96-104, 2014. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527414000290>>

STEWART, PS; BJARNSHOLT, T. Risk factors for chronic biofilm-related infection associated with implanted medical devices. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, no. 8, p. 1034-1038, 2020. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32120041/>>

TAM, Kayan; TORRES, Victor J. *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 2, p. 7.2. 16, 2019. Disponível em <<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018>>

TOLKER-NIELSEN, Tim. Biofilm development. *Microbial Biofilms*, pg. 51-66, 2015. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26104692/>>

TURNER, Nicholas A. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203-218, 2019. Disponível em < <https://www.nature.com/articles/s41579-018-0147-4>>

VENKATESAN, Nandakumar; PERUMAL, Govindaraj; DOBLE, Mukesh. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. **Future microbiology**, v. 10, n. 11, p. 1743-1750, 2015. Disponível em < <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fmb.15.69>>

VESTERGAARD, M.; FREES, D.; INGMER, H. **Antibiotic Resistance and the MRSA Problem**. *Microbiol Spectr.* v. 7, n. 2, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30900543/>>

VESTBY, Lene K. *et al.* Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 59, 2020. Disponível em <<https://www.mdpi.com/2079-6382/9/2/59>>

VUONG, Cuong; OTTO, Michael. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Micróbios e infecção**, v. 4, n. 4, pág. 481-489, 2002. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1286457902015630>>

WADHER, K. *et al.* 3D printing in pharmaceuticals: An emerging technology full of challenges. In: **Annales Pharmaceutiques Françaises**. Elsevier Masson, 2021. p. 107-118. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003450920301103>

YAN, Jing; BASSLER, Bonnie L. Surviving as a community: antibiotic tolerance and persistence in bacterial biofilms. **Cell host & microbe**, v. 26, n. 1, p. 15-21, 2019. Disponível em < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312819302914>>

YARWOOD, Jeremy M. *et al.* Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 11, p. 1620-1625, 2003. Disponível em <<https://www.jci.org/articles/view/20442>>

XU, Li-Chong *et al.* Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation by surfaces with dual functional texture and release of nitric oxide. **Acta biomaterialia**, v. 53-65, 2017. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5346060/>>

ZABORSKYTĖ, Greta *et al.* Modular 3D-printed Peg biofilm device for flexible setup of surface-related biofilm studies. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 802303, 2022. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35186780/>>