



UNIVERSIDADE JÚLIO DE MESQUITA FILHO
CAMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



Regina Helena Pires

Formação de biofilmes e resistência a antifúngicos e biocidas em *Candida parapsilosis* e *C. orthopsilosis* isoladas de águas usadas para hemodiálise.

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria José Soares Mendes Giannini

Araraquara
2010

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Pires, Regina Helena

P667f Formação de biofilmes e resistência a antifúngicos e biocidas em *Candida parapsilosis* e *C. orthopsilosis* isoladas de águas usadas para hemodiálise / Regina Helena Pires. – Araraquara, 2010.

172 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicada à Farmácia.

Orientadora: Maria José Soares Mendes Giannini

1. Biofilmes (*Candida parapsilosis*). 2. Biofilmes (*Candida orthopsilosis*).
3. Água de uso terapêutico. 4. Hemodiálise. I. Giannini, Maria José Soares Mendes, orient. II. Título.

(a) CAPES: 40500004

*“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses que-
fazeres se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino
continuo buscando, reprocuro. Ensino porque busco,
porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para
constatar, constatando, intervenho, intervindo, educo e me
educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e
comunicar ou anunciar a novidade”.*

Paulo Freire, *Pedagogia da Autonomia*.

Aos meus filhos Vinícius e Isis,

Pela paciência e compreensão da minha ausência em casa durante a realização deste trabalho.
Pelo amor e abraços nas horas difíceis. Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua grande misericórdia me guiando e dando forças em mais esta etapa da minha vida.

A professora Dr^a. Maria José Soares Mendes Giannini, mais que uma orientadora uma amiga e incentivadora deste doutorado, exemplo de dedicação, perseverança e profissionalismo. Tenho em você um exemplo de mestre e pesquisadora, a quem agradeço as oportunidades oferecidas.

Ao professor Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, pesquisador do Laboratório de Microbiologia Aplicada, da Universidade de Franca, a quem agradeço por me ouvir, me apoiar, me divertir, me ajudar a concentrar, torcer por mim sempre. Obrigada por me trazer calma e paz em todos os momentos em que precisei! Agradeço também a toda sua equipe, em especial à **Maria Gorete Mendes de Souza**. Obrigada por todas as tardes divertidas. Beijos a todos.

A Roberta Aparecida Duarte, doutoranda da Citologia, do Departamento de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, pelo prazer da convivência, pelo suporte moral, pelo acolhimento em sua casa. Obrigada por tudo.

Ao professor Dr. Jaime Maia dos Santos e sua equipe, Universidade Estadual Paulista/ FCAV/ Jaboticabal / Departamento de Fitossanidade da Fitossanidade Vegetal, que muito contribuíram nas análises de MEV.

Ao professor Dr. Arnaldo Lopes Colombo, da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, pela doação de microrganismos.

A professora Dr^a. Maria Célia Jamur, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, juntamente com a doutoranda **Claudia Maria Meirelles Marchini**, pela colaboração na obtenção das imagens de microscopia confocal à laser.

Ao Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais da Universidade de Franca – GPPNUF, representado pelo Prof. Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio pela doação de substâncias naturais para os ensaios.

À professora Dra. Maysa Furlan, do Instituto de Química, departamento de Química Orgânica, pela cessão de substâncias naturais para os ensaios.

À Indústria *Body And Mind Beautiful Com. de Cosméticos Ltda* (CNPJ 07.021.304/0001-84), Franca, SP, pela cessão dos óleos naturais.

À professora Dra. Ana Marisa Fusco Almeida e a todos os meus colegas da iniciação científica, estagiários, mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos da disciplina de Micologia, do departamento de Análises Clínicas, da FCFAR, UNESP, Araraquara, em especial a **Marcelo Teruyuki Matsumoto**, pela parceria na troca de informações e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

A Fabiana Cristina Donofrio e Elaine Toscano Miranda, minhas queridas amigas, pelos momentos maravilhosos de convivência, pelas risadas e até pelo choro juntas. Obrigada por me ouvir, me aconselhar e por entender meus momentos de silêncio. Obrigada pela torcida, pela ajuda em tudo!

Ao professor Dr. José Eduardo Zaia, professor do curso de mestrado em Promoção da Saúde, da Universidade de Franca, pela sua colaboração nas análises estatísticas.

A equipe da Clínica de Biomedicina, da Universidade de Franca, Michele Encinas, Marcos Stoppa, Maria Anita Ambrósio e Edna, obrigada por toda a ajuda, pela disponibilidade e pela atenção.

A Rosangela Aparecida Moraes da Silva, técnica da disciplina de Micologia, do departamento de Análises Clínicas da FCFAR, UNESP, Araraquara, pela alegria e pela disponibilidade. Muito obrigada.

Ao PADC/FCFAR-UNESP pela ajuda financeira para a realização do experimento.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMO.....	12
ABSTRACT	14

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	21
1.1.1 Qualidade microbiológica da água e dos fluidos usados em hemodiálise.....	21
1.1.2 Biofilmes	23
1.1.2.1 Destacamento de células ou de agregados celulares	25
1.1.2.2 Produção de endotoxinas	25
1.1.2.3 Resistência ao sistema imunológico do hospedeiro	26
1.1.2.4 Nicho para a geração de organismos resistentes	26
1.1.2.5 Biofilmes e hemodiálise	27
1.1.2.6 Biofilmes de <i>Candida</i>	28
1.1.3 <i>Candida parapsilosis</i>	29
1.1.4 Biofilmes em dispositivos médicos	31
1.1.5 Métodos de estudo de biofilme.....	32
1.1.6 Sensibilidades aos antifúngicos de células suspensas e de biofilmes.....	36
1.1.6.1 Agentes antifúngicos	37
1.1.6.1.1 Agentes antifúngicos que afetam os esteróis	38
1.1.6.1.2 Agentes antifúngicos poliênicos	40
1.1.6.1.3 Agentes antimicrobianos inibidores de síntese de glucanas	41
1.1.7. Resistência antifúngica	42
1.1.8 Agentes químicos	46
1.1.9 Atividade antimicrobiana de produtos naturais	49
1.1.9.1 Espécies vegetais	50
1.1.9.2 Substâncias líquênicas	53
1.1.9.3 Óleos essenciais	54
1.10 Estudos proteômicos.....	55
2. OBJETIVOS	62

3. MATERIAL E MÉTODOS	64
3.1 AMOSTRAGEM.....	64
3.2. PUREZA DOS ISOLADOS.....	64
3.2.1 Genotipagem dos isolados.....	64
3.2.1.1 Extração do DNA genômico.....	64
3.2.1.2.Reação de PCR.....	65
3.2.1.3 Digestão por enzima de restrição do fragmento SADH.....	66
3.3 ENSAIOS DE BIOFILMES.....	66
3.3.1 Crescimento dos isolados no modo biofilme (Pierce et al., 2008, modificado).....	66
3.3.2 Cinética de formação dos biofilmes.....	67
3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	67
3.5. MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER.....	68
3.6. DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS AOS ANTIFÚNGICOS.....	69
3.6.1 Cultivo das leveduras e padronização do inóculo.....	69
3.6.2. Teste de sensibilidade para leveduras.....	69
3.6.3 Determinação da atividade dos antifúngicos sobre biofilmes por medição da densidade Ótica (DO).....	70
3.7 ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE BIOCIDAS.....	71
3.7.1. Biocidas utilizados.....	71
3.7.2. Ensaios com biofilmes pré-formados.....	72
3.7.3 Ensaios para avaliação da eficácia de biocidas na prevenção de biofilmes.....	73
3.8 ENSAIOS COM SUBSTÂNCIAS NATURAIS.....	73
3.8.1. Preparo das substâncias vegetais.....	73
3.8.2 Avaliação da atividade antifúngica nos isolados de <i>C. parapsilosis</i> no modo de crescimento planctônico.....	74
3.8.3 Avaliação da atividade antifúngica sobre biofilmes de isolados de <i>C. parapsilosis</i>	75
3.8.4 Avaliação da atividade sinérgica de óleos essenciais e anfotericina B sobre biofilmes..	76
3.8.5 Ensaios de prevenção de biofilmes de <i>C. parapsilosis</i> por óleos essenciais.....	77
3.9 Técnicas proteômicas.....	77
3.9.1 Cultivo das células fúngicas e extração das proteínas.....	77
3.9.2. Determinação da concentração de proteínas totais: método de Bradford.....	77
3.9.3. Separação eletroforética em duas dimensões (2D- PAGE).....	77
3.9.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	78

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	79
4. RESULTADOS	81
4.1 TIPAGEM MOLECULAR DOS ISOLADOS DE <i>C. parapsilosis</i>	81
4.1.1 DNA genômico.....	81
4.1.2 Tipagem por PCR dos isolados de <i>C. parapsilosis</i>	81
4.1.3. Restrição enzimática dos produtos de PCR.....	83
4.2. ENSAIOS DE BIOFILME	84
4.2.1 Ensaio de cinética da formação de biofilmes por espectrofotometria.....	85
4.2.2 Ensaio de cinética da formação de biofilmes por número de microrganismos.....	87
4.3. DOCUMENTAÇÃO DOS BIOFILMES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	89
4.4. DOCUMENTAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA POR UTILIZAÇÃO DE FLUOROCROMOS	97
4.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE À ANTIFÚNGICOS	101
4.5.1. Perfil de sensibilidade das células planctônicas	101
4.5.2 Perfil de sensibilidade das células sésseis	101
4.6 ENSAIOS COM BIOCIDAS	105
4.7 ENSAIOS COM PRODUTOS NATURAIS	108
4.7.1 Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais	108
4.7.2 Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais em combinação com anfotericina B contra biofilmes	109
4.7.3 Ensaio com óleos essenciais para prevenção de biofilmes	111
4.7.4 Determinação da atividade antifúngica de substâncias naturais contra cepas de <i>C. orthopsilosis</i> e <i>C. parapsilosis</i>	111
4.8. ANÁLISES PROTEÔMICAS.....	113
4.8.1 Determinação das proteínas totais	113
4.8.2. Separação eletroforética 2D-PAGE.....	113
5. DISCUSSÃO	119
6. CONCLUSÕES.....	128
REFERÊNCIAS	130
CAPÍTULO II	
PUBLICAÇÕES DO AUTOR	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das várias etapas de desenvolvimento de um biofilme	24
Figura 2. Diagrama de um biofilme em dispositivo médico	31
Figura 3. Microfotografia de biofilme de <i>Candida</i>	33
Figura 4. Biofilme de <i>Candida</i> marcado com fluorocromos.....	34
Figura 5. Fase inicial de desenvolvimento de biofilme com células de levedura marcados com FUN-1 e ConA.....	35
Figura 6. Mecanismos de ação dos principais agentes antimicóticos	38
Figura 7. Via de biossíntese do ergosterol	40
Figura 8. Interação entre anfotericina B e ergosterol da célula fúngica.....	41
Figura 9. Esquemática do mecanismo dos inibidores de glucana sintetase.....	42
Figura 10. Mecanismos pelos quais as células microbianas podem desenvolver resistência .	43
Figura 11. Principais diterpenos que constituem o extrato em diclorometano das raízes de <i>V. arenaria</i> Baker.....	51
Figura 12. Estruturas moleculares de Maitenina e Pristimerina isoladas de extrato de <i>Maitenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss.....	52
Figura 13. – Estruturas químicas dos enantiômeros do ácido úsnico.....	54
Figura 14. Eletroforese bidimensional (2-D)	59
Figura 15. Eletroforese de DNA genômico de 12 isolados com fenótipos de <i>C. parapsilosis</i> em gel de agarose a 1%	82
Figura 16. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) de cepas de <i>C. parapsilosis</i> padrões	83
Figura 17. Eletroforese em gel de agarose (2%) das cepas padrões e 3 isolados ensaiados ...	83
Figura 18. Eletroforese em gel de agarose (2%) de cepas do estudo	84
Figura 19. Eletroforese em gel de agarose (2%) de cepas do estudo	84
Figura 20. Distribuição das espécies de <i>Candida</i> entre os isolados provenientes da Unidade de Hemodiálise estudada	85
Figura 21. Representação gráfica da comparação da capacidade de formação de biofilmes entre os isolados (100 cepas) estudados	85
Figura 22. Placa de microtitulação de 96 poços com cepa produtora de biofilme e cepas não produtoras de biofilme.....	86
Figura 23. Placa de microtitulação de 96 poços evidenciando biofilmes com células viáveis demonstradas pela solubilização dos cristais de formazana formados e controle de esterilidade	87

Figura 24. Comparação dos resultados obtidos pela metodologia da redução de MTT e número de células viáveis totais em diferentes intervalos de tempo.....	89
Figura 25. Eletromicrografia de biofilme de cepa referência de <i>C. albicans</i> (SC 5314).....	90
Figura 26. Eletromicrografia de biofilme de <i>C. albicans</i> (cepa SC5314) em diferentes magnitudes.....	91
Figura 27. Eletromicrografia de biofilme de isolado representativo de <i>C. orthopsilosis</i> do estudo.....	92
Figura 28. Eletromicrografia de aspectos celulares de biofilme de isolado representativo de <i>C. orthopsilosis</i> do estudo em diferentes magnitudes	93
Figura 29. Eletromicrografia de biofilme de isolado representativo de <i>C. parapsilosis</i> do estudo.....	94
Figura 30. Eletromicrografia de aspectos celulares de biofilme de isolado representativo de <i>C. parapsilosis</i> do estudo em diferentes magnitudes	95
Figura 31. Efeito de anfotericina B sobre as células sésseis de <i>C. albicans</i> após 48 horas de exposição dos biofilmes (24 horas de formação) à droga	96
Figura 32. Efeito de anfotericina B sobre as células sésseis de <i>C. parapsilosis</i> após 48 horas de exposição dos biofilmes (24 horas de formação) à droga.....	97
Figura 33. Efeito de anfotericina B sobre as células sésseis de <i>C. orthopsilosis</i> após 48 horas de exposição dos biofilmes (24 horas de formação) à droga.....	97
Figura 34. Efeito de fluconazol sobre as células sésseis de <i>C. parapsilosis</i> (isolado 123) após 48 horas de exposição dos biofilmes (24 horas de formação) à droga.....	98
Figura 35. Observação ao microscópio confocal à laser de células de biofilmes de <i>C. albicans</i> (SC 5314) coradas com os corantes de viabilidade celular	99
Figura 36. Análise de imagens de microscopia confocal à laser de biofilmes de <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. orthopsilosis</i>	100
Figura 37. Biofilme de <i>C. parapsilosis</i> sensu stricto e <i>C. orthopsilosis</i> após exposição ao fluconazol comparadas à cepa padrão coradas com ConA e FUN-1	101
Figura 38. Biofilme de <i>C. parapsilosis</i> sensu stricto após exposição à anfotericina B por 48 horas, comparadas à biofilme de <i>C. albicans</i>	102
Figura 39. Percentual de mortalidade dos organismos testados quando incubados juntamente com hipoclorito de sódio em diferentes concentrações	108
Figura 40. Percentual de mortalidade dos organismos testados quando incubados juntamente com peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações.....	108

Figura 41. Percentual de mortalidade dos organismos testados quando incubados juntamente com Proxitane® em diferentes concentrações.....	109
Figura 42. Percentual de mortalidade dos organismos testados quando incubados juntamente com ácido acético em diferentes concentrações	109
Figura 43. 2D-PAGE das proteínas de <i>C. parapsilosis</i> não formadoras de biofilme.....	116
Figura 44. 2D-PAGE das proteínas de <i>C. parapsilosis</i> formadoras de biofilme	116
Figura 45. Detalhe da região A (não formadora de biofilme) e A ₁ (formadora de biofilme) dos géis de eletroforese bidimensional.....	117
Figura 46. Detalhe da região B (não formadora de biofilme) e B ₁ (formadora de biofilme) dos géis de eletroforese bidimensional géis de eletroforese bidimensional	118
Figura 47. Detalhe da região C (não formadora de biofilme) e C ₁ (formadora de biofilme) dos géis de eletroforese bidimensional géis de eletroforese bidimensional.....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis importantes na adesão de células microbianas, formação e desenvolvimento de biofilme	29
Tabela 2. Bases bioquímicas da resistência aos azóis	44
Tabela 3. Possíveis mecanismos de resistência aos antissépticos e desinfetantes.....	49
Tabela 4. Equivalência entre as diluições e concentrações dos desinfetantes e esterilizantes no volume testado	72
Tabela 5. Valores de inibição para testes com material vegetal segundo Aligiannis et al., 2001.....	75
Tabela 6. Dados estatísticos obtidos após a leitura espectrofométrica (540 nm) dos biofilmes formados por todas as cepas do estudo, em poços independentes em uma mesma placa de microtitulação, após 24 horas de crescimento.....	87
Tabela 7. Distribuição das CIM ₅₀ de fluconazol, determinadas segundo a metodologia EUCAST-AFST (2008), para os isolados do complexo <i>C. parapsilosis</i> no modo planctônico de crescimento	103
Tabela 8. Distribuição das CIM de anfotericina B para as espécies do complexo de <i>C. parapsilosis</i> determinadas sob condições de crescimento planctônico e sésseis	105
Tabela 9. Resultados dos ensaios realizados no estudo com os biofilmes do complexo <i>C. parapsilosis</i> e biocidas.....	107
Tabela 10. Listagem dos óleos que tiveram suas atividades avaliadas contra cepas de <i>C. orthopsilosis</i> e <i>C. parapsilosis</i> do estudo com suas respectivas CIMs.	111
Tabela 11. Atividade antifúngica de óleo essencial combinado com droga antifúngica contra biofilmes de cepas de <i>C. orthopsilosis</i> e <i>C. parapsilosis</i> do estudo	112
Tabela 12. Resultados da atividade antifúngica de produtos naturais testados no estudo contra as espécies de <i>C. parapsilosis</i> no modo de crescimento planctônico e em biofilme, expressas em CIM (mg/L).....	114
Tabela 13. Concentração de proteínas totais em cada cepa submetida à extração determinadas pelo método de Bradford	115
Tabela 14. Listagem da seleção dos <i>spots</i> demonstrados nas figuras 42, 43 e 44 e as alterações das expressões (diminuição ou aumento) dos mesmos observadas nas cepas de <i>C. parapsilosis</i> sensu stricto formadoras de biofilme quando comparadas as não formadoras de biofilme.....	119

RESUMO

PIRES, Regina Helena. **Formação de biofilmes e resistência a antifúngicos e biocidas em genótipos de *Candida parapsilosis* e *C.orthopsilosis* isolados de águas usadas para hemodiálise.** 2010. 172 fls. Tese de doutorado (Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP.

Unidades de hemodiálise utilizam enormes quantidades de água potável para o funcionamento de "rins artificiais". Problemas microbiológicos com sistemas de distribuição de água potável são geralmente associados à presença de biofilmes formados por adesão e crescimento de microrganismos em superfícies. O patógeno humano *Candida* é capaz de crescer como biofilme na maioria dos aparatos médicos de uso corrente. Nos sistemas de hemodiálise, a formação de biofilme é relevante devido à contínua liberação de microrganismos que o compõe, os quais mostram fenótipo diverso daquele encontrado em seus homólogos de vida livre (forma planctônica de crescimento) com relação à transcrição gênica, velocidade de crescimento e habilidade de resistir a antimicrobianos e biocidas. *Candida parapsilosis*, atualmente dividida em três espécies distintas, tem sido associada às infecções decorrentes do uso de dispositivos médicos constituídos de material plástico e também de proliferar em soluções ricas em glicose, sendo que, tipicamente, tais infecções são relacionadas à formação de biofilmes. Assim, este trabalho teve como principais objetivos caracterizar molecularmente isolados identificados como *C. parapsilosis* advindos do circuito hídrico de uma Unidade de Hemodiálise coletados entre 2004 e 2006; verificar a capacidade de formação de biofilmes pelos mesmos; o efeito de produtos sintéticos e naturais, bem como a sensibilidade aos agentes antimicrobianos de uso clínico: anfotericina, fluconazol e voriconazol nos isolados. Por outro lado, técnicas proteômicas foram usadas para comparar o perfil de proteínas em isolados de *C. parapsilosis* capazes de crescerem no modo biofilme e em isolados que não apresentaram essa propriedade. Assim, 100 isolados fenotipicamente classificados como *C. parapsilosis* foram reclassificados por técnicas moleculares. Biofilmes foram preparados usando-se o modelo de placa de microtitulação estática e quantificados por metodologia colorimétrica do ensaio de redução de sal de tetrazólio (MTT), pela enumeração das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e pela microscopia confocal a laser. A atividade antifúngica das drogas foi determinada pelo método de microdiluição em caldo para as células planctônicas e pelo ensaio de MTT para os biofilmes. Adicionalmente, empregou-se o uso de microscopia eletrônica de varredura para observação da arquitetura dos biofilmes do complexo *C. parapsilosis* comparados à cepa referência e dos efeitos dos antifúngicos nas células sésseis, complementando-se o estudo de

viabilidade celular com a microscopia confocal a laser. As técnicas moleculares empregadas distinguiram os isolados como *C. parapsilosis* (53%) e *C. orthopsilosis* (47%), das quais 72% foram capazes de crescer no modo biofilme. Testes de sensibilidade frente aos agentes antifúngicos convencionais (fluconazol e anfotericina B) e à voriconazol revelaram resistência a ambos os azóis em todos os isolados de *Candida* examinados quando cresceram como biofilme, comparado à sua forma planctônica. Embora se tenha conseguido determinar a CIM para as células sésseis frente à anfotericina B, grande percentual das mesmas apresentou CIMs acima da dosagem terapêutica da droga. Os blastoconídios associados aos biofilmes tratados com os antifúngicos estudados exibiram alterações morfológicas distintas com cada agente. A eficácia de agentes químicos, rotineiramente utilizados na Unidade de Hemodiálise como desinfetantes e esterilizantes, variou conforme o agente, a concentração empregada e a espécie do microrganismo testado. Complementando-se os ensaios de sensibilidade contra as espécies do complexo *C. parapsilosis* nos modos de crescimento em suspensão e em biofilme foram testados óleos essenciais, sendo que, apenas dois exibiram atividade antimicrobiana sobre as células planctônicas, embora, sobre as células sésseis, somente um demonstrou atividade. Sinergismo deste óleo ativo com droga antifúngica, anfotericina B, sobre as células sésseis, avaliado pela metodologia do tabuleiro de xadrez, indicou que embora se tenha obtido diminuição da CIM do óleo, os dois compostos não tiveram ação sinérgica sobre os biofilmes dos microrganismos testados. Também foi avaliada a atividade antimicrobiana de substâncias purificadas de líquen (ácido úsnico), sendo que a substância liquênica apresentou efetividade contra ambos os modos de crescimento. A complexidade das proteínas expressas em organismos de uma mesma espécie (*C. parapsilosis* sensu stricto), mas com capacidade de crescer ou não em modo biofilme, foi avaliada por técnicas proteômicas, as quais sugeriram expressão de proteínas específicas para crescimento em biofilme. Concluindo, a água utilizada para fins terapêuticos, em especial em hemodiálise, deve ser submetida a protocolos de descontaminação e a monitoração da formação de biofilmes para assegurar qualidade à água utilizada em vista da ausência de padronização nacional e internacional.

Palavras-chave: biofilmes (*Candida parapsilosis*); biofilmes (*Candida orthopsilosis*); água de uso terapêutico; hemodiálise.

ABSTRACT

PIRES, Regina Helena. **Hemodialysis machines: the ability to form biofilms in vitro of isolates of *Candida parapsilosis*. Molecular, cellular aspects and resistance to antifungals.** 2010. 172 fls. Doctoral thesis (Bioscience and Biotechnology Applied to Pharmacy) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara, SP.

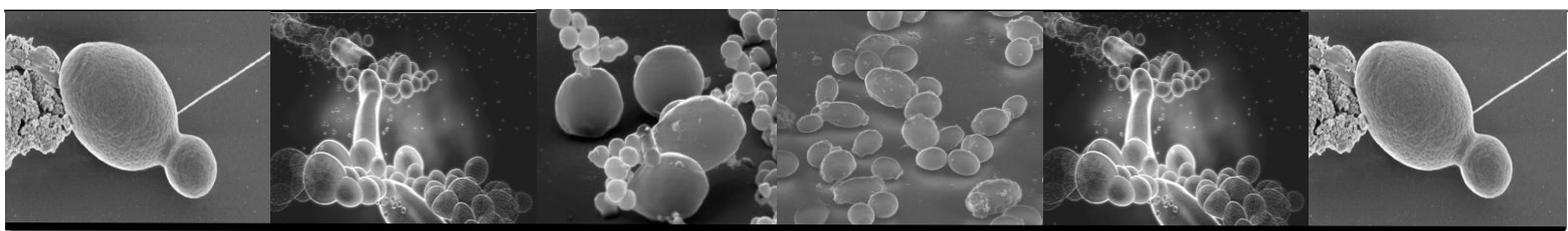
Hemodialysis units use large amounts of water for the operation of "artificial kidneys". Microbiological problems with distribution systems of drinking water are usually associated with the presence of biofilms formed by adhesion and growth of microorganisms on surfaces. The human pathogen *Candida* is able to grow as biofilm in most medical devices in current use. In hemodialysis systems, biofilm formation is relevant because of the continuous release of organisms that compose it, which have a phenotype different from their counterparts found in free-living (planktonic growth form) with respect to gene transcription, growth rate and ability to resist antibiotics and disinfectants. *Candida parapsilosis*, currently divided into three distinct species, has been linked to infections resulting from the use of medical devices made of plastic material and also to proliferate in glucose-rich solutions, and, typically, such infections are related to the formation of biofilms. The goals of the present study were to molecularly characterize isolates identified as *C. parapsilosis* coming from the water circuit of a hemodialysis unit between 2004 and 2006, assess at ability to form biofilms by these species, and to monitor the effect of synthetic and natural, as well the susceptibilities to antifungal agents in clinical use: amphotericin, fluconazole and voriconazole. Moreover, proteomic techniques were used to compare the profile of proteins isolated from *C. parapsilosis* able to grow in the biofilm mode and isolates that did not have this property. Thus, 100 strains classified as *C. parapsilosis* were identified by molecular techniques. *Candida* biofilms were formed in microplates and monitored by using colorimetric assay of tetrazolium salts reducing method (MTT), by the enumeration of colony forming units (CFU/mL), and by confocal scanning laser microscopy. The susceptibility to antifungal drugs was determined for the planktonic cells and MTT assay for biofilms. The susceptibility to antifungal drugs was determined for the planktonic cells and MTT assay for biofilms. Additionally, employed the use of scanning electron microscopy for observation of the complex architecture of biofilms *C. parapsilosis* compared to the reference strain and antifungal effects of sessile cells, complementing the study of cell viability with a confocal laser scanning microscope. The molecular techniques used distinguished the isolates as *C. parapsilosis* (53%) and *C. orthopsilosis* (47%) of which 72% were able to grow in biofilm mode. Tests of sensitivity compared to conventional antifungal agents (fluconazole and

amphotericin B) and voriconazole showed resistance to both azoles in all *Candida* isolates examined when grown as biofilms, compared to their planktonic form. Although it has been able to determine the MIC for the cells to amphotericin B against sessile, large percentage of them had MICs above the therapeutic dosage of the drug, indicating resistance to it. The blastoconidia biofilms-associated treated with antifungal agents exhibited distinct morphological changes with each agent studied. The effectiveness of chemical agents, routinely used in the hemodialysis unit as disinfectants and sterilants, varied according to the agent, the concentration used and the type of organism tested. Complementing the testing of susceptibility against *C. parapsilosis* complex in planktonic and biofilm-grown cells were tested essential oils, and only two exhibited antifungal activity against planktonic cells, though, about the sessile cells, only one showed activity. The synergistic effect between the essential oil and the antifungal compound amphotericin B on sessile cells as assessed by checkboard micro titer assay, said that although there was reduction in MIC of oil, the two compounds had no synergistic action on biofilms of different microorganisms. We also evaluated the antimicrobial activity of lichen substances purified (usnic acid), and lichen-like substance was effective against both modes of growth. The complexity of proteins expressed in organisms of the same species (*C. parapsilosis* sensu stricto), but with ability to grow or not in a different manner of growth, biofilm, giving you an additional tool for pathogenicity was assessed by proteomics techniques, which suggested expression of specific proteins to growth in biofilm mode. In conclusion, the water used for therapeutic purposes, especially in hemodialysis, should be subjected to decontamination protocols and monitoring of biofilm formation to assure the quality of water used in view of the absence of national and international.

Keywords: biofilms (*Candida parapsilosis*), biofilms (*Candida orthopsilosis*); water therapeutic use; hemodialysis.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO E CONSIDERAÇÕES GERAIS



1 INTRODUÇÃO

Apresentação

Na hemodiálise, o sangue é obtido de um acesso vascular, unindo uma veia e uma artéria superficial do braço (cateter venoso central ou fístula artério-venosa) e, impulsionado por uma bomba até o filtro de diálise, também conhecido como dialisador, onde o sangue é exposto à solução de diálise (conhecida como dialisato) através de membrana semipermeável, permitindo assim, as trocas de substâncias entre o sangue e o dialisato. Após ser retirado do paciente e passado através do dialisador, o sangue “filtrado” é então devolvido ao paciente pelo acesso vascular. Desta maneira, cada paciente é exposto a volumes de água que variam entre 18.000 a 36.000 L de água por ano e, portanto, se a água não for corretamente tratada vários contaminantes químicos, bacteriológicos e tóxicos, poderão ser transferidos para os pacientes (SILVA et al., 1996).

Basicamente, a fonte de água usada em hemodiálise é a água potável que é utilizada após purificação por diferentes tipos de tratamento, dentre os quais, o sistema de osmose reversa é bastante difundido em unidades de diálise no Brasil. Este é constituído por um sistema inicial de filtração em carvão (adsorver cloretos, cloraminas e substâncias orgânicas), filtração por filtros abrandadores (remoção de cálcio, magnésio e outros cátions polivalentes) e finalmente o filtro de osmose reversa, onde a água passa através de uma membrana semipermeável, sob pressão. Após este processo, a água é estocada em tanques e posteriormente distribuída, por tubulações plásticas de polivinilclorida (PVC), a todo o sistema hídrico da unidade (SILVA et al., 1996). Assim, esta pode ser facilmente contaminada, devido a fatores tais como ausência de teor de cloro (removido previamente pelo filtro de carvão ativado); presença de nutrientes como glicose e sais minerais no dialisato; presença de espaço morto no circuito hidráulico interno; períodos de estagnação de água sem cloro, dentro das máquinas, no intervalo entre as sessões de diálise; precipitação de sais de cálcio e magnésio provenientes do dialisato que determina formação de irregularidades na luz do circuito hidráulico, facilitando alojamento e proliferação microbiana, com conseqüente geração de biofilmes.

Assim, a morbi-mortalidade observada em pacientes submetidos à terapia renal substitutiva pode ser atribuída muitas vezes à água usada no processo de diálise, de qualidade inadequada: pela presença de elementos químicos e espécies químicas, transmissão de doenças de origem bacteriana, parasitária e virótica. Conforme registros do *United States*

Renal Data System, (2003), infecção é a segunda maior causa de morte em pacientes em diálise, só perdendo para patologias cardiovasculares e, sepse contribui com mais de 75% dessas mortes.

A partir da década de 80, as doenças fúngicas têm aumentado, especialmente entre os pacientes imunocomprometidos e, *Candida* é o quarto patógeno mais freqüente em fungemias (WISPLINGHOFF, 2004). Embora *C. albicans* seja a espécie fúngica mais isolada, a incidência de outras espécies tem aumentado (ANTUNES et al., 2004; RODERO, 2005; MEDRANO et al., 2006), sendo *C. parapsilosis* descrita como o segundo agente etiológico mais comum (PFALLER; DIEKEMA, 2007; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010). Ao contrário de outras espécies de *Candida*, *C. parapsilosis* foi encontrada nas mãos de profissionais de saúde, resultante em infecção hospitalar, associada com a manipulação de cateteres. Além disso, *C. parapsilosis* é um problema particular, pois tende a crescer como biofilmes em dispositivos médicos, o que está diretamente relacionado com doença clinicamente significativa (TROFA et al., 2008).

Os biofilmes foram estudados ao longo dos tempos e definidos como sendo uma comunidade séssil caracterizada por células que formam microcolônias e que estão irreversivelmente aderidas a um substrato, a uma interface, ou ainda umas às outras, embebidas numa matriz exopolimérica de substâncias extracelulares exibindo um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento e à transcrição genética (COSTERTON et al., 2003). Os biofilmes representam o tipo de crescimento microbiano predominante na natureza e são cruciais no desenvolvimento de infecções, uma vez que servem de nicho aos agentes patogênicos e estão associados a altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos (KUHN et al., 2002).

Em face dessas considerações e levando-se em conta o aumento percentual da população usuária de hemodiálise, neste estudo avaliou-se a qualidade microbiana de fluidos utilizados em uma Unidade de Hemodiálise, por fungos do gênero *Candida*, particularmente a espécie *C. parapsilosis*, sendo que, para facilitar a compreensão do trabalho, realizou-se uma revisão da literatura abordada em tópicos como segue:

1.1 Considerações gerais

Este tópico abrange a revisão da literatura, em que são descritas as padronizações da água utilizada em hemodiálise, o fenômeno de formação, visualização, perfil de sensibilidade e controle de biofilmes de *Candida*, precisamente *C. parapsilosis*, em dispositivos médicos, dando atenção à contaminação de circuito hídrico de hemodiálise. No que diz respeito ao controle de biofilme, foi abordado o controle químico dos mesmos, sendo os mecanismos de resistência microbiana descritos em detalhe, tendo em conta a literatura existente e a relevância do tema na compreensão do trabalho apresentado posteriormente.

1.1.1 Qualidade microbiológica da água e dos fluidos usados em hemodiálise

A primeira diálise bem sucedida da história da medicina foi realizada por Willem Kolff na Holanda em 1945. A paciente sobreviveu mais de 6 anos após ser submetida a uma hemodiálise (VORBECK-MEISTER et al., 1999). Aqui no Brasil, o pioneirismo foi do Dr. Tito Ribeiro de Almeida, que em 19 de maio de 1949, no Hospital de Clínicas da Universidade de São Paulo, dialisou uma paciente com insuficiência renal crônica. Essas experiências proporcionaram um feito inédito na época: divulgar e estimular o desenvolvimento de um tratamento até então inexistente. Hoje, mais de 1.200.000 pacientes são submetidos a este tratamento em todo o mundo e, no Brasil, segundo o censo de 2004/2005 da Sociedade Brasileira de Nefrologia, em janeiro de 2005, existiam 65.121 pacientes com insuficiência renal crônica em diálise no país, distribuídos em 596 unidades de diálise, dos quais 62,4% estão dentro de hospitais (www.sbn.org.br).

O fluido de diálise consiste de até 99% da água da osmose reversa, além disso, produtos químicos são adicionados, tais como ácidos, sais e bicarbonato. Uma unidade de diálise de tamanho médio produz mais de um milhão de litros de líquido de diálise por ano. Mundialmente, a produção de líquido de diálise é de cerca de 25.000 milhões de litros, o que torna o fluido de diálise um dos maiores produtos por volume utilizado na medicina (NYSTRAND, 2008).

A contaminação microbiana de fluido de hemodiálise ainda é comum. As fontes de microrganismos são múltiplas onde se inclui o complexo sistema de tratamento de água constituído pelas resinas de troca iônica, filtros de carvão e de partículas e unidade de osmose reversa que fornecem até 97% de água, a qual produtos químicos tais como ácidos, sais e bicarbonato são adicionados para constituírem o líquido de diálise. Como resultado, o

dialisato produzido é muitas vezes contaminado por microrganismos (MAN et al., 1988; KLEIN et al., 1990) sendo que esta contaminação pode persistir apesar dos regulares procedimentos de desinfecção após cada sessão de diálise (MAN et al., 1995; AMATO, 2005; VARO et al., 2007; MONTANARI et al., 2009).

A água utilizada para a diluição de concentrados de hemodiálise obedece à padronização oficial relativas à microbiologia e química sendo que a mais difundida recomendação é a prescrita pela AAMI RD 62, 2006 (publicado pela *Association for the Advancement of Medical Instrumentation*). Os fluídos não precisam ser estéreis, mas o número máximo de microrganismos deve ser controlado (contagem total de bactérias viáveis inferior a 200 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) para a água, menor do que 2000 células/ml para o líquido de diálise preparado e concentração de endotoxina inferior duas Unidades de Endotoxina por mililitro (EU)/mL). Atualmente uma nova norma ISO (*International Organization for Standardization*) está em preparação a fim de se conseguir uma melhor harmonização. Novas questões da ISO 13958 (concentrados), ISO 13959 (água) e ISO 26722 (equipamento para água) estão sendo unificadas na nova ISO para fluidos de hemodiálise (ISO/DIS 11663).

No Brasil, a resolução RDC N° 154, de 15 de junho de 2004, define os critérios mínimos para o funcionamento e avaliação dos serviços públicos e privados que realizam diálise em pacientes ambulatoriais, portadores de insuficiência renal crônica, bem como os mecanismos de sua monitoração; considerando a necessidade de redução dos riscos aos quais fica exposto o paciente que se submete à diálise.

Primordiamente, o enfoque de tais normas é o nível de contaminação microbiana nesses sistemas de tratamento de água, pois há a possibilidade de transporte de material microbiano para as máquinas de diálise, o qual é constituído de células microbianas, endotoxinas e metabólitos formados durante o crescimento no sistema. Células microbianas e até mesmo endotoxinas podem ser removidas por ultrafiltração; no entanto, metabólitos microbianos que podem incluir 5.000 diferentes tipos de moléculas, são, em princípio, impossíveis de se eliminar (NYSTRAND, 2008). Adicionalmente, há desenvolvimento de biofilme, constituído por uma malha fibrilar de polissacárides (matrix) a qual se prendem microrganismos (MAN et al., 1998; CAPPELLI et al., 2000). Além disso, há relatos de que os microrganismos presentes no biofilme liberam compostos, tais como endotoxinas, muramilpeptídeos e polissacárides na água, com peso molecular variando de 0,5 a 200 kDa, o que permite a sua passagem pelas membranas utilizadas em diálise renal. A transferência desses componentes está implicada na estimulação da resposta imune e na produção de

citocinas (LONNEMANN, 2000; CAPELLI et al., 2007) e pode ser modulada pela utilização de filtração (PEGUES et al., 1992; LONNEMANN et al., 2001), o que levou a uma ênfase maior sobre o potencial papel das citocinas induzidas microbiologicamente (KALANTARZADEH; KOPPLE, 2001; LOWRIE, 2002; NAKATANI et al., 2002).

1.1.2 *Biofilmes*

Biofilmes têm sido descritos em muitos sistemas, desde que Van Leeuwenhoek analisou os “animáculos” na placa de seus próprios dentes, no século XVII, mas a teoria geral da predominância do biofilme não foi promulgada até 1978 (COSTERTON; LAPPIN-SCOTT, 1995). Assim, biofilme tem sido definido como uma massa microbiana resultante da multiplicação e desenvolvimento de microrganismos, aderidos à superfície de sólidos, presa na matriz de polissacáride extracelular, em ambiente que contém líquido (COSTERTON et al., 1999), que se desenvolvem em verdadeira associação comunitária constituindo uma cadeia alimentar (STOODLEY et al., 2002). Esse tipo de desenvolvimento proporciona, aos microrganismos que o constituem, importantes benefícios, tais como: aumento da concentração de nutrientes nas interfaces líquido-biofilme uma vez que a matriz polimérica favorece a adsorção de moléculas de nutrientes; proteção contra fatores ambientais agressivos, como flutuações de pH, concentrações de sais, desidratação, forças de tensão de corte, substâncias químicas agressivas, bactericidas, antibióticos, predadores, bactérias líticas e metais pesados; possibilidade de troca de material genético devido aos longos tempos de retenção dos microrganismos; facilidade de desenvolvimento de microconsórcios que permitem o estabelecimento de relações de simbiose, bem como a utilização de substratos de difícil degradação e capacidade de estabelecer e colonizar nichos ecológicos (FLEMMING, 1993; MITTELMAN, 1998). Sendo assim, os microrganismos que crescem em biofilmes, células essas ditas sésseis, diferem profundamente de suas homólogas, ditas planctônicas ou flutuantes (COSTERTON; LAPPIN-SCOTT, 1995).

Geralmente, a dinâmica de formação de um biofilme ocorre em etapas distintas. A fase inicial de adesão caracteriza-se pela aproximação do microrganismo à superfície de adesão. Uma vez atingida a distância crítica (<1nm) a interação entre o microrganismo e a superfície depende do somatório das forças atrativas e repulsivas geradas entre estas duas entidades (forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals). As forças eletrostáticas tendem a repelir as duas superfícies, já que a maioria dos microrganismos e superfícies inertes está carregada negativamente e as interações de van der Waals têm influência positiva. Este estágio inicial de adesão em que há envolvimento de interações

físico-químicas entre as superfícies designa-se de adesão primária. Algumas proteínas humanas tais como a matriz conectiva (colágeno) ou plasma (fibrinogênio e fibronectina) adsorvem na superfície de biomateriais e são reconhecidas por adesinas específicas na membrana microbiana e são determinantes para o processo inicial de colonização (VERRAN; WHITEHEAD, 2005).

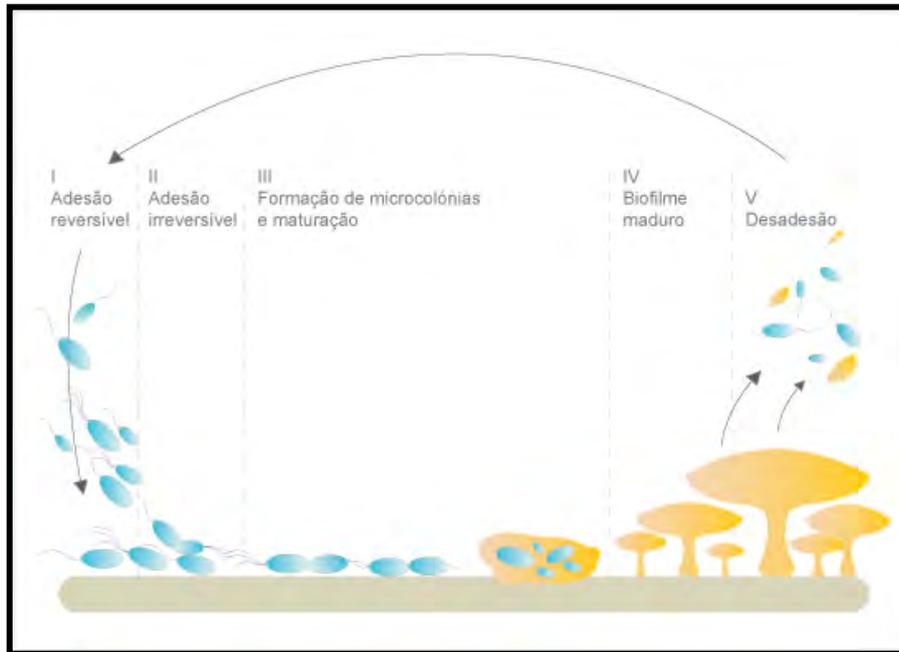


Figura 1 - Representação esquemática das várias etapas de desenvolvimento de um biofilme (adaptado de GHIGO et al., 2003).

A síntese de exopolissacárides e matriz proteica (*slime*) pelos primeiros microrganismos colonizadores mantém o biofilme unido e ajuda na deposição de outras células através de diferentes sítios de adesão. A composição da matriz extracelular é diferente entre as espécies microbianas e possuem um importante papel na determinação da arquitetura final dos biofilmes. Somente microrganismos de uma mesma espécie são capazes de aderirem conjuntamente a um ponto na superfície, enquanto outras espécies microbianas podem ancorar-se na matriz ou diretamente aos colonizadores primários. A matriz secretada protege as células dentro dela, facilitando a comunicação entre as mesmas através de sinais químicos e físicos e providencia uma barreira química e física à difusão de substâncias antimicrobianas e à injúrias ambientais (BRANDA et al., 2005), capacitando o biofilme ao crescimento proporcionado por uma combinação de divisão e recrutamento de células em uma estrutura tridimensional. Assim, o biofilme é um sistema dinâmico complexo que de acordo com as condições microambientais (hidrodinâmica e condições bioquímicas, espessura, tensão de cisalhamento) adquire uma heterogeneidade espacial (canais e edificações) que são características do tipo de micróbio envolvido e diferem-se em relação à limitação do oxigênio,

pH, acesso à nutrientes e velocidade de crescimento. Posteriormente, tem-se a disseminação da progênie das células do biofilme (sésseis) com características diferentes (transcrição de genes de resistência) de suas homólogas (plancônicas ou flutuantes), conforme esquematizado na Figura 1.

1.1.2.1 *Destacamento de células ou de agregados celulares*

As células podem destacar-se individualmente, como resultado do crescimento e divisão celular dentro do biofilme, ou agregados de células ou grupos podem soltar-se ou ser descartadas do biofilme. Apesar de destacamento não ser bem caracterizado em biofilmes de dispositivos médicos, alguns aspectos do processo pode ser considerado universal para todos os biofilmes. Os estudos de laboratório mostraram que um aumento do estresse de cisalhamento, como poderia ocorrer durante as mudanças na direção ou velocidade de fluxo, irá resultar em um aumento na taxa de erosão da célula do biofilme (CHARACKLIS; MCFETERS; MARSHALL, 1990). Também foi demonstrado que a separação de células ou agregados pode estar relacionado a mudanças na concentração do substrato (CHARACKLIS, 1990). Davies et al., 1998, também mostraram que moléculas de acil-lactona-homoserina poderiam mediar a arquitetura do biofilme e desprendimento. Também Uppuluri et al., 2010, relataram que a dispersão de células de biofilmes de *C. albicans* é dependente das condições do ambiente de crescimento. Independentemente do motivo, as células destacadas podem levar à uma infecção.

Organismos patogênicos de biofilmes de água potável também poderiam destacar-se como agregados, e, especialmente para aqueles organismos com uma baixa dose infectante, o consumo ou a exposição à água que os contenham pode resultar em infecção.

1.1.2.2 *Produção de endotoxinas*

Além dos efeitos diretos do destacamento ou da resistência antimicrobiana, microrganismos dentro de biofilmes podem produzir endotoxinas, o que poderia ser especialmente relevante para pacientes de hemodiálise, uma vez que endotoxinas do dialisato podem ser transportadas através da membrana de diálise do dialisador e provocarem uma resposta imunológica do paciente. Vários estudos reportam os níveis de endotoxina de biofilmes (RIOUFOL et al., 1999; HOLLAND, 2000). Vincent et al., 1989, mostrou que a contagem bacteriana no biofilme em tubulação de hemodializador correlacionava-se com os

níveis de endotoxina. No entanto, nenhum desses estudos documentou os níveis ou a cinética de liberação de endotoxina do biofilme.

1.1.2.3 Resistência ao sistema imunológico do hospedeiro

Alguns relatos dão sustentação à conclusão de que os organismos desanexados de um biofilme em um dispositivo médico poderiam sobreviver à ação do sistema imunológico na corrente sanguínea e iniciar uma infecção: Ward et al. , 1992, que usaram um modelo de coelho, mostraram que o crescimento microbiano dentro de um biofilme sobre um dispositivo implantado peritonealmente não foi afetado pelo sistema imunológico do animal vacinado (em termos de fagocitose). Os animais vacinados tiveram titulação do anticorpo 1.000 vezes maior, mas os anticorpos não atingiram as células dentro do biofilme; Yasuda et al., 1994, relataram que células de *E. coli* cultivadas em biofilme e, em seguida, re-suspensas eram tão sensíveis à fagocitose quanto bactérias cultivadas no modo planctônico, mas eram menos sensíveis à atividade microbicida dos leucócitos polimorfonucleares humanos *in vitro*; sugerindo que o fato era devido à resistência dos organismos de biofilme às espécies ativas de oxigênio produzidas pelos polimorfonucleares.

1.1.2.4 Nicho para a geração de organismos resistentes

A proximidade física das células dentro de microcolônias em biofilmes favorece o processo de conjugação. Estudos prévios, tais como o de Baillie e Douglas, 1998, relatam que células de *C. albicans* re-suspensas de biofilmes foram menos resistentes à anfotericina B do que as populações de biofilme intacto, embora as sensibilidades desses dois tipos celulares fossem significativamente maiores do que suas células no modo de crescimento planctônico. LaFleur et al., 2006, relatam que os biofilmes de *Candida* apresentaram um padrão bifásico em resposta a agentes antimicrobianos. Uma sub-população de células sobrevivia ou persistia exibindo tolerância à poliquimioterapia, enquanto outra sub-população era suscetível à antifúngicos estudados. Re-inoculação de células sobreviventes produzindo um novo biofilme revelava um genótipo hereditário das células do biofilme.

Este fenômeno pode ser especialmente relevante no caso de biofilmes em dispositivos médicos manuseáveis, pois os organismos resistentes podem ser transmitidos de paciente para paciente nas mãos dos profissionais de saúde.

1.1.2.5 Biofilmes e hemodiálise

Pacientes urêmicos possuem alto risco de contrair doença relacionada à biofilme no decurso do tratamento porque são manipulados freqüentemente pela equipe hospitalar e vários dispositivos médicos podem ser utilizados. Cateteres, intravascular ou urinário, representam os principais meios de instrumentação médica nesses pacientes. Mesmo na ausência de métodos de coleta padronizados, biofilme foi detectado no circuito hidráulico de máquinas de hemodiálise particularmente em setores de baixo fluxo, espaços mortos e ultrafiltros, atingindo uma concentração microbiana na ordem de 1×10^3 a 1×10^6 células/cm² e nível de endotoxina de 1-10 EU/cm² (CAPPELLI et al., 2005). Alguns constituintes da parede celular de microrganismos viáveis, onde se inclui tanto substância de alta massa molecular (>100.000 Da) como de baixa (<1.000 Da) ou fragmentos de DNA (CAPPELLI et al., 2005; SCHINDLER et al., 2004), ao serem lançados no dialisato, podem estimular tanto a circulação de leucócitos aderidos à membrana como também são capazes de induzir as células mononucleares humanas a produzir interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF), citocinas integrantes da resposta imune (LONNEMANN et al., 1988). Dentre os múltiplos efeitos biológicos da IL-1 destacam-se a febre (ação no hipotálamo), a neutrofilia (ação na medula óssea), a proliferação de colágeno (estímulo de fibroblastos), a liberação de aminoácidos de músculos, a produção de IL-2 (ação nas células T) e a produção de anticorpos (ação nas células B) (DINARELLO, 1984). As endotoxinas interagem com vários sistemas celulares e humorais. Após penetrar na circulação, liga-se a lipoproteínas plasmáticas, resultando em redução de sua atividade biológica. Mesmo assim ativam o complemento, induzem a coagulação, afetam a função hepática e o sistema neuro-endócrino. Esta diversidade de respostas fisiológicas são direcionados tanto à eliminação de endotoxinas, fragmentos, e até mesmo de células microbianas, como para promover o reparo das lesões teciduais. Porém, em resposta à altas concentrações ou à maior sensibilidade a endotoxinas, as ações do sistema de defesa tornam-se incontroláveis e, ao invés de contribuir, muitas destas respostas acabam sendo prejudiciais ao paciente. Estudos prévios (LONNEMANN et al., 1988; CAPPELLI et al., 2005) relatam que endotoxinas induzem os macrófagos do sistema retículo endotelial a liberar fatores antagonistas a glicocorticóide, fatores insulina-like e fatores coagulantes, os quais determinam a liberação de prostaglandinas, óxido nítrico (indutor de vasodilatação sistêmica e hipotensão no choque endotóxico), superóxidos e enzimas lisossômicas. Adicionalmente, devido a ativação de monócitos e macrófagos, ocorre no fígado a produção de mediadores de fase inflamatória

aguda, através da síntese desenfreada de proteína C reativa, fibrinogênio e β_2 -microglobulina. Este processo poderia, especulativamente, também ser gerador de uma forma de aterosclerose acelerada, recentemente descrita em renais crônicos como M.I.A (Má nutrição, Inflamação e Aterosclerose) (PANICHI et al., 2000; CAPPELLI et al., 2005).

No sistema de hemodiálise, os locais favoráveis para formação de biofilme incluem o sistema de tratamento de água, os gasodutos de distribuição e o circuito hidráulico do monitor de diálise, devido à contaminação microbiana transmitida pela água, presença de nutrientes orgânicos e pH elevado devido a soluções tamponadas com bicarbonato (CAPPELLI et al., 2000; LONNEMMAN, 2000; CAPPELLI et al., 2007). Embora constantemente se aprimore o método de padronização para águas utilizadas em hemodiálise pelos órgãos competentes, esses só avaliam a contaminação microbiana no modo planctônico, mas não no modo de crescimento em biofilme e, os testes para níveis de endotoxinas, não são eficientes para avaliar os níveis de citocinas relacionadas com biofilme, sendo, portanto incapazes de avaliar os riscos para a saúde dos pacientes.

1.1.2.6 *Biofilmes de Candida*

Candida é fungo comensal que habita vários nichos do corpo humano, incluindo a cavidade bucal, trato gastrointestinal, vagina e pele de indivíduos saudáveis, sendo considerado também o mais frequente patógeno fúngico isolado de sítios clínicos (SAMARANAYAKE; MacFARLANE, 1990). Além disso, a taxa de mortalidade entre os pacientes acometidos por candidíase tem aumentado e reportados em altos níveis tais como 40 a 60% (WENZEL; GENNINGS, 2005; COLOMBO et al., 2006). A transição do inócuo comensal ao parasita depende de alguns fatores tais como o estado imune do hospedeiro e à versatilidade de *Candida* em se adaptar a uma grande variedade de *habitats* e capacidade de formação de biofilmes (SENEVIRATNE; SAMARANAYAKE, 2008).

A formação de biofilmes de *C. albicans in vitro* tem sido descrita em três fases distintas (CHANDRA et al., 2001): precoce (0-11 horas), intermediária (12-30 h) e de maturação (38-72 h). A fase prematura é caracterizada pela aderência e desenvolvimento de blastoconídios em microcolonias distintas. Em 18-24 h, a comunidade do biofilme pode ser vista como uma bicamada, compreendendo uma mistura de blastoconídios, pseudohifas e hifas jovens, além de produção da matriz caracterizando a fase intermediária e, na fase de maturação uma espessa matriz abriga um denso emaranhado de células em todos os estágios de desenvolvimento de uma levedura.

Os fatores que podem estar envolvidos na adesão e formação de biofilmes de *Candida* estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Variáveis importantes na adesão de células microbianas, formação e desenvolvimento de biofilme (baseado em DONLAN, 2002).

<i>Fatores relacionados à superfície de adesão</i>	<i>Fatores relacionados ao fluido</i>	<i>Fatores relacionados à célula</i>
Textura ou rugosidade	velocidade de fluxo	Hidrofobicidade da superfície celular
hidrofobicidade	pH temperatura	Apêndices extracelulares Substâncias poliméricas extracelulares
condicionamento do biofilme	íons Presença de agentes antimicrobianos	Moléculas de sinalização Tipo de microrganismo

1.1.3 *Candida parapsilosis*

Durante a última década, a incidência de *C. parapsilosis* aumentou dramaticamente, evidenciada pelos relatos que a indicam como a segunda mais comumente isolada espécie de *Candida* de hemoculturas (PFALLER et al., 2001; MUJICA et al., 2004; RODERO, et al., 2005) e, em alguns países europeus (PFALLER et al., 2001), Ásia (NG et al., 2001; NAKAMURA; TAKAHASHI, 2006), e hospitais sul-americanos (MEDRANO et al., 2006), *C. parapsilosis* supera até mesmo *C. albicans*. Esse fenômeno tem sido atribuído a uma variedade de fatores de risco, incluindo capacidade de crescimento tanto em soluções de hiperalimentação com altas concentrações de glicose (SOLOMON et al., 1984; WEEMS, et al., 1987) como em dispositivos intravasculares (cateteres venosos, central e periférico; cateteres de hemodiálise e diálise peritoneal), dispositivos protéticos (prótese intracardíaca e de articulações), além de que doença invasiva pode ocorrer sem colonização prévia, transmitida horizontalmente através de contaminação de fontes externas ou pelas mãos dos profissionais de saúde antes ou durante o manuseio do paciente, nomeadamente nos cuidados de saúde ambiental onde desvios de protocolos de boa higienização das mãos podem ocorrer (BONASSOLI, BERTOLI, SVIDZINSKI, 2005).

Alguns métodos têm sido usados para distinguir isolados de *C. parapsilosis* a nível molecular no intuito de se determinar as rotas de transmissão, persistência de espécies e origem destas durante episódios de infecção. Trabalhos prévios com enzimas de restrição mostraram que os isolados de *C. parapsilosis* são mais heterogêneos que os de outras espécies de *Candida* (SCHERER; STEVENS, 1987). Os resultados obtidos com tipagem da seqüência de multilocus definiram genes que permitiram diferenciar o perfil dos isolados de *C.*

parapsilosis de diferentes localizações anatômicas ou geográficas. Em 2005, *C. parapsilosis* foi separada em três grupos e, estudos genéticos (LEHMANN et al., 1995; TAVANTI et al., 2005 e LASKER et al., 2006) revelaram suficientes diferenças que levaram à separação dos grupos em distintas espécies intimamente relacionadas: *C. parapsilosis* (grupo I), *C. orthopsilosis* (grupo II) e *C. metapsilosis* (grupo III), sendo que a maioria dos isolados clínicos é pertencente ao grupo I, o que poderia ser em decorrência da aumentada capacidade de formação de biofilmes dos mesmos (TAVANTI et al., 2005). Atualmente, o interesse por uma melhor caracterização do grupo *psilosis* possibilitou a inter-relação tanto da epidemiologia de *C. parapsilosis* como também as diferenças na sensibilidade antifúngica dos perfis de *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*.

Nos últimos anos, houve pelo menos dois surtos notificados em que *C. orthopsilosis* (*C. parapsilosis* tipo II) foi relatada. O primeiro surto foi em 1995 no hospital de San Antonio, relatado por Lin et al., e em 2000, Zancopé-Oliveira et al., descreveram um pequeno surto nosocomial de *C. parapsilosis* grupo II, em hospital brasileiro. Recentemente, Lockhart et al., 2008, ao testar 1929 isolados clínicos invasivos mundiais identificados como *C. parapsilosis*, constatou que 10,9% dos isolados sul-americanos eram de *C. orthopsilosis* e, que a distribuição dos mesmos no continente prevalecia nos isolados originários da Venezuela e Brasil, onde variaram de 16,5% e 16%, respectivamente. Com respeito a *C. metapsilosis*, apenas 1,7% dos isolados sul-americanos (quatro isolados no Brasil e um na Argentina) foram identificados como tal espécie.

A patogênese da candidíase invasiva é facilitada por um número de fatores de virulência, sendo o mais importante a adesão à células hospedeiras, possivelmente resultando em uma mudança no organismo de morfologia e/ou comportamento, formação de biofilme e, secreção de enzimas hidrolíticas tais como as proteases, fosfolipases e lipases. Em *C. parapsilosis*, a hidrofobicidade celular tem sido associada à adesão inicial em superfícies (PANAGODA; ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 2001), enquanto que a produção de matriz, à tendência de adesão à cateteres plásticos (BRANCHINI et al., 1994).

A propriedade de diferentes isolados de *C. parapsilosis* causarem doença em vários tecidos pode ser influenciada pela sua capacidade de formação de biofilme que confere resistência significativa à terapia antifúngica. Apesar de sua estrutura menos complexa, os biofilmes de *C. parapsilosis* são igualmente resistentes aos antifúngicos convencionais, tais como a anfotericina B e compostos azólicos (KATRAGKOU et al., 2007, RUZICKA et al., 2007) quanto os biofilmes de *C. albicans*.

1.1.4 Biofilmes em dispositivos médicos

A moderna medicina sustenta-se em uma variedade de aparatos médicos constituídos de diferentes materiais que representam possíveis sítios para adesão e conseqüente formação de biofilmes. O desenvolvimento do biofilme depende do tipo e do número de células que aderem ao dispositivo, do tipo de superfície que o constitui e do meio ou fluidos a que os microrganismos estão expostos (DONLAN, 2001). A natureza da estrutura do biofilme e as características das células que o constituem conferem uma resistência aos agentes antimicrobianos e às defesas naturais do organismo (LENGELER et al., 2000). Baseando-se nos três tipos de dispositivos médicos mais freqüentemente associados à biofilme: cateteres venosos centrais, válvulas cardíacas mecânicas e cateteres urinários de Foley, Costerton et al., 1999, propuseram os mecanismos possivelmente envolvidos, ilustrados na Figura 2.

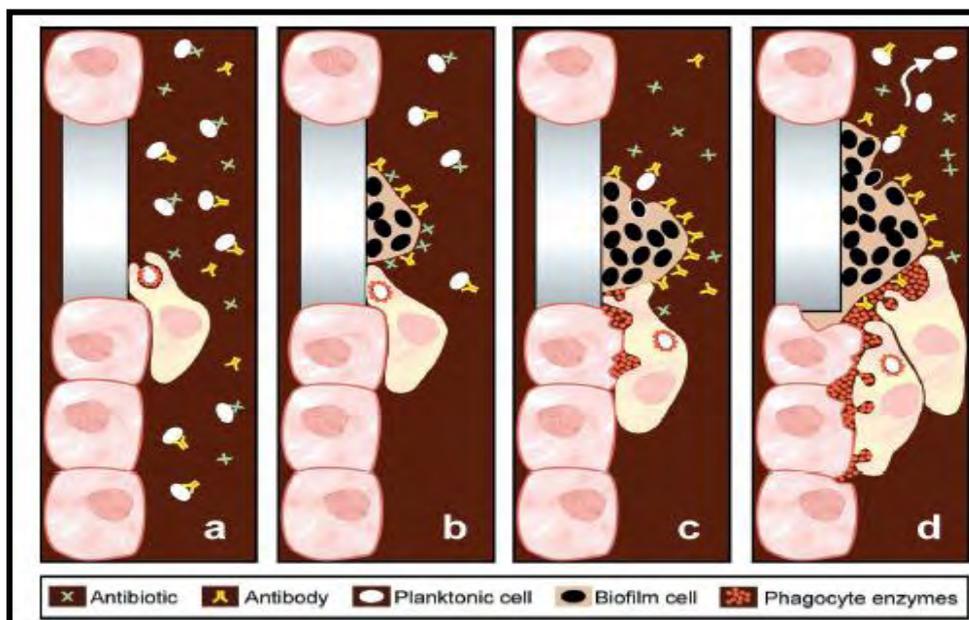


Figura 2. Diagrama de um biofilme em dispositivo médico. (a) microrganismos planctônicos podem ser detectados pelos anticorpos e fagocitose e são suscetíveis aos antibióticos. (b) células microbianas aderentes formam biofilmes preferencialmente em superfícies inertes, e essas comunidades são resistentes aos anticorpos, fagócitos e antibióticos. (c) Fagócitos são atraídos para o biofilme, embora a fagocitose seja frustrada, mas enzimas fagocíticas são liberadas. (d) enzimas fagocíticas danificam o tecido em torno do biofilme e microrganismos são liberados do biofilme, causando disseminação e infecção aguda no tecido vizinho (adaptado de COSTERTON et al..1999).

Atualmente, apesar da evidência epidemiológica, o processo exato pelo qual organismos associados a biofilme podem provocar doença no hospedeiro humano ainda é mal compreendido. Alguns mecanismos sugeridos relatam que células fagocíticas têm dificuldade em ingerir os microrganismos em um biofilme, devido às propriedades antifagocíticas da matriz do biofilme (HABASH; REID, 1999; WILSON, 2001). Na ausência de anticorpos específicos, a matriz do biofilme bloqueia a ativação do complemento, ao passo que se os anticorpos estiverem presentes, a matriz polimérica, geralmente os torna ineficazes. Tem sido demonstrado que a matriz do biofilme também é capaz de inibir a quimiotaxia e degranulação de polimorfonucleares e macrófagos, sendo também capaz de deprimir a resposta linfoproliferativa de monócitos ativadores policlonais (MAH; O'TOOLE, 2004). A separação de células ou agregados celulares de biofilmes do dispositivo médico resulta em infecções da corrente sanguínea ou do trato urinário e a resistência ao sistema imunológico do hospedeiro, tornando o biofilme uma fonte de geração de organismos resistentes. O processo pode ser particularmente relevante para os pacientes imunodeficientes, que têm diminuída capacidade de combater os organismos invasores.

1.1.5 Métodos de estudo de biofilme

A primeira abordagem para estudos *in vitro* de adesão inclui ensaios estáticos, quer adesão ao fundo dos poços de microplacas ou de materiais representante das superfícies. Enumeração das células aderidas tem sido realizada através de vários métodos diferentes, quer direta ou indiretamente. Incluídos nos métodos diretos são as observações de microscópio de luz e de fluorescência, microscópio invertido (WILLIAMS et al., 1998) e digitalização por microscópio eletrônico de varredura (MEV). Esta técnica utiliza solvente (álcool, acetona e xileno) para desidratar gradualmente o modelo antes do exame, pois a água de hidratação não é compatível com o vácuo usado com o feixe de elétrons. Isso resulta em distorção significativa da amostra e artefatos; as substâncias poliméricas extracelulares, que são cerca de 95% de água (CHARACKLIS; MARSHALL, 1990), vão aparecer mais como fibras do que como matriz gelatinosa que cerca as células. Entretanto, apesar de suas limitações, mas graças à sua excelente resolução, o microscópio eletrônico de varredura continua a ser uma ferramenta importante para observação do biofilme. A Figura 3 mostra uma imagem típica de um biofilme obtida por MEV.

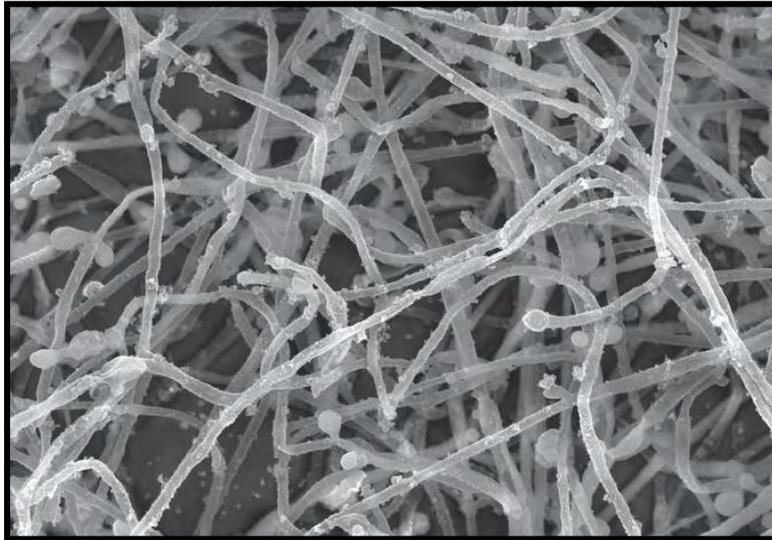


Figura 3. Microfotografia de biofilme de *Candida* (disponível em QUINDÓS et al., 2009).

O desenvolvimento do microscópio confocal de varredura a laser (CLSM) na década de 1980, possibilitou aos investigadores, a capacidade de examinar biofilmes *in situ* sem as limitações encontradas com o microscópio eletrônico de varredura. A utilização das técnicas CLSM (Figura 4) e microscopia de epifluorescência exigem que os organismos presentes no biofilme sejam marcados com corantes fluorescentes. Estas fluorescências são projetadas para emitir luz em comprimentos de onda específicos e podem ser usadas para sondar funções celulares específicas. Por exemplo, a marcação de ácidos nucleicos com o DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole), *acridinorange* e *Syto 9* irá evidenciar o DNA e RNA de todas as células, independentemente de sua viabilidade. Outros marcadores têm sido desenvolvidos para sondar a viabilidade celular. Iodeto de propídio marca membranas citoplasmáticas de células danificadas, e 5-ciano-2,3-tetrazólio ditolil é reduzida para 5-ciano-2,3-tetrazólio ditolil-formazana apenas por células que têm um funcionamento do sistema citocromo.

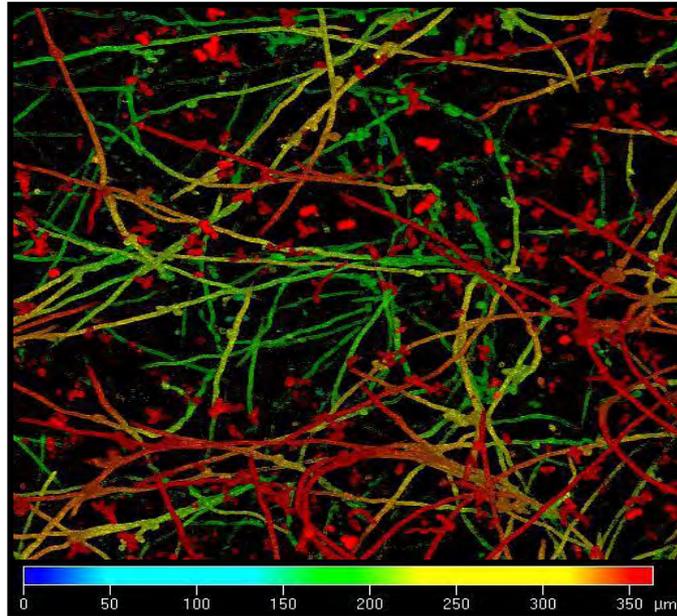


Figura 4. Biofilme de *Candida* marcado com fluorocromos.

Disponível em: www.physorg.com/news

Usando um conjunto de marcadores, podem-se quantificar todas as células e determinar quais são viáveis no biofilme. O fluorocromo FUN-1 [2-cloro-4-(2,3-(dihidro-3-metil) benzo -1,3-tiazol-2 metilideno)-1-fenilquinolinio iodado] entra nas células por difusão passiva e, nas células viáveis e metabolicamente ativas é concentrado nos vacúolos gerando estruturas cilíndricas e intravacuolares, sendo convertido numa sonda fluorescente vermelha nas células metabolicamente ativas (MILLARD et al., 1997). À medida que as células vão se tornando metabolicamente inativas, a cor vermelha fluorescente fica cada vez mais esmaecida até um amarelo fluorescente difuso.

Outro corante, Concanavalina A, ou ConA liga-se à glicose e manose da parede celular e emite uma fluorescência verde. Os dois corantes têm sido usados em associação para visualização de biofilmes pela técnica de microscopia confocal a laser (CHANDRA et al., 2001).

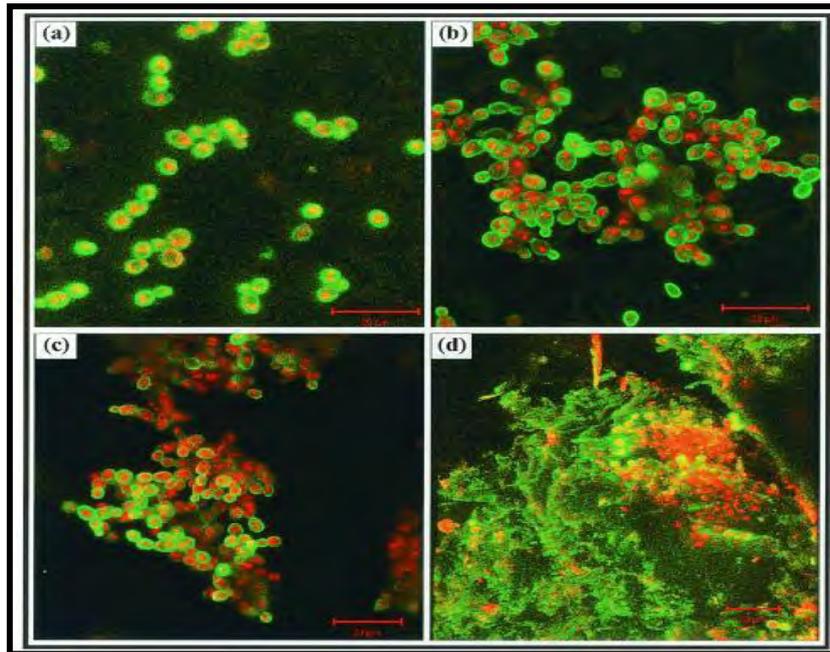


Figura 5. Fase inicial de desenvolvimento de biofilme com células de levedura marcadas com FUN-1 e ConA. Fluorescência verde intensa resultante da ligação de ConA a polissacárides delineando as paredes da levedura, enquanto a cor vermelha, devido à coloração FUN-1, localiza densos agregados no citoplasma das células metabolicamente ativas (CHANDRA et al., 2001).

A determinação da atividade celular pode ser feita recorrendo-se a testes bioquímicos que medem a atividade de determinadas enzimas, ou a concentração de determinados produtos do metabolismo microbiano. Outra forma de avaliar atividade celular é medir a quantidade de substrato consumido num determinado período de tempo. A determinação do consumo de glicose como forma de avaliar a atividade metabólica de leveduras tem sido descrita na literatura. A quantificação da glicose existente no meio de crescimento pode ser feita por métodos enzimáticos ou através de métodos que envolvem a quantificação dos açúcares redutores (RIESELMAN; HAZEN; CUTLER, 2000).

Além disso, os métodos colorimétricos são popularmente utilizados na avaliação da viabilidade celular e o uso de sais de tetrazólio (hidróxido de tetrazólio – XTT - 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfenyl)-5-[(Phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium-hydroxide e brometo de difeniltetrazólio – MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] representam uma das metodologias mais difundidas. Os sais de tetrazólio são compostos orgânicos heterocíclicos que substituem o aceitador normal de elétrons (O_2) nos processos biológicos de redução. Estes sais são reduzidos à derivados do formazano através

da aceitação de elétrons por ação enzimática (de substâncias do sistema de transporte de hidrogênio), ou por ação química (de transportadores de elétrons artificiais). Os transportadores de elétrons artificiais utilizados comumente são a menadiona ou metassulfato de fenazina e têm como função promover a reação entre as células e o sal utilizado (HAWSER et al., 1998). Os sais de tetrazólio, de cor amarela, penetram rapidamente nas células intactas e, através da atividade de succinato desidrogenase mitocondrial são convertidos a derivados de formazano de cor púrpura que é quantificado fotometricamente e relacionado com o número de células viáveis (HAWSER, 1996; RAMAGE et al., 2001). Ao contrário do MTT, o formazano produto do XTT é solúvel em água. Dessa forma, o ensaio XTT não necessita do processo de solubilização, o que permite a obtenção dos resultados em aproximadamente 3h (dependendo da duração da incubação). O MTT necessita de uma incubação adicional *overnight*. Esses métodos têm sido útil no estudo de biofilmes, pois permitem efetuar estudos de sensibilidade e de viabilidade celular, sem que para tal seja necessário haver destruição da sua estrutura (DE LOGU et al., 2005; KROM et al., 2007).

1.1.6 Sensibilidades aos antifúngicos de células suspensas e de biofilmes

A avaliação da sensibilidade à antifúngicos é feita recorrendo-se à determinação da viabilidade, atividade ou crescimento de células de levedura quando em contacto com o agente. Devido ao elevado número de métodos utilizados na determinação da sensibilidade de leveduras, o *National Commitee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) estabeleceu um conjunto de procedimentos com o intuito de normalizar as metodologias utilizadas. A Norma M27 foi proposta em 1992 depois de vários centros de investigação terem correlacionado dados relativos a fatores essenciais na reprodutibilidade de ensaios interlaboratoriais de determinação de sensibilidade. A introdução do documento inicial M27-A, em 1997, definiu o conceito de concentração inibitória mínima (CIM ou MIC – *Minimal inhibitory concentration*), como sendo a mais baixa concentração de um agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um microrganismo em meio sólido ou numa diluição feita em meio líquido. Além disso, os testes de sensibilidade podem ser influenciados por determinados fatores onde se incluem o tamanho do inóculo utilizado, o tempo e a temperatura de incubação do microrganismo, além do tipo e o pH do meio de cultura empregado (BARRY et al., 2002).

O ensaio de microdiluição para avaliação do perfil de sensibilidade para leveduras preconizado pelo NCCLS (atualmente CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*)

revisto para M27-A3 tornou possível a reprodutibilidade e comparação do perfil de sensibilidade aos agentes antifúngicos de leveduras patogênicas, sendo utilizado como método de referência (CLSI, 2008), para determinação da CIM para o modo planctônico de crescimento de leveduras. Os métodos colorimétricos, que se baseiam na determinação de mudanças de coloração permitindo uma melhor avaliação da concentração em que o antifúngico deixa de atuar, vêm sendo utilizados na determinação de CIM para o modo de crescimento em biofilme de *Candida*. De acordo com a metodologia atual, a CIM de células flutuantes é comparada com a de 24 – 48 h no modo biofilme (HAWSER; DOUGLAS, 1995; RAMAGE et al., 2001; CHANDRA et al., 2001b; LAMFON et al., 2004; CHOI et al., 2007).

Outro padrão para teste de sensibilidade de leveduras é o europeu preconizado pelo *Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST)* do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*, documento EDef 7.1, versão final publicada em 2007, que tem pontos de corte estabelecidos de acordo com as espécies e a relação entre critérios farmacocinéticos e farmacodinâmicos e distribuição de CIMs e tem-se mostrado equivalente ao documento M27-A3.

1.1.6.1 Agentes antifúngicos

Os agentes antifúngicos usados no tratamento de micoses invasivas são classificados de acordo com o tipo de ação que exercem sobre as células dos fungos, sendo os principais pontos de intervenção mostrados na Fig. 6. Nas classes mais comumente utilizadas encontram-se, os polienos (ex. anfotericina B, nistatina); os análogos de nucleosídeos (pirimidinas-fluorotinas, ex. 5-fluorocitosina), os azóis (ex. miconazol, cetoconazol, fluconazol e itraconazol), as pneumocandinas-equinocandinas, as pradimicinas-benanomicinas, nicomicinas, alilaminas e tiocarbamatos (ANDRIOLE, 1999).

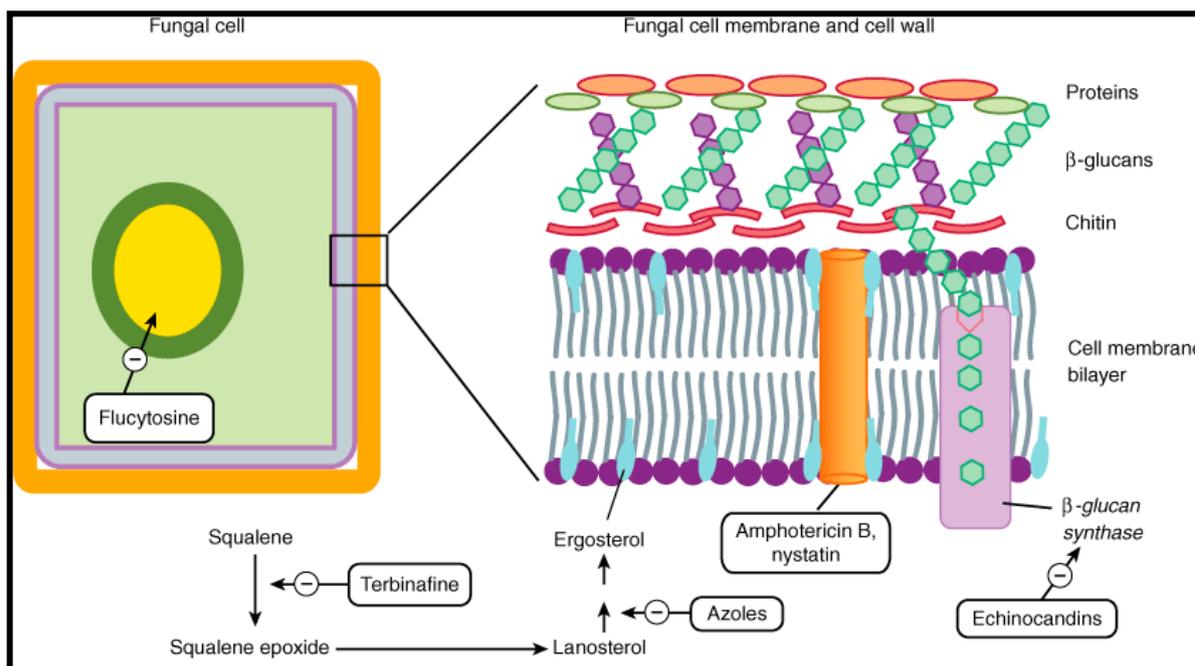


Figura 6. Mecanismos de ação dos principais agentes antimicóticos (baseado em KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2007).

1.1.6.1.1 Agentes antifúngicos que afetam os esteróis

Os três principais grupos de agentes antifúngicos em uso clínico, azóis, polienos e alilaminas/tiocarbamatos, devem sua atividade antifúngica à inibição da síntese ou da interação direta com o ergosterol, que é o componente predominante da membrana da célula fúngica (NOZAWA; MORITA, 1986).

a) Agentes antifúngicos baseados nos azóis.

Os primeiros relatórios das propriedades antifúngicas de N-imidazólicos substituídos foram publicados na década de 1960 (HOLT, 1980; SHEEHAN; HITCHCOCK; SIBLEY, 1999). Estes compostos originais, como miconazol e econazol, e aqueles que se seguiram, tais como o cetoconazol, fluconazol e itraconazol, provaram ser importantes para combater as infecções fúngicas humanas. A eficácia clínica e a segurança de fluconazol, em particular, resultaram em uso difundido. A emergência resultante da resistência à azóis tem intensificado a busca por novos compostos que são ativos contra organismos resistentes (HECTOR, 1993; KHOT et al., 2006; YEATER et al., 2007).

O voriconazol é um novo antifúngico triazólico com potente ação e largo espectro de atividade *in vitro*; atua como outros antifúngicos azólicos inibindo a enzima 14 alfa-desmetilase, dependente do citocromo P-450, essencial para a biossíntese de ergosterol. O

voriconazol é ativo *in vitro* frente a uma série de infecções fúngicas em modelos animais, incluindo infecções sistêmicas com *Aspergillus* sp, e *Candida* sp menos sensíveis a outros azólicos, e *C. neoformans* (KAPPE, 1999; MANAVATHU et al., 2000).

Ergosterol serve como um biorregulador da fluidez da membrana e da assimetria e, conseqüentemente, da integridade da membrana das células fúngicas (NOZAWA; MORITA, 1986). Várias linhas de evidência sugerem que o alvo primário dos compostos azólicos, tais como fluconazol, itraconazol e voriconazol, é a enzima citocromo P-450-dependente, lanosterol demetilase (14 α -demetilase), a qual está envolvida na conversão do lanosterol à ergosterol (HITCHCOCK, 1990; SANATI et al., 1997). A inibição de tal enzima conduz à depleção do ergosterol e acúmulo de precursores de esteróis, incluindo 14 α -esteróis metilados (lanosterol; 4,14-dimetilzimosterol e 24-metilenodihidrolanosterol), resultando na formação de uma membrana plasmática com alterações de estrutura e função. Dados convincentes em apoio a este mecanismo de ação vem de estudos em que Geber et al., 1995, clonaram os genes estruturais que codificavam a 14 α -metil demetilase esterol (ERG11) e a delta 5,6 esterol desaturase (ERG3) de *C. glabrata* e os usaram para criar mutantes de cada gene individualmente e de ambos os genes. Análises fenotípicas revelaram que a supressão ERG3 mutante permaneceu sensível ao fluconazol e itraconazol. Em contraste, a supressão ERG11 mutante e um duplo mutante em que ambos os genes foram excluídos eram resistentes a 100, 16 e 2 mg por mL de fluconazol, itraconazol e anfotericina B, respectivamente, sugerindo uma interação inibitória entre esses antifúngicos e 14 α -demetilase.

Embora os azóis mais recentes sejam inibidores da enzima 14 α -demetilase, existe uma heterogeneidade de ação entre estes antifúngicos (HITCHCOCK; WHITTLE, 1993; MCGINNIS; RINALDI, 1996; KINOBE et al., 2006). Os derivados imidazólicos anteriores (como o miconazol, econazol e cetoconazol) têm um complexo modo de ação, inibindo várias enzimas vinculadas à membrana, bem como a biossíntese da membrana lipídica (HITCHCOCK; WHITTLE, 1993; SHEEHAN et al., 1999). A acumulação da síntese do zimosterol e esqualeno foi observada quando as células de *C. albicans* foram tratadas com voriconazol (SANATI et al., 1997), embora não esteja claro se o voriconazol inibe enzimas envolvidas na síntese de ergosterol ou tem efeitos secundários à inibição de 14 α -demetilase. A síntese do colesterol de mamíferos também está bloqueada pelos azóis na fase de 14 α -demetilação; no entanto, a dose necessária para efetuar inibição é muito maior do que a necessária para fungos (GHANNOUM; RICE, 1999), sendo que os efeitos clínicos de inibição da biossíntese de esteróis de humanos são mais proeminentes com

cetoconazol. A Figura 7 mostra um resumo da via de biossíntese do ergosterol apontando os locais de ação de antifúngicos inibidores desse processo.

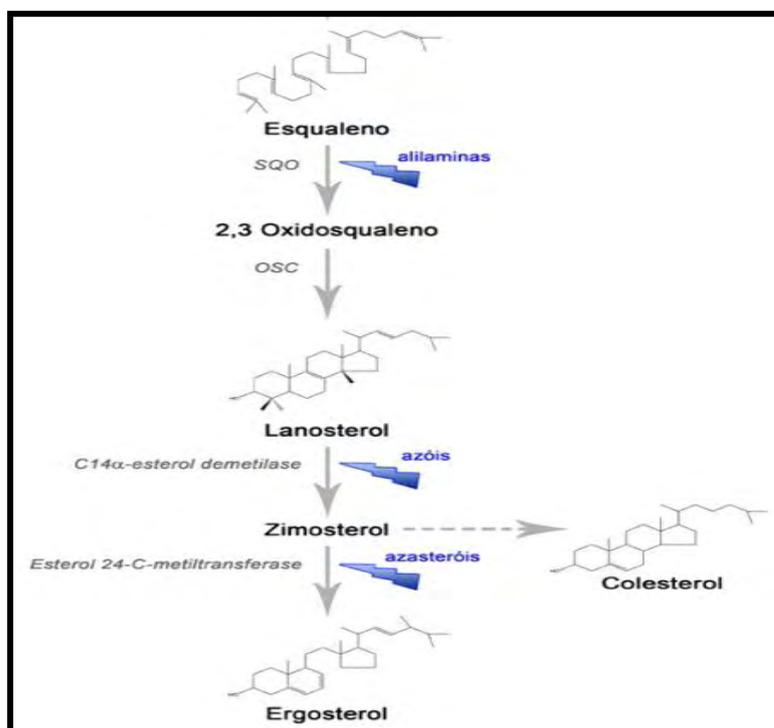


Figura 7. Via de biossíntese do ergosterol. Demonstração dos vários pontos onde os antifúngicos podem exercer sua atividade inibitória. (disponível em www.fiocruz.br).

1.1.6.1.2 Agentes antifúngicos poliênicos

De 1950 até a descoberta dos azóis, os antifúngicos poliênicos representavam o padrão de terapia sistêmica para infecções fúngicas (SUGAR, 1986). Anfotericina A e B são antibióticos antifúngicos produzidos por *Streptomyces nodosus*, embora a anfotericina A não esteja em uso clínico. Há uma associação entre sensibilidade à polienos e presença de esteróis na membrana celular. Para a anfotericina B, foi proposto que a interação de esterol da membrana com o antifúngico resulta na produção de um anel formado por oito moléculas de anfotericina B ligadas hidrofobicamente aos esteróis da membrana (HOLZ, 1974) (Fig. 9). Esta configuração dá origem a um poro no qual a hidroxila dos resíduos de polieno cria uma interface, alterando a permeabilidade, com fuga de componentes vitais citoplasmáticos e morte do organismo (RAO; DAS; PRASAD, 1985). A composição dos ácidos graxos constituintes dos fosfolipídeos da membrana também foi implicada na sensibilidade aos polienos (RAO, TRIVEDI, PRASAD, 1985).

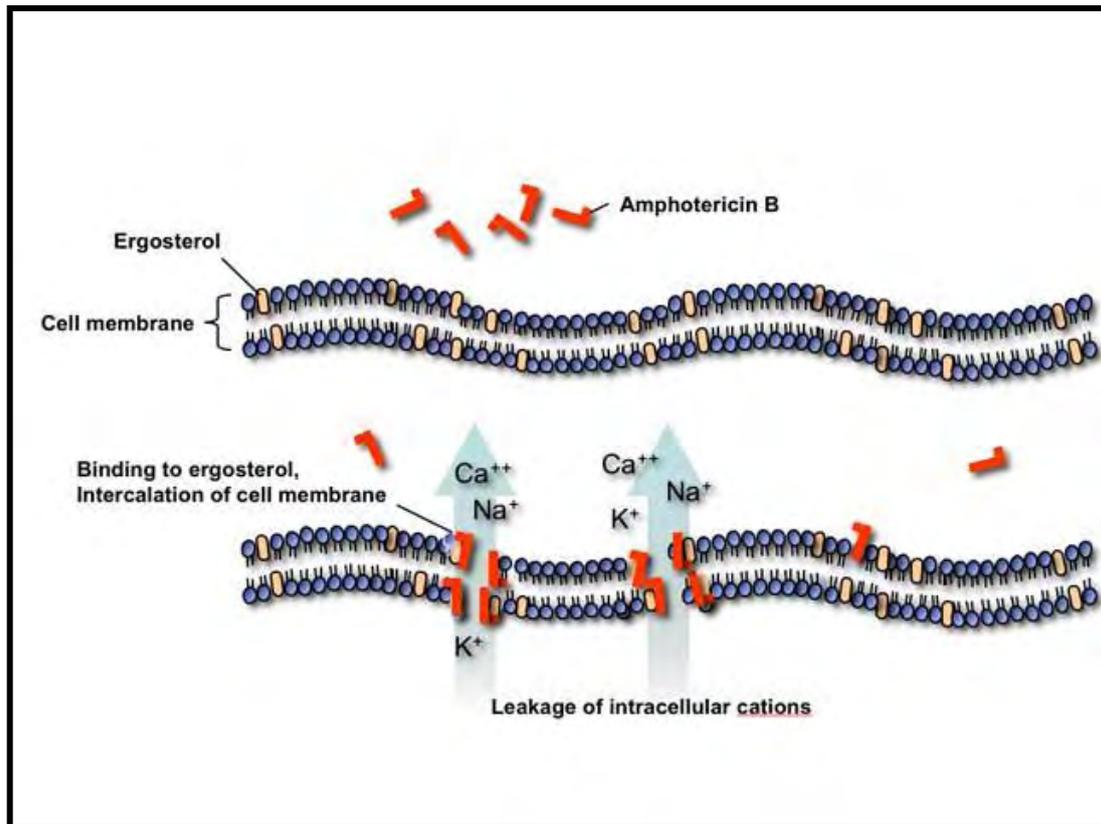


Figura 8. Interação entre anfotericina B e ergosterol da célula fúngica.
Disponível em: www.doctorfungus.org

1.1.6.1.3 Agentes antimicrobianos inibidores de síntese de glucanas

Equinocandinas, que são lipopeptídeos, têm atividade fungicida *in vitro* e *in vivo* contra espécies de *Candida* e *Aspergillus* (DIEKEMA et al., 2003; WALSH et al., 2000; GUPTA; TOMAS, 2003) e são inibidores específicos da β -1,3-glucano sintetase, uma grande proteína de membrana (210kDa) heterodimérica (GROLL; WALSH, 2001), embora sem afetar a síntese de ácidos nucleicos ou de manana (WALSH et al., 2000; GUPTA; TOMAS, 2003). Inibidores da síntese de glucano também têm efeitos secundários sobre outros componentes de células intactas, incluindo uma redução do teor de ergosterol e lanosterol e um aumento do teor de quitina da parede celular (GROLL; WALSH, 2001). A caspofungina é a primeira equinocandina aprovada pela *Federal Drug Administration* e Agência Europeia de Medicamento para o tratamento da aspergilose invasiva em pacientes que não respondem ou toleram o tratamento antifúngico convencional, e para a candidíase invasiva em adultos não neutropênicos (CORNELLY; SCHMITZ; AISENBREY, 2002). A Fig.9 mostra esquematicamente o mecanismo dos inibidores de glucanas.

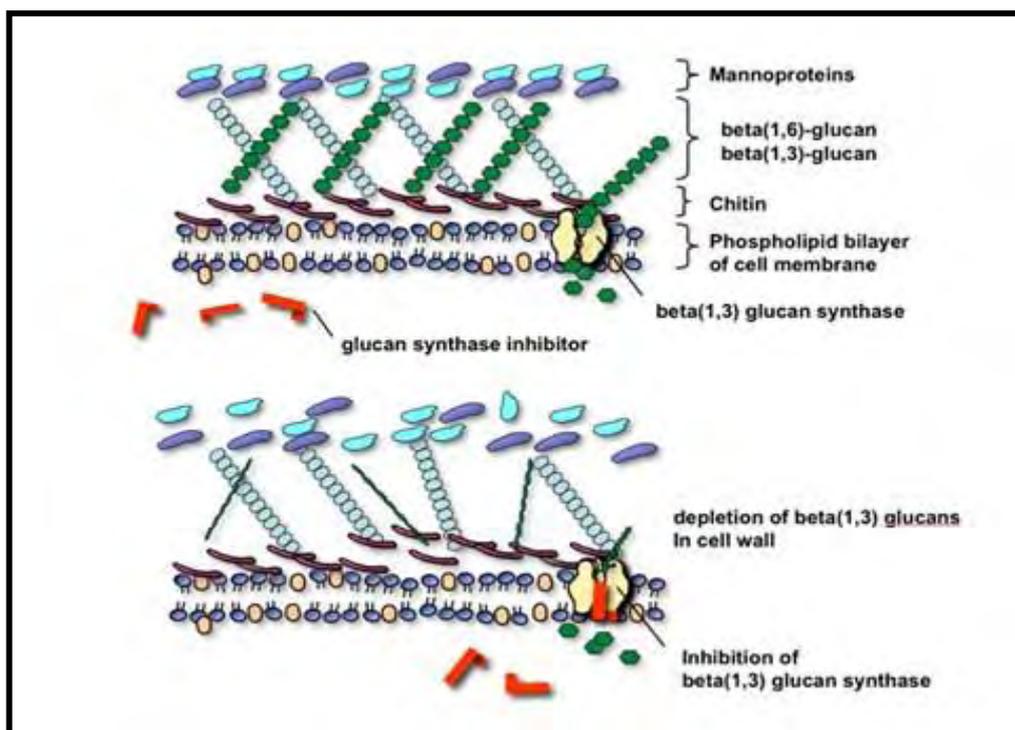


Figura 9. Esquematização do mecanismo dos inibidores de glucana sintetase. Disponível em: www.doctorfungus.org

Na realização deste estudo foram escolhidos os antifúngicos mais frequentes na prática clínica, fluconazol e anfotericina B. A introdução, no cenário literário, de novos antifúngicos levou-se a acrescentar também voriconazol para avaliação da atividade antifúngica de biofilmes.

1.1.7 Resistência antifúngica

Desde 1970, a resistência antimicrobiana aumentou significativamente, em associação com várias mudanças na prática médica tais como a utilização de terapias que deprimem o sistema imunológico, o uso frequente e muitas vezes indiscriminado de agentes antimicrobianos de amplo espectro, o uso comum de dispositivos intravenosos, e o surgimento de doenças crônicas imunossupressoras tais como a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), havendo, também conseqüente aumento de infecções fúngicas (BECK-SAGUÉ, 1993).

A previsibilidade de sucesso clínico ou falha na resposta à administração de um agente antifúngico específico é dependente de seu CIM, embora outros fatores (doses inadequadas; absorção, distribuição ou metabolismo deficientes; interações medicamentosas; neutropenia grave; presença de dispositivos médicos, local de infecção) também tenham um

impacto significativo sobre a probabilidade de sucesso terapêutico (CANUTO; RODERO, 2002). Com base nos dados atualmente disponíveis, parece que a resistência adequada medida *in vitro* frequentemente se correlaciona com a falha no tratamento clínico (REX et al., 1996).

São bem documentados os relatos de resistência aos azóis. Cepas resistentes podem apresentar uma alteração na qualidade ou na quantidade de enzima-alvo, acesso reduzido ao alvo, ou alguma combinação desses mecanismos. Estes mecanismos são resumidos na Fig. 10 e Tabela 2.

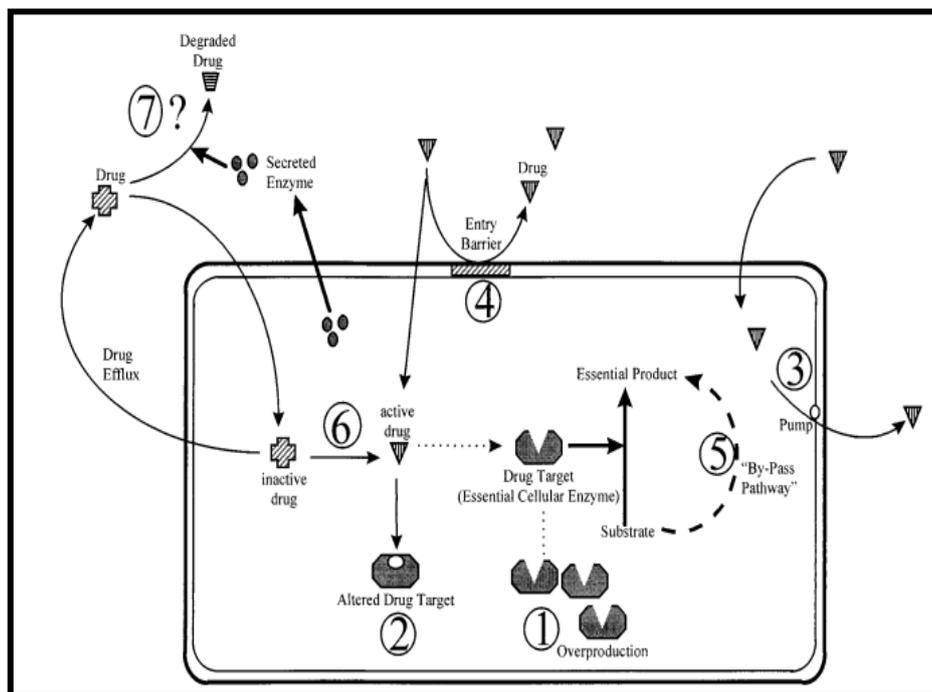


Figura 10. Mecanismos de resistência à drogas. 1.A enzima-alvo é superproduzida, para que o medicamento não iniba a reação bioquímica completamente. 2.O alvo da droga é alterado impossibilitando-a de agir. 3.A droga é bombeada por uma bomba de efluxo. 4.A entrada da droga é evitada na membrana /parede celular. 5.A célula tem uma via de circulação que compensa a perda de função devido a inibição da atividade da droga. 6.Alguns fungos inibem os mecanismos que convertem uma droga inativa em sua forma ativa. 7.A célula segrega algumas enzimas para o meio extracelular, que degradam a droga (baseado em GHANNOUM; RICE, 1999).

Tabela 2 . Bases bioquímicas da resistência aos azóis.

Mecanismo	Causado por:	Comentários
Alterações no sítio de ação (14α-demetilase)	Mutações que alteram a ligação à droga mas não a ligação ao substrato endógeno	Alvo está ativo (isto é, podem catalisar a demetilação), mas tem uma afinidade reduzida para azóis
Alteração na biosíntese de esterol	Danos na $\Delta^{5(6)}$ -desaturase	Resulta no acúmulo de 14-metil fecosterol em vez de ergosterol
Redução na concentração intercelular da enzima alvo	Alteração de lipídeos e esteróis na membrana; superexpressão de bombas de efluxo de drogas específicas	Pouca penetração através da membrana fúngica; ativação de efluxo da droga
Superexpressão do alvo de droga antifúngica	Aumento do número de cópias da enzima alvo	Resulta em aumento da síntese de ergosterol, contribui para uma resistência cruzada entre fluconazol e itraconazol

Fonte: GHANNOUM; RICE, 1999.

Casos de insucesso terapêutico com anfotericina B têm sido relatados bem como casos de espécies de *Candida* resistentes foram publicados entre 1968 e 1985 (BODENHOFF, 1969; DICK; MERZ; SARAL, 1980; DICK et al.,1985), embora tais relatos tenham-se baseados em testes executados com técnica não padronizada. A partir de 1997, com a disponibilidade de técnica padronizada, M27-A2, NCCLS, os testes de *Candida* spp a anfotericina B geraram interpretações conflitantes porque não se definiram os pontos de corte que permitiam classificar os isolados como sensíveis ou resistentes à anfotericina B (ELLIS, 2002; LOEFLER; STEVENS, 2003; HOSPENTHAL; MURRAY; RINALDI, 2004), embora se tenha sugerido que CIMs > 1 μ g/mL se relacionassem com resistência (PAPPAS et al., 2004; SPELBERG; FILLER; EDWARDS JR, 2006). Todavia, falhas à terapêutica com anfotericina B continuam a ser relatadas, com isolado evidenciando, majoritariamente, insensibilidade *in vitro* a este poliênico (NGUYEN et al., 1998; REX et al., 2001; HOSPENTHAL; MURRAY; RINALDI, 2004) .

A resistência à anfotericina B parece estar ligada à biossíntese de ergosterol, a qual é composta de muitos genes cujos produtos são necessários para converter acetil-coenzima A em ergosterol. O gene ERG6 codifica uma S-adenosilmetionina, delta 24-metiltransferase e tem sido isolada de leveduras tais como *C. albicans* e *Saccharomyces*

cerevisiae. Cepas mutantes ERG6 exibem múltiplos fenótipos, incluindo resistência aumentada para polienos, diminuição do teor de ergosterol e aumentada sensibilidade à cicloheximida (GABER et al., 1989; JENSEN-PERGAKES et al., 1998). Mudança no teor de ergosterol, substituição ou reorientação do ergosterol na membrana celular, resulta em interferência estérica do ergosterol provocando diminuição/ausência na interação anfotericina-B e ergosterol o que reflete em diminuição da atividade do polieno (SOKOL-ANDERSON et al., 1988; NOLTE et al., 1997). Essas alterações podem estar relacionadas à mutações no gene ERG2 ou ERG3 e, normalmente, a resistência à polienos é difícil de se detectar porque é expressa apenas em resposta ao estresse, e as células reverterem para um fenótipo susceptível quando o estresse é removido (VANDEN BOSSCHE, 1994).

O mecanismo de resistência intrínseca à caspofungina foi estudado em fungos em que esta droga está inativa, como *S. cerevisiae*, e parece estar relacionada com a superexpressão da proteína Sbe_p (proteína de transporte) do Golgi controlada pelo gene GAL₁, que regula mecanismos de transporte de componentes da parede celular fúngica. Isso explicaria a resistência natural de alguns fungos a este antifúngico. Não foram observadas variações significativas na sensibilidade da caspofungina contra cepas de *Candida* expostas à concentração sub-inibitória da droga (DERESINSKI; STEVENS, 2003), embora Dizbay et al., 2009, ao analisarem 35 episódios de candidemia, onde houve prevalência de *Candida parapsilosis* (77,1%), relataram que 5,7% dos mesmos eram resistentes à fluconazol e caspofungina.

Uma das conseqüências mais importantes do modo de crescimento em biofilme é a marcada resistência para grande número de agentes antifúngicos, nos quais se incluem a anfotericina B (AMB), fluconazol, itraconazol e cetoconazol (BAILLIE; DOUGLAS, 1998, CHANDRA et al., 2001; HAWSER; DOUGLAS, 1995). Alguns estudos, entretanto, sugerem que novas formulações de antifúngicos, como equinocandinas e lipo formulações da AMB são mais ativos contra biofilmes de *Candida* (BACHMANN et al., 2002; KUHN et al., 2002). A resistência antimicrobiana dos biofilmes tem sido atribuída a: elevada densidade de células dentro do biofilme; limitações difusionais da matriz; diminuição da taxa de crescimento e limitação de nutrientes; a expressão de genes estruturais comunitários, nomeadamente codificação das bombas de efluxo e a presença de células “persistentes” (BAILLIE; DOUGLAS, 2000; MAH; O'TOOLE, 2004; SENEVIRATNE; SAMARANAYAKE, 2008).

A matriz ou substância exopolimérica (EPS) produzida envolve a comunidade de células sésseis e, esta pode agir como uma barreira para a difusão de antibióticos e/ou como resina de troca iônica que se liga à moléculas de antibióticos carregadas (HAWSER,

BAILLIE; DOUGLAS, 1998). Estudo prévio que examinou os efeitos da taxa de crescimento e limitação de nutrientes em relação à resistência a drogas em biofilmes de *Candida* spp., indicou que a resistência à droga coincidia com o nível de maturação do biofilme (CHANDRA et al., 2001). Sob condições planctônicas, um dos principais mecanismos através do qual se desenvolve resistência aos azólicos em *Candida* spp. é ativação de efluxo destas drogas mediadas pelo transportador ABC (*ATP Binding Cassete*) e proteínas facilitadoras (WHITE; MARR; BOWDEN, 1998). A expressão dos genes que codificam ambos os tipos de bombas de efluxo foi encontrada durante as diferentes fases de desenvolvimento de biofilme, tanto *in vitro* como *in vivo* (RAMAGE et al., 2002; MUKHERJEE et al., 2003). Entretanto, biofilmes formados por cepas mutantes nos quais foram excluídos genes que codificavam as bombas de efluxo mantinham seu fenótipo resistente, apesar de serem mais suscetíveis durante o início de adesão do que na fase de formação de biofilme (MUKHERJEE et al., 2003, RAMAGE et al., 2002), embora, esta observação de resistência provavelmente represente um fenômeno fisiológico normal, pois dentro de biofilme, há superexpressão de bombas de efluxo, pois essas são empregadas tanto como um meio de absorção de nutrientes como de desintoxicação celular (DEL SORBO; SCHOONBEEK; WAARD; 2000; RAMAGE et al., 2002). Adicionalmente, análises revelaram que os níveis de ergosterol são significativamente diminuídos nas fases intermediárias e maduras de crescimento de biofilme em comparação com as fases iniciais de desenvolvimento (MUKHERJEE et al., 2003). Tomadas em conjunto, todas estas observações reforçam a idéia de que a resistência do biofilme é um fenômeno multifatorial.

1.1.8 Agentes químicos

Grande variedade de agentes químicos ativos (ou genericamente “biocidas”) tem sido utilizada por centenas de anos para anti-sepsia, desinfecção e preservação (RUTALA, 1996) em hospitais e em outros estabelecimentos relacionados aos cuidados de saúde. Dependendo da faixa de atividade antimicrobiana, outros termos podem ser mais específicos, como “-estática”, referindo-se aos agentes que inibem o crescimento (por exemplo, bacteriostático, fungistático) e “-cida”, referindo-se aos agentes que matam o organismo alvo (por exemplo, bactericida, fungicida e virucida).

São definidos como anti-sépticos os biocidas ou produtos que destroem ou inibem o crescimento de microrganismos em/ou sobre tecidos vivos (por exemplo, mãos de profissionais de saúde). O termo desinfecção deverá ser entendido como um processo de

eliminação ou destruição de todos os microrganismos na forma vegetativa, independente de serem patogênicos ou não, presentes nos artigos e objetos inanimados. A destruição de algumas bactérias na forma esporulada também pode ocorrer, mas não se tem o controle e a garantia desse resultado, subentendendo-se o uso de agentes químicos, cujos princípios ativos permitidos pelo Ministério da Saúde, através da Portaria número 15 de 1988 são: os aldeídos, fenólicos, quaternário de amônia, compostos orgânicos liberados de cloro ativo, iodo e derivados, álcoois e glicóis, biguanidas e outros, desde que atendam à legislação específica. Esterilização se refere a um processo físico ou químico que destrói inteiramente ou remove toda a vida microbiana, incluindo esporos e, preservação é a prevenção da multiplicação de microrganismos em produtos formulados, incluindo farmacêuticos e alimentos. Alguns biocidas também são utilizados para efeitos de limpeza, que, nestes casos, refere-se à eliminação física de microrganismos de uma superfície externa (BLOCK, 1991).

Uma variedade de técnicas tem sido descrita para estudar os mecanismos de ação dos anti-sépticos e desinfetantes sobre os microrganismos, especialmente bactérias (RUSSELL; FURR; MAILLARD, 1997). Muitos desses procedimentos mostraram-se valiosos na detecção e avaliação de anti-sépticos ou desinfetantes utilizados em combinação (HODGES; HANLON, 1991), sendo que técnicas semelhantes têm sido usadas para estudar a atividade de anti-sépticos e desinfetantes contra fungos, em particular leveduras. Além disso, estudos sobre a porosidade da parede celular (DE NOBEL et al., 1990), têm fornecido informações úteis sobre a entrada intracelular de biocidas (HIOM et al., 1996).

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é biocida amplamente utilizado para a desinfecção, esterilização e anti-sepsia. É usado como desinfetante em concentração de 3%, para superfícies não orgânicas. Degrada-se rapidamente na água em produtos inócuos e oxigênio. Embora soluções puras sejam geralmente mais estáveis, contêm estabilizadores para evitar a decomposição. Além disso, H_2O_2 demonstra amplo espectro de eficácia contra vírus, leveduras e bactérias, inclusive as esporuladas (RUSSEL, 1982). Em geral, maior atividade é observada contra bactérias gram-positivas, porém, a presença de peroxidases pode aumentar a tolerância em concentrações mais baixas, visto que maiores concentrações de H_2O_2 (10 a 30%) e maior tempo de contato são necessários para atividade antiesporos (DENYER; STEWART, 1998). Sua ação oxidante se dá por produção de radicais hidroxilas livres (-OH) que atacam componentes celulares essenciais, como os lipídeos, proteínas e DNA. Também foi proposto que ligações insaturadas e grupos sulfidríla expostos são particularmente visados (BLOCK, 1991).

Ácido peracético (PAA) (CH_3COOOH) é considerado um biocida mais potente que o peróxido de hidrogênio, sendo antiesporos, bactericida, viricida e fungicida em baixas concentrações (0,3%) (BLOCK, 1991). PAA também se decompõe em produtos (ácido acético, água, oxigênio e peróxido de hidrogênio) biodegradáveis, embora tenha a vantagem adicional de estar livre de decomposição por peroxidases (MALCHESKY, 1993). Sua principal aplicação é como um esterilizante para os dispositivos médicos, espaços flexíveis, e hemodializadores, mas também é usado como esterilizante ambiental de superfície (CAPPELLI et al., 2003). Semelhantemente ao H_2O_2 , PAA provavelmente desnatura proteínas e enzimas além de aumentar a permeabilidade da parede celular, rompendo ligações sulfidríla (-SH) e dissulfeto (S-S) (MALCHESKY, 1993). A Portaria nº 15 da ANVISA, de 23 de agosto de 1988, inclui no subanexo 1, alínea I, este princípio ativo para uso com finalidade desinfetante e esterilizante.

O mais importante tipo de agente liberador de cloro é o hipoclorito de sódio (água sanitária) que é amplamente utilizado para desinfecção de superfície dura e pode ser utilizado para a desinfecção dos derramamentos de sangue contendo os vírus da CIDA ou da hepatite B. Na água, hipoclorito de sódio ioniza para produzir o cátion Na^+ e o ânion hipoclorito, ClO^- , que estabelece um equilíbrio com o ácido hipocloroso, HClO . No pH entre 4 e 7, o cloro existe predominantemente como HClO , a molécula ativa, enquanto que acima de $\text{pH}=9$, ClO^- predomina. O cloro ativo, liberado pelo ácido hipocloroso, ao entrar em contato com as proteínas tissulares, forma nitrogênio, formaldeído e acetaldeído. Como consequência ocorre a quebra da cadeia de peptídios resultando na dissolução das proteínas. Durante este processo, hidrogênio do grupamento amina (-HN) é substituído por cloro (-NCL) formando cloraminas, compostos de alta toxicidade, os quais interferem no metabolismo celular (ESTRELA, 2000; HAUMAN; LOVE, 2003). Algumas enzimas microbianas possuem cadeias laterais que terminam em grupamentos sulfidríla (SH). Essas enzimas somente exercem suas funções quando este grupamento se encontra livre e reduzido. O cloro age promovendo a oxidação irreversível do grupamento sulfidríla causando inativação das enzimas essenciais e consequentemente a morte celular (ESTRELA, 2000; HAUMAN; LOVE, 2003).

Em comparação com as bactérias, muito pouco é conhecido sobre as maneiras pelas quais os fungos podem burlar a ação dos anti-sépticos e desinfetantes (RUTALA, 1996). Há dois mecanismos gerais de resistência: a) resistência intrínseca ou natural: a parede celular representa uma barreira para reduzir ou excluir a entrada de um agente antimicrobiano e b) resistência adquirida. A Tabela 3 sumariza os tipos de mecanismos citados e os possíveis mecanismos envolvidos.

Tabela 3. Possíveis mecanismos de resistência fúngica aos antissépticos e desinfetantes.

Tipo de resistência	Possível mecanismo	Exemplo
<i>Intrínseca</i>	Exclusão	Clorexidina
	Inativação enzimática	Formaldeído
	Modulação fenotípica	Etanol
	Efluxo*	Não demonstrado até o momento
<i>Adquirida</i>	Mutação	Alguns preservativos
	Indução de efluxo	Alguns preservativos
	Resposta plasmídeo mediada	Não demonstrada até o momento

*Efluxo é um mecanismo conhecido para resistência fúngica à antibióticos (adaptado de MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

A associação de microrganismos com superfícies sólidas leva à geração de biofilmes, os quais são importantes por vários motivos, nomeadamente: biocorrosão, redução da qualidade da água e focos de contaminação de produtos de higiene (MCDONNELL; RUSSELL, 1999). Várias razões podem explicar a redução da sensibilidade dos microrganismos dentro de um biofilme: (a) redução ao acesso de um desinfetante/biocida às células dentro do biofilme; (b) interação química entre o desinfetante/biocida e o biofilme em si; (c) modulação do microambiente; (d) produção de enzimas de degradação e/ou produtos de neutralização; (e) troca genética entre as células de um biofilme.

Fatores em paralelo, incluindo a limpeza inadequada, uso incorreto do produto ou práticas de controle de infecção ineficazes, não podem ser subestimados (MCDONNELL; RUSSELL, 1999). Em vista das crescentes preocupações sobre o desenvolvimento de resistência aos biocidas e resistência cruzada com antimicrobianos, isolados clínicos devem estar sob vigilância contínua e os mecanismos possíveis devem ser investigados.

1.1.9 Atividade antimicrobiana de produtos naturais

A resistência dos biofilmes de *Candida* spp. frente aos antifúngicos atualmente utilizados, aliada à incidência de acometimento do patógeno, à condição monetária da população, à diminuição na disponibilidade de moléculas sintéticas, com características fungicidas e à questões econômicas envolvidas, reforça-se o interesse em alternativas, como as representadas por ingredientes ativos dos vegetais, dos quais se extraem os óleos e extratos, tornando-se substancialmente importante a viabilização de estudos e experimentos que colaborem no combate a tais microrganismos.

Como o Brasil é o país com a maior diversidade vegetal do mundo e conta com mais de 55.000 espécies vegetais catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (LORENZI, 2000), indústrias farmacêuticas e grupos de pesquisa direcionados ao desenvolvimento de novos produtos, sejam eles medicamentos, cosméticos ou produtos para a indústria química em geral têm demonstrado interesse nesse mercado abrangente. Assim, desde 1998 vem sendo realizada no Instituto de Botânica de São Paulo uma triagem de espécies nativas da Mata Atlântica e do Cerrado com metabólitos responsáveis por atividades fungitóxicas, antibacteriana, antitumoral e antioxidante. As espécies que mostram algumas dessas atividades são selecionadas para estudos fitoquímicos visando à identificação dos princípios ativos (MOTANARI; BOLZANI, 2001). Dados sobre a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, avaliada frente à microrganismos sensíveis e resistentes a antibióticos, bem como o possível efeito sinérgico da associação entre antibióticos e extratos vegetais, são relevantes, permitindo concluir que estudos mais detalhados sobre o uso terapêutico das plantas devem ser intensificados (NASCIMENTO et al., 2000).

Visando contribuir na busca de novos agentes antifúngicos para uma terapia alternativa ou futuramente para a elaboração de novos fármacos, na presente tese, selecionou-se algumas plantas, óleos essenciais e substância liquênica para testar possível atividade inibitória sobre as espécies de *C. parapsilosis*, no modo de crescimento planctônico e de biofilme.

1.1.9.1 Espécies vegetais

a) *Viguiera* é um gênero pertencente à família *Asteraceae* e à tribo *Heliantheae*, sendo um representante importante da flora brasileira, especialmente na área de cerrado onde é representada por aproximadamente 200 espécies (SCHILLING et al., 2000). Em 2004, Ambrosio et al., descreveram pela primeira vez a presença de grande quantidade de diterpenos da classe dos pimaranos nas raízes de *Viguiera arenaria* Baker, isolando-se sete diterpenos derivados do pimarano, sendo o ácido *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-óico, o *ent*-8(14),15-pimaradien-3 β -ol e o *ent*-8(14),15-pimaradien-3 β ,19-diol os principais metabólitos (Fig.11). O ácido pimárico foi relatado na literatura como capaz de inibir a agregação plaquetária em coelhos (CHEUNG et al., (1994)), capaz de inibir a enzima ciclo-oxigenase do tipo 2, agindo como um potente agente antiinflamatório (ULUBELEN et al., 1997), além de inibir a contração de artéria carótida de rato induzida por fenilefrina e KCl (AMBROSIO et al., 2002).

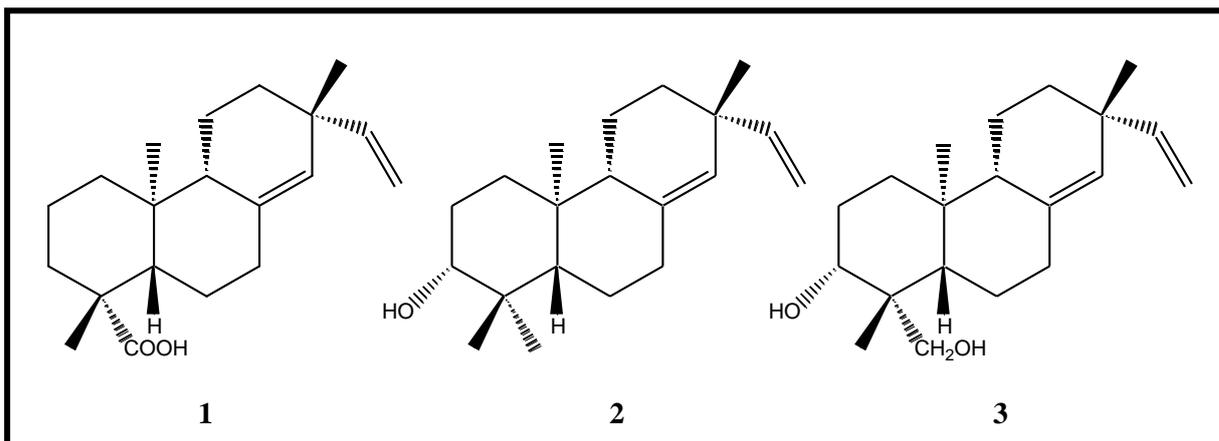


Figura 11. Principais diterpenos que constituem o extrato em diclorometano das raízes de *V. arenaria* Baker: ácido *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-óico (1), o *ent*-8(14),15-pimaradien-3β-ol (2) e o *ent*-8(14),15-pimaradien-3β,19-diol (3).

b) A família Celastraceae apresenta cerca de 1260 espécies, sendo agrupadas em 98 gêneros distintos (SIMMONS et al., 2008). *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., integrante da família Celastraceae é conhecida popularmente como Espinheira Santa e utilizada na medicina popular brasileira para o combate de afecções gastroduodenais. Atualmente há estudos que afirmam que a *M. ilicifolia* apresenta, também, atividades antineoplásica e antimicrobiana. Dentre as substâncias estudadas e classificadas na *Maytenus ilicifolia*, pode-se citar vários grupos, dentre eles os terpenos: maitenina, tringenona, isotengingona II, congorosinas A e B, ácido maitenóico (SANTOS-OLIVEIRA; COULAUD-CUNHA; COLACO, 2009).

A maitenina tem despertado interesse como droga para o tratamento do câncer, em função de sua baixa toxicidade e capacidade de potencializar outros quimioterápicos (CORSINO et al., 2000).

A pristimerina é um composto triterpenóides isolado de Celastraceae e Hippocrateaceae que tem mostrado tanto atividades antimicrobiana, antiinflamatória e antiperoxidase (DIRSCH et al., 1997), bem como efeitos antitumorais em vários tipos de cânceres humanos (COSTA et al., 2008).

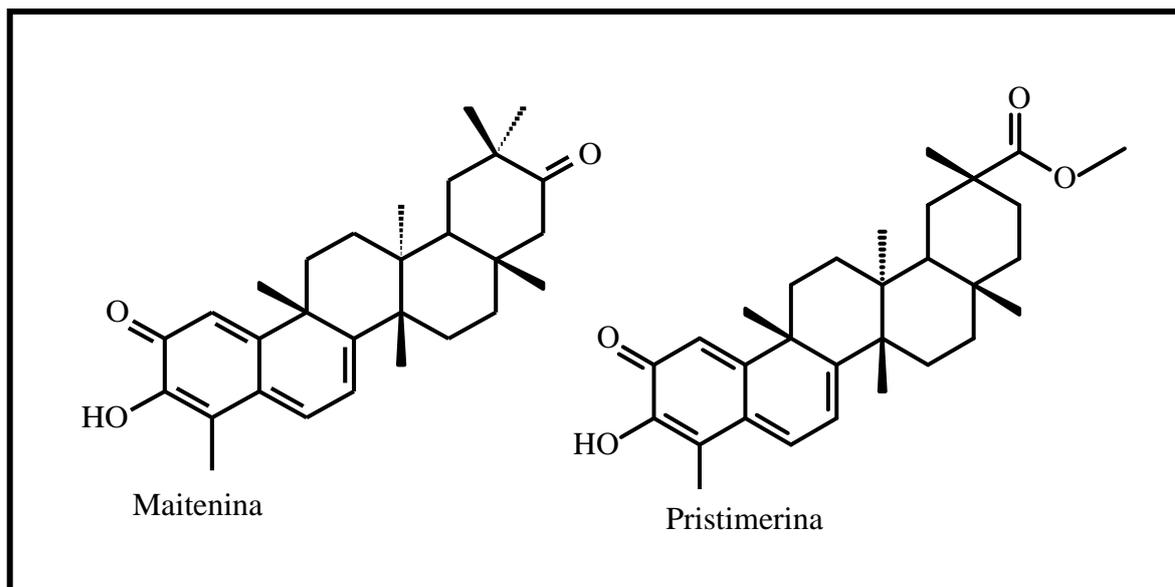


Figura 12. Estruturas moleculares de Maitenina e Pristimerina isoladas de extrato de *Maitenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.

c) *Pinus elliottii* e *Pinus tropical*

P. elliottii Engelm. var. *elliottii* é uma conífera pertencente à família Pinaceae de gimnospermas, característica pela produção de resina em todos os seus gêneros. Nativa do sudeste dos EUA, essa espécie, amplamente cultivada em plantações subtropicais do Brasil, Índia e China, é usada principalmente na produção de resina e na indústria moveleira. A resina sintetizada por espécies de coníferas é um exemplo de fonte natural abundante de terpenos, metabólitos secundários que constituem a maior família de produtos naturais existente, com cerca de 30.000 compostos. Além disso, alguns terpenos constituem metabólitos farmacologicamente importantes e outros são extensivamente empregados na indústria química fina de sabores e fragrâncias. O significado ecológico da síntese da resina está diretamente relacionado ao mecanismo de defesa da planta contra os insetos predadores da casca e seus fungos patogênicos, agentes responsáveis pelas principais doenças que afetam as espécies de coníferas. A partir do estabelecimento do primeiro orifício no tronco da árvore hospedeira, ocorre a exsudação da oleoresina, que funciona como o principal mecanismo de resistência (além da casca) aos organismos invasores (besouros), em função da sua toxicidade e ação inseticida. Após a evaporação dos compostos voláteis (terebintina) constituintes da resina em contato com a atmosfera, os compostos responsáveis por sua viscosidade (breu) polimerizam selando o ferimento e aumentando a possibilidade de aprisionamento dos organismos invasores. *P. elliottii*, possui a segunda melhor qualidade de terebintina

(aproximadamente 90% de pineno) e o segundo melhor rendimento de resina das espécies de *Pinus* (SHIMIZU; SPIR, 1999).

Alguns anos depois da implantação dos pinus sub-tropicais (*elliottii* e *taeda*), que se adaptaram ao clima da Região Sul do país, foram introduzidos os pinus tropicais nos Estados de São Paulo, Minas, Goiás, Mato Grosso e Bahia, provenientes do Caribe e da América Central. Dentre estes, o *P. caribaea* var. *hondurensis*, plantada exclusivamente na região tropical, visto que não tolera geadas, também é rico em resinas (misturas de compostos terpenóides e fenólicos que são produzidas em dutos internos ou glândulas superficiais especializadas dos vegetais), embora seja melhor produtor de breu que de terebentina (LUCHI et al., 2005).

1.1.9.2 Substâncias liquênicas

Os líquens são organismos simbióticos de estrutura estável, compostos por diferentes partes: alga (clorofilada) ou ficobionte e o fungo (aclorofilado) ou micobionte. A união entre esses simbiontes propicia a produção de metabólitos exclusivos deste grupo taxonômico (CULBERSON et al., 1972), as substâncias liquênicas, também conhecidas como ácidos liquênicos (maioria compostos fenólicos). A origem biossintética das substâncias liquênicas ocorre principalmente por: a) via do acetato-polimalonato, onde são sintetizadas a maioria das substâncias típicas, como quinonas, depsídeos, depsidonas e ácidos graxos; b) via do ácido mevalônico, na qual ocorre a formação dos terpenóides e esteróis e c) via do ácido chiquímico, que origina muitos dos pigmentos amarelos (ASAHINA & SHIBATA, 1954; HUNECK, 1973; HALE, 1983). Além disso, XAVIER-FILHO, 1989, acrescenta mais uma via: a dos carboidratos, onde se têm os sacarídeos e polióis, produtos da redução de açúcares.

Vários ácidos liquênicos têm sido estudados do ponto de vista farmacológico e dentre estes, o ácido úsnico [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8-9b-dimetil-1,3(2H,9bH)-Dibenzofuradiona]: $C_{18}H_{16}O_7$] (Fig. 13), resultante do metabolismo secundário de várias espécies de líquens, tais como *Cladonia* (Cladoniaceae), *Usnea* (Usneaceae), *Lecanora* (Lecanoraceae), *Ramalina* (Ramalinaceae) e *Parmelia* (Parmeliaceae) é o mais estudado apresentando diversas atividades biológicas (COCCHIETTO et al., 2002), principalmente a de antibiótico.

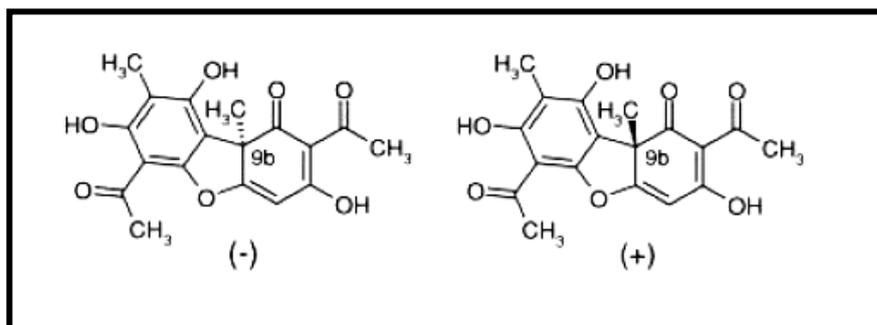


Figura 13 – Estruturas químicas dos enantiômeros (-)1a e (+) 1b do ácido úsnico.

Sabe-se, atualmente, que este ácido interfere nos processos de fosforilação oxidativa atuando sobre o metabolismo do DNA em células animais e inibindo a fusão nuclear. Apresenta atividade antitumoral e também atividades antihistamínica, espasmolítica e antiviral. Já é usado em cremes antissépticos encontrados, com frequência, no comércio europeu com nome comercial de "Usno®" e "Evosin®". Entretanto, apesar de apresentar ampla utilidade terapêutica, este ácido pode desencadear efeitos potencialmente tóxicos (LEGAZ; VICENTE, 2001).

1.1.9.3 Óleos essenciais

A produção de óleo essencial no Brasil teve início ao final da segunda década dos anos 20, tendo como base o puro extrativismo de essências nativas, principalmente do Pau-Rosa. Durante a Segunda-Guerra Mundial, em função da grande demanda imposta pelas indústrias do ocidente, que se viram privadas de suas tradicionais fontes de suprimento, em virtude da desorganização do transporte e do comércio, a produção de óleos essenciais no Brasil foi consolidada. Na década de 50, importantes empresas internacionais especializadas no aproveitamento de óleos essenciais para produção de fragrâncias e aromas, destinadas as indústrias de perfumes, cosméticos, produtos alimentares, farmacêuticos e de higiene, se instalaram no país. Este fato provocou um aumento do consumo interno dos óleos essenciais, dando maior estabilidade à nossa produção. Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Essas denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como, por exemplo, a de serem geralmente na forma líquida, de aparência oleosa a temperatura ambiente, advindo daí a designação de óleo. Segundo a *International Standard Organization* (ISO) são definidos como produtos obtidos de partes de plantas, através da

destilação por arraste com vapor d'água bem como produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. São misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas sendo que seus constituintes químicos variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples, fenóis, aldeídos, éteres, ácidos orgânicos, ésteres, cetonas, lactonas, cumarinas e até compostos contendo nitrogênio e enxofre (SIMÕES et al., 2004).

Embora a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais seja clara (ABDELGALEIL et al., 2008), quanto ao mecanismo de ação, há consenso de que grande maioria dos compostos aromáticos e fenólicos exerce seus efeitos antimicrobianos diretamente na membrana citoplasmática, provocando alterações na sua estrutura e funções (HOLEY; PATEL, 2005). Por outro lado, considerando-se o número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, é muito provável que a sua atividade antimicrobiana não seja atribuível a um mecanismo específico, mas que existam vários alvos na célula. Na literatura são citadas alterações da membrana citoplasmática, perturbações no fluxo de elétrons, no transporte ativo e coagulação do conteúdo celular (BURT, 2004).

Neste estudo foram testados os óleos essenciais de bergamota, patchouli, sândalo, olíbano, tomilho, canela, eucalipto, gengibre, grapefruit, limão, petit grain, pau-rosa, mirra, laranja, cedro, sálvia e copaíba para avaliação de possível atividade antimicrobiana sobre isolados de *C. parapsilosis* no modo de crescimento planctônico e de biofilme.

1.1.10 Estudos proteômicos

A aplicação de técnicas de biologia molecular para estudar leveduras, tais como sistemas de transformação, estratégias de bloqueios de gens e sistemas de expressão controlada de gens permitiram a descrição genética de diferentes aspectos biológicos e patológicos de *C. parapsilosis* (TROFA et al., 2008). No entanto, a fim de obter uma visão global sobre estes aspectos, resposta para as questões fundamentais sobre a morfogênese de *C. parapsilosis*, patogenicidade e virulência, bem como outros aspectos de interesse clínico, não somente as abordagens genéticas moleculares, mas também abordagens de bioquímica de proteínas são necessárias. Este último poderia fornecer pistas precisas quanto à complexidade biológica do organismo, uma vez que as proteínas são biomoléculas funcionais que estão diretamente envolvidos em processos fisiológicos e patológicos.

A era atual, pós-genoma, anuncia uma nova etapa para a compreensão bioquímica de produtos de expressão final do gene através de grandes estudos de proteômica. Assim, ao contrário do genoma, o proteoma ou o sistema operacional do genoma de qualquer célula é

um sistema dinâmico e complexo, pois qualquer genoma pode originar um grande número de sub-proteomas (GRAVES; HAYSTEAD, 2002). Análises baseadas em proteoma envolvem a separação simultânea, visualização e quantificação de milhares de proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e sua posterior identificação e caracterização por espectrometria de massa. Concomitantemente, a sub-proteômica, tendência em quebrar o proteoma total em várias frações distintas, está desempenhando um papel determinante no estudo de proteínas complementando o genoma. O termo proteoma foi proposto por Marc Wilkins, 1996, para descrever o estudo das proteínas complementares do genoma (protein complement of the genome). O avanço com técnicas complementares tais como a MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*) na espectrofometria de massa têm contribuído com novos horizontes nos estudos proteômicos.

As proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes nas células, por serem fundamentais para a estrutura e função celular (LEHNINGER et al., 1995). Estas moléculas possuem estruturas bastante complexas formadas por unidades monoméricas, denominadas aminoácidos que se agrupam por meio de ligações peptídicas. As proteínas possuem massa molar (MM) que variam de centenas a milhares de unidades de Dalton ($1 \text{ Da} = 1,661 \times 10^{-24} \text{ g}$).

A estrutura tridimensional das proteínas possibilita-lhes diferentes propriedades graças às cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. Cada monômero apresenta duas constantes de ionização (uma do grupo amino e a outra do grupo carboxílico). Assim, a carga líquida de uma molécula da proteína em solução aquosa depende da constante de ionização de seus aminoácidos e do pH da solução (VOET et al., 1999). Assim, em menores valores de pH, devido à protonação dos grupos amino, a carga líquida de uma proteína será positiva; ao passo que, em valores maiores de pH, devido a ionização dos grupamentos carboxílicos, a proteína terá carga líquida negativa. Em um pH particular, a proteína terá carga líquida nula (mesmo número de grupos carregados positiva e negativamente). Este valor de pH é denominado ponto isoelétrico (PI) da proteína (MELVIN, 1987).

Para realizar estudos a respeito das proteínas, primeiro é necessário isolá-las das demais substâncias. Esta separação é feita baseada nas suas características físico-químicas, tais como carga iônica, tamanho, conformação e especificidade de ligação com outras moléculas biológicas. Podem ser manipuladas também variáveis como pH, temperatura, concentrações de sais dissolvidos e polaridade de solventes para precipitar seletivamente algumas proteínas, além do que o pH pode ser ainda ajustado até aproximadamente o PI da proteína desejada tornando-a menos solúvel (VOET et al., 1999).

A eletroforese é vastamente utilizada em estudos proteômicos pelo fato de ser capaz de separar várias proteínas simultaneamente e por apresentar elevada resolução (MELVIN, 1987).

Esta técnica foi introduzida por Tiselius em 1933, tendo como principal interesse a separação de frações protéicas do soro humano. A partir do final da década de 1940, surgiu a eletroforese em papel; no início da década de 1950, a eletroforese em gel de amido e de acetato de celulose; por volta de 1960, a técnica em gel de acrilamida e finalmente, nos anos 90 a eletroforese capilar (MELVIN, 1987).

Independentemente do tipo, a eletroforese é um método associado à migração de partículas carregadas em um meio sob a influência de um campo elétrico contínuo baseando-se nas propriedades das proteínas tais como massa molar, carga e conformação, as quais influenciam diretamente na velocidade de migração e na mobilidade das mesmas ao longo da corrida eletroforética, podendo ser citados, ainda, o campo elétrico aplicado e a viscosidade do meio (SILVA-JUNIOR, 2001). As proteínas que possuem velocidades de migração diferentes são separadas umas das outras (MELVIN, 1987).

Estão disponíveis vários suportes pelos quais a eletroforese pode ser realizada e, dentre esses, o gel de poliacrilamida (*PAGE- Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), formado pela copolimerização entre acrilamida e N,N'- metilenobisacrilamida, na presença de persulfato de amônio e tetrametilenodiamina (TEMED). Quanto maior a proporção de bisacrilamida, menor o tamanho dos poros (MELVIN, 1987; HAMES; RICKWOOD, 1990; SILVA-JUNIOR, 2001). Avanços na técnica possibilitaram a introdução de géis ditos fracionador ou de separação e concentrador ou empilhador, simultaneamente, além de sistemas descontínuos, onde os íons tamponantes do gel (Tris-HCl) são diferentes daqueles do reservatório do eletrodo (Tris-glicina), proporcionando elevado grau de resolução, evidenciando bandas, resultantes das diferenças nas velocidades de migração, reveladas por coloração específica (HAMES; RICKWOOD, 1990). Essa técnica pode ser classificada como sendo em uma (1D) ou em duas (2D) dimensões.

Nesta técnica, pode-se analisar a proteína na forma nativa, sendo as proteínas separadas com base na sua carga, usando-se o método de focalização isoelétrica (IEF – *Isoelectric Focusing*), ou então, em gel vertical em SDS. Durante a IEF é formado um gradiente de pH e as espécies carregadas movem-se pelo gel até alcançar um pH específico, onde as proteínas apresentam carga efetiva nula (pI).

Uma variação da técnica permite o uso em sistemas desnaturantes ou dissociantes, onde as proteínas são solubilizadas em tampão contendo reagente usado para promover a

desnaturação das proteínas, geralmente o duodecil sulfato de sódio (SDS), que interage com as proteínas fornecendo-lhes cargas negativas. Nestas condições, todas as proteínas migram em direção ao eletrodo positivo e são separadas somente pelas diferenças relacionadas à massa molar. Além disso, a adição de reagentes redutores como o β -mercaptoetanol e o DTT rompem as pontes de dissulfeto, facilitando o acesso do SDS às partes mais internas das proteínas (MELVIN, 1987; HAMES; RICKWOOD, 1990; SILVA-JUNIOR, 2001). Esse tipo de eletroforese é conhecido como SDS-PAGE, originalmente descrito por Laemmli, 1970.

A técnica por desenvolvida por O'Farrel, 1975, onde o gel proporciona um gradiente de pH gerado pela adição de anfólitos (substâncias que podem se comportar como ácido ou uma base). Atualmente, a primeira dimensão é realizada em fitas pré-fabricadas de gel de poliacrilamida onde os anfólitos estão imobilizados, formando, assim, um gradiente de pH. Após a separação das proteínas de acordo com o PI, a fita é incubada com agente redutor e iodoacetamida (evita a reoxidação dos grupos tióis). As proteínas presentes na fita são separadas de acordo com a massa molar, utilizando eletroforese do tipo SDS-PAGE. A associação entre estes dois tipos de eletroforese (IEF e SDS-PAGE) aumenta significativamente o poder de resolução do método. Desta forma, cada ponto resultante (*spot*) observado no gel de 2D-PAGE corresponde a uma espécie protéica presente na amostra (HAMES; RICKWOOD, 1990).

Atualmente vários pesquisadores não têm medido esforços para mapear as proteínas de um microrganismo em particular, uma determinada célula ou tecido usando a técnica em gel 2-D. A Fig. 14 ilustra o procedimento.

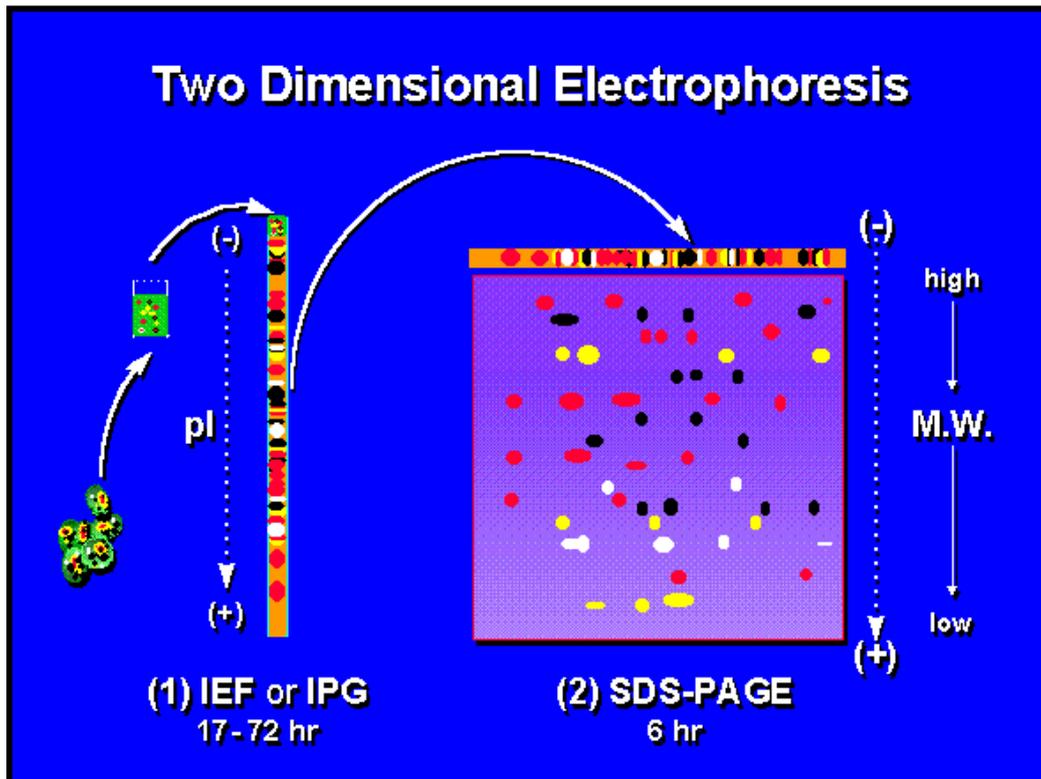


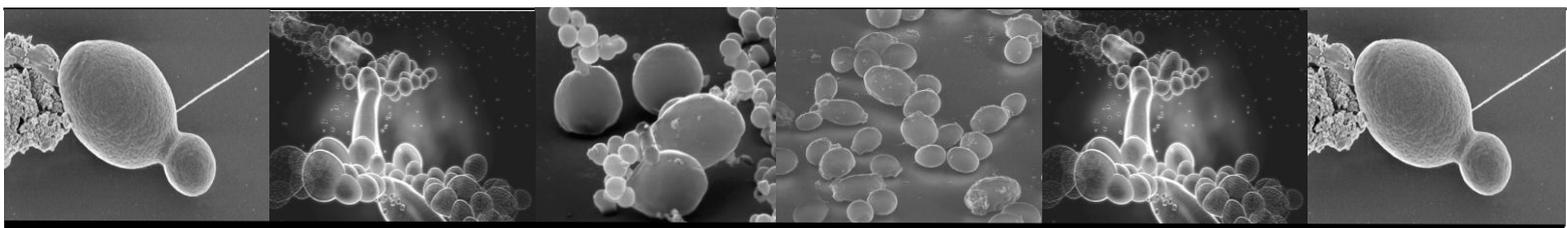
Figura 14. Eletroforese bidimensional (2-D). Consiste em duas separações eletroforéticas: Na primeira dimensão, as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoelétricos (pI) utilizando gradiente imobilizado de pH (IPGE), focalização isoelétrica (IEF). Na segunda dimensão, as proteínas são separadas de acordo com seu peso molecular aproximado utilizando dodecil sulfato de sódio e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). O resultado final consiste em um gel com diversos discos (spots) dispersos, cada um correspondendo a uma proteína em particular. As proteínas separadas eletroforéticamente podem ser visualizadas por técnicas gerais de coloração. Esta técnica pode fornecer aproximações de peso molecular ($\pm 10\%$) para a maioria das proteínas.

A formação de biofilme é um fator de virulência importante para *Candida* spp., e mais de 300 artigos já foram publicados envolvendo biofilmes de *Candida* durante as últimas duas décadas (RAMAGE et al., 2005). No entanto, a maioria destes dados referem-se à biofilmes de *C. albicans*, e informações sobre biofilmes de outras espécies de *Candida* ainda é escassa. Análises transcricionais têm mostrado que existem diferenças no transcriptoma entre hifas e blastoconídios e entre os organismos planctônicos e em crescimento no modo biofilme (NANTEL et al., 2002; MURILLO et al., 2005), o que implica em mudanças no perfil proteico do organismo (NANTEL et al., 2002).

O citoplasma da célula contém o mecanismo de conversão de nutrientes em energia e produtos celulares, organelas que são especializadas para diferentes funções

metabólicas, tais como produção de energia e funções de transporte, além de proteínas envolvidas na estrutura celular e replicação. Estudos sobre a identidade e a função de proteínas da parede celular proporcionaram um melhor entendimento dos mecanismos de patogenicidade, pois a transição da condição de comensal para parasita pode envolver tanto mudanças nas condições ambientais como nas de dispersão dentro do hospedeiro humano (PITARCH; NOMBELA; GIL, 2009). A parede celular não é uma estrutura estática e invariável, mas, sim, uma estrutura que pode mudar durante a vida de uma única célula, em resposta ao estado de crescimento e uma variedade de estímulos ambientais. Por sua vez, algumas proteínas da parede celular podem ser sensores de contatos ambientais que iniciam um sinal para alterações na expressão de diferentes gens nos fungos (PITARCH; NOMBELA; GIL, 2008). Assim, componentes protéicos têm sido extraídos ou solubilizados da parede celular por uma variedade de técnicas. A maioria dos estudos tem envolvido detergentes (como dodecil sulfato de sódio ou n-octylglucoside), agentes redutores (como ditioneitol (DTT) e b-mercaptoetanol), ou hidrolases (como proteases ou β -glucanases e quitinases) que possibilitam a liberação de proteínas intactas isoladas de paredes celulares ou de componentes celulares (CASANOVA; CHAFFIN, 1991; MARCILLA et al., 1991; MOLLOY; SHEPHERD; SULLIVAN, 1995; CHAFFIN et al., 1998; KUSCH et al., 2007; THOMAS; LOPEZ-RIBOT; LEE; 2009).

OBJETIVOS



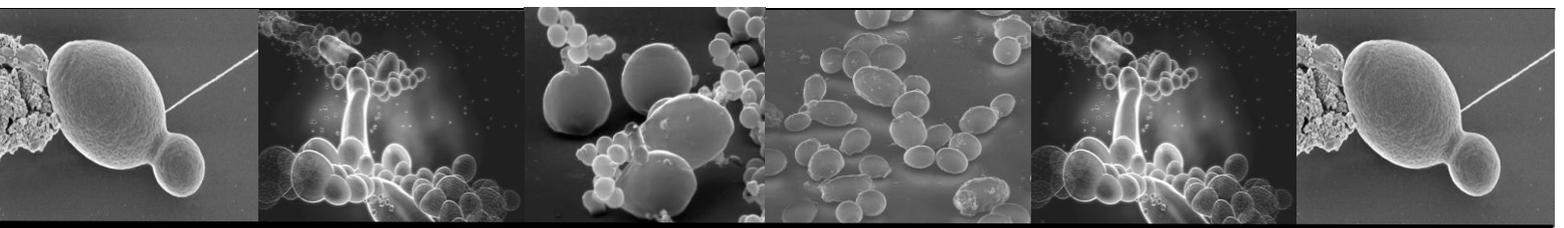
2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como principais objetivos caracterizar molecularmente isolados fenotipicamente identificados como *C. parapsilosis* advindos do circuito hídrico de uma Unidade de Hemodiálise entre 2004 e 2006, bem como a capacidade de formar biofilmes e o efeito de agentes antimicrobianos de uso clínico e produtos sintéticos e naturais. Por outro lado, técnicas proteômicas foram usadas para comparar o perfil de proteínas em isolado de *C. parapsilosis* capaz de crescer no modo biofilme e em isolado que não apresentava essa propriedade.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar método molecular para caracterizar 100 isolados do complexo *C. parapsilosis*;
- Verificar a capacidade de formação de biofilme por estes isolados;
- Utilizar a microscopia eletrônica de varredura para observação dos biofilmes formados por isolados do complexo *C. parapsilosis*, após 24 horas de incubação assim como os efeitos fungicidas ou inibitórios de drogas antimicóticas (anfotericina B, fluconazol e voriconazol) em diferentes concentrações sobre os biofilmes formados;
- Usar técnicas proteômicas para comparar o perfil de proteínas em isolados de *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* capazes de crescerem no modo biofilme e em isolados que não apresentam essa propriedade.

PARTE EXPERIMENTAL (Material e Métodos)



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

Foram analisados 100 isolados laboratoriais acondicionados em freezer provenientes do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca, previamente identificados como *C. parapsilosis*, obtidos em estudo anterior, após dois períodos de coleta (05/11/04 à 10/01/05 e 03/06/06 à 12/06/06) no circuito hídrico de uma Unidade de Hemodiálise situada em Franca, SP, vinculada à Fundação Civil Casa de Misericórdia de Franca, que atende 250 pacientes renais crônicos pelo SUS (Sistema Único de Saúde). Esses isolados foram obtidos, após processamento de amostras de água (1 litro) pela técnica da membrana filtrante utilizando-se membranas (*Millipore, USA*) com poros de 0,45 μ . As amostras foram coletadas de pontos específicos tais como: I - água afluyente ou da rede pública (fornecida pela SABESP) à Unidade; II - água tratada (pós-tratamento por osmose reversa); água de local onde se realizam sessões rotineiras de hemodiálise: III - sala A; IV - sala B e V - sala C. Amostras de águas das máquinas desinfetadas prontas para reinício de turno de pacientes também foram coletadas. O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa, mas a análise considerou o projeto isento de permissão, pois os isolados eram provenientes de micoteca.

3.2. PUREZA DOS ISOLADOS

Os isolados fenotípicamente identificados foram submetidos a cultivo em CHROMagar *Candida* (*M-Tech Diagnostic, Warrington, United Kingdom*), para confirmação de pureza e viabilidade.

3.2.1 Genotipagem dos isolados

3.2.1.1 Extração do DNA genômico

O DNA total dos isolados de *C. parapsilosis* foi extraído utilizando-se a metodologia de Moller et al., 1992. Para tal, as leveduras foram incubadas por 24 h, a 37°C, sob agitação (*Shaker Innova 40, Scientific Co., Inc. Edison, New Jersey, USA*), em caldo constituído de 2% de glicose, 2% de peptona micológica (Oxoid) e 1% de extrato de levedura (*Difco, Detroit, Mich., USA*). Após esse tempo, as células foram levadas a centrífuga refrigerada (*Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany*) para lavagem em tampão TES (0,1 M Tris-HCl pH=8,0; 10 mM EDTA pH=8,0 e 10 mM DTT (Ditiotreitól, *USB Corporation*). Ao sedimento, adicionou-se 500 μ L de tampão TES adicionado de 2% de duodecil sulfato de sódio (SDS) e lisou-se as células, por agitação em vortex por 20 segundos com pérolas de

vidro (0,45 x 0,52 mm de diâmetro, *Sigma, St. Louis, Mo., USA*), deixando por igual tempo em gelo, repetindo-se o procedimento por 3 vezes. Em seguida, adicionou-se 5 µL de proteinase K (*Sigma-Aldrich Co*) e incubou-se por 1 h 55°C. A seguir, adicionou-se 300 µL de NaCl 5M e 100 µL de CTAB (Cethyltrimethylammonium Bromide, *Sigma*) 10%, incubando-se 10 minutos a 65°C. À mistura, agregou-se 700 µL de clorofórmio, permanecendo 30 minutos em gelo. Após centrifugação (12.000 rpm, 10 minutos), transferiu-se o sobrenadante para novo tubo, onde se adicionou 10 µL de ribonuclease A (RNase A - *Fermentas*) e incubou-se por 1 h 37°C. Extraiu-se, o DNA pela adição de 700 µL de clorofórmio/álcool isoamílico, na proporção de 24:1, ao sobrenadante, por 2 vezes consecutivas, submetendo-se à centrifugação (12.000 rpm, 10 minutos) após cada procedimento. Recuperou-se o sobrenadante e agregaram-se 500 µL de isopropanol gelado, incubando-se em -20°C por 30 minutos. Decorrido esse tempo, foi centrifugado 15 minutos, 12.000 rpm, descartando-se o sobrenadante. Adicionaram-se aproximadamente 500µL de etanol 70°GL para desidratar o DNA e centrifugou-se 10 min, 12.000 rpm. Após a secagem, o DNA foi dissolvido em 50 µL de água milli-Q estéril.

3.2.1.2 Reação de PCR

Após a determinação da pureza e da concentração do DNA genômico obtido de cada isolado, os mesmos foram submetidos à reação de PCR em termociclador GeneAmp 9700 machine (*Perkin Elmer Corporation, Foster City, USA*), conforme descrito por Tavanti et al., 2005. O ciclo utilizado constituiu-se de: denaturação inicial a 94 °C por 7 minutos, seguido por 30 ciclos de denaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto e alongação por 1 minuto a 72°C, com extensão final a 72 °C por 10 minutos. Utilizou-se iniciador com a seqüência *Fwd*, 5'-GTTGATGCTGTTGGATTGT-3'; *Rev*, 5'-CAATGCCAAATCTCCAA-3' (*Integrated DNA Technologies*), o qual amplificou fragmento de aproximadamente 716 pares de base (bp), correspondente ao gene SADH (*Secondary alcohol dehydrogenase*). O volume total da reação (50 µL) foi constituído por 2 ng de DNA genômico, 1,5 U de Taq polimerase (*Pharmacia Biotech, USA*), 5 µL de tampão de PCR, 2 µL de deoxinucleotídeos trifosfato (*Amersham Pharmacia Biotech Inc*) e 5 µL de cada iniciador. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese (*Electroforesis systems, Fisher Scientific Inc, USA*) em gel de agarose (1,5%), corado com brometo de etídio (*Pharmacia Biotech*) e visualizado sob luz UV (Image Master VDS System - *Amersham Pharmacia Biotech, UK*). *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. orthopsilosis* ATCC 96141 e *C.*

metapsilosis ATCC 96143 foram usadas como controles e água destilada como controle negativo.

3.2.1.3 Digestão por enzima de restrição do fragmento SADH

Os produtos de PCR obtidos foram submetidos à digestão pela enzima de restrição Ban I que possui um sítio de restrição nos isolados de *C. parapsilosis* do grupo I revelando 2 bandas; 3 sítios nos isolados do grupo III revelando 4 bandas e nenhum sítio de restrição nos isolados do grupo II (TAVANTI et al., 2005; TAVANTI et al., 2007; SILVA et al., 2009). A reação processou-se em volume total de 30 μ L que se constituiu de 25 μ L do produto de PCR, 3 μ L do tampão (10 X) de dissolução da mesma e 0,5 μ L de Ban I (*New England Biolabs*). O produto da digestão foi submetido à eletroforese em tampão TBE (Tris base 54g, ácido bórico 27,5g; EDTA 0,5 M 20 mL e água destilada q.s.p 1.000 mL) \times 1, em agarose 2%, 80 v, 180 minutos, corado com brometo de etídio (*Pharmacia*) e visualizado por luz ultravioleta em transluminador (*Image Master VDS System - Pharmacia*).

3.3 ENSAIOS DE BIOFILMES

3.3.1 Crescimento dos isolados no modo biofilme (*Pierce et al., 2008, modificado*)

Inicialmente as leveduras foram incubadas em 20 mL de meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*: 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose) em tubos cônicos tipo Falcon com capacidade de 50 mL, em agitador orbital (150-180 rpm) a 30°C por 18 a 20 hs. Em seguida, procedeu-se a lavagem das células em solução salina tamponada com fosfato – PBS (8g NaCl, 0,2g KCl; 14,4g Na₂HPO₄; 0,24g KH₂PO₄, água destilada q.s.p. 1L = tampão 10x concentrado. No momento do uso, diluiu-se 1:10, pH=7,4) por três vezes. Posteriormente, as células foram suspensas em PBS e, ajustadas em concentração de 1 \times 10⁶/mL em RPMI com 2% de glicose, por comparação com o padrão 0,5 da escala de McFarland. A seguir, foram dispensados 100 μ L dessa suspensão, nos poços de 2 a 5 de cada fileira de uma placa de microtitulação de 96 poços (*TPP, BIOGEN, Europe*). Ao poço 1 adicionou-se RPMI como controle de esterilidade. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica, estaticamente, a 37°C por 24 horas. Na sequência, aspirou-se o meio sobrenadante e a placa foi lavada delicadamente com PBS três vezes. A quantificação dos biofilmes foi realizada com o ensaio de redução de sal de tetrazólio, onde 20 μ L de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), na proporção de 5 μ L para 1 mL de tampão PBS, esterilizado por filtração em membrana (*Millipore*, poros de 0,22 μ m) foi adicionado à cada poço da placa de microtitulação, inclusive nos controles. Incubou-se à

temperatura de 37°C, no escuro, por 18 a 20 h. O corante foi aspirado e adicionou-se 200 µL de isopropanol (DENIZOT; LANG, 1986; TWENTYMAN; LUSCOMBE, 1987; HAWSER; DOUGLAS, 1994; FREMOSIER et al., 1999; BERRIDGE; HERST; TAN; 2005; KROM et al., 2006). As placas foram deixadas em repouso por 10 a 15 minutos; transferiu-se 100 µL de cada poço para nova placa de microtitulação e procedeu-se à leitura em 540 nm em leitor de microplacas (ASYS, Eugendorf, Salzburg, Áustria). *C. albicans* SC5314 foi usada como controle para formação de biofilme (RAMAGE et al., 2002; CHANDRA et al., 2005; KROM et al., 2006; PIERCE et al., 2008).

3.3.2 Cinética de formação dos biofilmes

Seis replicatas de biofilmes foram formadas em poços de placas de microtitulação (TPP, BIOGEN, Europe), em intervalos de tempo conforme segue: 4, 6, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 84 e 96 h, a 37°C. Em cada intervalo de tempo, a análise quantitativa da produção de biofilme foi estimada usando o ensaio de redução de sal de tetrazólio conforme descrito acima em três poços. Paralelamente, nos outros três poços, em cada intervalo de tempo, também se monitorou a quantidade de células viáveis pela lavagem vigorosa e extensiva do poço que continha o biofilme formado com 100 µL de PBS estéril (poço-mãe). Diluições 1:10, 1:100 e 1:1000 em PBS estéril foram realizadas a partir do poço-mãe e depositadas sobre placas contendo ágar Sabouraud-dextrose (Difco), incubadas 48 h a 37°C e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi expresso em \log_{10} CFU/mL, calculando-se as médias e os desvios-padrões.

3.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

O preparo das amostras para a documentação ao MEV foi realizado a partir de culturas puras das leveduras, repicadas em 20 mL de meio YPD em tubos cônicos com capacidade de 50 mL, em agitador orbital (150-180 rpm) a 30°C por 18 - 20 h. Em seguida, procedeu-se a lavagem das células em PBS por três vezes. Depois disso, as células foram suspensas inicialmente em PBS e, ajustadas a concentração em 1×10^6 /mL em RPMI, por comparação ao padrão 0,5 da escala de McFarland (item 3.5.1). A seguir, foi dispensado 300µL dessa suspensão, nos poços de uma placa de microtitulação de 12 poços nos quais se havia depositado um disco de policloreto de vinila (PVC) de 2 mm de espessura. Incubou-se à temperatura ambiente por 24 horas para formação dos biofilmes microbianos sobre os discos

de PVC, sem agitação. Decorrido esse tempo, lavou-se cuidadosamente os discos com PBS estéril. Para o monitoramento dos efeitos de antifúngicos sobre as células sésseis, as drogas foram adicionadas em concentrações determinadas sobre os biofilmes, incubando-se por 48 horas a 37°C. Prosseguiu-se a lavagem (três vezes) com PBS, dando continuidade à técnica indistintamente para biofilmes tratados ou não. Para tal, adicionaram-se, então a cada poço, 1 mL de glutaraldeído 3% e paraformolaldeído a 2%, em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4 para fixação das amostras. A seguir, submeteu-se em seis lavagens com solução-tampão pura, em intervalos de 15 minutos e pós fixou-se em tetróxido de ósmio 1% por 16 h. Decorrido esse tempo, o material foi novamente submetido a seis lavagens com a mesma solução-tampão e submetidas à desidratação em crescentes concentrações de álcool etílico (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) (REED, 1996; RAMAGE et al., 2002). Em seguida as amostras foram secas em Secadora de Ponto Crítico com CO₂ líquido (*Critical Point Dryer, modelo CPD-030, Balzers, Oberkochen, Germany*), e montadas para a metalização com ouro (*metalizador DENTON VACUM, modelo DESK II, Freehold, NJ, USA*), analisadas e eletromicrografadas em microscópio eletrônico de varredura (*JEOL, modelo JSM 5410, Japan*) operado em 15 KV.

Estes ensaios foram realizados em colaboração com Universidade Estadual Paulista/ FCAV/ Jaboticabal / Departamento de Fitossanidade da Fitossanidade Vegetal, sob a coordenação do professor Dr. Jaime Maia dos Santos.

3.5. MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER

Lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro (*Boeco, Hamburg, Germany*) após lavagem, secagem e esterilização foram postas no fundo de cada poço de placas de microtitulação de 24 poços. A seguir, inoculou-se 300 µL da suspensão de levedura em estudo na concentração de 10⁶ cel/mL em RPMI. Após incubação de 24 horas a 37°C, estaticamente, para formação do biofilme, lavou-se o poço com PBS estéril por três vezes para retirada de células não aderidas. Adicionou-se a droga em estudo nas concentrações estabelecidas incubando-se novamente a 37°C por 24 horas para o fluconazol e 48 horas para anfotericina B. Após esse tempo, lavou-se o poço com PBS estéril por três vezes. À parte, misturou-se 4 µL do fluorocromo FUN-1 ([2-cloro-4-(2,3-dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-metilideno)-1-fenilquinolio iodato], *Molecular Probes, OR, USA*), partindo-se de uma solução estoque de 10 mM e 15 µL de CAAF (Concanavalina A- conjugada à alexa fluor 488- *Molecular Probes*) proveniente de uma solução estoque de 5 mg/mL com 3 mL de PBS estéril para se obter uma

concentração final de 10 μ L e 25 μ g/mL, respectivamente (RAMAGE et al., 2001; KUHN et al., 2002; CHANDRA et al., 2005). A seguir, adicionou-se a mistura aos poços contendo as lamínulas com os biofilmes, incubando-se a placa por 45 minutos a 37°C, no escuro. Decorrido esse tempo, adicionou-se água ultrapura (3 vezes) aos poços para lavagem das lamínulas. A seguir, as lamínulas foram retiradas dos poços e invertidas sobre 4 μ L de Fluoromount-G (*Sigma-Aldrich*), anteriormente depositado sobre lâminas de microscopia para observação ao microscópio de epifluorescência e confocal (usando-se o protocolo de fluorescência com isotiocinato e rodamina com excitação a 543 nm e 488 nm e emissão à 560 e 505 nm para FUN-1(vermelho) e CAAF (verde), em microscópio confocal Leica TCS SP5 (*Leica Microsystems, Wetzlar, Germany*) com programa de captura e processamento de imagem LAS AF 1.8.2 build 1465 Leica Microsystems CMS GmbH.

Estes ensaios foram realizados em colaboração com a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, sob a coordenação da professora Dr^a. Maria Célia Jamur.

3.6. DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS AOS ANTIFÚNGICOS

3.6.1 *Cultivo das leveduras e padronização do inóculo*

Inicialmente, os isolados foram semeados em SDA (*Sabouraud dextrose agar, Difco*) a 30 °C em condições aeróbias por 24 horas. A seguir, as leveduras foram suspensas em solução salina 0,85% estéril. A turbidez de cada suspensão foi medida por espectrofotometria a 530 nm, ajustando-se a uma densidade óptica entre 0,11 e 0,13. A concentração final do inóculo foi de 0,5 a 2,5 x 10⁵ UFC/mL em meio RPMI com 2% de glicose (RODRIGUEZ-TUDELLA et al., 1996; CUENCA-ESTRELLA et al., 2003; RODRIGUEZ-TUDELLA et al., 2007; AFST- EUCAST, 2008).

3.6.2 *Teste de sensibilidade para leveduras*

A sensibilidade *in vitro* do fluconazol (*Pfzer, Sandwich, UK*) e anfotericina B (AMB - *Bristol-Myers Squibb, Woerden, Holanda*) foi avaliada e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada utilizando-se microdiluição em caldo segundo a metodologia para leveduras fermentadoras preconizada pelo *Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of European for Committee Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST, 2008)*, devido à maior proximidade de alguns parâmetros (tamanho do inóculo e

leitura espectrofotométrica em 530 nm) com a metodologia empregada para os ensaios com biofilmes. Fluconazol foi dissolvido em água destilada estéril e anfotericina B foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) para preparo da solução estoque. RPMI 1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio (*GIBCO BRL, Life Technologies, Woerden, Holanda*) e tamponado com ácido morpholinepropanesulfônico (MOPS) a 0,165 M (*Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha*), pH 7, foi usado como meio de cultivo. Diluições finais de cada antifúngico foram preparadas em RPMI 1640 acrescido de 2% de glicose (RODRIGUEZ-TUDELLA et al., 1996; CUENCA-ESTRELLA et al., 2003). As concentrações de fluconazol testadas variaram de 0,25 a 128 mg/L e anfotericina B, de 0,0625 a 16 mg/L, sendo que alíquotas de 100 µL de cada diluição do agente antifúngico foi dispensada nos poços de placas de microtitulação de fundo chato (*Costar, Corning, NY, USA*). Os inóculos foram preparados segundo o item 3.6.1 e um volume constante (100 µL) do inóculo foram adicionados aos poços 2 a 11 da placa de micro diluição contendo 100 µL de cada diluição do antifúngico para atingir as concentrações finais tanto do inóculo quanto da droga. Ao poço 1 foi adicionado 200 µL de meio RPMI (controle negativo de crescimento) e ao poço 12, 100 µL do inóculo e 100 µL de RPMI (100% de crescimento). As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas após 24 horas de incubação a 35°C, sendo as leituras realizadas por espectrofotometria (RODRIGUEZ-TUDELLA et al., 2003; RODRIGUEZ-TUDELLA et al., 2007) com leitor de microplacas (*ASYS, Eugendorf, Salzburg, Áustria*) a 530 nm (EUCAST-AFST, 2008). O ponto de leitura ou “*endpoint*”, que indicou a concentração inibitória mínima (CIM) de fluconazol foi o que permitiu a inibição de 50% do crescimento (“*inhibition concentration*” ou IC₅₀) de cada amostra de leveduras, em relação ao seu controle positivo. Para AMB, o ponto de leitura foi o que inibiu 90% (IC₉₀) do crescimento de cada amostra (EUCAST, 2003; RODRIGUEZ-TUDELLA et al., 2007; EUCAST-AFST, 2008), em comparação com o do controle de 100% de crescimento, livre de droga. Os valores de CIM para fluconazol foram comparados com as orientações do EUCAST-AFST, 2008, para interpretação em testes de sensibilidade antifúngica: CIMs ≤ 2 mg/L consideradas sensíveis (S); com CIMs de 4 mg/L intermediárias e > 4 mg/L como resistentes (R). Embora este documento ainda não tenha proposto limites para a AMB, foi sugerido considerar para fins de comparação, valor de referência de CIM ≥ 2 mg/L como cepas classificadas como resistentes (SHADOMY; PFALLER (1992); NOLTE et al. (1997), RODRIGUEZ-TUDELLA et al., 2008; EUCAST-AFST, 2008). As cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) recomendadas pelo CLSI (M27-A2, 2002) e EUCAST-AFST, 2008, *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. krusei* (ATCC 6258) foram utilizadas como controle para cada teste. Todos os testes foram realizados em

duplicata. Foi também determinada a CIM₅₀, aquela que inibe 50% das amostras testadas e CIM₉₀, aquela que inibe 90% das amostras testadas.

3.6.3 Determinação da atividade dos antifúngicos sobre biofilmes por medição da densidade Ótica (DO)

A formação do biofilme foi realizada de acordo com o procedimento descrito no item 3.3.1 com período de incubação de 24 horas. Em cada placa foi preparado um controle negativo (poço sem formação de biofilme, poço n°1 com RPMI), um controle de 100% de crescimento (com suspensão de células em RPMI). Depois de formado, o biofilme foi lavado com 100µL de PBS estéril por três vezes para remoção das células não aderentes. A seguir, nos poços 2 a 11 foram colocadas as soluções de antifúngico (100µL de solução de antifúngico) em diluição seriada e no poço 12, novamente RPMI, incubando-se a 37°C durante 48 horas. Os ensaios foram realizados em duplicata. Terminado o tempo de incubação, aspirou-se a droga e cada poço foi lavado três vezes com PBS estéril. Na seqüência, colocou-se em todos os poços 20 µL do corante de viabilidade celular (MTT-*Sigma Chemical, St. Louis, MO*). Após incubação de 18- 20 h no escuro, o corante foi removido, o poço lavado e adicionado isopropanol (200 µL). Retirou-se 100 µL de cada poço, transferindo-se para nova placa. Leu-se, então a absorbância do conteúdo dos poços da placa a 540m. A redução de crescimento foi comparada ao poço 12, que corresponde a 100% de crescimento, livre de droga (DENIZOT; LANG, 1986; HAWSER; DOUGLAS, 1994; DE LOGU et al., 2005). As concentrações de fluconazol e voriconazol utilizadas variaram de 512 mg/L a 1 mg/L enquanto que anfotericina B, de 128 a 0,25 mg/L.

3.7 ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE BIOCIDAS

3.7.1 Biocidas utilizados

Os biocidas utilizados no estudo foram: ácido acético (*Merck, Darmstadt, Germany*), peróxido de hidrogênio 10 vol. (*SYNTH, SP, Brasil*), hipoclorito de sódio 2% (*Merck, Darmstadt, Germany*) e Proxitane[®] (Peróxido de hidrogênio (6,3%) e ácido peracético (2%) - *Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany*) e suas respectivas concentrações em cada diluição em RPMI estão descritas na Tabela 4.

TABELA 4. Equivalência entre as diluições e concentrações dos desinfetantes e esterilizantes no volume testado.

Agente químico	Diluição	Concentração (g/L)
<i>Hipoclorito de sódio 2%</i>	1/2	20
	1/4	10
	1/8	5
	1/16	2,5
	1/32	1,25
	1/64	0,62
	1/128	0,31
	1/256	0,15
	1/512	0,08
	1/1024	0,04
	1/2048	0,02
<i>Peróxido de hidrogênio 10 v</i>	1/2	15
	1/4	7,5
	1/8	3,75
	1/16	1,87
	1/32	0,93
	1/64	0,47
	1/128	0,23
	1/256	0,11
	1/512	0,05
	1/1024	0,03
	1/2048	0,01
<i>Ácido acético</i>	1/2	2,7
	1/4	1,35
	1/8	0,675
	1/16	0,33
	1/32	0,16
	1/64	0,08
	1/128	0,04
	1/256	0,02
	1/512	0,01
	1/1024	0,005
	1/2048	0,002
<i>Proxitane® Ácido peracético: 13,4g/L + Peróxido de hidrogênio: 42g/L</i>	1/2	6,7 + 21
	1/4	3,3 + 10,5
	1/8	1,6 + 5,2
	1/16	0,83 + 2,6
	1/32	0,41 + 1,3
	1/64	0,21 + 0,6
	1/128	0,10 + 0,3
	1/256	0,05 + 0,1
	1/512	0,02 + 0,08
	1/1024	0,01 + 0,04
	1/2048	0,006 + 0,02

3.7.2 Ensaio com biofilmes pré-formados

Biofilmes de isolados representativos do complexo *C. parapsilosis* e da cepa referência *C. albicans* SC5314 foram formados em placas de microtitulação de 96 poços como previamente descrito (item 3.3.1). A seguir, trataram-se os biofilmes com 100 µL de cada um dos biocidas testados em diferentes concentrações, obtidas por diluição seriada (1/2 até 1/2048) em meio RPMI com 2% de glicose. Incubou-se por 48 horas. A seguir, se aspirou ao meio sobrenadante, lavou-se três vezes em PBS, adicionou-se 20 µL de MTT e procedeu-se à leitura espectrofotométrica conforme já citado (adaptação das metodologias empregadas por Théraud et al., 2004; Nett et al., 2008).

3.7.3 Ensaio para avaliação da eficácia de biocidas na prevenção de biofilmes

Paralelamente, realizaram-se também ensaios de prevenção, onde uma suspensão preparada pela mistura equitativa da suspensão padronizada de células (10^6 – item 3.6.1) de isolados representativos de *C. parapsilosis* e *C. albicans* SC5314 e biocidas previamente diluídos em RPMI em diferentes concentrações foi inoculada nas microplacas. Incubou-se por 48 horas, estaticamente, a 37°C. Após aspiração cuidadosa do meio sobrenadante, lavaram-se os poços e adicionou-se sal de tetrazólio (MTT) para verificação da viabilidade celular por colorimetria conforme especificado no item 3.3.1

A concentração efetiva do biocida para inibir a formação ou inviabilizar o biofilme de dispersar sua progênie foi determinada pela redução de 100% da densidade óptica (0% de sobreviventes) comparada ao controle livre de substância química (100% de sobreviventes). Cada condição experimental testada foi realizada em quaduplicata e a média aritmética dos resultados foi utilizada para os cálculos estatísticos. O número de células viáveis também foi associado à densidade óptica por cálculos estatísticos.

3.8 ENSAIOS COM SUBSTÂNCIAS NATURAIS

3.8.1 Preparo das substâncias vegetais

As substâncias vegetais utilizadas no estudo foram doadas pelos pesquisadores responsáveis após o processo de extração. Para a obtenção dos extratos, as folhas, galhos ou raízes das plantas foram secas e moídas e em seguida, submetidos a processos de extração e partição com solventes orgânicos fornecendo as frações de diversas polaridades a serem estudadas. As frações selecionadas foram submetidas a diferentes técnicas cromatográficas, incluindo cromatografia em coluna sobre sílica ou Sephadex LH-20, cromatografia em

camada delgada, além da cromatografia líquida de alta eficiência visando o isolamento e purificação de substâncias. A determinação das estruturas químicas dos componentes puros foi realizada por análises espectrométricas.

A procedência das substâncias utilizadas no estudo é listada a seguir: o ácido *ent-pimara-8* (14), 15-dien-19-óico e as resinas de *P. elliottii* e *P. tropical* foram cedidas pelo Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais da Universidade de Franca – GPPNUF, representado pelo prof. Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio; a maitenina e a pristimerina foram cedidas pelo Instituto de Química de Araraquara, UNESP, Departamento de Química Orgânica, representado pela prof. Dr^a. Maysa Furlan; o ácido úsnico (com grau de pureza de 98%) foi adquirido na empresa Sigma-Aldrich (*St. Louis, EUA*) e os óleos essenciais utilizados foram cedidos pela *Body And Mind Beautiful Com. de Cosméticos Ltda* (CNPJ 07.021.304/0001-84), Franca, SP.

3.8.2 Avaliação da atividade antifúngica nos isolados de *C. parapsilosis* no modo de crescimento planctônico

Para os ensaios com substâncias naturais baseou-se nos trabalhos publicados por Karpanen et al., 2008 e Hendry et al., 2009, com algumas adaptações. Os microrganismos usados na avaliação de atividade antifúngica foram crescidos e mantidos em meio de ágar Sabouraud-dextrose por 24 h em temperatura ambiente. O método utilizado para avaliação da atividade antifúngica foi o método da microdiluição em caldo, segundo a AFST- EUCAST, 2008. O meio usado foi RPMI 1640 com L-glutamina em tampão a pH 7,0 com ácido morfolinopropano-sulfônico (MOPS) 0,165 M, suplementado com glicose 2%. Os extratos ou substâncias puras foram dissolvidos em DMSO (5% v/v) em diluídas em RPMI em concentrações decrescentes a partir de 4000 mg/L a 7,80 mg/L, e adicionados às microplacas de 96 cavidades. Os óleos essenciais também foram inicialmente dissolvidos em DMSO (5% v/v) e diluídos em RPMI em concentrações decrescentes a partir de 8000 mg/L a 15,6 mg/L. As suspensões celulares contendo leveduras foram preparadas em solução salina 0,85% e diluídas em RPMI até concentração final de 1×10^5 a 5×10^5 unidades formadoras de colônias por mL (CFU/mL). Cada suspensão foi inoculada nas microplacas previamente preparadas com as diluições das substâncias químicas e incubadas a 37 °C por 24 h. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de substância que inibiu completamente o crescimento do fungo. Pelo método espectrofotométrico, a CIM foi definida como a menor concentração em que a densidade óptica foi equiparada à do controle de

esterilidade (RPMI). Os resultados foram analisados espectrofotometricamente. Em relação à CIM dos extratos vegetais, foi utilizada a classificação sugerida por Aligiannis et al., 2001 (Tab. 5). *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 e o antifúngico anfotericina B (0,03 a 16 µg/mL) foram usados como controles. A atividade antimicrobiana do DMSO a 5% (v/v) e o meio de cultura sem o inoculo, acrescido dos extratos vegetais ou da droga controle também foi testada em placa separada concomitante ao ensaio. Os ensaios foram realizados em duplicata e o valor médio obtido foi utilizado para compilação dos dados. A metodologia utilizada para substâncias naturais foi baseada no trabalho de Pierce et al., 2009 e para os óleos essenciais em Braga et al., 2008 e Zu et al., 2010.

Tabela 5 - Valores de inibição para testes com material vegetal, segundo Aligiannis et al., 2001.

<i>Inibição</i>	<i>Valores de CIM</i>
Forte inibição	CIM menor ou igual a 500 mg/L
Moderada inibição	CIM entre 600 a 1500 mg/L
Fraca inibição	CIM maior ou igual a 1600 mg/L

CIM = Concentração Inibitória Mínima

C. krusei ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 e o antifúngico anfotericina B (0,03 a 16 µg/mL) foram usados como controles. Como controle foi usado DMSO a 5% (v/v) em placa separada concomitante ao ensaio. Os ensaios foram realizados em duplicata e o valor médio obtido foi utilizado para compilação dos dados.

3.8.3 Avaliação da atividade antifúngica sobre biofilmes de isolados de *C. parapsilosis*

Aos biofilmes de isolados representativos de *C. parapsilosis* do estudo, pré-formados (24 h de desenvolvimento) em microplaca e lavados (x 3) com PBS estéril adicionaram-se as substâncias naturais, previamente dissolvidas em DMSO a 5% (v/v) e diluídas em RPMI em concentrações de 2000 mg/L à 3,9 mg/L. Incubou-se por 48 h a 37°C, lavou-se (x 3) com PBS estéril e procedeu-se ao ensaio de redução do MTT. Os resultados foram analisados visual e espectrofotometricamente. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de substância que causou a morte das células do biofilme traduzida pela persistência da cor amarela (inviabilidade celular), após a adição e incubação com o MTT. Pelo método espectrofotométrico, a CIM foi definida como a menor concentração em que a densidade óptica foi equiparada ou em valor abaixo à do controle de

esterilidade (RPMI). DMSO a 5% (v/v) foi avaliado contra os biofilmes em placa separada concomitante ao ensaio. Anfotericina B (0,03 a 16 µg/mL) foi usada como controle. Os ensaios foram realizados em duplicata e o valor médio obtido foi utilizado para compilação dos dados.

3.8.4 Avaliação da atividade sinérgica de óleos essenciais e anfotericina B sobre biofilmes

Foi utilizado o teste do “tabuleiro de xadrez” para avaliação dos óleos essenciais que demonstraram atividade (cedro e canela) em conjugação com anfotericina B. O meio de cultura utilizado foi o RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose, tamponado com MOPS 0,165 M, pH 7,0. Formaram-se biofilmes (coluna 2 a 11) em placa de microtitulação de 96 poços conforme descrito no item 3.3.1. Alíquotas (50 µL) de diluições seriadas decrescentes em RPMI dos óleos essenciais (16.000 mg/L – 31,5 mg/L) foram dispensadas nas colunas (2 a 11) de microplacas de 96 poços. A seguir, 50 µL da droga antifúngica diluída em RPMI em concentrações decrescentes (64mg/L – 1 mg/L) foram adicionados às linhas da placa de microtitulação (linha A a G). A coluna 1 serviu de controle (4 orifícios controle negativo – 200 µL de RPMI; 4 orifícios controle positivo: 100 µL de RPMI e 100 µL de inóculo). À coluna 12 adicionou-se apenas a anfotericina B em concentrações decrescentes (CIM da droga) e, à linha H, apenas o óleo em concentrações decrescentes (CIM do óleo) sobre os biofilmes pré-formados e lavados. Incubaram-se as placas a 37°C por 48 h. Lavou-se (3 x) com PBS e procedeu-se ao ensaio de redução do MTT. Para verificar o efeito combinatório das frações, adotou-se o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), que é obtido pela soma da concentração inibitória fracionada (CIF) da fração 1 (óleo) mais a CIF da fração 2 (antifúngico), conforme a fórmula:

$$\text{CIF} = \frac{\text{CIM da substância em combinação}}{\text{CIM da substância sozinha}}$$

$$\text{ICIF} = \text{CIF}_1 + \text{CIF}_2$$

A combinação é definida como sinérgica quando o ICIF é menor ou igual a 0,5; aditiva quando ICIF é maior que 0,5 e menor/igual a 1,0; indiferente quando ICIF é maior que 1 e menor/igual 4; e antagônica quando ICIF é maior 4,0 (KARPANEN et al., 2008; HENDRY et al., 2009).

3.8.5 Ensaio de prevenção de biofilmes de *C. parapsilosis* por óleos essenciais

Foram utilizadas as mesmas condições descritas no item 3.7.2 substituindo-se o biocida pelo óleo essencial. Os critérios de interpretação também foram os mesmos citados.

3.9 TÉCNICAS PROTEÔMICAS

3.9.1 Cultivo das células fúngicas e extração das proteínas

As leveduras foram cultivadas em 100 mL meio YEPD (1% de extrato de levedura; 2% de glicose e 2% de peptona) na concentração de 1×10^4 – 5×10^4 UFC/mL até atingirem a fase *log* da curva de crescimento. A seguir, o cultivo foi centrifugado e lavado de 3 vezes com água gelada para retirada do meio de cultura residual. Ao sedimento foi adicionado tampão 10mM Tris – HCl (pH 8,8) e macerado em almofariz de porcelana, contendo nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Procedeu-se à centrifugação por 40 minutos 13.000 g, desprezou-se o sobrenadante e procedeu-se a dosagem das proteínas.

3.9.2. Determinação da concentração de proteínas totais: método de Bradford

A determinação da concentração de proteínas totais presentes nos extratos protéicos obtidos conforme item 3.9.1 foi realizado pelo método de Bradford, 1976. A concentração proteica presente nos extratos foi expressa utilizando-se albumina bovina como padrão. Para isso, realizou-se curva analítica de calibração na faixa de concentração entre 5 a 2000 mg/mL, com tampão PBS. Para as medidas espectrofotométricas, pipetaram-se, em tubos de vidro, 50 μ L do extrato protéico, onde se adicionou 1,5 mL do restivo de Bradford que consiste em uma mistura de azul de Comassie G-250 a 0,01% (m/v), 4,75% (v/v) de etanol e 8,5% (v/v) de ácido fosfórico. Após 10 minutos de reação, foi determinada a absorbância das amostras em 595 nm, usando espectrofotômetro UV/Vis (*Micronal*, modelo B582).

3.9.3. Separação eletroforética em duas dimensões (2D- PAGE)

Inicialmente, as proteínas foram separadas pelo ponto isoelétrico em fitas (*IPG-immobilized pH gradient*), de 13 cm com valores de pH variando entre 3 a 10 (*Immobiline DryStrips*, *GE Healthcare*, *Uppsala*, *Suécia*). Para focalização isoelétrica, foram aplicados 250 μ L de tampão de hidratação de amostra em uma canaleta do aparato sobre o qual as fitas foram colocadas. Em seguida, foram adicionados cerca de 2000 μ L de óleo mineral sobre cada fita para evitar o ressecamento da mesma. O gel das fitas foi reidratado por 16-20 h a

22°C. Após este período, as fitas foram levadas ao sistema focalizador Ettan IPGphor 3 (*GE Healthcare*), e, a amostra protéica foi aplicada sobre cada fita e o focalizador programado para aplicação do programa formado pelas seguintes etapas: (1) 500V até 500 Vh, (2) 1000V até 800Vh, (3) 10000V até 11300Vh e (4) 10000V até 3000Vh. Em média, o programa foi executado durante 5,5 h.

Ao término da focalização, as fitas foram equilibradas em duas etapas. Na primeira delas, foram usados 10 mL da solução contendo 6 mol/L de uréia, 2% (m/v) de SDS, 30% (v/v) de glicerol, 50 mmol/L de tris-Hcl a 1,5 mol/L (pH 8,8), 0002% de azul de bromofenol e 1% (m/v) de DTT para cada fita. Na segunda etapa, foi usada a mesma solução, porém, neste caso, o DTT (*GE Healthcare*), foi substituído por 2,5% (m/v) de iodoacetamida (*GE Healthcare*). Cada etapa de equilíbrio da fita foi executada por 15 minutos, sob leve agitação. Em seguida, as fitas foram aplicadas em géis de poliacrilamida a 12,5% previamente preparados em placas de 180 x 160 11,5 mm.

3.9.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A fim de comparação, a cada corrida eletroforética foram colocados em cada gel, 5 µL do padrão de massa molecular (*GE Healthcare*), contendo as proteínas β-fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa). Anteriormente à aplicação no gel, o padrão protéico foi aquecido em banho-maria por 5 minutos, conforme recomendação do fabricante.

Após a focalização, as fitas foram aplicadas em géis de poliacrilamida a 12,5%, previamente montados entre placas de vidro. Após ser acomodada apropriadamente cada fita e o padrão sob o gel, foi adicionada solução aquecida (40°C) de agarose a 0,5% (m/v), para proporcionar contato efetivo entre a fita e o gel.

As condições eletroforéticas aplicadas como pH, força iônica e tampão foram as mesmas estabelecidas por Laemmli, 1970. A solução de tampão de corrida empregada no preenchimento dos reservatórios da cuba foi formada por Tris-Base a 0,06 mol/L, glicina a 0,5 mol/L e SDS a 0,15% (m/v).

Na corrida eletroforética foi fixada a corrente de 15 v aplicado no gel durante 15 minutos, e, 30 v por gel por aproximadamente 240 minutos. Os parâmetros elétricos foram fornecidos por uma fonte de alimentação. A separação eletroforética foi realizada mantendo-se a temperatura entre 6-10°C para evitar distorções das bandas, e, conseqüentemente, problemas de resolução. Ao término da separação das proteínas (identificado pela linha de

azul de bromofenol), o gel foi lavado com água mili-Q durante 5 minutos para remoção do excesso de SDS. Em seguida, o mesmo foi fixado com solução constituída por 40% (v/v) de etanol, 10% (v/v) de ácido acético, 50% de água (v/v) e corado durante 90 minutos, sob leve agitação, usando solução de azul de Coomassie G-250 a 1% (m/v) preparado com 45% (v/v) de metanol, 45% (v/v) de água deionizada e 10% (v/v) de ácido acético glacial (NEUHOFF et al., 1988). O excesso de azul de Coomassie G-250 foi removido utilizando-se solução descorante, composta por água deionizada (75%), etanol (20%) e ácido acético glacial (5%). Esta solução foi trocada até que fosse possível visualizar apropriadamente as bandas de proteínas.

Depois das etapas de coloração e descoloração, as imagens dos géis foram capturadas por *scanner* (Amersham Bioscience). Em seguida, foi realizada a análise das imagens empregando-se o programa *ImageMaster 2D Platinum* (Genebio, Genebra, Suíça) versão 6,0 que permite estimar as massas molares e o ponto isoelétrico (pI) das proteínas, bem como o número de proteínas obtidas no gel.

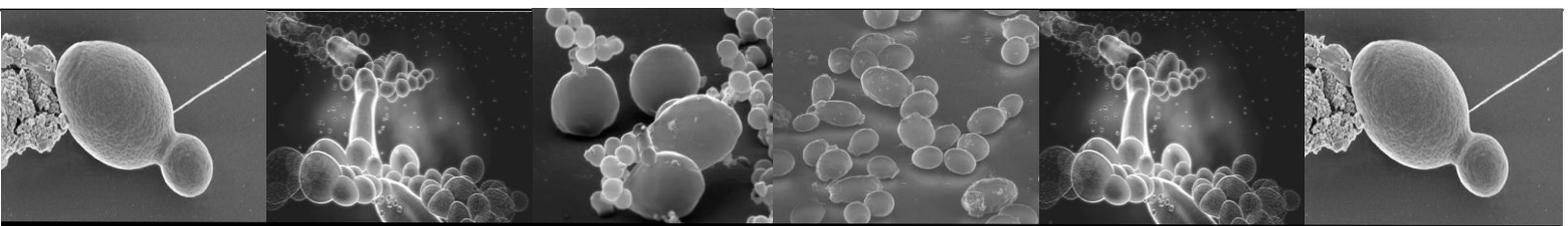
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas utilizaram-se os testes listados abaixo (HOFFMANN, 2006):

- a) teste t de Student ($p < 0,05$) para comparação dos valores individuais da densidade óptica (D.O) dos biofilmes dos isolados de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*
- b) coeficiente de correlação de Pearson ($p < 0,001$) para avaliar a correlação entre D.O. e enumeração das unidades formadoras de colônias (UFC)
- c) Para se verificar a forma como se associam as porcentagens de mortalidade e a concentração de cada um dos produtos químicos (hipoclorito, H_2O_2 , proxitane e ácido acético), foi utilizado o modelo de regressão que, no presente estudo aplica-se com propriedade já que os valores da variável dependente são médias de 4 valores. Através desse modelo foram traçadas as curvas de melhor ajuste, isto é, aquelas que apresentaram o maior valor de r^2 , coeficiente que, no experimento em questão, estima quanto da variação da mortalidade é consequência da variação das concentrações. A curva que melhor se ajustou aos dados amostrais foi a curva exponencial.
- d) Os testes de significância para r foram realizados com a aproximação de Fischer e para a análise estatística, t de Student, sendo que em todos os casos o valor de p

ficou abaixo de 0,05, mostrando correlação significativa entre as variáveis concentração e porcentagem de mortalidade.

RESULTADOS



4 RESULTADOS

Os isolados do estudo foram recuperados a partir de 30 coletas de águas em uma Unidade de hemodiálise a partir de pontos específicos de coleta, assim distribuídos: rede de abastecimento (8), pós-osmose reversa (7), reservatório da osmose reversa (6), salas de diálise I (8), II (14) e III (12), entrada de máquinas (41) e sistema de reuso (4), perfazendo um total de 100 isolados.

4.1 TIPAGEM MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *C. parapsilosis*

4.1.1 DNA genômico

Os DNAs totais dos 100 isolados de *C. parapsilosis* apresentaram em média relação A_{260nm}/A_{280nm} entre 1,8 e 2,0. O DNA, analisado por eletroforese em gel de agarose, a 1%, apresentou-se como banda única e definida, de tamanho superior ao do fragmento maior de 2000 pb, livre de contaminação com RNAs e degradação parcial (Fig. 15).

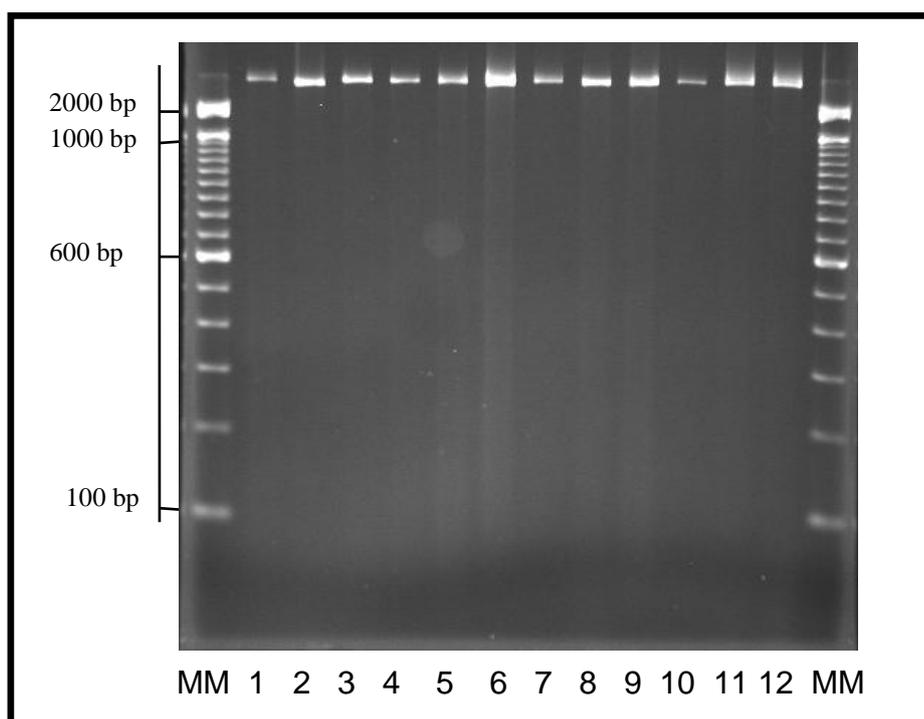


Figura 15. Eletroforese de DNA genômico de 12 isolados escolhidos aleatoriamente com fenótipos de *C. parapsilosis* em gel de agarose a 1%. MM 100 pb (*Fermentas*)

4.1.2 Tipagem por PCR das cepas de *C. parapsilosis*

O DNA de todas as cepas do grupo *C. parapsilosis* foi amplificado pelo iniciador com a sequência Fwd, 5'-GTTGATGCTGTTGGATTGT-3'; Rev, 5'-

CAATGCCAAATCTCCAA-3', que analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% revelou ter amplificado fragmento de aproximadamente 716 pares de base, correspondente ao gene SADH, conforme demonstrado na Fig. 16.

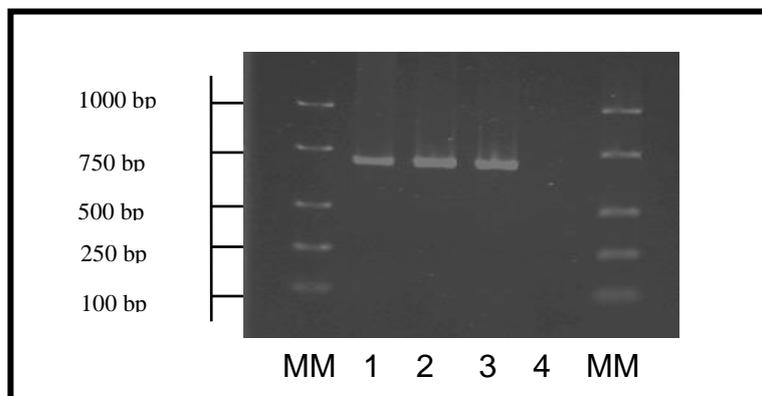


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos amplicons de *C. parapsilosis* padrões ATCC (1- *C. orthopsilosis* ATCC 96141; 2- *C. metapsilosis* ATCC 96143 e 3- *C. parapsilosis* ATCC 90019) e 4- água (controle negativo). MM 1000 pb (*Fermentas*).

4.1.3 Restrição enzimática dos produtos de PCR

Os fragmentos de DNA obtidos na reação de PCR foram tratados com a enzima Ban I e submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%) nas condições já descritas revelando duas bandas (521 e 196 bp) para *C. parapsilosis* sensu stricto, quatro bandas (370, 188, 93 e 60 bp) para *C. metapsilosis* e nenhum sítio de restrição nos isolados de *C. orthopsilosis*. Na Fig.17 está ilustrado a restrição do produto de PCR das cepas padrões e do estudo e nas Fig. 18 e Fig. 19 são apresentados apenas isolados representativos do estudo.

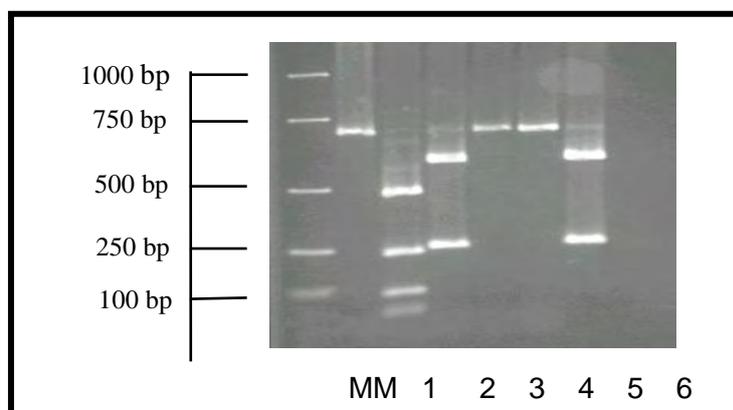


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose (2%), após restrição (Ban I), das cepas padrões ATCC (1- *C. orthopsilosis*, 2- *C. metapsilosis* e 3- *C. parapsilosis*) e 3 isolados ensaiados (4- isolado 18 (*C. orthopsilosis*); 5- isolado B (*C. orthopsilosis*) e 6- isolado 132 (*C. parapsilosis*). MM 1000 pb (*Fermentas*)

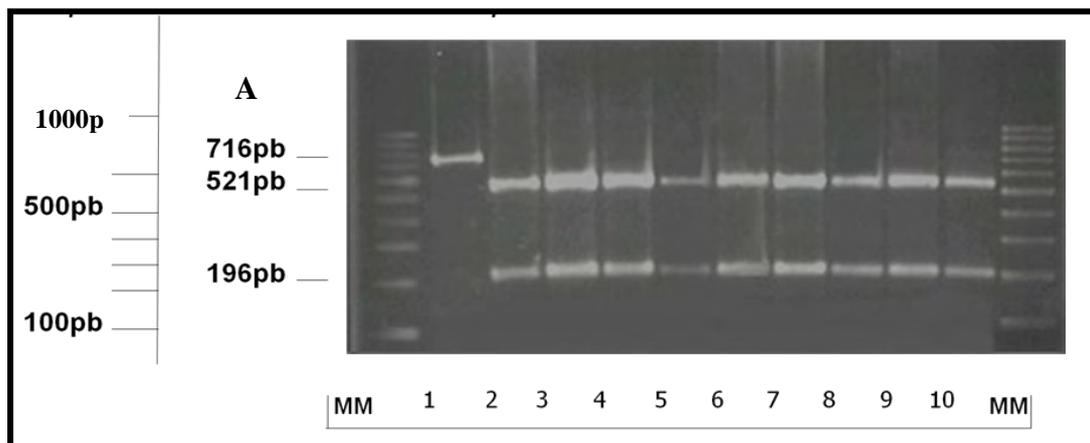


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose (2%), após restrição (Ban I), de cepas do estudo (1- *C. orthopsilosis*; 2 a 10- *C. parapsilosis* sensu stricto, MM- massa molecular 1000pb (Fermentas) A = massa molecular correspondente as bandas de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*.

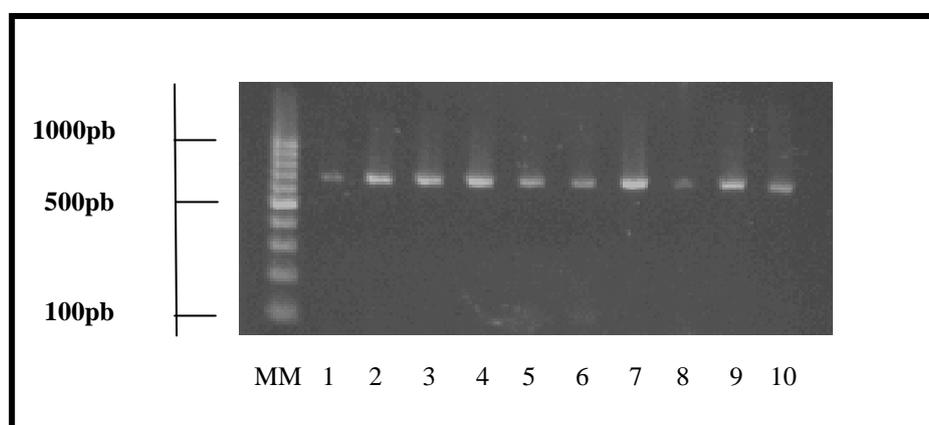


Figura 19. Eletroforese em gel de agarose (2%), após restrição (Ban I), de cepas do estudo: 1- 10 *C. orthopsilosis*; MM- massa molecular 1000nb (Fermentas).

A tipagem molecular dos 100 isolados classificados fenotípicamente como *C. parapsilosis* revelou que os mesmos eram constituídos de 47% de *C. orthopsilosis* e 53% de *C. parapsilosis* sensu stricto (Fig. 20).

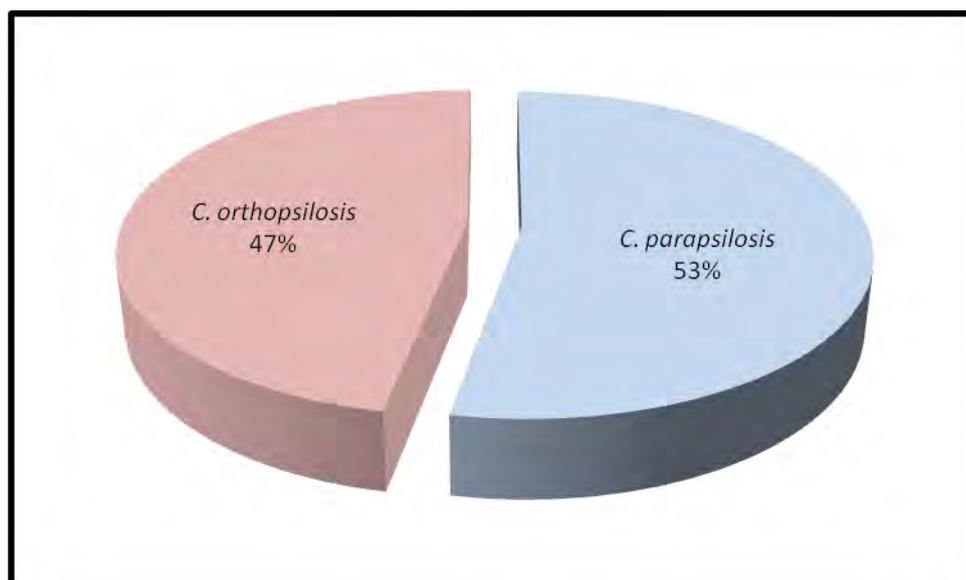


Figura 20. Distribuição das espécies de *Candida* entre os isolados provenientes da Unidade de Hemodiálise estudada.

4.2. ENSAIOS DE BIOFILME

No estudo, verificou-se que 72% do total das cepas (100) eram capazes de formar biofilme. Apesar da distribuição quase equitativa das duas espécies, entre os isolados de *C. orthopsilosis*, a percentagem de cepas formadoras de biofilmes (80,1% - 38/47) não era significativamente maior ($p=0,063$) que entre os isolados de *C. parapsilosis* sensu stricto (64,1% - 34/53), conforme demonstrado na Fig. 21.

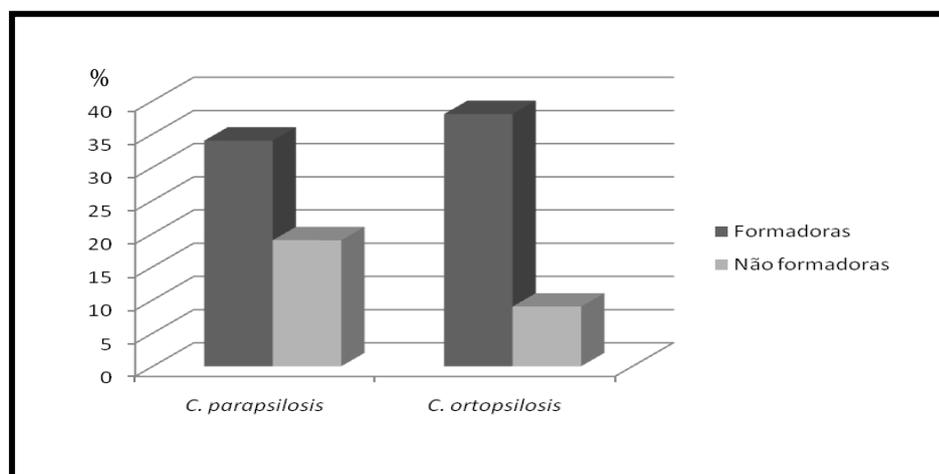


Figura 21. Representação gráfica da comparação da capacidade de formação de biofilmes entre os isolados (100 cepas) estudados.

4.2.1 Ensaios de cinética da formação de biofilmes por espectrofotometria

Todas as cepas do estudo foram ensaiadas quanto à capacidade de crescimento no modo de biofilme segundo a metodologia de Pierce et al., 2008, modificado, em que cepas produtoras de biofilme (aderidas à microplaca) são visualizadas após coloração e cepas não produtoras de biofilme não aderem e, portanto, são lavadas com o PBS, conforme mostrado na Fig. 22.

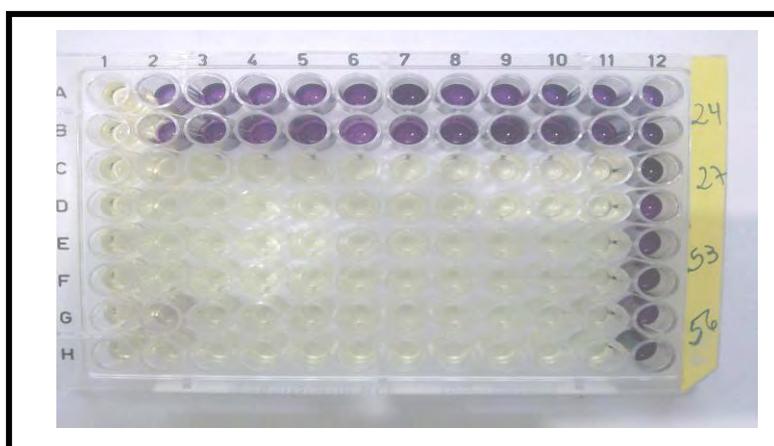


Figura 22. Placa de microtitulação de 96 poços com cepa produtora de biofilme (24, fileiras A e B) e cepas não produtoras de biofilme (27- fileiras C e D; 53 – fileiras E e F e 56- fileiras G e H), após ensaio de redução com MTT.

A utilização de sal de tetrazólio (MTT) permitiu a quantificação de biofilmes através da medida da viabilidade celular, por espectrofotometria; pois nas células com atividade metabólica o sal é reduzido ao seu produto, cristal de formazana que é solubilizado pela adição de solventes, DMSO ou álcool isopropílico, sendo, nesse estudo, utilizados MTT e álcool isopropílico. A Fig. 23 mostra uma placa de isolados de *C. parapsilosis* (cepas 104, 106, 114 e 120) obtidas no estudo, pronta para realização de leitura espectrofométrica em leitor de microplacas.

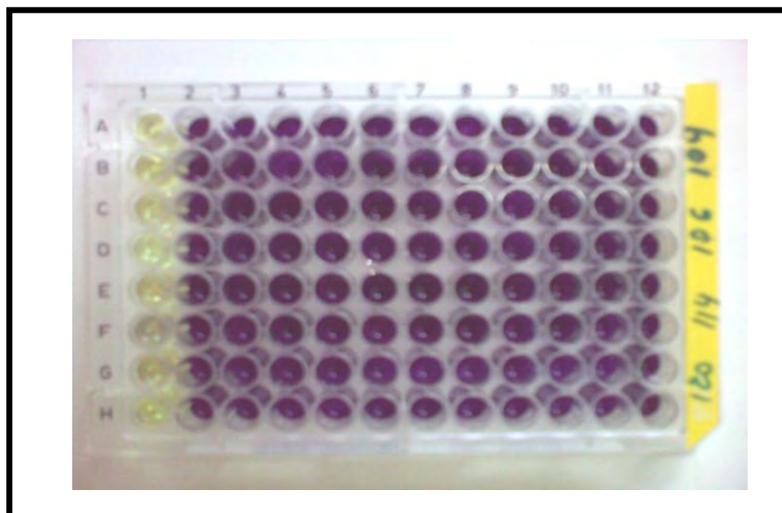


Figura 23. Placa de microtitulação de 96 poços evidenciando biofilmes com células viáveis demonstradas pela solubilização dos cristais de formazana formados (colunas 2 a 12) e controle de esterilidade (coluna 1- RPMI) que permanece com a coloração amarela do sal de tetrazólio.

Foi constatado na metodologia empregada, que havia uma pequena variabilidade na capacidade de formação de biofilme entre os isolados de uma mesma espécie e também entre as duas espécies testadas, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa, demonstrada através do teste t de *Student* ($p= 0,332$) e dos cálculos estatísticos descritos na Tab. 6.

Tabela 6. Dados estatísticos obtidos após a leitura espectrofométrica (540 nm) dos biofilmes formados pelas 100 cepas do estudo, em poços independentes em uma mesma placa de microtitulação, após 24 horas de crescimento.

Parâmetro Estatístico	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
	(D.O _{540nm})	(D.O _{540 nm})
Média	1963,4	2014,3
Mediana	1897,5	1975,3
Desvio padrão	294,3	250,0
Erro padrão	50,5	29,5
Abaixo de 95% do intervalo de confiança	1864,5	1932,2
Acima de 95% do intervalo de confiança	2062,3	2096,5
Máximo	2758,3	2631,3
Mínimo	1365,3	1572,3

4.2.2 Ensaio de cinética da formação de biofilmes por número de microrganismos

O número de células viáveis do biofilme em intervalos distintos de desenvolvimento (4, 6, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 84 e 96 h) a 37°C foi estimado, em paralelo à leitura da densidade óptica, por semeadura das células do biofilme em agar Sabouraud (RAMAGE et al., 2001; ANGIOLELLA et al., 2008; SENEVIRATNE et al., 2009; RICICOVA et al., 2010) e expressos como log UFC/mL (RICICOVA et al., 2010; UPPULURI et al., 2010). Ao se construir curvas com os valores médios \pm erro padrão do crescimento individual de cada isolado, observou-se que a cinética de formação de biofilme pelas espécies de *C. parapsilosis* apresentaram um padrão similar. Também, ao se associar as taxas de crescimento (número de UFC/mL) específico para as diferentes espécies de *Candida* e atividade metabólica (D.O. _{540 nm}) constatou-se que houve uma correlação significativa ($r = 0,940$, $r = 0,951$ e $r = 0,958$) para *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. albicans* (SC 5314), respectivamente, conforme demonstrado na Fig. 24. Para a análise estatística, foi escolhido o coeficiente de correlação de Pearson (r). Valores de $p < 0,001$ indicaram significância estatística.

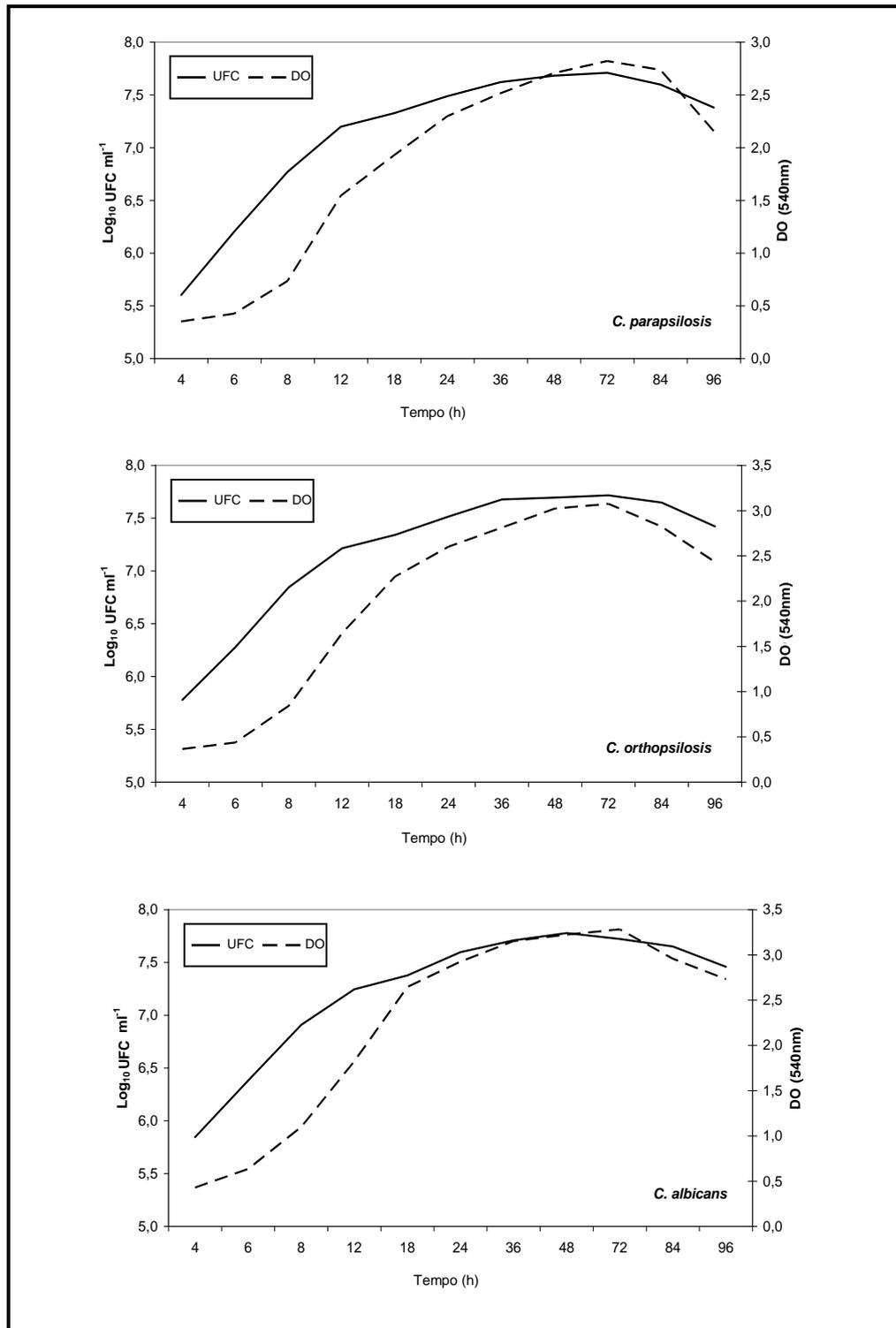


Figura 24. Comparação dos resultados obtidos pela metodologia da redução de MTT (expresso em D.O.) e número de células viáveis totais (expresso em \log_{10} UFC/mL) em diferentes intervalos de tempo (4 a 96 h) para as duas espécies de *C. parapsilosis* e a cepa referência *C. albicans* SC 5314.

4.3 DOCUMENTAÇÃO DOS BIOFILMES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Apesar da sua natureza destrutiva, as observações com MEV forneceram informações úteis sobre as diferentes morfologias celulares presentes na estrutura do biofilme. Biofilme da cepa referência *C. albicans* SC 5314 consistiu de uma densa rede de células de todas as morfologias, mostrado nas Fig. 25 e 26.

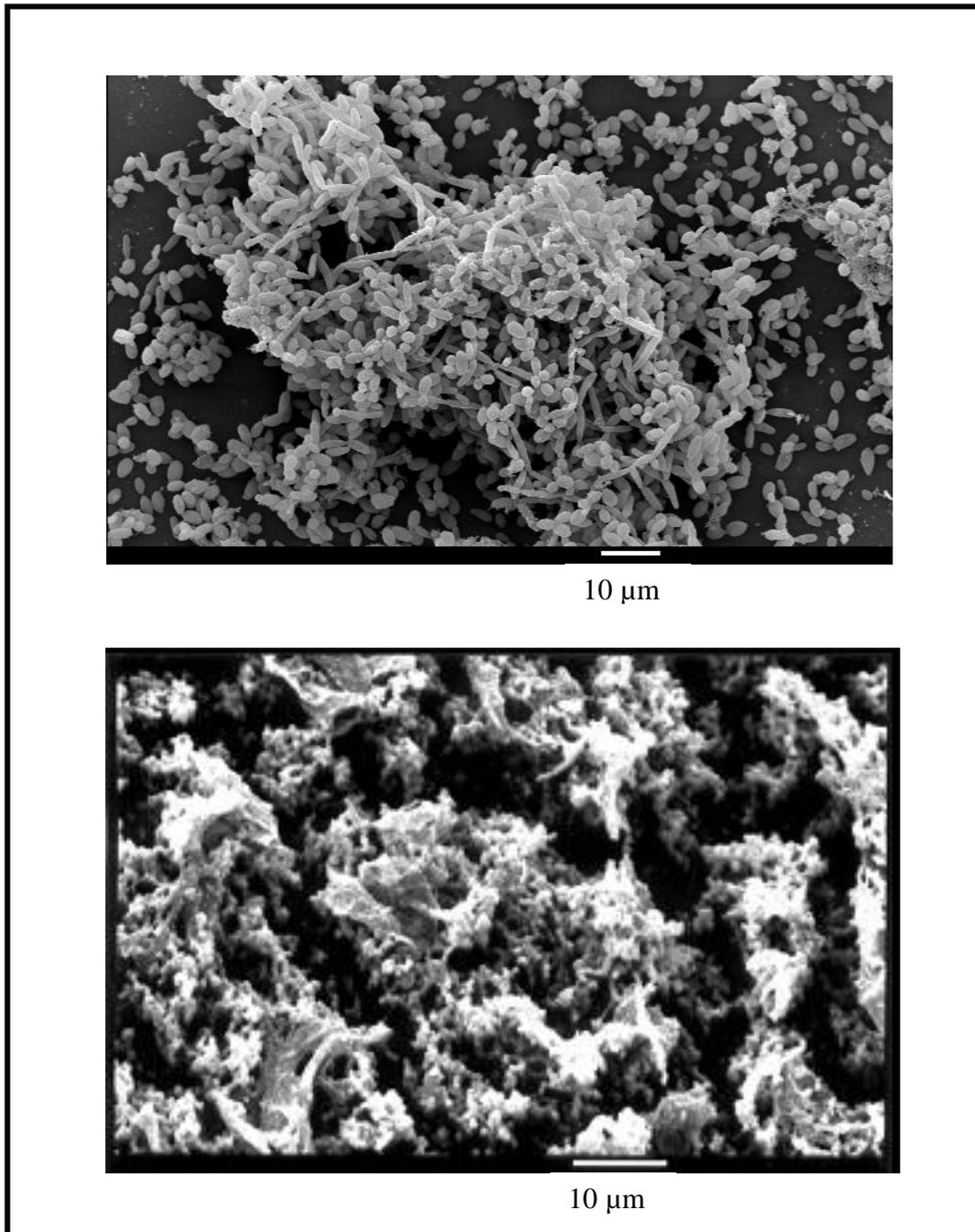


Figura 25. Eletromicrografia de biofilme de cepa referência de *C. albicans* (SC 5314).

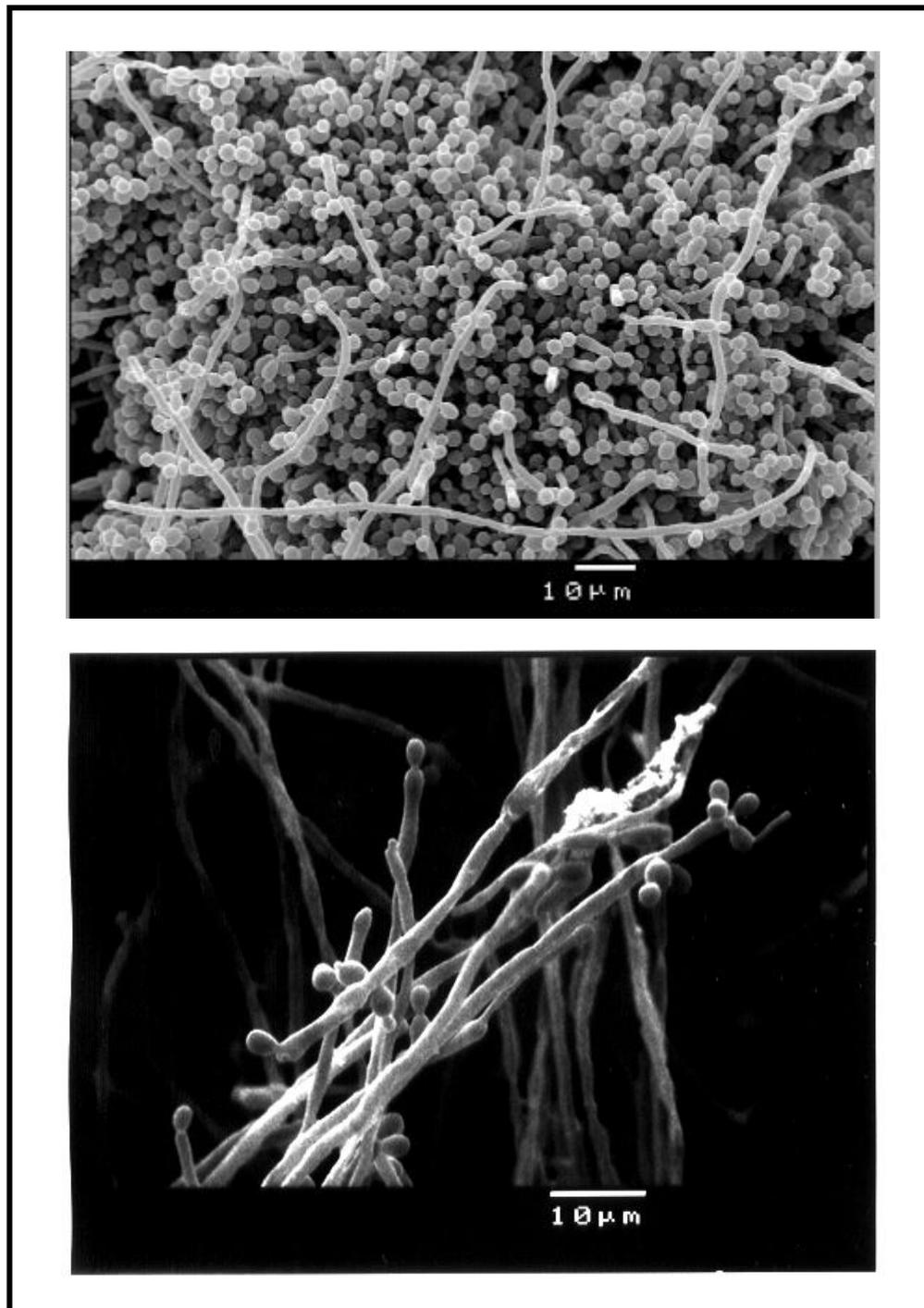


Figura 26. Eletromicrografia de biofilme de *C. albicans* (cepa SC5314) em diferentes magnitudes.

Tanto os biofilmes de *C. orthopsilosis* (Fig. 27 e 28) como os de *C. parapsilosis* (Fig. 29 e 30) formaram camadas de blastoconídios e raras pseudohifas. Aparentemente, o biofilme de *C. orthopsilosis* forma mais pseudo-hifas rudimentares do que *C. parapsilosis*.

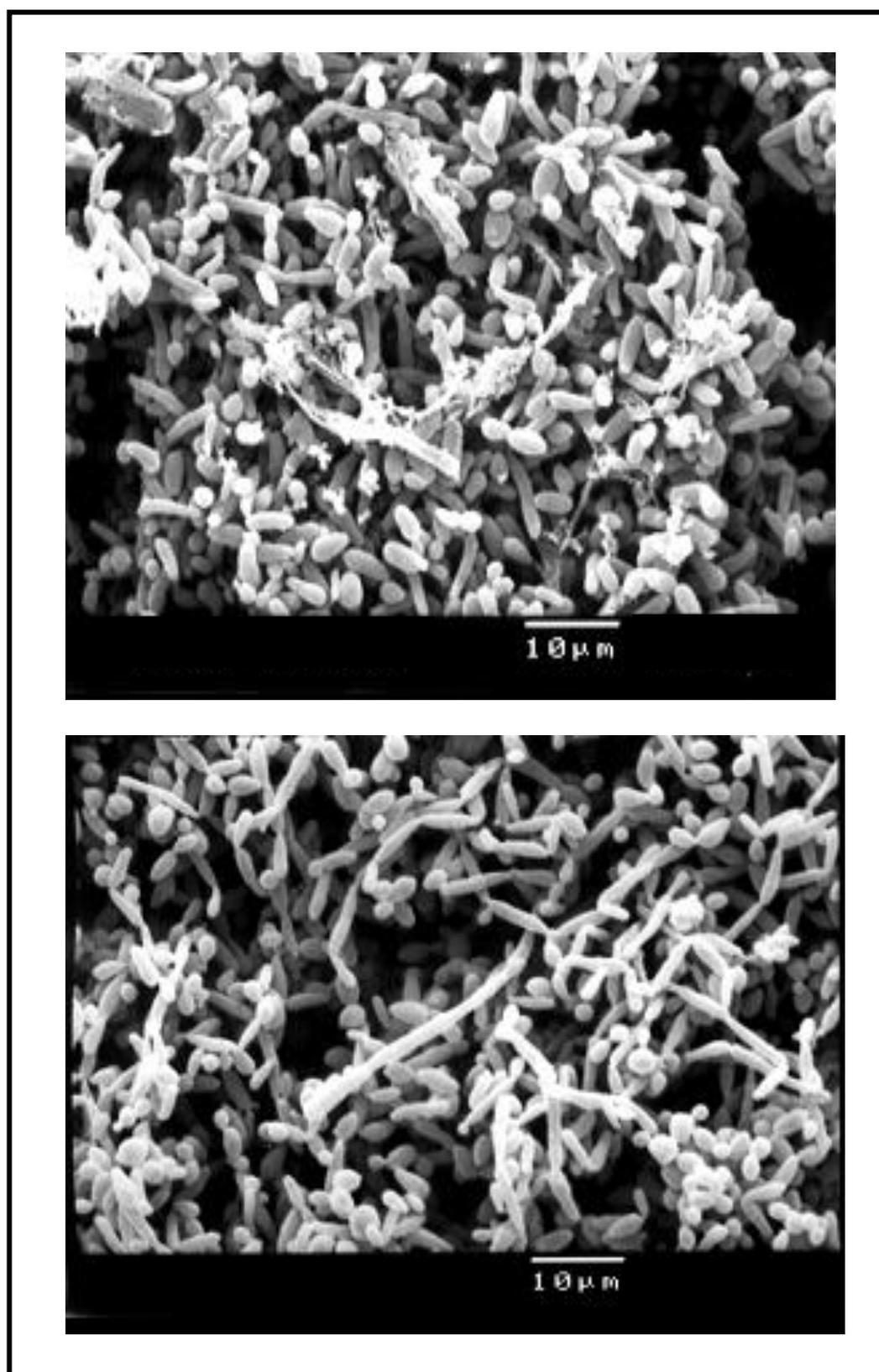


Figura 27. Eletromicrografia de biofilme de isolado representativo de *C. orthopsilosis* do estudo.

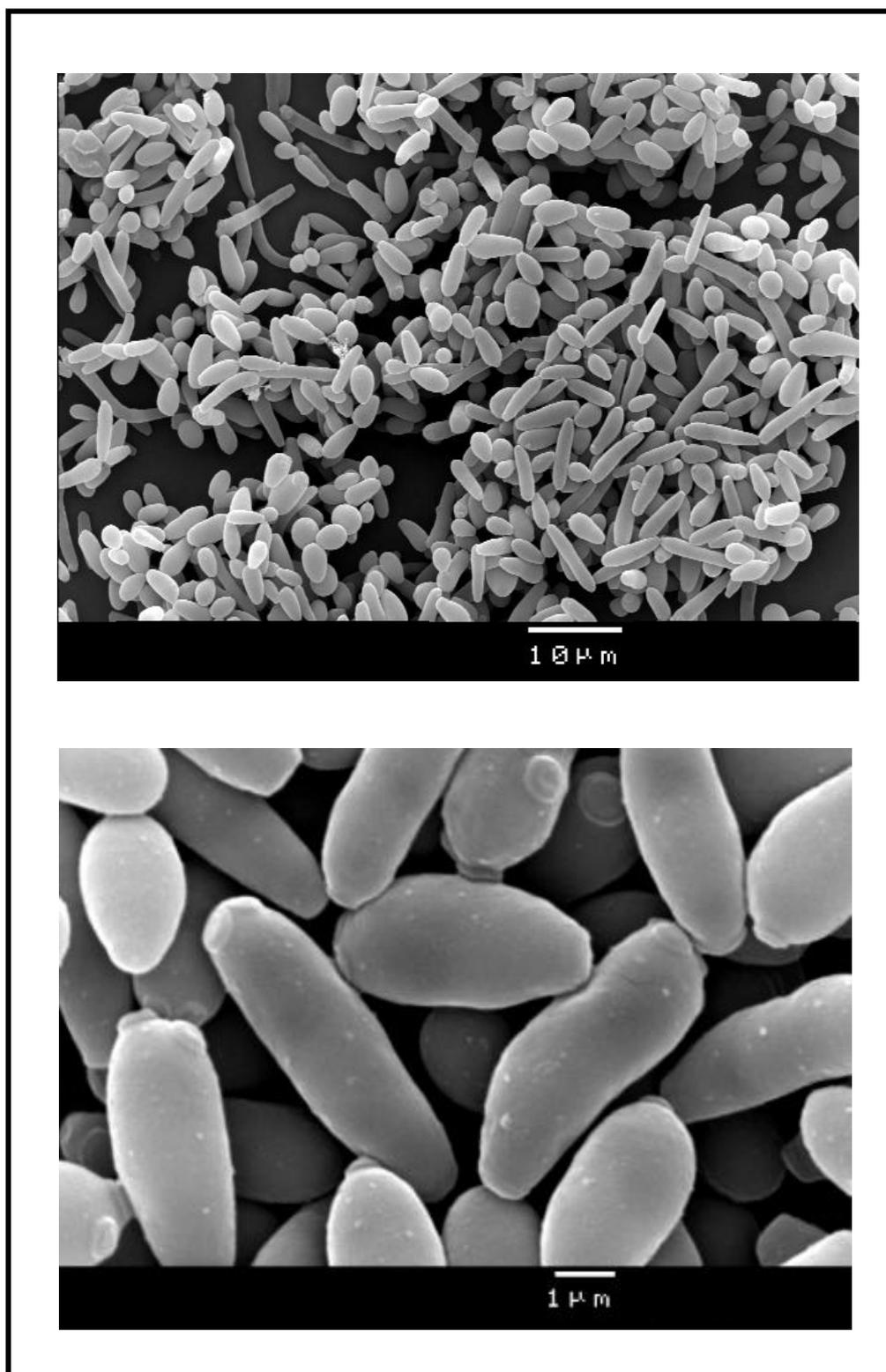


Figura 28. Eletromicrografia de aspectos celulares de biofilme de isolado representativo de *C. orthopsilosis* do estudo em diferentes magnitudes.

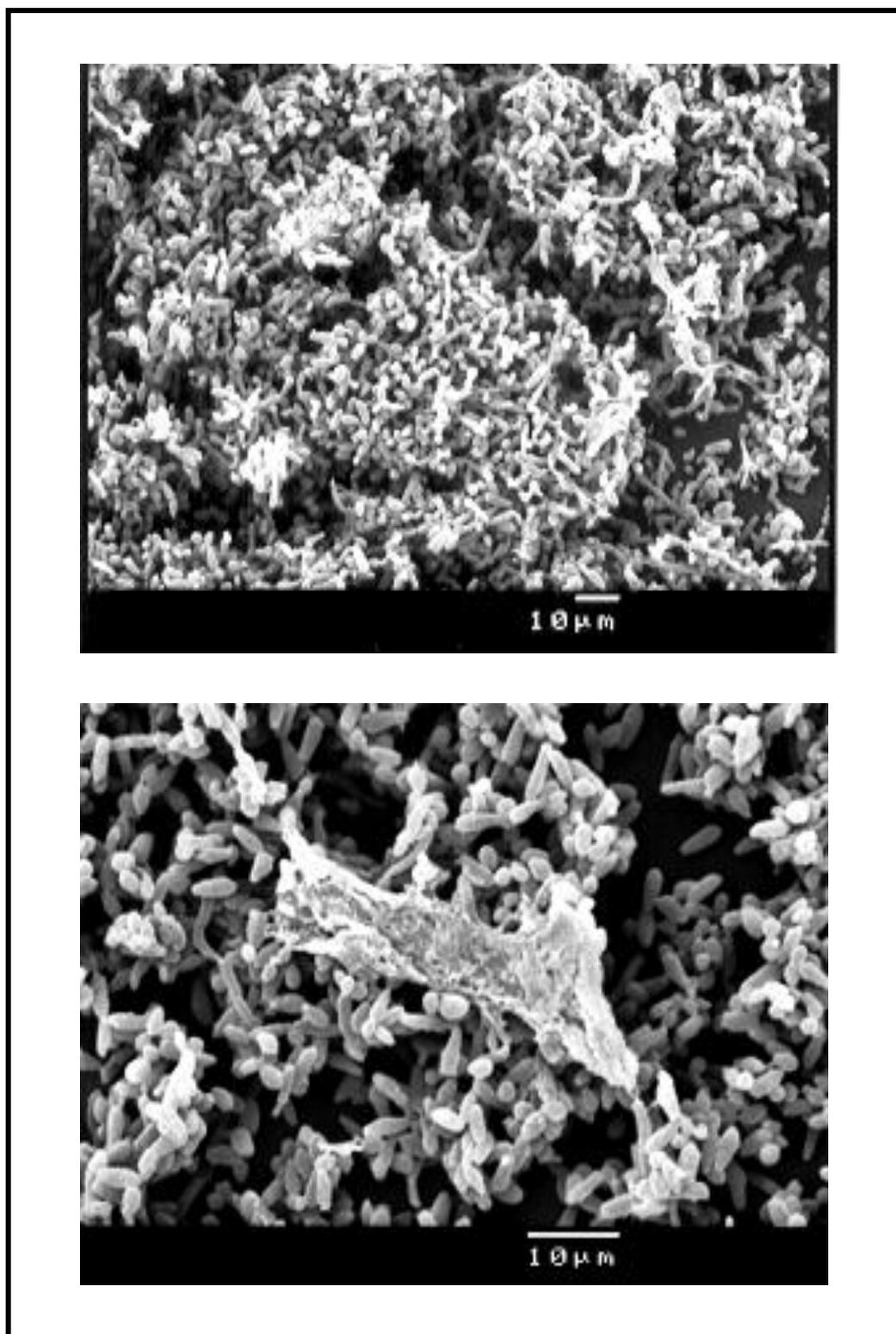


Figura 29. Eletromicrografia de biofilme de isolado representativo de *C. parapsilosis* do estudo.

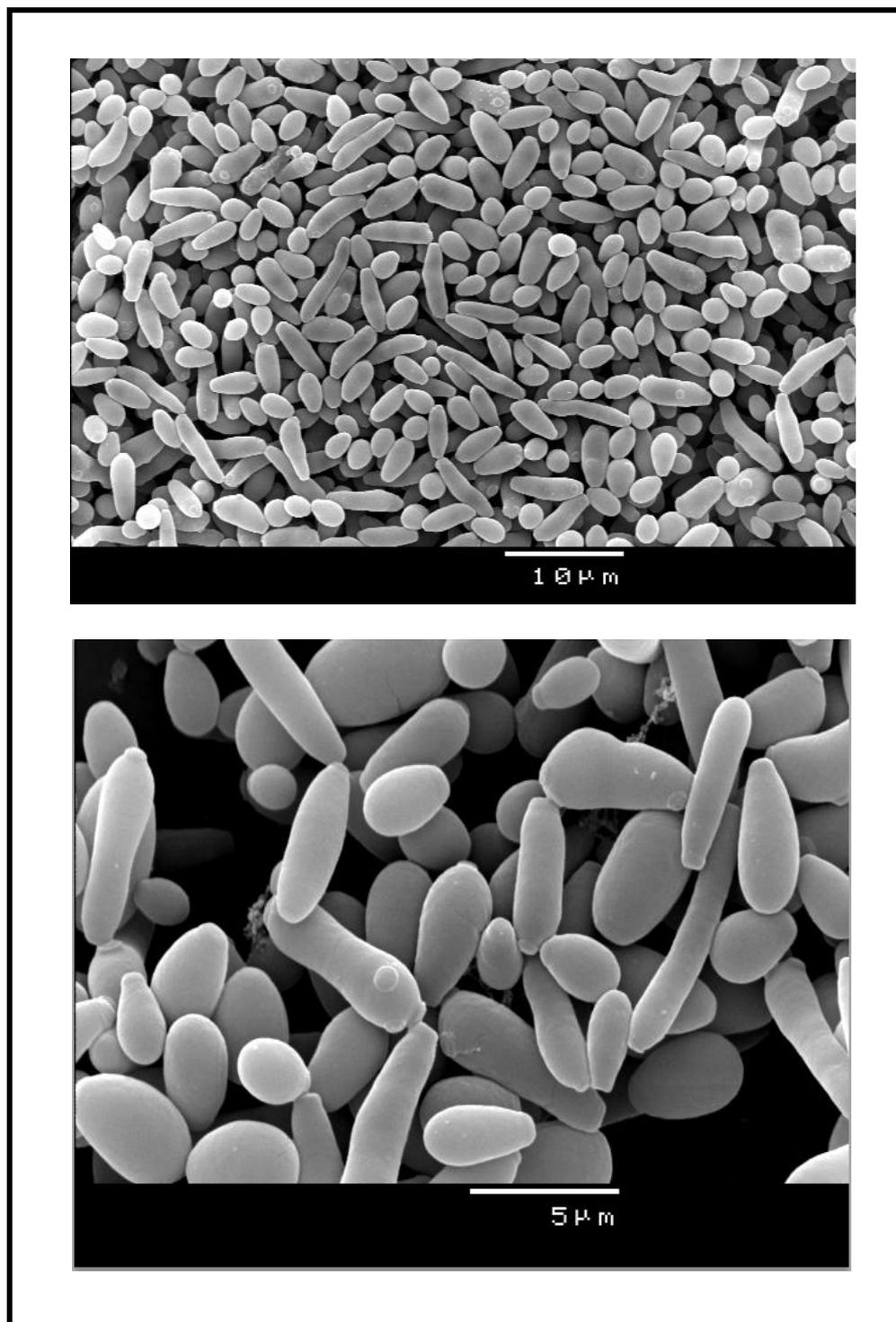


Figura 30. Eletromicrografia de aspectos celulares de biofilme de isolado representativo de *C. parapsilosis* do estudo em diferentes magnitudes.

Pela técnica de MEV foi também monitorado o efeito das duas principais drogas de uso clínico em nosso meio, fluconazol e anfotericina B, sobre as células dos biofilmes formados. A Fig. 31 mostra os detalhes de anfotericina B, sobre as células sésseis de *C. albicans* na concentração de CIM para o isolado (4 $\mu\text{g/mL}$), previamente determinado pela metodologia de microplacas com redução do MTT. As figuras, 32 e 33, evidenciam os efeitos da droga sobre as células sésseis de *C. parapsilosis* e *C. orthopsislosis* (CIM = 16 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente. O efeito de fluconazol sobre as células do biofilme, para todas as cepas citadas na concentração de 512 $\mu\text{g/mL}$, foi similar, provocando apenas leves alterações, demonstradas na Fig. 34.

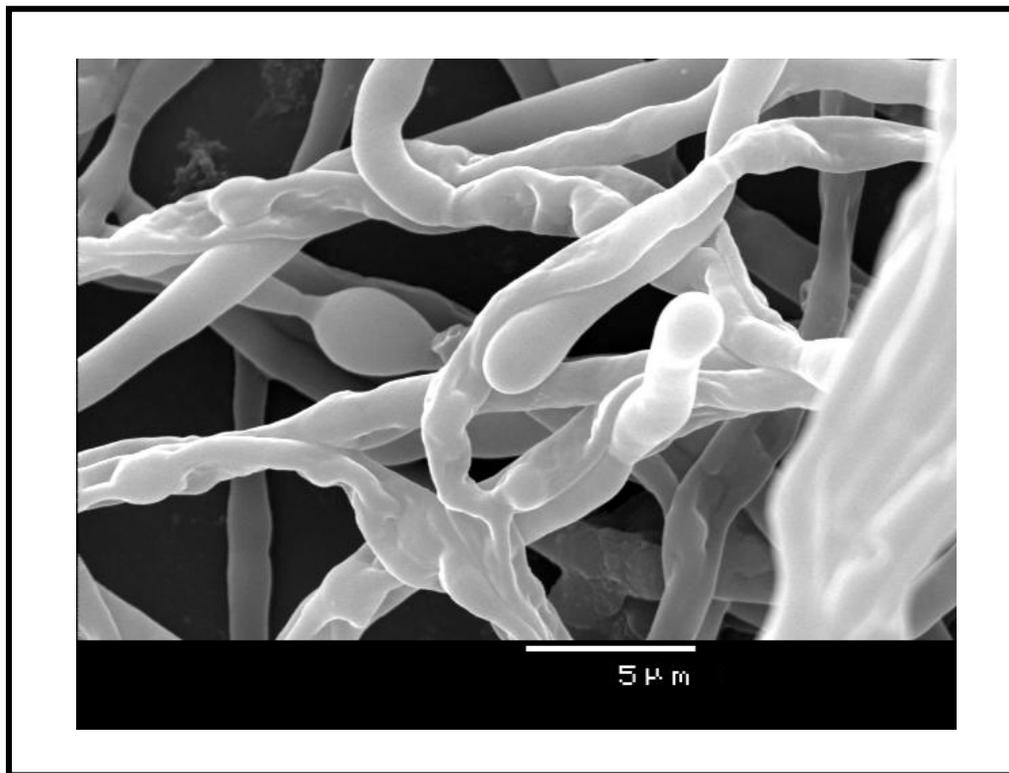


Figura 31 Eletromicrografia do efeito de anfotericina B sobre as células sésseis de *C. albicans* após 48 h de exposição dos biofilmes (24 h de formação) à droga.

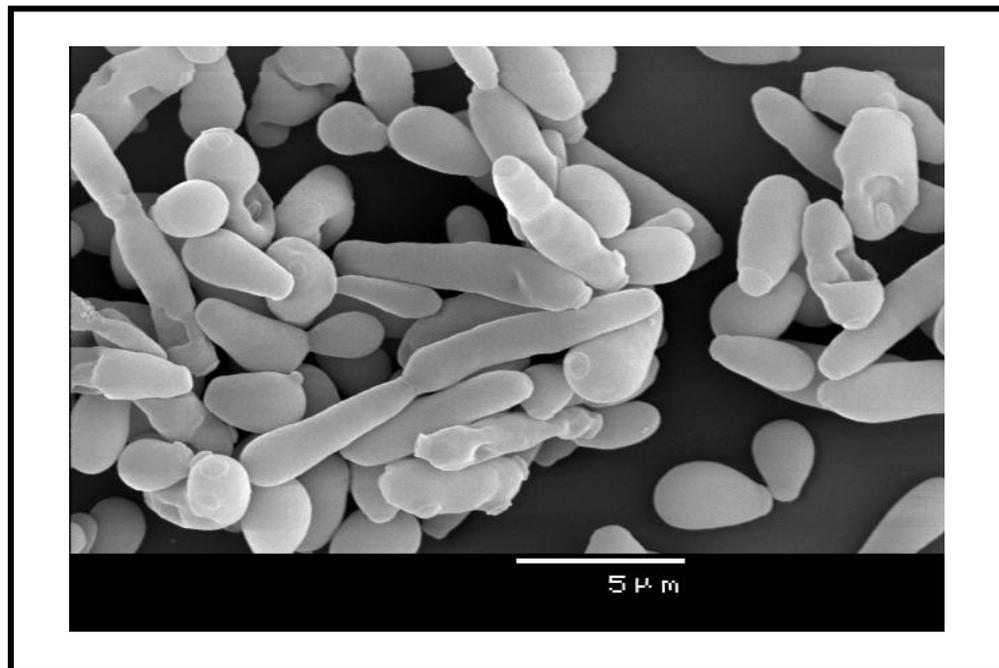


Figura 32. Eletromicrografia do efeito de anfotericina B sobre as células sésseis de *C. parapsilosis* após 48 h de exposição dos biofilmes (24 h de formação) à droga.

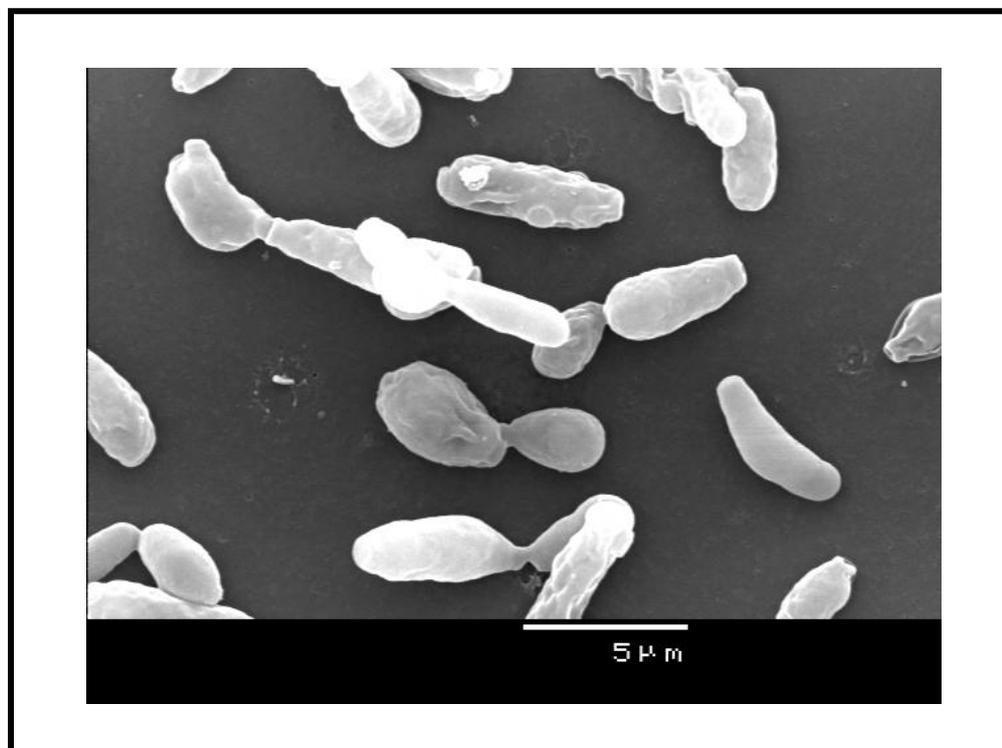


Figura 33. Eletromicrografia do efeito de anfotericina B sobre as células sésseis de *C. orthopsilosis* após 48 h de exposição dos biofilmes (24 h de formação) à droga.

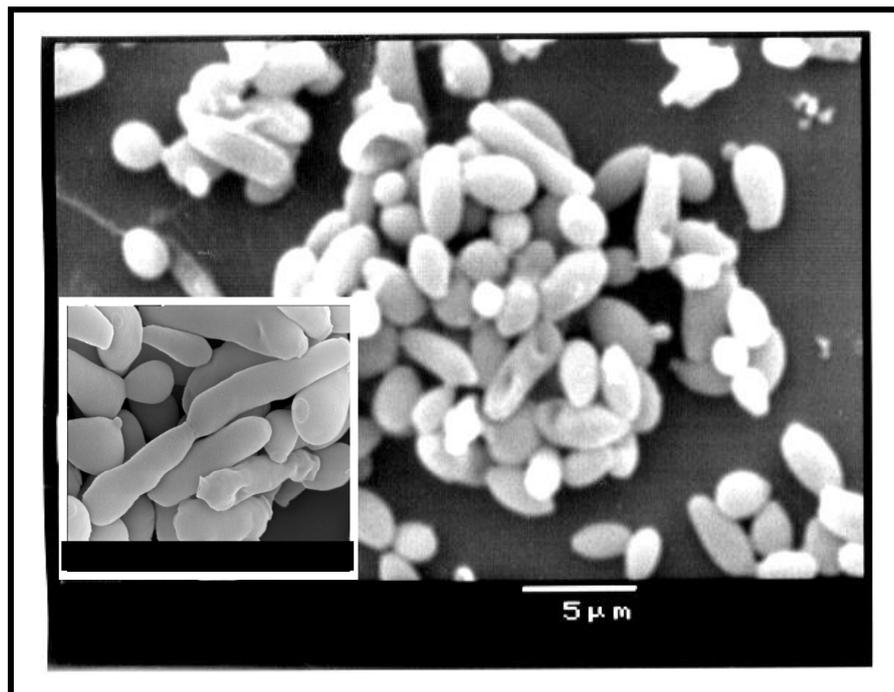


Figura 34. Eletromicrografia do efeito de fluconazol sobre as células sésseis de *C. parapsilosis* (isolado 123) após 48 h de exposição dos biofilmes (24 h de formação) à droga

4.4. DOCUMENTAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DOS BIOFILMES POR UTILIZAÇÃO DE FLUOROCROMOS

O uso de fluorocromos é particularmente útil na determinação da atividade/viabilidade celular *in situ* de células aderidas. O fluorocromo FUN-1 foi aplicado para determinar a atividade/viabilidade, pois permite a observação de estruturas cilíndricas intravacuolares em células fúngicas metabolicamente ativas que se coram em vermelho. Em associação, também se utilizou o fluorocromo Alexa fluor 488 conjugado à concanavalina A (ConA-AF), que seletivamente se liga a polissacárides da parede celular, incluindo resíduos de α -manopiranosil e α -glucopiranosil dando fluorescência verde.

Das várias observações microscópicas efetuadas, a concentração que permitiu um melhor contraste entre as células aderidas e a superfície, e que corava todas as células viáveis e metabolicamente ativas foi de 10 μ M de FUN-1 e 25 μ g/mL de ConA-AF. A cepa referência *C. albicans* SC5314 formadora de biofilme foi utilizada para finalidade comparativa. A Fig. 35 mostra células sésseis de *C. albicans* em observação ao microscópio confocal a laser (CLSM - *confocal laser scanning microscope*).

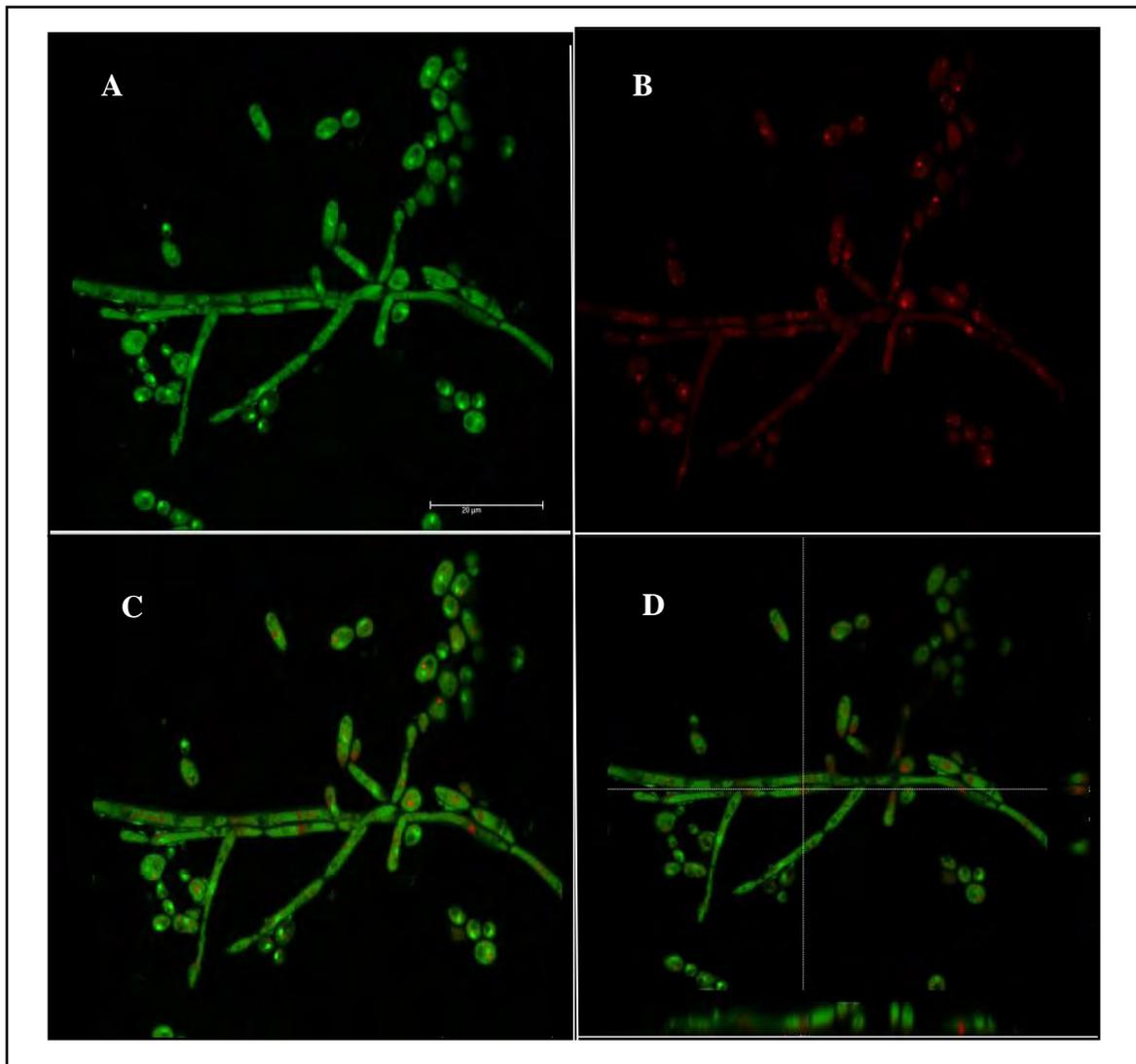


Figura 35. Observação ao microscópio confocal a laser de células de biofilmes sendo que a parede celular dos blastoconídios de *C. albicans* (SC 5314) foi marcada por ConA (concentração final de 25µg/mL) em (A). As células viáveis foram coradas com FUN-1 (concentração final de 10 µM) que formam agregados intracelulares vermelho-fluorescentes em (B). Em (C) a sobreposição das imagens (A) e (B) mostra que a maioria das células é viável. Em (D) corte transversal e longitudinal da imagem (C) demonstrando que os agregados vermelhos estão dentro das células. A barra de 20µm de tamanho em (A) é a mesma para todas as imagens.

Na Fig. 36 são apresentadas imagens de microscópio confocal a laser, aumento 400x, células associadas a biofilme de isolado representativo de *C. parapsilosis* (isolado 9) e *C. orthopsilosis* (isolado 13), numa das observações coradas com os dois fluorocromos, simultaneamente, demonstrando sua viabilidade. Além disso, está também demonstrado que as células do biofilme metabolizaram FUN-1, processo bioquímico distinto do que ocorre com o MTT, confirmando que as células sésseis estão metabolicamente ativas (KHUN et al., 2002)

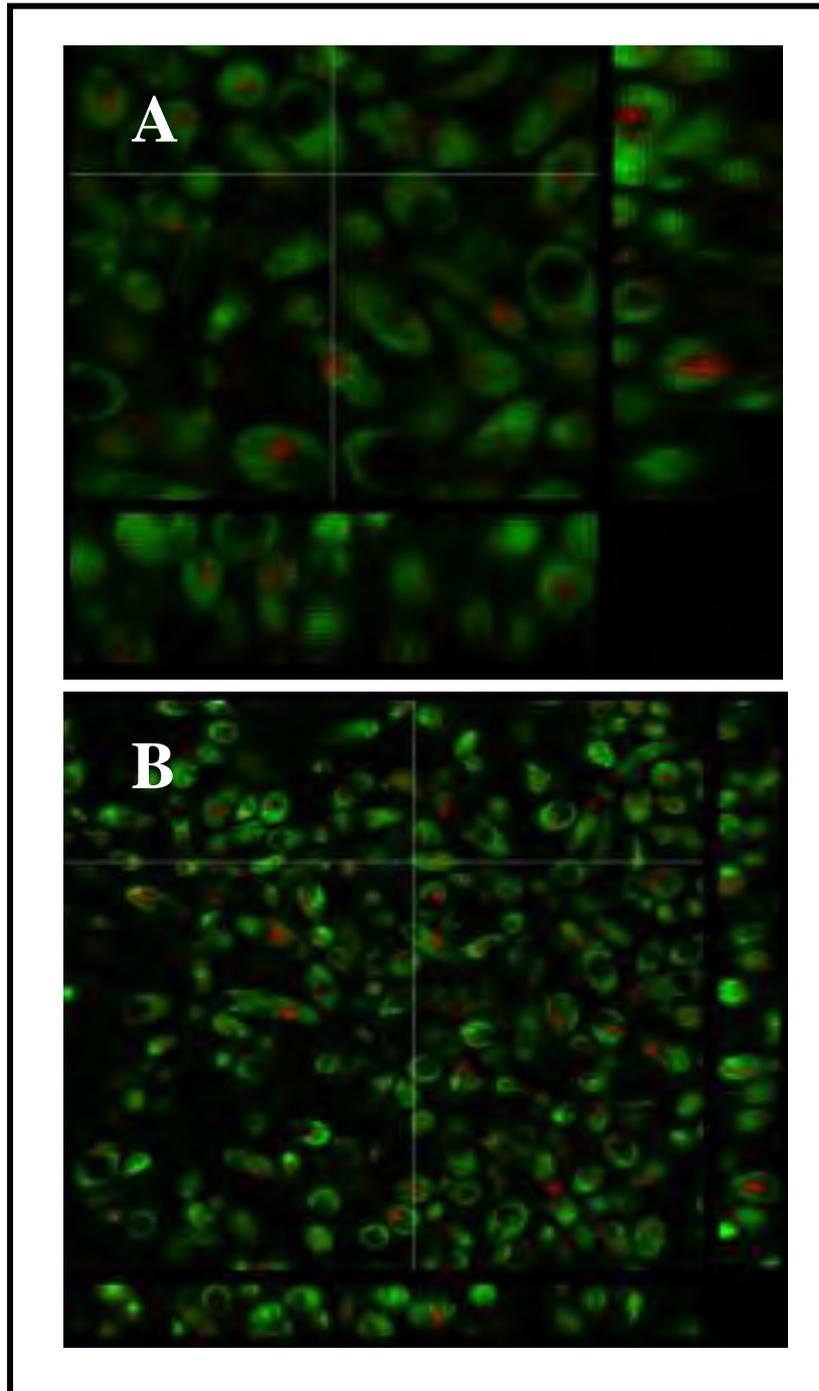


Figura 36. Análise de imagens de CLSM de biofilmes de *C. parapsilosis* (imagem A) e *C. orthopsilosis* (imagem B) processadas para mostrar uma visão lateral do biofilme mostrando tanto a coloração com CA-AF como a coloração com FUN-1. Em ambas as imagens ilustram-se o vermelho de FUN-1 convertido no interior dos blastoconídios (eixo xz ou vista lateral).

Em um esforço para correlacionar nossos resultados de CIM com mudanças celulares nos biofilmes de *Candida*, foi utilizado CLSM para examinar os efeitos de antifúngicos em células associadas a biofilme. As células tratadas com fluconazol, como esperado, permanecem viáveis (Fig. 37), pois grande número de blastoconídios apresenta agregados intracelulares de FUN-1, confirmando suas viabilidades e em acordo com a CIM encontrada (> 512 mg/L).

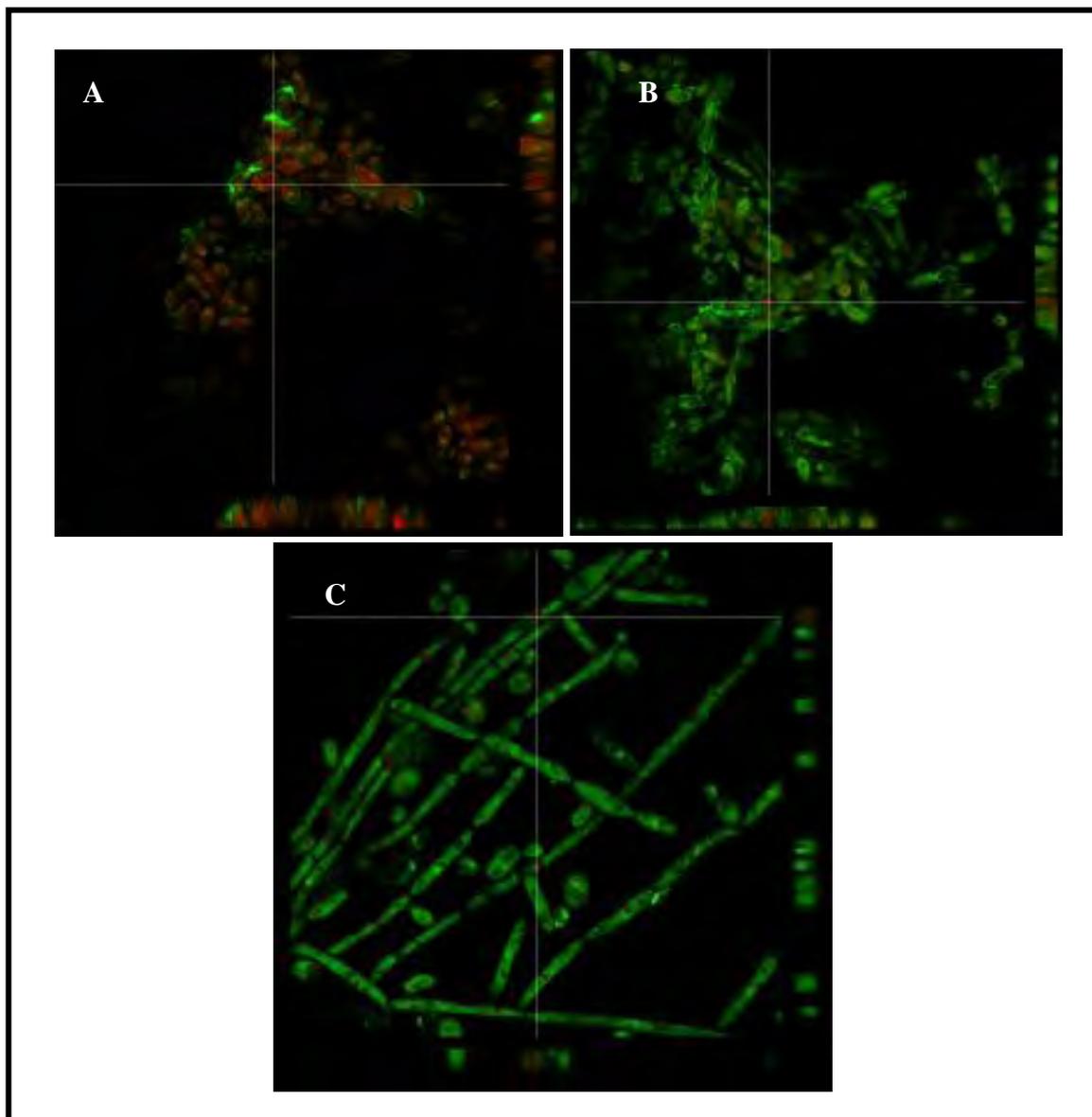


Figura 37. Biofilme (24 h de crescimento) de *C. parapsilosis* sensu stricto (imagem A), *C. orthopsilosis* (imagem B) após exposição ao fluconazol ($512 \mu\text{g/mL}$) por 48 horas, comparadas a biofilme de *C. albicans* SC5314 (imagem C), não exposto à droga, corados com ConA e FUN-1. Todas as imagens são do eixo xz ou vista lateral, demonstrando viabilidade celular, pois FUN-1 está em agregados intracelulares. Aumento de 400x.

Além disso, também em concordância com os resultados de CIM, os biofilmes expostos a anfotericina B praticamente não fluorescem. ConA cora fracamente as células e a coloração de FUN-1 desaparece, evidenciando morte celular (Fig. 38).

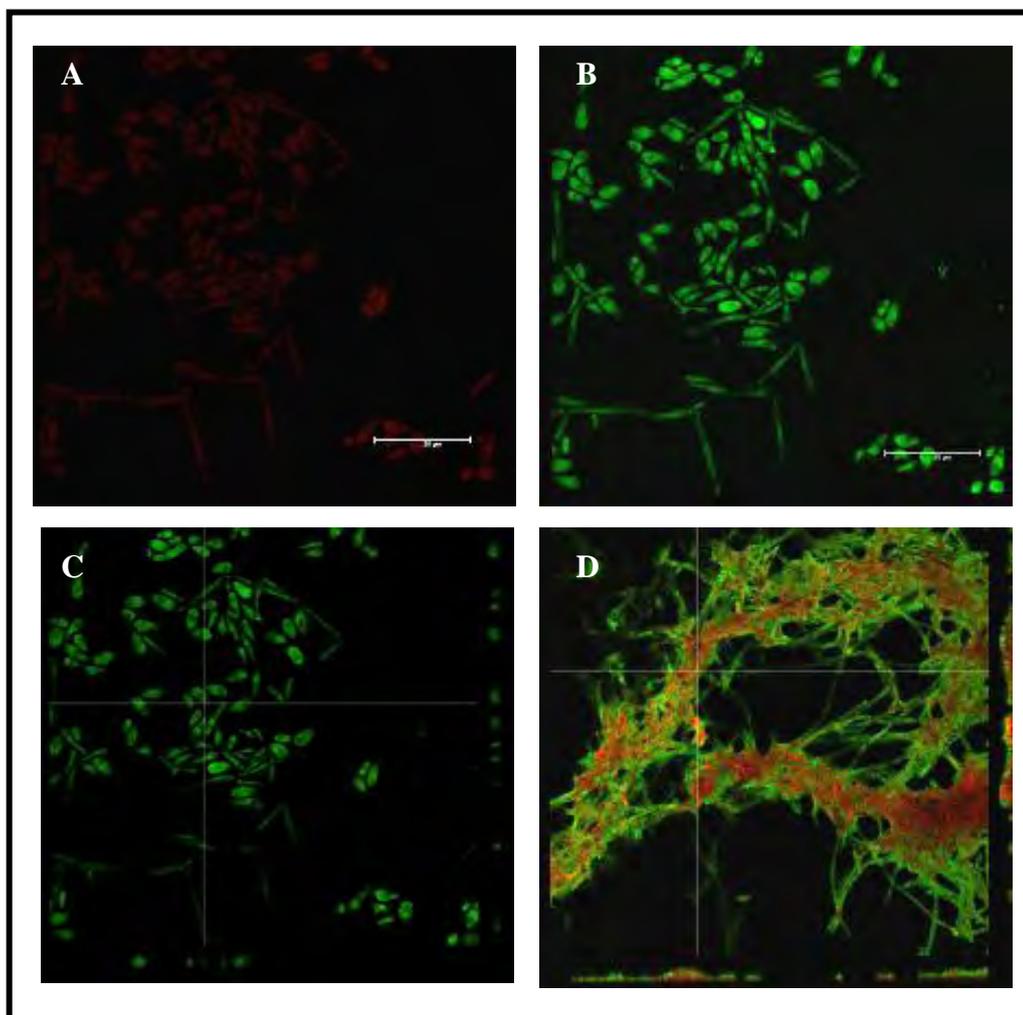


Figura 38. Biofilme (24 h de crescimento) de *C. parapsilosis* sensu stricto após exposição à anfotericina B por 48 horas, comparadas a biofilme de *C. albicans* SC5314 (imagem inferior à direita), não exposto à droga. Imagem A – corada com FUN-1; imagem B – corada com ConA-AF; imagens C e D – coradas com FUN-1 e ConAAF simultaneamente (eixo xz). Barra = 20 μ m.

4.5. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS

4.5.1. Perfil de sensibilidade das células planctônicas

A determinação foi efetuada por meio do método turbidimétrico (EUCAST, 2008) que se baseia na leitura da densidade ótica. Fluconazol foi testado nas concentrações de 64 a 0,06 mg/L e, a CIM variou de 0,06 a 4 mg/L, para ambas as espécies do complexo *C.*

parapsilosis, sendo os dados apresentados na Tab. 7. As cepas de *C. parapsilosis* apresentaram um valor médio de sensibilidade ligeiramente maior, na faixa de $0,84 \pm 1,13$ mg/L, enquanto *C. orthopsilosis*, na faixa de $0,64 \pm 0,70$ mg/L. Ambas as espécies não apresentaram resistência ao fluconazol, sendo que sete isolados foram classificados como intermediários (CIM₅₀ igual a 4 mg/L). A concentração de 0,5 mg/L (CIM₅₀) é eficaz para inibir o crescimento de 50% dos isolados testados e de 2,0 mg/L, para a inibição de 90% (CIM₉₀) dos isolados.

Tabela 7. Distribuição das CIMs (IC₅₀) de fluconazol, para os isolados do complexo *C. parapsilosis* no modo planctônico de crescimento, determinadas segundo a metodologia EUCAST-AFST (2008).

Espécies	Nº. de isolados testados	Nº. de isolados e CIMs indicada (mg/L)							
		0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	
<i>C. parapsilosis</i>	53	2	6	15	16	6	3	5	
<i>C. orthopsilosis</i>	47	1	6	13	11	12	2	2	

IC₅₀ = Coeficiente de inibição de 50% de crescimento das amostras.

Após a exposição à anfotericina B, verificou-se que as suspensões celulares apresentaram CIMs (IC₉₀) que variaram de 0,015 a 0,25 mg/L (Tab. 8), sendo que, na média, tanto os isolados de *C. parapsilosis* quanto os de *C. orthopsilosis*, não apresentaram diferenças: $0,05 \pm 0,02$ mg/L e $0,05 \pm 0,04$ mg/L, respectivamente. A concentração de 0,031 mg/L (CIM₅₀) é capaz de inibir o crescimento de 50% dos isolados e 0,062 mg/L (CIM₉₀), o crescimento de 90% dos isolados. Não foi encontrado nenhum isolado resistente à anfotericina B.

4.5.2 Perfil de sensibilidade das células sésseis

Para a determinação da sensibilidade dos isolados formadores de biofilme utilizou-se a metodologia de microplacas com redução do sal de tetrazólio, testando-se os azóis fluconazol e voriconazol em concentrações que variaram de 512,0 a 1,0 mg/L, sendo que todos os isolados apresentaram resistência superior a 512 mg/L, para ambas as drogas. As células sésseis apresentaram valor de CIMs aproximadamente 700 vezes mais que o CIMs

obtido com as mesmas células no modo planctônico de crescimento, quando testadas frente ao fluconazol.

Os isolados que foram capazes de formar biofilme (72), após formação dos mesmos, estes foram expostos à anfotericina, em concentrações que variaram de 0,25 a 4,0 mg/L. Grande percentual dos isolados (39%) apresentaram CIMs (IC₉₀) acima de 4 mg/L, embora entre as duas espécies testadas, não foi detectada diferença (20 isolados de *C. parapsilosis* e 19 isolados de *C. orthopsilosis*). A concentração de 4,0 mg/L (CIM₅₀) é capaz de inibir o crescimento de 50% dos isolados e >4,0 mg/L (CIM₉₀), o crescimento de 90% dos isolados.

Tabela 8. Distribuição da CIMs (IC₅₀) de anfotericina B para as espécies do complexo de *C. parapsilosis* determinadas sob condições de crescimento planctônicas e sésseis.

Espécies	Nº. de isolados testados	Tipo de crescimento	Nº. de isolados e CIM (mg/L) indicada										
			0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1,0	2,0	≥4,0		
<i>C. parapsilosis</i>	53	planctônico	2	24	23	4							
	34	biofilme					3	5	6	20			
<i>C. orthopsilosis</i>	47	planctônico	5	18	19	4	1						
	38	biofilme					7	9	3	19			

4.6 ENSAIOS COM BIOCIDAS

Dentre as cepas isoladas, 72% são formadoras de biofilme; propriedade esta que lhes conferem maior facilidade para se adaptarem as condições adversas e maior resistência aos agentes antimicrobianos, devido principalmente a matriz extracelular polimérica que é uma barreira à permeação de substâncias tóxicas (por ex., os biocidas), o que conseqüentemente dificulta sua penetração (COSTERTON et al., 1995).

Apesar da vigilância quanto à qualidade da água utilizada em hemodiálise, na literatura, há relatos de contaminação microbiana dessas águas o que implica no uso de tratamentos desinfetantes e microbiocidas. Por essas razões, a efetividade das substâncias ditas biocidas deve ser monitorada.

Neste trabalho, o efeito no controle de biofilmes desenvolvidos tanto na presença como na ausência de biocidas foi determinado pela atividade enzimática mitocondrial das células do biofilme (ensaio de redução do MTT) quantificada após a exposição ou a adição dos biocidas por tempo específico (48 horas). A tabela seguinte mostra os biocidas testados no estudo assim como as CFMs sobre as células sésseis obtidas para as espécies de *C. parapsilosis* e da cepa de referência *C. albicans* SC5314. Ao se consultar a tabela de equivalência das diluições realizadas com a concentração das substâncias químicas (material e métodos, item 3.7.1), pode-se observar que, com exceção do hipoclorito, diluição até 1/16 dos demais agentes químicos é suficiente para causar a morte das células sésseis de *C. orthopsilosis* (Tab. 9). Os biofilmes de *C. parapsilosis* têm o mesmo comportamento que os da cepa referência frente aos biocidas: a morte das células sésseis se dá com as mesmas concentrações de todos os biocidas testados (diluição 1/16). Na Tab. 9 também estão detalhadas as concentrações necessárias de cada agente químico para prevenir a formação de biofilme das cepas estudadas e da cepa referência *C. albicans* SC 5314.

Tabela 9. Resultados dos ensaios realizados no estudo com os biofilmes do complexo *C. parapsilosis* e biocidas.

Espécies	Composto ^a	Faixa de concentração	CFM para	CFM para prevenção de
		avaliada	biofilme (g/L) ^{b,c}	biofilme (g/L) ^{b,c}
<i>C. orthopsilosis</i>	NaOCl	20 – 0,02	2,5	1,25
	H ₂ O ₂	15 – 0,01	3,75	0,93
	C ₂ H ₄ O ₂	2,7 – 0,002	0,33	0,04
	Proxitane	6,7 + 21 0,006 + 0,02	0,83 + 2,6	0,21 + 0,6
<i>C. parapsilosis</i>	NaOCl	20 – 0,02	2,5	2,5
	H ₂ O ₂	15 – 0,01	1,87	1,87
	C ₂ H ₄ O ₂	2,7 – 0,002	0,33	0,04
	Proxitane	6,7 + 21 0,006 + 0,02	0,83 + 2,6	0,41 + 1,3
<i>C. albicans</i> (SC 5314)	NaOCl	20 – 0,02	2,5	2,5
	H ₂ O ₂	15 – 0,01	1,87	0,47
	C ₂ H ₄ O ₂	2,7 – 0,002	0,33	0,02
	Proxitane	6,7 + 21 0,006 + 0,02	0,83 + 2,6	0,21 + 0,6

NaOCl = hipoclorito de sódio; H₂O₂ = peróxido de hidrogênio; C₂H₄O₂ = ácido acético; Proxitane = ácido peracético + peróxido de hidrogênio)

^b O inóculo usado para os ensaios de formação e prevenção de biofilme foi em densidade idêntica (10⁶ cel/mL)

^c A CFM obtida foi baseada na leitura da densidade ótica a 540 nm (teste de redução do MTT).

Paralelamente, testou-se também a capacidade dos agentes químicos em prevenir a formação de biofilme. Acompanhando a literatura, e com base nos ensaios anteriores de viabilidade (item 3.3.2), assume-se que a atividade metabólica medida no ensaio de redução do MTT, expressa como densidade ótica corresponde à taxa de sobrevivência dos microrganismos comparada ao controle sem adição de substâncias químicas (100% de sobrevivência). Assim, em relação ao hipoclorito de sódio (Fig. 39) pode-se observar que *C. parapsilosis* equipara-se à cepa referência na quantidade suficiente para prevenção de biofilme (dil. 1/16), enquanto *C. orthopsilosis* é mais sensível (dil 1/32). O peróxido de hidrogênio (Fig. 40) teve ação semelhante nas espécies de *C. parapsilosis* (dil 1/16 e 1/32) enquanto *C. albicans* foi bem mais sensível (1/64). Proxitane[®] mostrou igualdade entre *C. orthopsilosis* e *C. albicans* (dil 1/64) enquanto *C. parapsilosis* foi mais resistente (dil 1/32) (Fig. 41). O ácido

acético não apresentou diferença na ação sobre as espécies de *C. parapsilosis* (1/128), mas *C. albicans* foi mais sensível (1/256), sendo também o agente químico mais eficaz na prevenção de biofilmes de microrganismos testados (Fig.42).

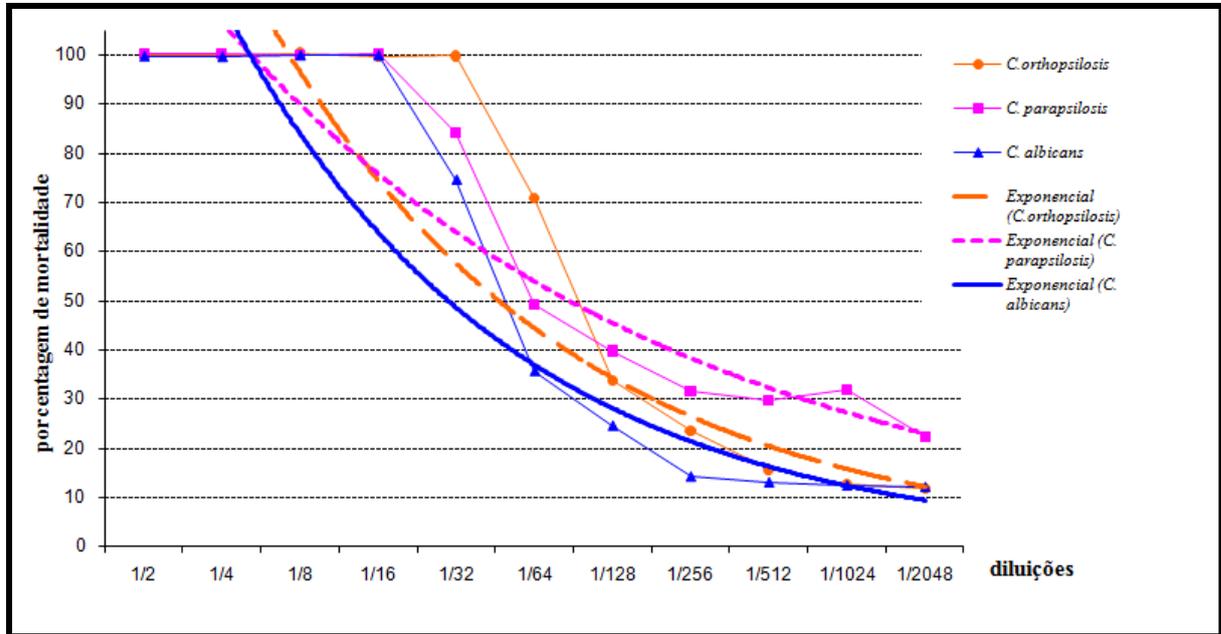


Figura 39. Percentual de mortalidade dos organismos testados quando incubados juntamente com hipoclorito de sódio em diferentes concentrações, apresentado em resultados amostrais e na curva ajustada. As funções exponenciais que deram origem às curvas apresentadas são respectivamente $y = 209,92e^{-0,259x}$; $y = 150,08 e^{-0,17}$ $y = 190,9e^{-273x}$ para *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis* e *C. albicans* e, os valores estimados para R^2 foram, respectivamente, 0,87; 0,90 e 0,90.

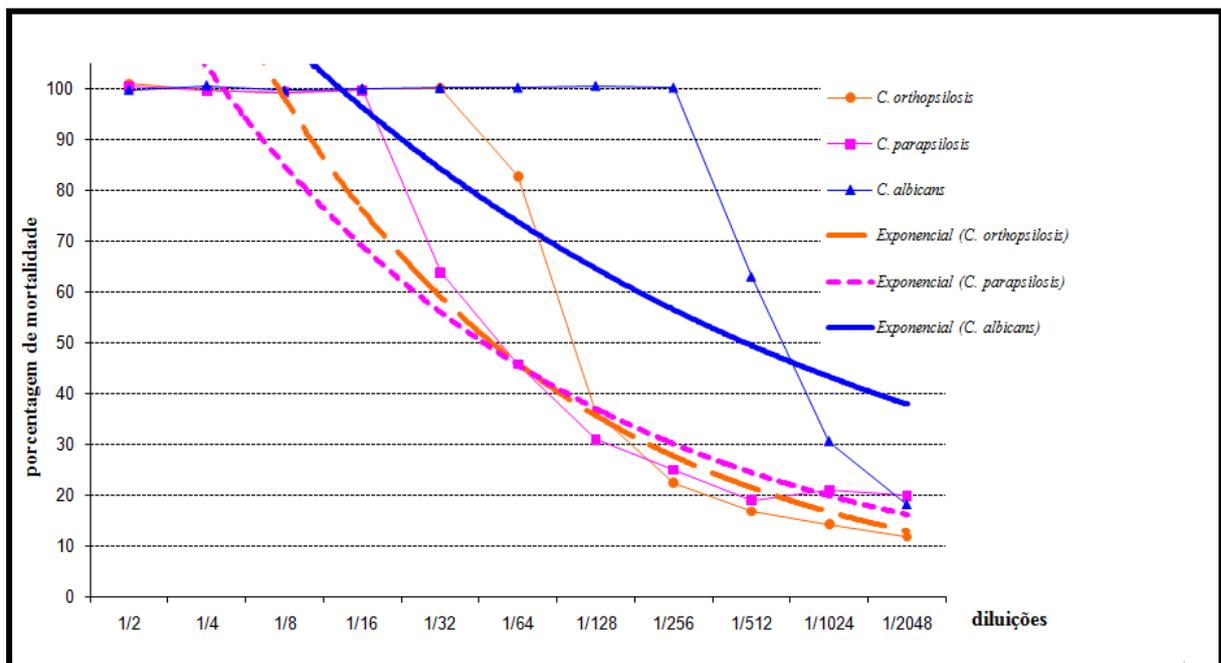


Figura 40. Percentual de mortalidade dos organismos testados quando incubados juntamente com peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações, apresentado em resultados amostrais e na curva ajustada. As funções exponenciais que deram origem às curvas apresentadas são respectivamente $y = 209,52e^{-0,253x}$ para *C. orthopsilosis*; $y = 158,08 e^{-0,207}$ para *C. parapsilosis* e $y = 164,26e^{-133x}$ para *C. albicans* e, os valores estimados para R^2 foram, respectivamente, 0,86; 0,92 e 0,55.

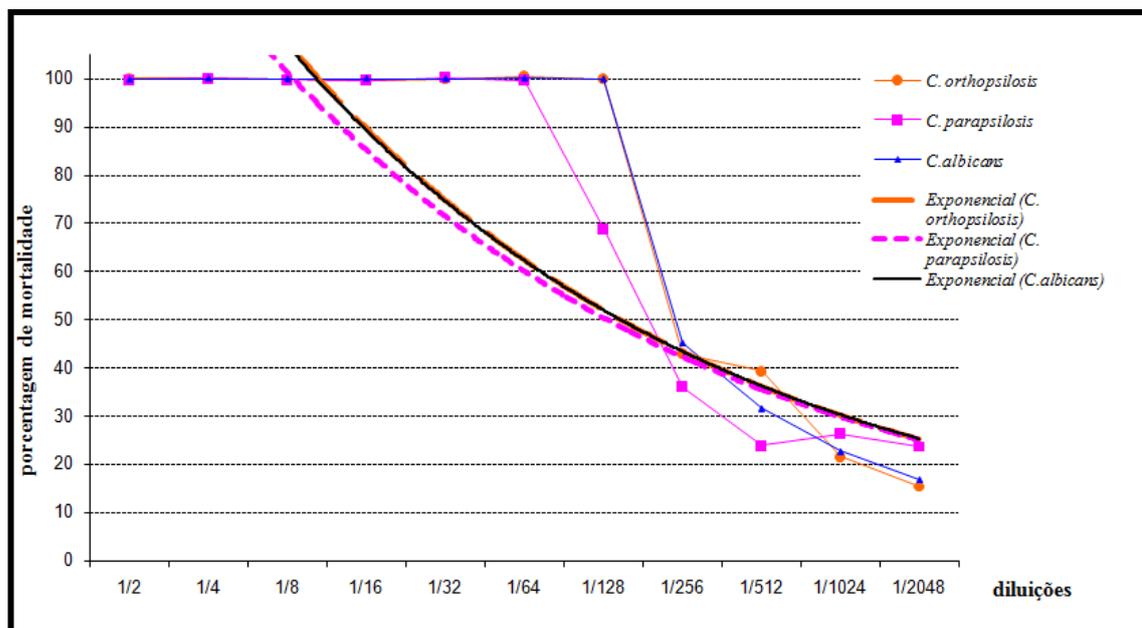


Figura 41. Percentual de mortalidade dos organismos testados quando incubados juntamente com Proxitane® em diferentes concentrações, apresentado em resultados amostrais e na curva ajustada. As funções exponenciais que deram origem às curvas apresentadas são respectivamente $y = 185,8e^{-0,182x}$ para *C. orthopsilosis*; $y = 171,51e^{-0,175x}$ para *C. parapsilosis* e $y = 183,81e^{-0,18x}$ para *C. albicans* e, os valores estimados para R^2 foram, respectivamente, 0,72; 0,79 e 0,74.

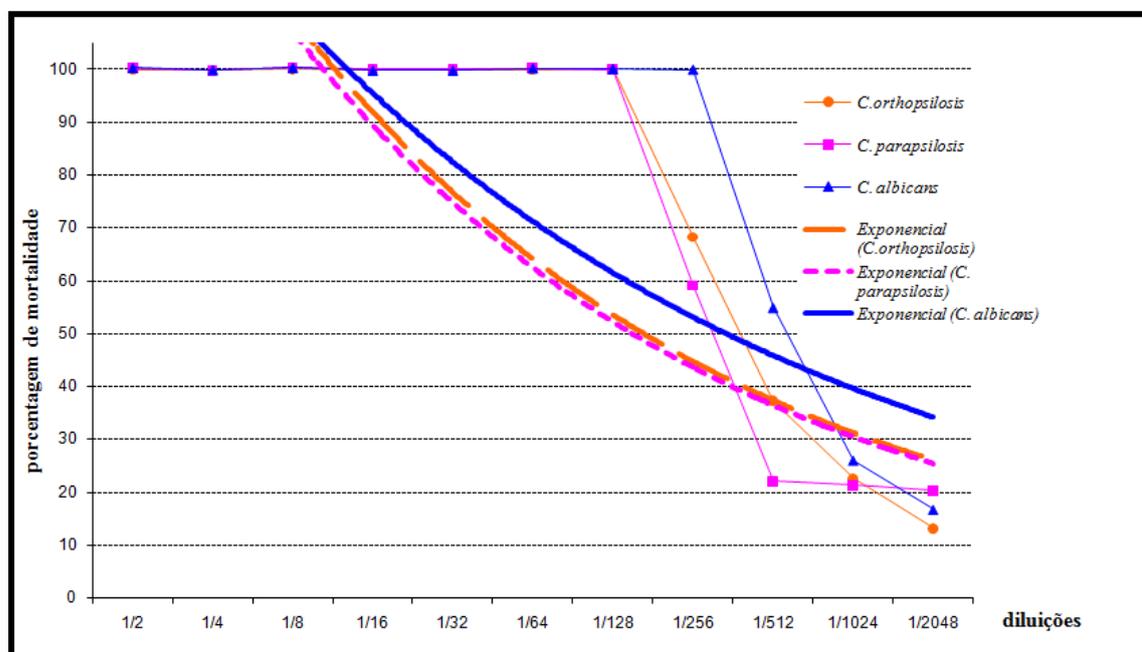


Figura 42. Percentual de mortalidade dos organismos testados quando incubados juntamente com ácido acético em diferentes concentrações, apresentado em resultados amostrais e na curva ajustada. As funções exponenciais que deram origem às curvas apresentadas são respectivamente $y = 188,64e^{-0,18x}$ para *C. orthopsilosis*; $y = 183,49e^{-0,179x}$ para *C. parapsilosis* e $y = 171,65e^{-0,147x}$ para *C. albicans* e, os valores estimados para R^2 foram, respectivamente, 0,67; 0,70 e 0,57.

4.7 ENSAIOS COM PRODUTOS NATURAIS

Muitos antifúngicos existentes no mercado apresentam efeitos colaterais indesejáveis ou podem induzir a resistência fúngica, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Nessa perspectiva, esta pesquisa avaliou *in vitro* a atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos vegetais, extraídos de plantas da região Amazônica e do cerrado, o que poderia ser significativo para a terapêutica desses indivíduos.

4.7.1 Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais

Os óleos foram testados em diluições de 8000 mg/L a 15,6 mg/L para determinação da CIM, utilizando-se a metodologia de microdiluição em caldo segundo AFAST- EUCAST (2008) para isolados representativos de *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* do estudo. Dos dezessete óleos testados (Tab. 9), dois (canela e cedro) apresentaram maior atividade antifúngica frente às leveduras em igual concentração (1000 mg/L). Seguiram-se os óleos de tomilho, eucalipto e laranja (2000 mg/L), sendo todos os resultados obtidos, descritos na Tab.10.

Tabela 10. Listagem dos óleos que tiveram suas atividades avaliadas contra cepas de *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* do estudo com suas respectivas CIMs.

Óleo essencial	<i>C. orthopsilosis</i> (CIM mg/L)	<i>C. parapsilosis</i> (CIM mg/L)
<i>Citrino Bergamia</i> (bergamota)	> 4000	> 4000
<i>Pogostemon patchouli</i> (patchouli)	4000	4000
<i>Santalum album</i> (sândalo)	> 4000	> 4000
<i>Boswellia thurifera</i> (olíbano)	> 4000	> 4000
<i>Thymus vulgaris</i> (tomilho)	2000	2000
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela)	1000	1000
<i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto)	2000	2000
<i>Zengiber officinalis</i> (gengibre)	> 4000	> 4000
<i>Citrus máxima</i> (grapefruit)	4000	4000
<i>Citrus limonum</i> (limão)	4000	4000
<i>Citrus aurantium, C. bigaradia</i> (petit grain)	> 4000	> 4000
<i>Aniba Rosaedora</i> (pau-rosa)	> 4000	> 4000
<i>Commiphora Myrrha</i> (mirra)	> 4000	> 4000
<i>Citrus aurantium amara</i> (laranja)	2000	2000
<i>Juniperus virginiana J. communis</i> (cedro)	1000	1000
<i>Salvia officinalis</i> L. (sálvia)	> 4000	> 4000
<i>Copaífera multijuga</i> (copaíba)	4000	4000

4.7.2 Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais em combinação com anfotericina B contra biofilmes

Os óleos que apresentaram atividade antifúngica (canela e cedro) foram testados em combinação com anfotericina B para avaliação de sinergismo entre os componentes químicos sobre biofilmes formados (24 h de desenvolvimento) de cepas representativas do estudo de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*. O óleo de cedro não foi capaz de inibir o crescimento da progênie do biofilme de nenhum dos microrganismos testados. A combinação do óleo de canela com a anfotericina B diminuiu o valor das CIMs tanto frente às cepas de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* como à cepa referência (Tab. 11) embora não se tenha conseguido efeito sinérgico.

Tabla 11. Atividade antifúngica de óleo essencial combinado com droga antifúngica contra biofilmes de cepas de *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* do estudo.

Microorganismo	Combinação	CIM do óleo (µg/mL) em combinação/sozinho	CIF do óleo	CIM da droga (µg/mL) em combinação/sozinha	CIF da droga	ICIF	Resultado
<i>C. parapsilosis</i>	ANFO + canela	1000/ 2000	0,5	2/ 2	1	1,5	Indiferente
<i>C. orthopsilosis</i>	ANFO + canela	500/ 2000	0,25	0,5/0,5	1	1,25	Indiferente
<i>C. albicans</i>	ANFO + canela	1000/ 2000	0,5	2/ 2	1	1,5	Indiferente

ANFO = anfotericina B

CIF = concentração inibitória fracionada

ICIF = índice de concentração inibitória fracionada

4.7.3 Ensaio com óleos essenciais para prevenção de biofilmes

Os óleos de canela e de cedro foram testados para avaliação da capacidade de prevenção de biofilmes das espécies de *C. parapsilosis*. O óleo de canela em concentração de 1000 mg/L previne a formação de biofilme da cepa referência e em concentração de 500 mg/L previne os biofilmes de ambas as espécies testadas de *C. parapsilosis*. O óleo de cedro necessita de concentração de 4.000 mg/L e de 8.000 mg/L para prevenir formação de biofilmes de *C. albicans* (SC 5314) e de *C. parapsilosis* ou *C. orthopsilosis*, respectivamente.

4.7.4 Determinação da atividade antifúngica de substâncias naturais contra cepas de *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis*

Para o modo de crescimento planctônico, dois extratos vegetais (*Pinus elliotti*, *Pinus tropicalis*), uma substância liquênica (ácido úsnico) e três substâncias isoladas a partir de extratos vegetais (maitenina, pristimerina, ácido pimaradienólico) foram testadas contra as cepas de *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* do estudo em concentrações decrescentes a partir de 4000 mg/L a 7,80 mg/L. Segundo o critério adotado para aceitação da atividade antifúngica (ALIGIANNIS et al., 2001), a pristimerina foi a droga que mostrou melhor atividade antifúngica contra as espécies de *C. parapsilosis*, seguida pela maitenina (Tab. 12), enquanto que o ácido pimaradienólico foi inativo (Tab. 12). As resinas de *P. elliotti* e *P. tropicalis* e o ácido úsnico também estiveram dentro da faixa de aceitabilidade, pois apresentaram CIMs de 500, 250 e 125 mg/L, respectivamente. As cepas controle *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 apresentaram valores de CIM para anfotericina B dentro do prescrito.

Para o modo de crescimento em biofilme, testaram-se as mesmas substâncias, com exceção da pristimerina, devido à insuficiência de material, sobre biofilmes pré-formados (24 h de desenvolvimento) de espécies de *C. parapsilosis*. A faixa de concentração testada foi de 2000 mg/L à 3,9 mg/L, por insuficiência de material. O ácido úsnico foi o único composto que mostrou atividade sobre os biofilmes (Tab. 12) e, no caso de *C. parapsilosis* não houve alteração no valor da CIM para a forma de crescimento planctônica ou em biofilme (Tab. 12).

Tabela 12. Resultados da atividade antifúngica de produtos naturais testados no estudo contra as espécies de *C. parapsilosis* no modo de crescimento planctônico e em biofilme, expressas em CIM (mg/L).

Microorganismo testado	Forma de crescimento	<i>P. elliotti</i>	<i>P. tropicalis</i>	Pristimerina	Maitenina	Ac. úsnico	Ac. pimaradienólico
<i>C. orthopsilosis</i>	planctônico	500	250	31,25	62,50	125	>1000
	Biofilme	> 1000	> 1000	NR	>1000	250	>1000
<i>C. parapsilosis</i>	planctônico	1000	500	31,25	31,25	250	> 1000
	Biofilme	> 1000	> 1000	NR	> 1000	250	> 1000

NR- não testado por insuficiência da substância.

4.8. ANÁLISES PROTEÔMICAS

4.8.1 Determinação das proteínas totais

A quantidade de proteínas totais presentes nas amostras foi determinada pelo método de Bradford que se baseia na interação entre as moléculas de azul de Coomassie G-250 e os grupos ácidos ou básicos das proteínas. Este reagente liga-se, preferencialmente, aos resíduos de aminoácidos básicos e aromáticos (especialmente a arginina). Os resultados das concentrações de proteínas totais nas amostras de crescimento de *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* capazes de formar biofilmes e não capazes estão descritas na Tab. 13.

Tabela 13. Concentração de proteínas totais em cada cepa submetida à extração determinadas pelo método de Bradford.

Microrganismo (cepa do estudo)	Capacidade de formar biofilme	Densidade óptica (595 nm)	Concentração de proteínas (mg/mL)
<i>C. orthopsilosis</i> (27)	negativa	1,062	1050
<i>C. orthopsilosis</i> (U)	positiva	1,184	1150
<i>C. parapsilosis</i> (146)	negativa	0,977	970
<i>C. parapsilosis</i> (123)	positiva	1,230	1170

4.8.2. Separação eletroforética 2D-PAGE

Aproximadamente 1000 µg de proteínas foram aplicadas em uma fita de 13 cm com pH não linear variando de 3 a 10. A focalização isoeletrica foi conduzida até atingir a voltagem acumulada de 18 kV h. O perfil eletroforético adquirido com cepa não formadora de biofilme, aparentemente expressa maior quantidade de *spots* (Fig. 43) que as cepas formadoras de biofilme (Fig.44) embora, em ambos os perfis, a maioria das proteínas expressas possuam massa molar entre 30 a 67 kDa. A análise comparativa da expressão proteica dos isolados revelou aumento e diminuição na expressão de proteínas em três áreas distintas dos géis designadas A, B e C (não formadora) e A₁, B₁ e C₁ (formadoras de biofilme) evidenciados nas Figuras 43 e 44, sendo detalhados nas Figuras 45, 46 e 47. A listagem dos *spots* diferenciais encontra-se detalhada na Tab. 14.

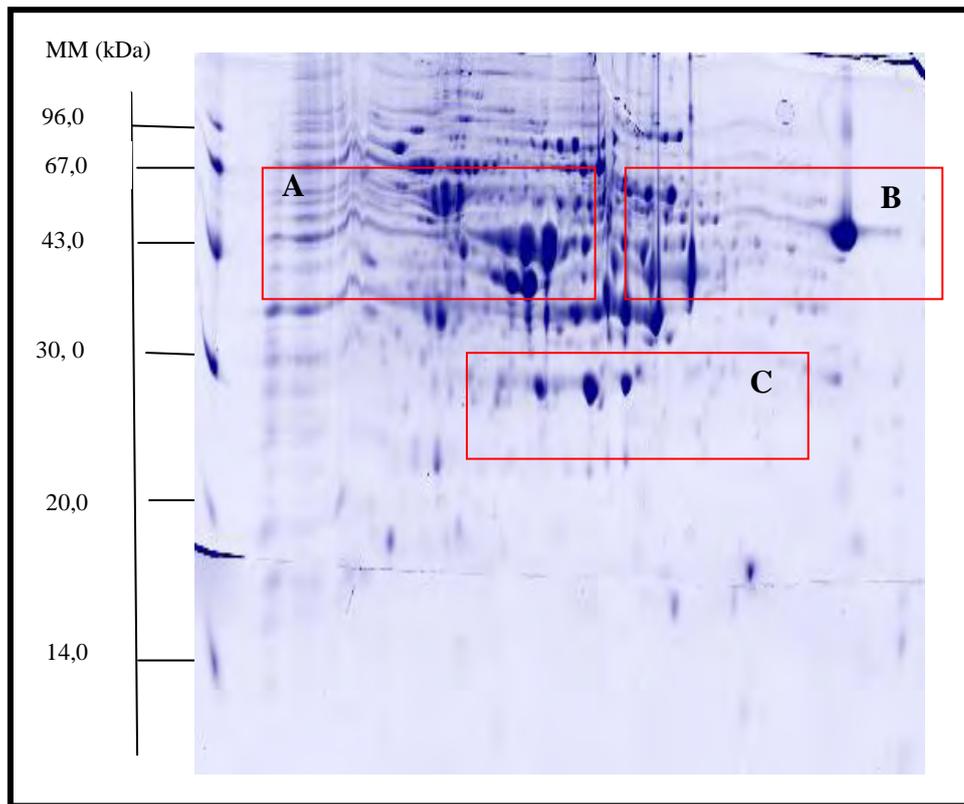


Figura 43. 2D-PAGE das proteínas de *C. parapsilosis* sensu strictu não formadoras de biofilme. Fitas de 13 cm, pH de 3 a 10 não-linear. Padrão de massa molar de 14,0 a 96,0 kDa. Gel com dimensões de 13 cm x 13 cm x 1,5 cm.

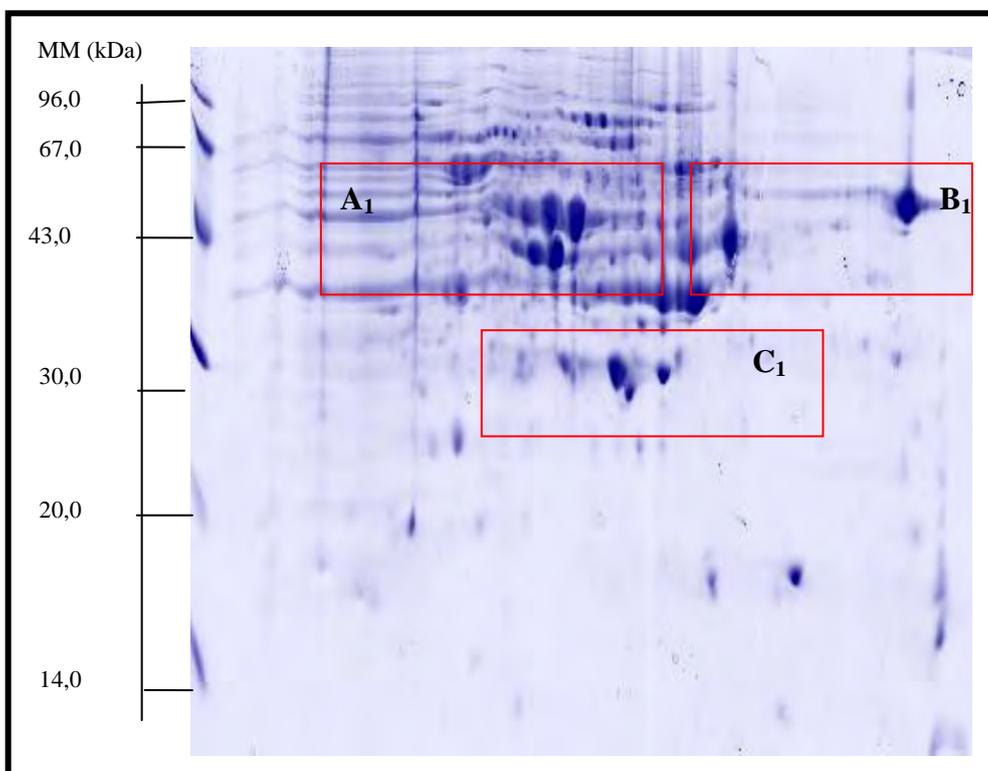


Figura 44. 2D-PAGE das proteínas de *C. parapsilosis* sensu stricto formadoras de biofilme. Fitas de 13 cm, pH de 3 a 10 não-linear. Massa molar de 14,0 a 96,0 kDa. Gel com dimensões de 13 cm x 13 cm x 1,5 cm.

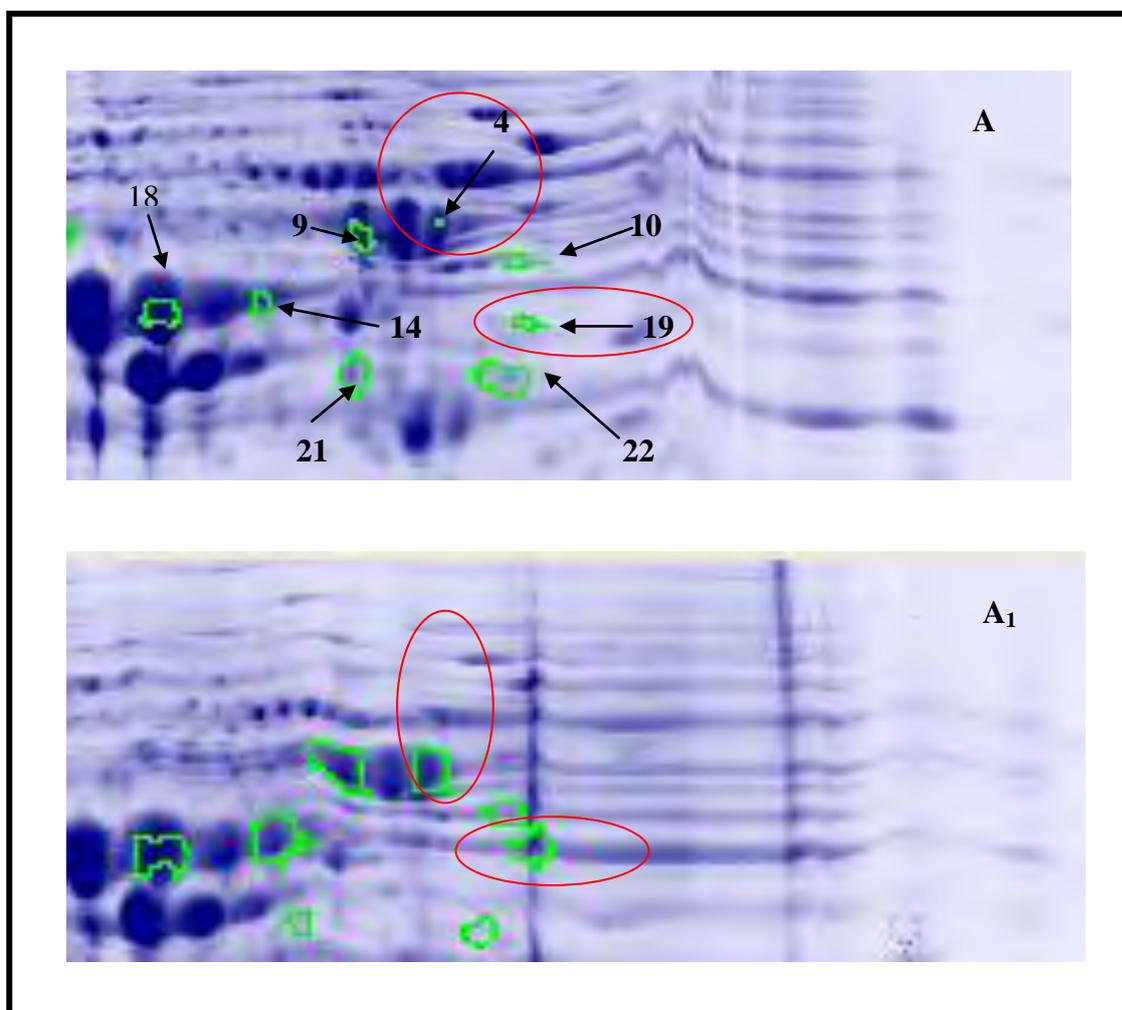


Figura 45. Detalhe da região A (não formadora de biofilme) e A₁ (formadora de biofilme) dos géis de eletroforese bidimensional comparando os diferentes graus de expressão das proteínas, sobressaindo-se os spots 4 (+98,8) e 19 (+18) .

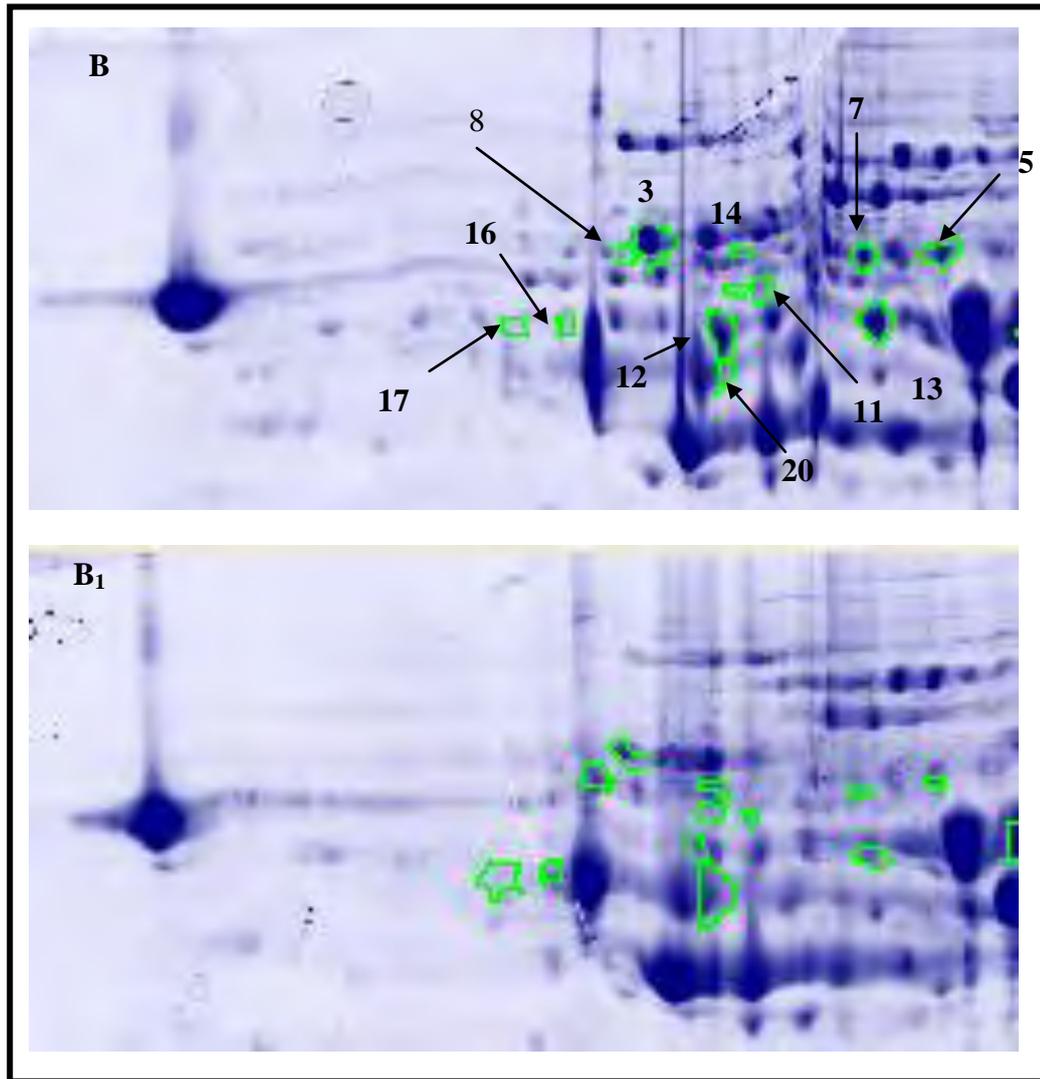


Figura 46. Detalhe da região B (não formadora de biofilme) e B₁ (formadora de biofilme) dos géis de eletroforese bidimensional comparando os diferentes graus de expressão das proteínas em cada caso.

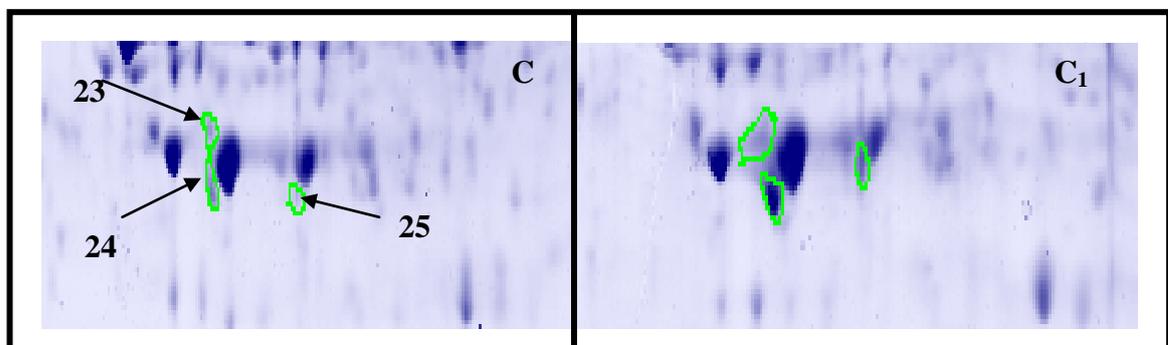


Figura 47. Detalhe da região C (não formadora de biofilme) e C₁ (formadora de biofilme) dos géis de eletroforese bidimensional comparando os diferentes graus de expressão das proteínas em cada caso.

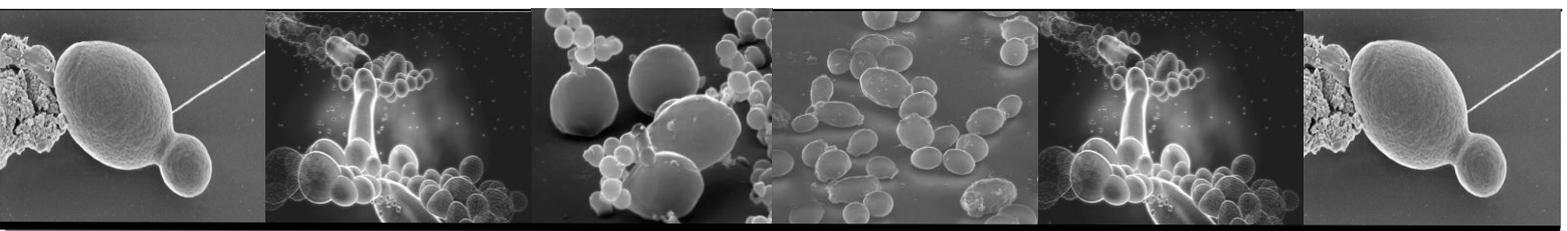
Tabela 14. Listagem da seleção dos *spots* demonstrados nas figuras 42, 43 e 44 e as alterações das expressões (diminuição ou aumento) dos mesmos observadas nas cepas de *C. parapsilosis* sensu stricto formadoras de biofilme quando comparadas as não formadoras de biofilme.

Spot	Ponto isoelétrico	Massa molar (kDa)	Alteração na expressão
1	6,18	93,687	- 3,9
2	6,36	86,726	+5,4
3	6,2	77,241	- 3,2
4	5,0	77,871	+98,8
5	5,6	75,534	- 4,9
6	5,9	75,534	+3,9
7	5,7	74,922	- 5,2
8	6,2	74,316	+5,3
9	5,2	74,922	+5,8
10	4,8	72,085	+4,0
11	5,9	70,491	- 4,9
12	6,0	70,491	+5,7
13	5,7	66,849	-3,0
14	5,3	66,849	+5,3
15	6,0	64,036	-6,2
16	6,4	66,246	+3,7
17	6,6	65,649	+3,9
18	5,5	66,246	+3,5
19	4,8	64,036	+18,0
20	6,0	58,760	+7,6
21	5,2	59,294	- 3,7
22	4,9	57,706	- 3,5
23	5,7	43,195	+4,6
24	5,8	39,789	+4,2
25	5,6	39,267	+3,6

+ = aumento na expressão da proteína

- = diminuição na expressão da proteína

DISCUSSÃO



5. DISCUSSÃO

A doença invasiva causada por *C. parapsilosis* pode ocorrer sem colonização prévia e é freqüentemente transmitida horizontalmente, através de fontes externas contaminadas tais como dispositivos médicos, líquidos, mãos dos profissionais de saúde, dispositivos protéticos e cateteres. Três grupos distintos (I, II e III) de *C. parapsilosis* foram previamente reconhecidos com base em análise molecular. Em 2005, após análise de seqüenciamento de gens, os grupos II e III foram reclassificados em duas novas espécies nomeadas como *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, respectivamente (TAVANTI et al., 2005). Neste estudo, foram examinados 100 isolados de *C. parapsilosis* advindos do circuito hídrico e de máquinas de uma unidade de hemodiálise, e, após a análise molecular, estes revelaram ser constituídos de 53% de *C. parapsilosis* sensu stricto e 47% corresponderam a *C. orthopsilosis*. São poucos os estudos sobre a prevalência de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. A maioria dos estudos (TAVANTI et al., 2005; LOCKHART et al., 2008; SILVA et al., 2009; GONÇALVES et al., 2009) aponta *C. orthopsilosis* em menos de 10% das infecções de *C. parapsilosis* em geral, com variação regional considerável, embora, o estudo de TAY et al., 2009, relatado o encontro de 23,8% de *C. orthopsilosis*. Em comparação com outras espécies de *Candida*, *C. parapsilosis* tem uma ampla distribuição na natureza. Ao contrário de *C. albicans* e *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, não é um patógeno humano obrigatório, tendo sido isolado a partir de fontes não-humanas (WEEMS, 1992). Este estudo reforça que *C. parapsilosis* é onipresente, podendo ser isolada de diferentes fontes ambientais, as quais podem representar rotas potenciais de transmissão nosocomial de pacientes (KOJIC; DAROUICHE, 2004).

Urêmicos estão em risco de contrair uma doença associada com biofilme, uma vez que no curso do tratamento, vários dispositivos podem ser usados. Além disso, os coágulos formados na ponta do cateter utilizado durante o período inter-dialítico podem fornecer um meio nutriente para a proliferação microbiana e, possivelmente, formação de biofilme (CAPELLI; TETTA; CANAUD, 2005). Neste estudo, a capacidade de isolados do complexo *C. parapsilosis* para formar biofilme em condições estáticas foi demonstrada. Crescimento do biofilme foi acompanhado por testes colorimétricos e contagem das células viáveis. Pequenas variações nas atividades metabólicas do biofilme formado na superfície de poliestireno foram detectadas entre os isolados testados do complexo *C. parapsilosis*. Os resultados refletem, provavelmente, as diferenças fisiológicas entre os isolados e confirmam o relato de Lattif et al., 2010, que todas as espécies do complexo *C. parapsilosis* formam biofilmes equivalentes.

Basicamente, um biofilme é formado quando uma estrutura ou uma superfície abriga uma comunidade de microrganismos metabólicamente ativos. Considerável número de *C. parapsilosis* (48,2%) e *C. orthopsilosis* (52,8%) formou biofilmes. Embora, até o momento, não haja descrições de taxas individuais de isolados do complexo *C. parapsilosis* a partir de água utilizada para fins terapêuticos, a alta frequência encontrada em nosso estudo foi, talvez, devido à maior capacidade dos isolados de fontes ambientais para formar biofilmes em comparação com isolados obtidos de sítios clínicos. Fungos e bactérias patogênicas são predominantemente encontrados sob a forma de biofilmes, ao invés de organismos livres ou flutuantes (CUSHION; COLLINS; LINKE, 2009).

Em nível de comportamento basal do biofilme, nossos resultados confirmam observações anteriores (BAILLIE; DOUGLAS, 1998; FREIMOSER et al., 1999; KUHN et al., 2002; BRUZUAL et al., 2007) de que existe uma correlação linear entre a capacidade de crescer no modo de biofilme (como medido pelo número de células viáveis) e atividade metabólica (MTT). Na literatura, biofilmes jovens apresentam alta taxa de crescimento celular e atividade metabólica comparado com as células maduras de 24-48 h que parecem atingir o seu patamar de desenvolvimento, resultante de maior estabilidade da arquitetura. Uma vez que o biofilme atinge a maturidade, a senescência das células parece ocorrer por volta de 72 h com uma concomitante redução na atividade metabólica e na viabilidade celular (CHANDRA et al., 2001). Além disso, biofilmes de *Candida* possuem células com diferentes graus de atividades metabólicas em diferentes níveis, ou seja, no desenvolvimento da estrutura do biofilme, as camadas inferiores estão em estado de latência, enquanto que a atividade metabólica das camadas de nível médio e superior pode ser ainda muito elevada (LAFLEUR et al., 2006; SENEVIRATNE et al., 2009).

A microscopia eletrônica de varredura confirmou que *C. albicans* produz biofilme mais complexo que espécies de *C. parapsilosis*. Biofilmes de *C. albicans* revelaram serem os mesmos constituídos por uma densa rede de hifas e outros elementos fúngicos, em acordo com outros pesquisadores (CHANDRA et al., 2001; RAMAGE et al., 2001). Biofilmes maduros de *C. parapsilosis* desenvolvidos em uma superfície de PVC são estruturalmente semelhantes aos descritos por Kuhn et al., (2002). Uma camada basal de blastoconídios ou agrupamentos irregulares de blastoconídios foi observado em *C. parapsilosis*, enquanto *C. orthopsilosis* apresentou formas filamentosas curtas, além de blastoconídios. Globalmente, os resultados indicaram que biofilmes maduros das espécies de *C. parapsilosis* apresentaram microcolônia com arquitetura típica com extensa heterogeneidade espacial e canal de água. No entanto, imagens de biofilmes de *C. orthopsilosis* ainda não foram publicadas para

comparação. De relevância para a hemodiálise, a formação de biofilme representa o ponto de partida para a bioincrustação, a resistência à quimioterapia e antibióticos ou desinfecção além da dispersão microbiana (STEWART; COSTERTON, 2001). Além disso, tubos plásticos dentro da máquina de diálise pode ser o sítio de desenvolvimento de biofilme, resultando em alto nível de contaminação do dialisato (MAN et al., 1998). Evidências crescentes demonstram que a natureza química do material do cateter desempenha um papel importante na patogênese das infecções relacionadas com dispositivos médicos, e, a maioria destes é feitos de PVC. Rotrosen et al., (1983), observaram que *C. albicans* adere ao PVC mais rapidamente do que à teflon. Adicionalmente, monitores de hemodiálise representam o elo final da cadeia de abastecimento de água que transforma a água potável em fluido de diálise o que implica em razões adicionais para expor pacientes à proliferação microbiana e à formação de biofilmes, devido à conexão de soluções concentradas de base e de ácido ao dialisato e ao dreno do paciente (CAPELLI; TETTA; CANAUD, 2005). Além disso, infecções causadas por *C. parapsilosis* tem sido associadas com a capacidade de proliferar em altas concentrações de glicose e formar biofilme em material plástico (TROFA et al., 2008; PFALLER; MESSER; HOLLIS, 1995). Nossos resultados demonstraram que *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* são propensas à formação de biofilme em material plástico (poliestireno e PVC).

A técnica não-invasiva de microscopia confocal habilita imagem intacta de biofilme e visualização da distribuição de células marcadas de *C. parapsilosis* no contexto da comunidade de biofilme. A maioria das figuras apresentadas neste trabalho mostra uma reconstrução tridimensional de biofilme de espécies de *C. parapsilosis* resultante da compilação de uma série de seções xy individuais obtidas através do eixo z. Como pode ser observado e em concordância com outros autores (KHUN et al., 2002b; RAMAGE et al., 2002), biofilmes expostos ao fluconazol (512 mg/L) praticamente não alteraram a viabilidade celular, ao passo que biofilmes expostos à anfotericina B (em concentrações de CIM, determinadas pelo ensaio de redução do MTT) apresentaram severas interferências com seu metabolismo (CHOI et al., 2007) culminando com a morte celular. De acordo com dados disponíveis, esta é a primeira observação de imagens de CSLM de biofilmes destes organismos assim como dos efeitos de drogas antifúngicas contra os mesmos.

Apesar da variabilidade das regras utilizadas para identificar pacientes de alto risco, os resultados individuais dão suporte para uma política de profilaxia em pacientes de hemodiálise: o uso de azóis reduziu o risco de candidíase invasiva de 80% para 50% (PLAYFORD et al., 2006). Sob a pressão seletiva do tratamento com fluconazol, células de leveduras podem gerar resistência através de uma variedade de mecanismos (WHITE;

MARR; BOWDEN, 1998). O aumento da resistência as drogas dos isolados do complexo *C. parapsilosis* na forma de crescimento em biofilme em comparação às formas planctônicas, aqui descrito, é consistente com estudos anteriores (WHITE; MARR; BOWDEN, 1998; MUKHERJEE; CHANDRA, 2004; DE LOGU et al., 2005; BRUZUAL et al., 2007). Cepas resistentes ao fluconazol não foram detectadas entre as células planctônicas de *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis*, sendo a maior CIM detectada igual a 4 mg/L, considerada de sensibilidade intermediária (EUCAST, 2008). Porém, o biofilme destas células apresentou uma maior resistência tanto ao fluconazol como ao voriconazol, uma vez que as leituras de densidade óptica do ensaio de redução de MTT para biofilmes em concentrações tão altas quanto 512 mg/L foram semelhantes à dos biofilmes controle (sem adição de droga). Estes resultados confirmam que as células sésseis foram altamente resistentes a ambos os azóis (BAILLIE; DOUGLAS, 1999; RAMAGE et al., 2001; MUKHERJEE; CHANDRA, 2004; RŮZICKA et al., 2007; TAY; NA; CHONG, 2009; SILVA et al., 2009). Alguns autores consideram que as limitações difusionais à penetração do antifúngico através do biofilme, podem ser consideradas como um mecanismo de resistência (MAH; O'TOOLE, 2004). A passagem do antifúngico através das diferentes camadas de células e da matriz polimérica faz com que a concentração que atinge as células mais internas do biofilme seja inferior.

Destacamento de células de biofilmes pode dar origem a uma septicemia que pode não responder à terapia antifúngica convencional (UPPULURI et al., 2010). Células sésseis são viáveis e permanecem como reservatório de infecção em consequência à sua resistência, tanto para com os mecanismos de defesa do hospedeiro como para vários agentes antifúngicos, incluindo o fluconazol (CHANDRA et al., 2001). O uso de azóis como uma medida de profilaxia para prevenir infecções fúngicas invasivas pode resultar em respostas adaptativas de *Candida* à anfotericina B, que pode ter sérias implicações clínicas (DE LOGU et al., 2005). Neste estudo, embora nenhuma das cepas do complexo *C. parapsilosis*, na forma planctônica de crescimento tenha apresentado resistência à anfotericina B, contra os biofilmes, este antifúngico demonstrou atividade em menor grau, pois 39% das cepas exibiram CIMs, acima de 2 mg/L, indicando resistência de acordo com os critérios de interpretação para dosagens terapêuticas (EUCAST, 2008). Este dado é bastante preocupante, em vista de poucos isolados até hoje terem sido descritos como resistentes (KUHN et al., 2002b; AL-FATTANI; DOUGLAS; 2004; EL-AZIZI, 2007). Fatores que podem ser responsáveis para o aumento da resistência incluem penetração restrita de agentes antimicrobianos, devido ao material exopolimérico, taxa de crescimento diminuída das células

dentro do biofilme e expressão diferencial de genes (RAMAGE et al., 2001; BRUZUAL et al., 2007).

Para maior pureza possível do dialisato há necessidade de freqüente desinfecção das máquinas de Hemodiálise, com agentes químicos ou calor, reduzindo o nível de uma eventual contaminação microbiana e prevenindo a formação de biofilmes, visto que endotoxinas derivadas de microrganismos presentes na água ou sais usados na produção de dialisato estimulam a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (CAPPELLI; TETTA; CANAUD, 2005). O uso de hipoclorito de sódio, na concentração de 100 ppm é preconizado pela ANVISA como agente de desinfecção de nível médio aplicável à Unidades de diálise e hemodiálise. Nesse estudo, a concentração de 2,5 g/L (dil. 1/16) de hipoclorito de sódio revelou ser suficiente para debelar a progênie do biofilme em todas as espécies testadas e para prevenir a formação destes no caso de *C. parapsilosis* e da cepa referência. Essa concentração (0,25%) corresponde a 2.500 ppm (conversão de % para ppm – multiplica-se por 10.000) o que implica na utilização de 125 mL da solução comercial (2% - 20.000 ppm) por litro de água. Paradoxalmente, devido à natureza corrosiva do cloro, este desinfetante deve ser removido da máquina após tempo de contato com abundante enxágüe procedimento este, que acaba anulando o resultado da desinfecção por permitir que microrganismos eventualmente presentes na água do enxágüe se multipliquem na máquina. Caso a máquina fique parada por uma noite ou nos fins de semana, o nível da contaminação pode ser significativamente alto. Além disso, estudo prévio (MORIN, 2000) relacionado com contaminação microbiana em água tratada para hemodiálise, relata que o impacto do tratamento com hipoclorito sobre a qualidade da água foi negativo devido ao desprendimento do biofilme e a re-suspensão de altas cargas de microrganismos na água imediatamente após a desinfecção. Limitada eficácia contra a desinfecção de biofilme aderido ao filtro de carvão também foi demonstrada por Lechevallier et al., 1988, os quais usaram 5 mg/L de cloro e tempo de contato de 1 h, observando redução da viabilidade microbiana para 58%, fato explicado pela falta de contato entre o cloro e os microrganismos localizados nos poros do filtro de carvão ativado. Também, Norman et al., 1977, demonstraram que um biofilme de 165 mm de espessura mantido em água clorada a 2,0 ou 4,1 g/dia rapidamente voltava à sua espessura original, tão logo o tratamento fosse interrompido.

O limitado efeito do cloro contra a biomassa fixa em filtros de carvão ativado levou ao uso de outros agentes químicos à base de ácido peracético, e outros oxidantes também. O ácido peracético, no interior do biofilme, devido ao seu menor potencial redox (comparado com o cloro) induziria a uma menor cinética de oxidação, permitindo difusão

mais profunda na biomassa fixa, perturbando sua organização. Isso poderia explicar o contínuo descolamento de microrganismos até 6 h após a desinfecção com o ácido peracético, enquanto que o fenômeno foi observado somente no tempo zero empregando-se o hipoclorito de sódio (MORIN, 2000). Nas condições deste estudo, o uso de Proxitane®, desinfetante à base de ácido peracético, de uso corrente na Unidade de Hemodiálise estudada, na diluição 1/32 (0,41 g/L de ácido peracético) debela completamente a progênie do biofilme de todos os microrganismos testados enquanto a diluição 1/128 (0,10 g/L) é capaz de prevenir a formação de biofilme do complexo *C. parapsilosis*.

Cerca de 50% das entidades químicas na terapêutica são compostos naturais, semi-sintetizados ou sintetizados a partir de grupos farmacofóricos naturais (NEWMAN et al., 2003). Assim sendo, o estudo de substâncias naturais apresenta potencialidade na busca de novos agentes terapêuticos, embora não haja um consenso em relação ao nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados aos antibióticos padrões, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos antibióticos enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibição superiores (DUARTE et al., 2005). Avaliados segundo os critérios propostos por Aligianis et al., 2001, os extratos vegetais e substâncias vegetais puras isoladas utilizadas neste estudo demonstraram atividade contra as espécies de *C. parapsilosis*, a exceção do ácido pimaradienólico. A pristimerina e a maitenina, isoladas de *M. iliciflora* foram os compostos testados que exibiram maior atividade (CIM de 31,25 e 62,5 mg/L, respectivamente), corroborando com outros autores (ORABI et al., 2001; RODRIGUEZ et al., 2005; DE LÉON; MOUJIR, 2007) no relato da atividade antifúngica de espécies da família Celastraceae do gênero *Maytenus*, sendo este o primeiro trabalho a estudar esses compostos contra as espécies *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* sensu stricto tanto no crescimento planctônico como em biofilme.

Além disso, no presente trabalho, o ácido úsnico demonstrou boa atividade contra as cepas testadas, sendo a única substância natural avaliada a apresentar atividade antimicrobiana contra biofilmes, contrastando com estudos anteriores (SILVA et al., 1986; XAVIER FILHO et al., 1987, HARMALA et al., 1992; RIBEIRO et al., 2006) que demonstraram a resistência de leveduras do gênero *Candida* à substâncias produzidas por várias espécies de líquens. A divergência nos resultados obtidos poderia ser resultante de alguns fatores interferentes, dentre os quais se podem citar: os diferentes meios de cultura utilizados nos testes, as condições determinadas para estes, a pureza do material utilizado para extração, a eficiência no processo extrativo, assim como as diferentes formas de extração da substância (SCOTT LUPER, 1998).

Estima-se que 65% das infecções microbianas são causadas por microrganismos capazes de crescer em superfícies ao invés de vida livre (DONLAN, 2002; CUSHION; COLLINS; LINKE, 2009), fenômeno que é associado à resistência aos antimicrobianos (BRANDA et al., 2005). Assim, junto com a exploração a partir de vegetais, na década de 50, um fator colaborou para o aumento da extração de essências no país: empresas internacionais produtoras de perfumes, cosméticos, produtos farmacêuticos e alimentares se instalaram no país. Em geral, a matéria-prima na extração de óleos essenciais é diversificada, podendo ser utilizado qualquer vegetal que apresenta óleos voláteis odoríferos. Estes são misturas de vários componentes (terpenos, aldeídos, álcoois, ésteres acíclicos, etc), com diferentes quimiotipos, com efeitos antifúngicos, inclusive com atividade anti-*Candida* estabelecida e podem influenciar na produção de biofilme microbiano (NIU; GILBERT, 2004), embora a literatura seja escassa com relação a trabalhos com óleos essenciais com atividade contra biofilmes de *Candida* (ALVIANO et al., 2005; KARPANEN et al., 2008; HENDRY et al., 2009; ALVES et al., 2009), ou abordando a prevenção de biofilmes (AGARWAL et al., 2008), os quais se direcionam quase que exclusivamente à *C. albicans*. Nesse trabalho, no intuito de contribuir com os trabalhos já descritos, pesquisou-se a atividade antimicrobiana de dezessete óleos essenciais contra as espécies de *C. parapsilosis* no modo planctônico de crescimento sendo que apenas os de canela e cedro demonstraram atividade (concentração de 1000 mg/L). Estes foram então testados contra as formas sésseis dos mesmos organismos, sendo que apenas o de canela demonstrou atividade (concentração de 2000 mg/L).

Os maiores componentes do óleo essencial de *C. zeylanicum* (canela) são o cinamaldeído e eugenol, sendo que o primeiro está presente na proporção de 90% e tem sido apontado como capaz de inibir crescimento fúngico e bacteriano (LÓPEZ et al., 2007). O ponto crucial na transição da forma planctônica para biofilme é a adesividade. O óleo de canela na concentração de 1000 mg/L previne a formação de biofilme da cepa referência e em concentração de 500 mg/L os das espécies de *C. parapsilosis*, fato que nos leva a hipotetizar que o cinamaldeído, poderia afetar a carga eletrostática da superfície celular e gerar uma tensão assimétrica na membrana, uma vez que as forças atrativas e repulsivas (forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals) geradas entre as duas superfícies (microrganismos e superfícies bióticas ou abióticas) condicionam o processo de adesão (PINA-VAZ et al., 2004). Dados da literatura (OUSSALAH; CAILLET; LACROIX, 2006), relatam que o óleo essencial de canela na CIM afetou a integridade da membrana celular de bactérias (*E. coli* e *L. monocytogenes*) e induz depleção na concentração intracelular de ATP, sugerindo que o óleo tem ação tóxica à membrana citoplasmática.

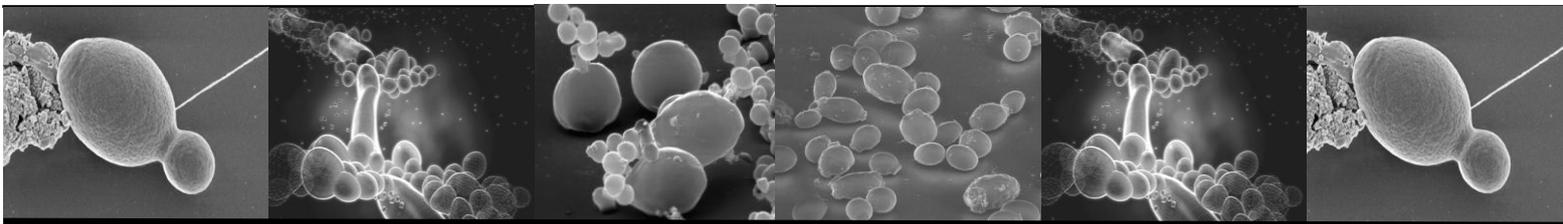
Além disso, semelhantemente aos terpenos (URIBE; RAMIREZ; PENA, 1985), o cinamaldeído poderia exercer efeitos adversos nas mitocôndrias, inibindo o metabolismo celular, pois nos ensaios de redução do MTT, processo que envolve a enzima succinato desidrogenase mitocondrial, o óleo essencial de canela tanto inibiu a dispersão da progênie do biofilme, inviabilizando as células, quanto impediu o desenvolvimento deste em sua presença.

Com o crescente reconhecimento do papel que os biofilmes de *Candida* desempenham durante a infecção (DONLAN; COSTERTON, 2002; KOJIC; DAROUICHE, 2004; CHANDRA; ZHOU; GHANNOUM, 2005), também se faz importante análise do perfil proteico expresso no fungo capaz de crescer no modo de biofilme, e compará-lo com o seu homólogo capaz de crescer apenas no modo planctônico, pois expressão, características químicas e propriedades biológicas das proteínas parecem ser dependentes de vários fatores ambientais, onde se incluem a morfologia celular, o estado de crescimento, a espécie e o sorotipo (CASANOVA; CHAFFIN, 1991). A pesquisa proteômica realizada sobre leveduras patogênicas humanas, basicamente é direcionada à *C. albicans*, sendo que neste estudo, utilizaram-se técnicas proteômicas aliada à técnica de eletroforese bidimensional e programa computadorizado para as análises comparativas das proteínas secretadas pelas espécies de *C. parapsilosis*. Nas análises dos géis de eletroforese bidimensional, *C. parapsilosis* sensu stricto não produtoras e produtoras de biofilmes revelaram semelhanças entre os perfis de proteínas, pois as não formadoras de biofilme expressaram um total de 408 spots, com PI variando de 4,58 à 8,9 e massa molar com variação de 101,20 a 17,3 kDas enquanto as formadoras de biofilme apresentaram 317 spots, PI 4,48 a 9,13 e massa molar entre 96,0 e 16,2 kDas, ou globalmente, a maioria dos peptídeos expressos apresentou massa molar entre 39 e 77 Kdas, na faixa de valores de pH entre 4 e 9. Os resultados desse estudo reforçam os encontros em bancos de dados (<http://www.expansy.org/ch2d/2d-index.html>; <http://www.ibgc.u-bordeaux2.fr/YPM/>) que disponibilizam perfil proteicos de leveduras, os quais têm mostrado que a grande maioria dos spots proteicos variam no pH de 4-9 e, soma-se aos estudos de Wildgruber et al., 2002, que relatam o encontro de peptídeos com massa molar entre 15 e 65 kDas para *S. cerevisiae* e ao estudo de Thomas et al., 2006, que relatam o encontro de elevado grau de semelhança entre os perfis de proteínas associadas à extratos de superfície celular de *C. albicans* no modo de crescimento planctônico e biofilme.

A evidenciação da expressão de duas proteínas de 77,8 (spot 4) e de 64,0 (spot 19) kDa, respectivamente, 98,8 e 18 vezes mais expressas na levedura que cresce no modo de biofilme, seria sugestivo de proteínas específicas para este modo. Estudos complementares a

respeito da identificação e funcionalidade das proteínas diferencialmente expressas em ambos os isolados e a tipagem molecular dos mesmos, poderiam esclarecer tais resultados.

CONCLUSÕES

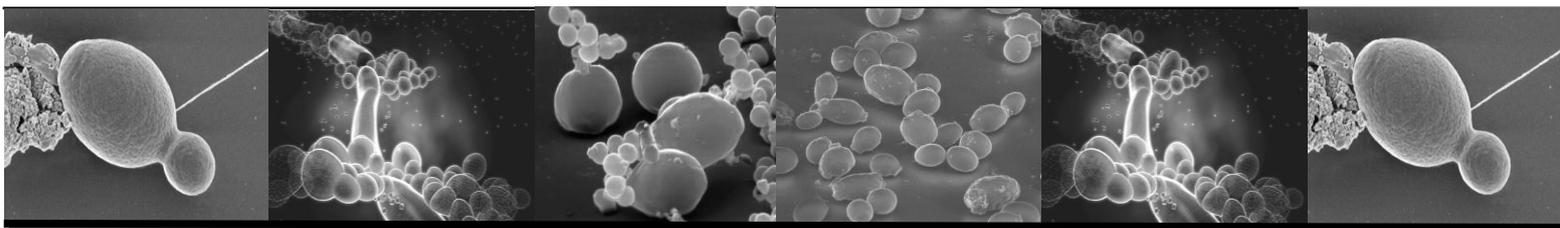


6. CONCLUSÕES

Com base no método experimental utilizado e nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- a) As espécies *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis sensu stricto*, advindas de fluidos dialíticos, são leveduras capazes de formarem biofilmes, fator determinante de virulência.
- b) O perfil de resistência aos antifúngicos de uso clínico (fluconazol e anfotericina B) pelas células do biofilme (sésseis) comparado à sensibilidade de suas homólogas, em suspensão (crescimento planctônico) de *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* estudadas é semelhante ao demonstrado por células de *Candida* em condições idênticas.
- c) O efeito de produtos químicos sobre a viabilidade dos biofilmes variou de acordo com a natureza química e o tratamento empregado, embora a remoção dos mesmos não tenha sido um fator induzido pela exposição a nenhum dos compostos. Mesmo com sinergismo químico a remoção do biofilme não foi alcançada neste trabalho em nenhuma condição estudada.
- d) A expressão de duas proteínas de 77,8 e de 64,0 kDa, respectivamente, 98,8 e 18 vezes mais expressas na levedura que cresce no modo de biofilme é sugestivo de proteínas específicas para este modo.
- e) A divulgação das informações obtidas neste trabalho visa o desenvolvimento de programas de qualidade e de monitoramento para prevenção de contaminação e colonização microbiana dos fluidos de diálise, visando minimizar as infecções, especialmente infecções associadas aos biofilmes.

REFERÊNCIAS



1. ABDELGALEIL, S. A. M.; ABBASSY, M. A.; BELAL, A. S.; RASOUL, M. A.A.A. Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemia judaica* L. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 5947-5950, 2008.
2. AGARWAL, V.; LAL, P.; PRUTHI, V. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. **Mycopathologia**, v.165, p. 13-19, 2008.
3. ALGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, K.; MITAKU, S.; CHINO, L. B. Composition and antimicrobial of essential oils of two *Origanum* species. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 4168-4170, 2001.
4. ALVES, P. M.; QUEIROZ, L. M. G.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, p. 222-224, 2009.
5. AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 48, p. 3291-3297, 2004.
6. ALVIANO, W. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, D. S.; BIZZO, H. R.; SOUTO-PADRÓN, T.; RODRIGUES, M. L.; BOLOGNESE, A. M.; ALVIANO, C. S.; SOUZA, M. M. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 20, p. 101-105, 2005.
7. AMATO, R. L. Water treatment for hemodialysis-updated to include the latest AAMI standards for dialysate (RD52: 2004) continuing. **Nephrol. Nurs J.**, v. 32, p.151-67, 2005.
8. AMBROSIO, S. R.; TIRAPELLI, C.R.; BONAVENTURA, D.; DE OLIVEIRA A.M.; DA COSTA, F.B. Pimarane diterpene from *Viguiera arenaria* (Asteraceae) inhibit rat carotid contraction. **Fitoterapia**, v. 73, p. 484-489, 2002.
9. AMBROSIO, S.R.; SCHORR, K.; DA COSTA, F.B. Terpenoids of *Viguiera arenaria* (Asteraceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 32, p. 221-224, 2004.
10. ANAISSIE, E. J.; STRATTON, S. L.; DIGNANI, C.; SUMMERBELL, R. C.; REX, J. H.; MONSON, T. P. ; SPENCER, T.; KASAI, M.; FRANCESCONI, A.; WALSH, T.J. Pathogenic *Aspergillus* species recovered from a hospital water system: a 3-year prospective study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p.780-789, 2002.
11. ANDES, D.; NETT, J.; OSCHEL, P.; ALBRECHT, R.; MARCHILLO, K.; PITULA, A. Development and characterization of an *in vivo* central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 6023-6031, 2004.
12. ANDRIOLE, V. T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 44, p. 151-162, 1999.
13. ANGIOLELLA, L.; STRINGARO, A. R.; DE BERNARDIS, F.; POSTERARO, B.; BONITO, M.; TOCCACIELI, L.; TOROSANTUCCI, A.; COLONE, M.;

- SANGUINETTI, M.; CASSONE, A.; PALAMARA, A.T. Increase of virulence and its phenotypic traits in drug-resistant strains of *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, p. 927-936, 2008.
14. ARVANITIDOU, M.; SPAIA, S.; VELEGRAKI, A.; PAZARLOGLOU, M.; KANETIDIS, D.; PANGIDIS, P.; ASKEPIDIS, N.; KATSINAS, C. H.; VAYONAS, G.; KATSOUYANNOPOULOS, V. High level of recovery of fungi from water and dialysate in haemodialysis units. **J. Hosp. Infect.**, v. 45, p. 225-230, 2000.
 15. ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. Chemistry of lichen substances. Tokio, Japanese Society for the Promotion of Science, 1954.
 16. ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION. DIALYSATE FOR HEMODIALYSIS, ANSI/AAMI RD 52, 2004.
 17. BACHMANN, S. P.; VANDEWALLE, K.; RAMAGE, G.; PATTERSON, T. F.; WICKES, B. L.; GRAYBILL, J. R.; LOPEZ-RIBOT, J. L. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 3591-3596, 2002.
 18. BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, J. L. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 1900-1905, 1998.
 19. BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, J. L. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 46, p. 397-403, 2000.
 20. BARRY, A. L.; PFALLER, M. A.; RENNIE, R. P.; FUCHS, P. C.; BROWN, S. D. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, Etest, and disk diffusion methods. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.46, p.1781-1784, 2002.
 21. BECK-SAGUÉ, C. M., JARVIS, W. R. AND NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. **J. Infect. Dis.**, v. 167, p.1247-1251, 1993.
 22. BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnol. Annu. Rev.**; v. 11, p.127-152, 2005.
 23. BLOCK, S. S. 1991. Definitions of terms, p. 18-125. In S. S. Block (ed.), Disinfection, sterilization, and preservation, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.
 24. BIAVATTI, M. W.; DOSSIN, D.; DESCHAMPS, F. C.; LIMA, M. P. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.16, p. 230-235, 2006.

25. BLOISE, M. I. Óleos vegetais e especialidades da floresta Amazônica. **Cosmetics & Toiletries**, v. 15, p. 46-49, 2003.
26. BODENHOFF, J. Development of strains of genus *Candida* and genus *Torulopsis* resistant to antimycotics. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 75, p. 622-630, 1969.
27. BONASSOLI, L. A.; BERTOLI, M.; SVIDZINSKI, T. I. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. **J. Hosp. Infect.**, v. 59, p. 159–162, 2005.
28. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
29. BRAGA, P. C.; CULICI, M.; ALFIERI, M.; DAL SASSO, M. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 31, p. 472-477, 2008.
30. BRANDA, S. S.; VIK, A.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends Microbiol.**, v. 13, p. 21-26, 2005.
31. BRANCHINI, M. L.; PFALLER, M. A.; RHINE-CHALBERG, J.; FREMPONG, T.; ISENBERG, H. D. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 452 – 456, 1994.
32. BRASIL. Ministério da Saúde (2004) Portaria nº 154 de 15.06.2004. D.O.U. 17.06.2004. Regulamento técnico para o funcionamento dos serviços de diálise.
33. BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 94, p. 233-253, 2004.
34. CANAUD, B.; BOSCH, J. Y.; LERAY-MORAGUES, H.; MORENA, M.; STEC, F. Microbiologic purity of dialysate: rationale and technical aspects. **Blood Purif.**, v. 8, p. 200–213, 2000.
35. CANUTO, M. M.; RODERO, F. G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **The Lancet Infect. Dis.**, v. 2, p. 550-563, 2002.
36. CAPPELLI, G.; BALLESTRI, M.; PERRONE, S.; CIUFFREDA, A.; INGUAGGIATO, P.; ALBERTAZZI, A. Biofilms invade nephrology: effects in hemodialysis. **Blood Purif.**, v. 18, p. 224–230, 2000.
37. CAPPELLI, G.; SERENI, L.; SCIALOJA, M. G.; MORSELLI, M.; PERRONE, S.; CIUFFREDA, A.; BELLESIA, M.; INGUAGGIATO, P.; ALBERTAZZI, A.; TETTA, C. Effects of biofilm formation on haemodialysis monitor disinfection. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 18, p. 2105-111, 2003.
38. CAPPELLI, G.; TETTA, C.; CANAUD, B. Is biofilm a cause of silent chronic inflammation in haemodialysis patients? A fascinating working hypothesis. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 20, p. 266-70, 2005.

39. CAPELLI, G.; RICARDI, M.; RAVERA, F.; LIGABUE, G.; BALLESTRI, M.; BONUCCHI, D.; BONDI, M. Biofilm on artificial surfaces. **Contrib. Nephrol.**, v. 154, p. 61-71, 2007.
40. CASANOVA, M.; CHAFFIN, W. L. Cell wall glycoproteins of *Candida albicans* as released by different methods. **J. Gen. Microbiol.**, v. 137, p.1045–1051, 1991.
41. CHAFFIN, W. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J. P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**,v. 62, p.130-180, 1998.
42. CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M. A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J. Bacteriol.**, v.183, p. 5385-5394, 2001.
43. CHANDRA, J.; PATEL, J. D.; LI, J.; ZHOU, G.; MUKHERJEE, P. K.; McCORMICK, T. S.; ANDERSON, J. M.; GHANNOUM, M. A. Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms. **Appl. Environ. Microbiol.**,v. 71, p. 8795-8801, 2005.
44. CHANDRA, J.; ZHOU, G.; GHANNOUM, M. A. Fungal biofilms and antimycotics. **Curr. Drug Targets**, v. 6, p. 887-894, 2005.
45. CHARACKLIS, W. G. Biofilm processes. In CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. (ed.) **Biofilms**. John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1990, p. 195-232.
46. CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL K. C. Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. In CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. (ed.) **Biofilms**. John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1990, p. 3-15.
47. CHARACKLIS, W. G.; MCFETERS, G. A.; MARSHALL, K. C. Physiological ecology in biofilm systems. In CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. (ed.) **Biofilms**. John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1990, p. 341-39.
48. CHEUNG, H.T.; FU, S.L.; SMAL, M.A. Inhibition of platelet aggregation by diterpenes acids from *Pinus massoniana* resin. **Arzneimittelforschung**, v. 44, p. 17-25, 1994.
49. CHOI, H. W.; SHIN, J. H.; JUNG, S. I.; PARK, K. H.; CHO, D.; KEE, S. J.; SHIN, M. G.; SUH, S. P.; RYANG, D. W. Species-specific differences in the susceptibilities of biofilms formed by *Candida* bloodstream isolates to echinocandin antifungals. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 51, p. 1520-1523, 2007.
50. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition, M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2008.

51. CULBERSON, C. F. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin layer chromatographic method. **J. Chromatogr.**, v. 72, p. 113-125, 1972.
52. COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. and the Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 2816-2823, 2006.
53. COCCHIETTO, M., SKERT, N., P.L., SAVA, G., A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 137-146, 2002.
54. CORNELLY, O. A.; SCHMITZ, K.; AISENBREY, S. The first echinocandin: caspofungin. **Mycoses**, v. 3, p. 56-60, 2002.
55. CORSINO, J.; DE CARVALHO, P. R.; KATO, M. J.; LATORRE, L. R.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; ARAUJO, A. R.; BOLZANI, V. S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, M. A. S.; FURLAN, M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 741-748, 2000.
56. COSTA, P. M.; FERREIRA, P. M.; BOLZANI, S. V.; FURLAN, M.; SANTOS, V. A. F. F. M.; CORSINO, J.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicol. In Vitro**, v. 22, p. 854-863, 2008.
57. COSTERTON, J. W.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Introduction to microbial biofilms, p. 1-11. In: LAPPIN-SCOTT, H. M.; COSTERTON, J. W. (ed.): *Microbial biofilms*. Cambridge University Press: Cambridge, United Kingdom, 1995.
58. COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.
59. COSTERTON, J.W., COOK, G., LAMONT, R. The community architecture of biofilms: dynamic structures and mechanisms. In: NEWMAN, H. N.; WILSON, M. (eds). *Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease*. London, Cardiff: Boline, 1999.
60. COSTERTON J.W., LEWANDOWSKI Z., CALDWELL D.E., KORBER D.R. AND LAPPIN-SCOTT H.M. Microbial biofilms. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 49, p. 711-745, 2003.
61. DAVIES, D. G.; PARSEK, M. R.; PEARSON, J. P.; IGLEWSKI, B. H.; COSTERTON, J. W.; GREENBERG, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, p. 295-298, 1998.
62. DE LEÓN, L.; MOUJIR, L. Activity and mechanism of the action of zeylasterone against *Bacillus subtilis*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 104, p. 1266-1274, 2008.

63. De LOGU, A.; SADDI, M.; CARDIA, M. C.; BORGNA, R.; SANNA, C.; SADDI, B.; MACCIONI, E. In vitro activity of 2-cyclohexylidenhydrazo-4-phenyl-thiazole compared with those of amphotericin B and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. and fluconazole-resistant *Candida albicans*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 55, p. 692-698, 2005.
64. DEL SORBO, G.; SCHOONBEEK, H.; WAARD, M. A. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. **Fungal Genet. Biol.**, v. 30, p. 1-15, 2000.
65. DENYER, S. P.; STEWART, G. S. A. B. Mechanisms of action of disinfectants International Biodeterioration & Biodegradation, V. 41, P. 261-268, 1998.
66. DENIZOT F, LANG R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods.**, v.22, p. 271-277, 1986.
67. DE NOBEL, J. G.; KLIS, F. M.; PRIEM, J.; MUNNIK, T.; VAN DEN ENDE, H. The glucanase-soluble mannoproteins limit cell porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 6, p. 491-499, 1990.
68. DERESINSKI, S. C.; STEVENS, D. A. Caspofungin. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36, p. 1445-1457, 2003.
69. DICK, J. D.; MERZ, W. G.; SARAL, R. Incidence of polyene resistant yeasts recovered from clinical specimens. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 18, p.158-163, 1980.
70. DICK, J. D.; ROSENGARD, B. R.; MERZ, W. G.; STUART, R. K.; HUTCHINS, G. M.; SARAL, R. Fatal disseminated candidiasis to amphotericin B resistant *C. guilliermondii*. **Ann. Internal Med.**, v. 102, p. 67-68, 1985.
71. DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; JONES, R. N.; PFALLER, M. A. Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 3623-3626, 2003.
72. DINARELLO, C .A. The multiple biologic activities of IL-1. **N. Engl. J. Med.**, v. 311, p.1413 -1417, 1984.
73. DIRSCH, V. M.; KIEMER, A. K.; WAGNER, H.; VOLLMAR, A. M. The triterpenoid quinonemethide pristimerin inhibits induction of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 336, p. 211-217, 1997.
74. DIZBAY, M.; FIDAN, I.; KALKANCI, A.; SARI, N.; YALCIN, B.; KUSTIMUR, S.; ARMAN, D. High incidence of *Candida parapsilosis* candidaemia in non-neutropenic critically ill patients: Epidemiology and antifungal susceptibility. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 42, p. 114-120, 2010.
75. DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, p. 277-281, 2001.

76. DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 167-193, 2002.
77. EL-AZIZI, M. Enhancement of the in vitro activity of amphotericin B against the biofilms of non-*albicans* *Candida* spp. by rifampicin and doxycycline. **J. Med. Microbiol.**, v.56, p. 645-649, 2007.
78. ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 49 (suppl 1): S7-S10, 2002.
79. EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 14, p. 398-405, 2008.
80. FALCÃO, H. S.; LIMA, I. O.; SANTOS, V. L.; DANTAS, H. F.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, p. 381-391, 2005.
81. FREIMOSER, F. M.; JAKOB, C. A.; AEBI, M.; TUOR, U. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 3727-3729, 1999.
82. FLEMMING, H-C. Biofilms and Environmental Protection. **Water Sci. Technol.**, 27: 1-10, 1993.
83. GABER, R. F.; COPPLE, D. M.; KENNEDY, B. K.; VIDAL, M.; BARD, M. The yeast gene *ERG6* is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell cycle-sparking sterol. **Mol. Cell. Biol.**, v. 9, p. 3447-3456, 1989.
84. GEBER, A.; HITCHCOCK, C. A.; SWARTZ, J. E.; PULLEN, F. S.; MARSDEN, K. E.; KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. Deletion of the *Candida glabrata* *ERG3* and *ERG11* genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, p. 2708-2717, 1995.
85. GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 501-517, 1999.
86. GHIGO, J. M. Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? **Res. Microbiol.**, v. 154, p.1-8, 2003.
87. GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, p. 39-63, 2002.
88. GROLL, A. H.; WALSH, T. J. Caspofungin: pharmacology, safety and therapeutic potential in superficial and invasive fungal infections. **Expert Opin. Investig. Drugs.**, v. 10, p. 1545-1558, 2001.

89. GUPTA, A. K.; TOMAS, E. New antifungal agents. **Dermatol. Clin.**, v. 21. p. 565-576, 2003.
90. HABASH, M.; REID, G. Microbial biofilms: Their development and significance for medical device-related infections. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 39, p. 887-98, 1999.
91. HALE-JR., M. E. The Biology of Lichens. 3th ed. Edward Arnold Pub, London, 1983
HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. Gel electrophoresis of proteins. New York: IRL Press, 1990, USA.
92. HAWSER S. P.; NORRIS, H.; JESSUP, C. J.; GHANNOUM, M. A. Comparison 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfenyl)- 5 -[(Phenylamino)carbonyl] - 2H - tetrazolium - hydroxide XTT) in colorimetric method with the standardized national committee for clinical laboratory standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 1450-1452, 1998.
93. HAWSER, S. Comparisons of the susceptibilities of planktonic and adherent *Candida albicans* to antifungal agents: a modified XTT tetrazolium assay using synchronised *C. albicans* cells. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 34, p. 149-152, 1996.
94. HAWSER, S. P.; BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. **J. Med. Microbiol.**, v. 47, p. 253-256, 1998.
95. HAWSER, S. P.; DOUGLAS L. J. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, p. 2128-2131, 1995.
96. HAWSER, S. P.; DOUGLAS L. J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 915-921, 1994.
97. HECTOR, R. F. Compounds active against cell walls of medically important fungi. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p.1-21, 1993.
98. HENDRY, E. R.; WORTHINGTON, T.; CONWAY, B. R.; LAMBERT, P. A. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grow in planktonic and biofilms cultures. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 64, p. 1219-1225, 2009.
99. HIOM, S. J.; FURR, J. R.; RUSSELL, A. D.; HANN, A. C. The possible role of yeast cell walls in modifying cellular response to chlorhexidine diacetate. **Cytobios**, v. 86, p.123-135, 1996.
100. HITCHCOCK, C.; DICKINSON, K.; BROWN, S. B.; EVANS, E. G.; ADAMS, D. J. Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P450-dependent 14 α -sterol demethylase purified from *Candida albicans*. **J. Biochem.**, v. 266, p. 475-480, 1990.
101. HITCHCOCK, C.; WHITTLE, P. T. Chemistry and mode of action of fluconazole, p. 183-197. In: RIPPON, J. W.; FROMTLING, R. A. (ed.). Cutaneous antifungal agents: selected compounds in clinical practice and development. Marcel Dekker, Inc.: New York, N.Y., 1993.

102. HODGES, N. A., HANLON, G. W. Detection and measurement of combined biocide action. **Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser.**, v. 27, p. 297–310, 1991.
103. HOFFMANN, Rodolfo. Análise de regressão: uma introdução à econometria. 4. ed. São Paulo: Hucitec, 2006.
104. HOLLAND, S. P.; MATHIAS, R. G.; MORCK, D. W.; CHIU, J.; SLADE, S. G. Diffuse lamellar keratitis related to endotoxins released from sterilizer reservoir biofilms. **Ophthalmology**, v. 107, p. 1227-1234, 2000.
105. HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oil and smoke antimicrobials. **Food Microbiol.**, v. 27, p. 273-292, 2005.
106. HOLT, R. J. The imidazoles, p. 107-148. *In*: Speller, D. C. E (ed.). Antifungal chemotherapy. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, England, 1980.
107. HOLZ, R. W. The effects of the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B on thin lipid membranes. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 235, p. 469–479, 1974.
108. HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K.; RINALDI, M. G. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 48, p. 1153-1160, 2004.
109. HUNECK, S.; *Nature of lichen substances*; *In The Lichens*; Ahmadjian, V.; Hale, M. E.; Ed.; Academic Press, New York, 495, 1973.
110. ISO 13958. Concentrates for haemodialysis and related therapies. 2002.
111. ISO 13959. Water for haemodialysis and related therapies. 2002.
112. ISO/DIS 11663 (draft). Dialysis fluid for haemodialysis and related therapies.
113. ISO/DIS 26722 (draft). Water treatment equipment for haemodialysis applications.
114. JENSEN-PERGAKES, K. L.; KENNEDY, M. A.; LEES, N. D.; BARBUCH, R.; KOEGEL, C.; BARD, M. Sequencing, disruption, and characterization of the *Candida albicans* sterol methyltransferase (ERG6) gene: drug susceptibility studies in erg6 mutants. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 1160–1167, 1998.
115. JOLY, A.B. Botânica – Introdução à taxonomia vegetal 6ª edição. Editora Nacional. 1993.
116. KALANTAR-ZADEH, K.; KOPPLE, J. D. Relative contributions of nutrition and inflammation to clinical outcome in dialysis patients. **Am. J. Kidney Dis.**, v.38, p. 1343–1350, 2001.
117. KAPPE, R. Antifungal activity of the new azole UK-109,496 (voriconazole). **Mycoses**, v.42, p.83-86, 1999.

118. KARPANEN, T. J.; WORTHINGTON, T.; HENDRY, E. R.; CONWAY, B. R.; LAMBERT, P.A. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 62, p. 1031-1036, 2008.
119. KATRAGKOU, A.; CHATZIMOSCHOU, A.; SIMITSOPOULOU, M.; DALAKIOURIDOU, M.; DIZA-MATAFTSI, E.; TSANTALI, C.; ROILIDES, E. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, p. 357–360, 2007.
120. KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. Basic and Clinical Pharmacology, Capítulo 48: Antifungal Agents, McGraw-Hill Medical, 2007.
121. KHOT, P. D.; SUCI, P. A.; MILLER, R. L.; NELSON, R. D.; TYLER, B. J. A small subpopulation of blastospores in *Candida albicans* biofilms exhibit resistance to amphotericin B associated with differential regulation of ergosterol and β -1,6-glucan pathway genes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, p. 3708-3716, 2006.
122. KINOBE, R. T.; DERCHO, R. A.; VLAHAKIS, J. Z.; BRIEN, J. F.; SZAREK, W. A.; NAKATSU, K. Inhibition of the enzymatic activity of heme oxygenases by azole-based antifungal drugs. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 319, p. 277-284, 2006.
123. KLEIN, E.; PASS, T.; HARDING, G. B.; WRIGHT, R.; MILLION, C. Microbial and endotoxin contamination in water and dialysate in the central United States. **Artif. Organs**, v. 14, p. 85–94, 1990.
124. KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. *Candida* infections of medical devices. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, p. 255-267, 2004.
125. KROM, B. P.; COHEN, J. B.; FESER, G. E. M.; CIHLAR, R. L. Optimized candidal biofilm microtiter assay. **J. Microbiol. Methods**, v. 68, p. 421-423, 2007.
126. KUHN, D. M.; BALKIS, M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 506-508, 2003.
127. KUHN, D. M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 878-888, 2002a.
128. KUHN, D. M.; GEORGE, T.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 1773–1780, 2002b.
129. KUSCH, H.; ENGELMANN, S.; ALBRECHT, D.; MORSCHHÄUSER, J.; HECKER, M. Proteomic analysis of the oxidative stress response in *Candida albicans*. **Proteomics**, v. 7, p. 686-697, 2007.

130. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
131. LAFLEUR, M. D.; KUMAMOTO, C. A.; LEWIS, K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, p. 3839–3846, 2006.
132. LAMFON, H.; PORTER, S. R.; MCCULLOUGH, M.; PRATTEN, J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 53, p. 383–385, 2004.
133. LASKER, B. A.; BUTLER, G.; LOTT, T. J. Molecular genotyping of *Candida parapsilosis* group I clinical isolates by analysis of polymorphic microsatellite markers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p.750-759, 2006.
134. LECHEVALLIER, M. W.; CAWTHON, C. D.; LEE, R. G. Inactivation of biofilm bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, p. 2492–2499, 1988.
135. LEGAZ, M. E. E.; VICENTE, C. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxilase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prusnatri* thallus. **J. Plant Physiol.**, v. 71, p. 300-302, 1983.
136. LEHMANN, P. F.; RINALDI, M. G.; WU, L.; LIN, D. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 1815-1821,1995.
137. LENGELER, K. B.; DAVIDSON, R. C.; D'SOUSA, C.; HARASHIMA, T.; SHEN, W.; WANG, P.; PAN, X.; WAUGH, M.; HEITMAN, J. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 746-785, 2000.
138. LEHNINGER, A. B.; NELSON, D. L; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. São Paulo: Sarvier, Brasil, 1995.
139. LIN, D.; WU, L. C.; RINALDI, M. G.; LEHMANN. P. F. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p.1815–1821, 1995.
140. LOCKHART, S. R.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Geographic Distribution and Antifungal Susceptibility of the Newly Described Species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in Comparison to the Closely Related Species *Candida parapsilosis*. **J. Clin. Microbiol.** , v. 46, p. 2659–2664, 2008.
141. LOEFLER, J.; STEVENS, D. A. Antifungal drug resistance. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, (suppl 1): S31-41, 2003.
142. LONNEMANN, G. The quality of dialysate: an integrated approach. **Kidney Int.**, v. 58(Suppl 76), p. S112–S119, 2000.

143. LONNEMANN, G.; BINGEL, M.; FLOEGE, J.; KOCH, K. M.; DINARELLO, C. Detection of endotoxin-like interleukin-1-inducing activity during in vitro dialysis. **Kidney Int.**, v. 33, p. 29-35, 1988.
144. LONNEMANN, G.; SERENI, L.; LEMKE, H. D.; TETTA, C. Pyrogen retention by highly permeable synthetic membranes during in vitro dialysis. **Artif Organs**, v.25, p. 951-60, 2001.
145. LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERÍN, C. Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 8814-8824, 2007.
146. LORENZI H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 3.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2000.
147. LUCHI, A. E.; SILVA, L. C. PEREIRA; MORAES, M. A. Anatomia comparada do lenho de *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. em áreas de cerrado e de plantação de *Pinus elliottii* Engelm. **Rev. Bras. Bot.**, v.28, p.809-820, 2005.
148. LOWRIE, E. G: Chronic inflammation and clinical outcome in adult hemodialysis patients. **Kidney Int. Suppl.**, v. 80, p. 94–98, 2002.
149. MAH, T. F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol.**, v. 9, p. 34-39, 2004.
150. MALCHESKY, P. S. Peracetic acid and its application to medical instrument sterilization. **Artif. Organs**, v. 17, p. 147–152, 1993.
151. MAN, N. K.; CIANCIONI, C.; FAIVRE, J. M.; DIAB, N.; LONDON, G.; MARET, T.; WAMBERGUE, F. P. Dialysis-associated adverse reactions with high-flux membranes and microbial contamination of liquid bicarbonate concentrate. **Contrib. Nephrol.**, v. 62, p. 24–34, 1988.
152. MAN, N. K.; DEGREMONT, A.; VAILLANT, P.; COLLET, M.; ZINGRAFF, J. Criteres actuels et perspectives de realisation d'un dialysat optimal. In: Chatelain C, Jacobs CL, eds. Seminaires d'uronephrologie. Paris: Masson, p. 79–87, 1995.
153. MAN, N-K.; DEGREMONT, A.; DARBORD, J-C.; COLLET, M.; VAILLANT, P. Evidence of bacterial biofilm in tubing from hydraulic pathway of hemodialysis system. **Artif. Organs**, v. 22, p. 596–600, 1998.
154. MANAVATHU, E.K.; CUTRIGHT, J.L.; LOEBENBERG, D., et al. A comparative study of the *in vitro* susceptibilities of clinical and laboratory-selected resistant isolates of *Aspergillus* spp. to amphotericin B, itraconazole, voriconazole and posaconazole (SCH 56592). **J. Antimicrob. Chemoth.**, v.46, p.229-234, 2000.
155. MARCILLA, A., ELORZA, M. V.; MORMENEO, S.; RICO, H.; SENTANDREU, R. *Candida albicans* mycelial cell wall structure: supramolecular complexes released by Zymolyase, chitinase and b-mercaptoethanol. **Arch. Microbiol.**, v.155, p. 312–319, 1991.

156. MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 147–179, 1999.
157. MCGINNIS, M.; RINALDI, M. G. Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biological fluids, p. 176–211. In: LORIAN, V. (ed.). *Antibiotics in laboratory medicine*. The Williams & Wilkins Co.: Baltimore, Md, 1996.
158. MEDRANO, D. J.; BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO A.; ROCHA, M. F.; RABENHORST, S. H.; SIDRIM, J. J. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 48, p. 17–20, 2006.
159. MELVIN, M. *Electroforesis*. London: John Wiley & Sons, UK, 1987.
160. MITTELMAN, M. W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **J. Dairy Sci.**, v. 81, p. 2760–2764, 1998.
161. MOLLOY, C.; SHEPHERD, M. G.; SULLIVAN, P. A. Differential extraction of N-acetylglucosaminidase and trehalase from the cell envelope of *Candida albicans*. **Exp. Mycol.**, v. 19, p. 178–185, 1995.
162. MORIN, P. Identification of the bacteriological contamination of a water treatment line used for haemodialysis and its disinfection. **J. Hosp. Infect.**, v. 45, p. 218–224, 2000.
163. MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento Racional de Fármacos Baseados em Produtos Naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105–111, 2001
164. MONTANARI, L. B.; SARTORI, F. G.; CARDOSO, M. J.; VARO, S. D.; PIRES, R. H.; LEITE, C. Q.; PRINCE, K.; MARTINS, C. H. Microbiological contamination of a hemodialysis center water distribution system. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 51, p. 37–43, 2009.
165. MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; GHANNOUM, M. A. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 4333–4340, 2003.
166. MUJICA, M. T.; FINQUELIEVICH, J. L.; JEWTOCHOWICZ, V.; IOVANNITTI, C. A. Prevalence of *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in clinical samples during 1999–2001. **Rev. Argent Microbiol.**, v. 36, p. 107–112, 2004.
167. MURILLO, L. A.; NEWPORT, G. LAN, C. Y.; HABELITZ, S.; DUNGAN, J.; AGABIAN, N. M. Genome-wide transcription profiling of the early phase of biofilm formation by *Candida albicans*. **Eukaryot. Cell**, v. 4, p. 1562–1573; 2005.
168. NAKATANI, T.; TSUCHIDA, K.; SUGIMURA, K.; YOSHIMURA, R.; TAKEMOTO, Y. Response of peripheral blood mononuclear cells in hemodialyzed patients against endotoxin and muramyl dipeptide. **Int. J. Mol. Med.**, v. 10, p. 469–472, 2002.

169. NAKAMURA, T.; TAKAHASHI, H. Epidemiological study of *Candida* infections in blood: susceptibilities of *Candida* spp. to antifungal agents, and clinical features associated with the candidemia. **J. Infect. Chemother.**, v. 12, p. 132–138, 2006.
170. NANTEL, A.; DIGNARD, D.; BACHEWICH, C.; HARCUS, D.; MARCIL, A.; BOUIN, A. P.; SENSEN, C.W.; HOGUES, H.; VAN HET HOOG, M.; GORDON, P.; RIGBY, T.; BENOIT, F.; TESSIER, D. C.; THOMAS, D. Y.; WHITEWAY, M. Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. **Mol. Biol. Cell**, v. 13, p. 3452–3465, 2002.
171. NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.D. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz. J. Microbiol.**, v.31, p.247-256, 2000.
172. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-second edition, M27-A2. Clinical and Laboratory Standards, 22 (15), Wayne, Pa, 2002.
173. NETT, J. E.; GUTE, K. M.; RINGEISEN, A.; HOLOYDA, K. A.; ANDES, D. R. Reduced biocide susceptibility in *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, p. 3411-3413, 2008.
174. NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R- 250. **Electrophoresis**, v.9, p.255-62, 1988.
175. NG, K. P.; SAW, T. L.; NA, S. L.; SOO-HOO, T. S. Systemic *Candida* infection in University hospital 1997–1999: the distribution of *Candida* biotypes and antifungal susceptibility patterns. **Mycopathologia**, v. 149, p.141–146, 2001.
176. NGUYEN, M. H.; CLANCY, C. J.; YU, V. L.; YU, Y. V.; MORRIS, A. J.; SNYDMAN, D. R.; SUTTON, D. A.; RINALDI, M. G. Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response o amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 425-430, 1998.
177. NIU, C.; GILBERT, E. S. Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 6951–6956, 2004.
178. NOLTE, F. S.; PARKINSON, T.; FALCONER, D. J.; DIX, S.; WILLIAMS, J.; GILMORE, C.; GELLER, R.; WINGARD, J. R. Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, p. 196-199, 1997.
179. NORRMAN, G.; CHARACKLIS, W. G.; BRYERS, J. D. Control of microbial fouling in circular tubes with chlorine. **Dev. Indus. Microbiol.**, v. 18, p. 581–590, 1977.

180. NOZAWA, Y.; MORITA, T. Molecular mechanisms of antifungal agents associated with membrane ergosterol. Dysfunction of membrane ergosterol and inhibition of ergosterol biosynthesis, p. 111. In: Iwata, K.; Vanden Bossche, H. (ed.). *In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents*. Elsevier Science Publishers: Amsterdam, The Netherlands, 1986.
181. NYSTRAND, R. Microbiology of water and fluids for hemodialysis. **J. Chin. Med. Assoc.**, v.71, p. 223–229, 2008.
182. OUSSALAH M, CAILLET S, LACROIX M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, v. 69, p. 1046-1055, 2006.
183. ORABI, K. Y.; AL-QASOUMI, S. I.; EL-OLEMY, M. M.; MOSSA, J. S.; MUHAMMAD, I. Dihydroagarofuran alkaloid and triterpenes from *Maytenus heterophylla* and *Maytenus arbutifolia*. **Phytochemistry.**, v. 58, p. 475-480, 2001.
184. PANAGODA, G. J., ELLEPOLA, A. N.; SAMARANAYAKE, L. P. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. **Mycoses**, v. 44, p. 29–35, 2001.
185. PANICHI, V.; MIGLIORI, M.; DE PIETRO, S.; TACCOLA, D.; ANDREINI, B.; METELLI, M. R.; GIOVANNINI, L.; PALLA, R. The link of biocompatibility to cytokine production. **Kidney Int.**, v. 76, p. S96–S103, 2000.
186. PAPPAS, P. G.; REX, J. H.; SOBEL, J. D.; FILLER, S. G.; DISMUKES, W. E.; WALSH, T. J.; EDWARDS, J. E. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, p. 161-189, 2004.
187. PEGUES, D. A.; OETTINGER, C. W.; BLAND, L. A.; OLIVER, J. C.; ARDUINO, M. J.; AGUERO, S. M.; MCALLISTER, S. K.; GORDON, S. M.; FAVERO, M. S.; JARVIS, W. R. A prospective study of pyrogenic reactions in hemodialysis patients using bicarbonate dialysis fluids filtered to remove bacteria and endotoxin. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 3; p. 1002–1007, 1992.
188. PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; REX, J. H.; ESPINEL-INGROFF, A.; JOHNSON, E. M.; ANDES, D.; CHATURVEDI, V.; GHANNOUM, M. A.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN, D. J.; TROKE, P.; WALSH, T. J.; WARNOCK, D. W. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 819-826, 2006.
189. PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; SADER, H. S.; FLUIT, A. C.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 3254–3259, 2001.

190. PIERCE, C. G.; UPPULURI, P.; TRISTAN, A. R.; WORMLEY JR, F. I.; MOWAT, E.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocol.**, v.3, p. 1494-1500, 2008.
191. PIERCE, C. G.; THOMAS, D. P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Effect of tunicamycin on *Candida albicans* biofilm formation and maintenance. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 63, p. 473–479, 2009.
192. PINA-VAZ, C.; GONCALVES RODRIGUEZ, A.; PINTO, E.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; TAVARES, C.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C.; GONÇALVES, M. J.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. Antifungal activity of thymus oils and their major compounds. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v.18, p. 73–78, 2004.
193. PIRES-GONÇALVES, R.H. ; SARTORI, F.G. ; MONTANARI, L.B. ; ZAIA, J.E. ; MELHEM, M.S.C. ; MENDES-GIANNINI, M.J.S. ; MARTINS, C.H.G. . Occurrence of fungi in water used at a haemodialysis centre. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 46, p. 542-547, 2008.
194. PITARCH, A.; NOMBELA, C.; GIL, C. Collection of proteins secreted from yeast protoplasts in active cell wall regeneration. **Methods Mol. Biol.**, v.425, p. 241-263, 2008.
195. PITARCH, A.; NOMBELA, C.; GIL C. Proteomic profiling of serologic response to *Candida albicans* during host-commensal and host-pathogen interactions. **Methods Mol. Biol.**, v. 470, p. 369-41, 2009.
196. QUINDÓS, G.; VILLAR-VIDAL, M.; ERASO, E. Activity of micafungin against *Candida* biofilms. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 26, p. 49-55, 2009.
197. RAMAGE G.; WALLE, K. V.; WICKES, B. L.; LWICKES, B. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 2475-2479, 2001.
198. RAMAGE, G.; VANDE WALLE, K.; WICKES, B. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 3234-3240, 2001.
199. RAMAGE, G.; BACHMANN, S.; PATTERSON, T. F.; WICKES, B. L.; LOPEZ RIBOT, J. L. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to flucoazole resistance in *Candida albicans* biofilms. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 4, p. 973–980, 2002.
200. RAMAGE G.; SAVILLE, S. P.; THOMAS, D. P.; LOPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* biofilms: an update. **Eukaryot. Cell**, v. 4, p. 633-638, 2005.
201. RAO, T. V. G.; DAS, S.; PRASAD, R. Effect of phospholipid enrichment on nystatin action: differences in antibiotic sensitivity between *in vivo* and *in vitro* conditions. **Microbios**, v. 42, p.145–153, 1985.

202. RAO, T. V. G.; TRIVEDI, A.; PRASAD, R. Phospholipid enrichment of *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on polyene sensitivity. **Can. J. Microbiol.**, v. 31, p. 322–326, 1985.
203. REED, S. J. B. Electron microprobe analysis and scanning electron microscopy in geology. New York, Cambridge University Press, 1996, 201 p.
204. REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J.; CHATUVERDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, L. L.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN, D. J.; WARNOCK, D. W. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, p. 643-658, 2001.
205. REX, J. H.; PFALLER, M. A.; GALGANI, J. N.; BARTLETT, M. S.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; LANCASTER, M.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; WALSH, T. J.; BARRY, A. L. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 235–247, 1996.
206. RIBEIRO, S. M.; PEREIRA, E. C.; GUSMÃO, N. B.; FALCÃO, E. P.; SILVA, N. H. Produção de metabólitos bioativos pelo líquen *Cladonia substellata* Vainio¹. **Acta bot. bras.**, v. 20, p. 265-272, 2006.
207. RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. Fungal infection – Diagnosis and management. London: Blackwell, 1993.
208. RICICOVÁ, M.; KUCHARÍKOVÁ, S.; TOURNU, H.; HENDRIX, J.; BUJDÁKOVÁ, H.; VAN ELDERE, J.; LAGROU, K.; VAN DIJCK, P. *Candida albicans* biofilm formation in a new *in vivo* rat model. **Microbiology**, v. 156, p. 909-919, 2010.
209. RIESELMAN, M. H., HAZEN, K. C.; CUTLER, J. E. Determination of antifungal MICs by a rapid susceptibility assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 333-340, 2000.
210. RIOUFOL, C.; DEVYS, C.; MEUNIER, G.; PERRAUD, M.; GOULLET, D. Quantitative determination of endotoxins released by bacterial biofilms. **J. Hosp. Infect.**, v. 43, p. 203-209, 1999.
211. RODRÍGUEZ, F. M.; LÓPEZ, M. R.; JIMÉNEZ, I. A.; MOUJIR, L.; RAVELO, A. G.; BAZZOCCHI, I. L. New phenolic triterpenes from *Maytenus blepharodes*. Semisynthesis of 6-deoxoblepharodol from pristimerin. **Tetrahedron**, v. 61, p. 2513-2519, 2005.
212. RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; BARCHIESI, F.; BILLE, J.; CHRYSSANTHOU, E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DENNING, D.; DONNELLY, J. P.; DUPONT, B.; FEGELER, W. ; MOORE, C.; RICHARDSON, M.; VERWEIJ, P. E and Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 9, p.I-VIII, 2003.

213. RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; DONNELLY, J. P.; PFALLER, M. A.; CHRYSSANTOU, E.; WARN, P.; DENNING, D. W.; ESPINEL-INGROFF, A.; BARCHIESI, F.; CUENCA-ESTRELLA, M. Statistical analyses of correlation between fluconazole MICs for *Candida* spp. assessed by standard methods set forth by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (E.Dis. 7.1) and CLSI (M27-A2). **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p.109-111, 2007.
214. RUSSELL, A. D.; FURR, J. R.; MAILLARD, J.-Y. Microbial susceptibility and resistance to biocides. **ASM News**, v. 63, p. 481–487, 1997.
215. RUSSELL, A. D. Antifungal activity of biocides. In A. D. Russell, W. B. Hugo, and G. A. J. Ayliffe (ed.), Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization, 3rd ed., in press. Blackwell Science, Oxford, England, 1982.
216. RUZICKA, F., V. HOLA, M. VOTAVA, AND R. TEJKALOVA. Importance of biofilm in *Candida parapsilosis* and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method. **Folia Microbiol.** (Praha), v. 52, p. 209–214, 2007.
217. RUTALA, W. A. APIC guidelines for selection and use of disinfectants. **Am. J. Infect. Control**, v. 23, p. 313–342, 1995.
218. SAMARANAYAKE, L. P.; MacFARLANE, T. W. Oral Candidosis. Wright-Butterworth, London, 1990.
219. SANATI, H.; BELANGER, P.; FRATTI, R.; GHANNOUM, M. A new triazole, voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, p. 2492-2496, 1997.
220. SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLAÇO, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 19, p. 650-659, 2009.
221. SCHINDLER, R.; BECK, W.; DEPPISCH, R.; AUSSIEKER, M.; WILDE, A.; GÖHL, H.; FREI, U. Short bacterial DNA fragments: detection in dialysate and induction of cytokines. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 15, p. 3207-3214, 2004.
222. SCHERER, S.; STEVENS, D. A. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, p. 675– 679, 1987.
223. SCOTT-LUPER, N. D. A review of plants used in the treatment of liver disease: Part I. **Altern. Med. Rev.**,v. 3, p. 410-420, 1998.
224. SHIMIZU, J. Y.; SPIR, I. H. Z. Seleção de *Pinus elliottii* pelo valor genético para alta produção de resina. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 38, p. 103-117, 1999.
225. SENEVIRATNE, C. J.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Dis.**, v. 14, p. 582-590, 2008.
226. SENEVIRATNE, C. J.; SILVA, W. J.; JIN, L. J.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Architectural analysis, viability assessment and growth

- kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. **Arch. Oral Biol.**, v. 54, p. 1052-1060, 2009.
227. SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 40-79, 1999.
228. SILVA, A. P.; MIRANDA, I. M.; LISBOA, C.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, p. 2392-2397, 2009.
229. SILVA, J. O.; LEITE, J. E. M.; PAULO, M. Q.; XAVIER FILHO, L. Atividade antimicrobiana de iquens brasileiros I. **Boletim da Sociedade Broteriana**, v. 59, p. 87-96, 1986.
230. SILVA-JUNIOR, J. G. Eletroforese de proteínas – Guia teórico-prático. Rio de Janeiro: Interciências, 2001, Brasil.
231. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS, 2004.
232. SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Disponível em http://www.sbn.org.br/pdf/censo_SBN_2009_final.pdf.
233. SOKOL-ANDERSON, M.; SLIGH, J. E. JR.; ELBERG, S.; BRAJTBURG, J.; KOBAYASHI, G. S.; MEDOFF, G. Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 32, p. 702-705, 1988.
234. SOLOMON, S. L.; KHABBAZ, R. F.; PARKER, R. H.; ANDERSON, R. L.; GERAGHTY, M. A.; FURMAN, R. M.; MARTONE, W. J. An outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in patients receiving parenteral nutrition. **J. Infect. Dis.**, v. 149, p. 98-102, 1984.
235. SPELBERG, B. J.; FILLER, S. G.; EDWARDS JR, J. E. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 2, p. 244-251, 2006.
236. STOODLEY, P., SAUER, K., DAVIES, D.G., COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 56, p. 187-209, 2002.
237. SUGAR, A. M. The polyene macrolide antifungal drugs, p. 229-244. In: PETERSON, P. K.; VERHOEF, J. (ed.). *Antimicrobial agents*, vol. 1. Elsevier Science Publishers: Amsterdam, The Netherlands, 1986.
238. TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; N.A. R. GOW, M. C. J. MAIDEN, F. C. ODDS *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 284-292, 2005.

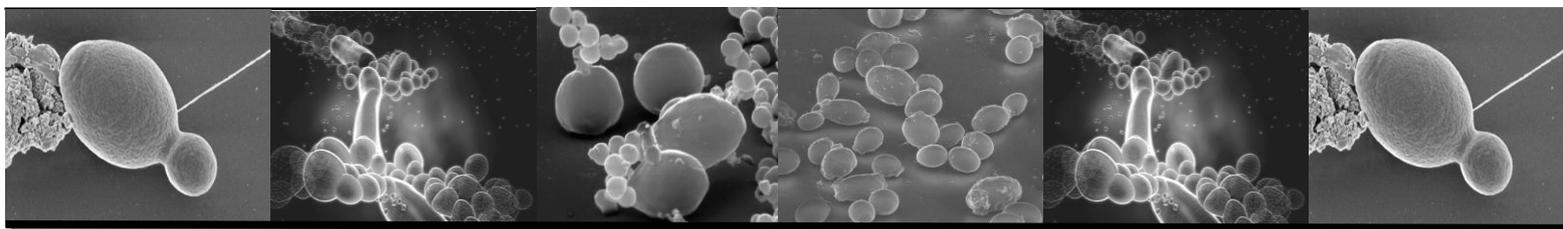
-
239. TAVANTI, A.; HENSGENS, L. A. M.; GHELARDI, E.; CAMPA, M.; SENESI, S. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 1455-1462, 2007.
240. THÉRAUD, M.; BÉDOUIN, Y.; GUIGUEN, C.; GANGNEUX, J.P. Efficacy of antiseptics and disinfectants on clinical and environmental yeast isolates in planktonic and biofilm conditions. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 1013-1018, 2004.
241. THOMAS, D. P.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; LEE, S. A. A proteomic analysis of secretory proteins of a pre-vacuolar mutant of *Candida albicans*. **J Proteomics.**, v. 73, p. 342-351, 2009
242. TROFA, D.; GACSER, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. **Cl. Microbiol. Rev.**, v. 21, p. 606–625, 2008.
243. ULUBELEN, A.; TOPCU, G.; JOHANSSON, C.B. Norditerpenoids and diterpenoids from *Salvia multicaulis* with antituberculous activity. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 1275-1280, 1997.
244. UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM: USRDS 2003 Annual Data Report, Bethesda, MD: National Institutes of Health, Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2003.
245. UPPULURI, P.; CHATURVEDI, A. K.; SRINIVASAN, A.; BANERJEE, M.; RAMASUBRAMANIAM, A. K.; KÖHLER, J. R.; KADOSH, D.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. **PLoS Pathog.**, v. 6 e1000828, 2010.
246. URIBE, S.; RAMIREZ, J.; PENA, A. Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. **J. Bacteriol.**, v. 161, p. 1195–1200, 1985.
247. VANDEN BOSSCHE, H.; MARICHAL, P.; ODDS, F. C. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. **Trends Microbiol.**, v. 2, p. 393-400, 1994.
248. VARO, S. D.; MARTINS, C. H. G.; CARDOSO, M. J. O.; SARTORI, F. G.; MONTANARI, L. B.; PIRES-GONÇALVES, R. H. Isolamento de fungos filamentosos em água utilizada em uma unidade de hemodiálise. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, p. 326-331, 2007.
249. VERRAN, J.; WHITEHEAD, K. Factors affecting microbial adhesion to stainless steel and other materials used in medical devices. **Int. J. Artif. Organ.**, v. 28, p. 1138-1145, 2005.
250. VINCENT, F. C.; TIBI, A. R.; DARBORD, J. C. A bacterial biofilm in a hemodialysis system. Assessment of disinfection and crossing of endotoxin. **ASAIO Trans.**, v. 35, p. 310-313, 1989.
251. VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. Fundamentals of biochemistry. London: John Wiley & Sons, UK, 1999.

252. VORBECK-MEISTER, I., SOMMER, R., VORBECK, F. AND HORL, W.H. Quality of water used for haemodialysis: bacteriological and chemical parameters. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 14, p. 666–675, 1999.
253. XAVIER-FILHO, L. Inibição Fotooxidativa de b-Caroteno por Cloroatranorina de *Parmelia tinctorum* Nyl. João Pessoa: UFPB. Tese - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, UFPB, 1989.
254. XAVIER FILHO, L.; PAULO, M. Q.; LEITE, J. E.; SILVA, J. O. Atividade antimicrobiana de líquens brasileiros II. **Boletim da Sociedade Broteriana**, v. 59, p. 79-86, 1987.
255. WALSH, T. J.; VIVIANI, M. A.; ARATHOON, E.; CHIOU, C.; GHANNOUM, M.; GROLL, A. H.; ODDS, F. C. New targets and delivery systems for antifungal therapy. **Med. Mycol.**, v. 38, Suppl. 1, p. 335-347, 2000.
256. WARD, K. H.; OLSON, M. E.; LAM, K; COSTERTON, J. W. Mechanism of persistent infection associated with peritoneal implants. **J. Med. Microbiol.**, v. 36, p. 406-413, 1992.
257. WARRIS, A.; GAUSTAD, P.; MEIS, J. F. G. M.; VOSS, A.; VERWEIJ, P. E.; ABRAHAMSEN, T. G. Recovery of filamentous fungi from water in a pediatric bone marrow transplantation unit. **J. Hosp. Infect.**, v. 47, p.143-148, 2001.
258. WEEMS, J. J., JR. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. **Clin. Infect. Dis.**, v. 14, p. 56–766, 1992.
259. WEEMS, J. J.; CHAMBERLAND, JR., M. E.; WARD, J.; WILLY, M.; PADHYE, A. A.; SOLOMON, S. L. *Candida parapsilosis* fungemia associated with parenteral nutrition and contaminated blood pressure transducers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, p.1029–1032, 1987.
260. WENZEL, R. P.; GENNINGS, C. Bloodstream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. **Clin. Infect. Dis.**, v. 41, S389- S393, 2005.
261. WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 382–402, 1998.
262. WILDGRUBER, R.; REIL, G.; DREWS, O.; PARLAR, H.; GÖRG, A. Web-based two-dimensional database of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using immobilized pH gradients from pH 6 to pH 12 and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. **Proteomics**, v. 2, p.727-32, 2002.
263. WILLIAMS, D. W.; JONES, H. S.; ALLISON, R. T.; POTTS, A.; LEWIS, M. A. Immunocytochemical detection of *Candida albicans* in formalin fixed, paraffin embedded material. **J. Clin. Pathol.**, v. 51, p. 857-859, 1998.

264. WILSON M. Bacterial biofilms and human disease. *Science Progress* 2001;84:235-54.
265. YASUDA, H.; AJIKI, Y.; AOYAMA, J.; YOKOTA, T. Interaction between human polymorphonuclear leucocytes and bacteria released from *in vitro* bacterial biofilm models. **J. Med. Microbiol.**, v. 41, p. 359-367, 1994.
266. YEATER, K. M.; CHANDRA, J.; CHENG, G.; MUKHERJEE, P. K.; ZHAO, X.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; KWAST, K. E.; GHANNOUM, M. A.; HOYER, L. L. Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm development. **Microbiol.**, v. 153, p. 2373-2385, 2007.
267. ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; JAMES, M. J.; DEROSI, A. P.; SAMPAIO, J. L.; MUNIZ, M. M.; LI, R. K.; NASCIMENTO, A. S.; PERALTA, J. M.; REISS, E. Strain characterization of *Candida parapsilosis* fungemia by molecular typing methods. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 19, p.14–520, 2000.

CAPÍTULO II
PUBLICAÇÕES DO AUTOR

PUBLICAÇÕES



**In vitro biofilm of *Candida parapsilosis* complex from hemodialysis unit
Biofilms in hemodialysis fluids**

Regina Helena Pires¹, Carlos Henrique G. Martins², José Eduardo Zaia², Ana Marisa Fusco Almeida¹, Marcelo T. Matsumoto¹ and Maria José S. Mendes-Giannini¹

¹ Department of Clinical Analysis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. UNESP – Univ Estadual Paulista. Araraquara, SP, Brasil.

² Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada. Universidade de Franca (Unifran). Franca, SP, Brasil.

Address correspondence to Maria José Soares Mendes-Giannini, PhD. Departamento de Análises Clínicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. UNESP – Univ Estadual Paulista. Araraquara, SP, Brasil. Rua Expedicionários do Brasil, 1621. Araraquara - SP - 14801-902 - Brazil. E-mail: giannini@fcar.unesp.br.

Summary

The dialysis fluid consists of up to 99% water reverse osmosis which must meet official recommendations regarding microbiology and chemistry, but no include fungi. *Candida parapsilosis*, currently divided into three distinct species, has been associated with infections resulting from the use of medical devices made of plastic and also proliferate in glucose-rich solutions, common environment to dialysis centers, and such infections related to biofilm formation. Molecular and analytical tools were used to distinguish the genotypes, to evaluate the kinetics of growth, and architecture of *C. parapsilosis* complex biofilm's from hydraulic circuit collected in Hemodialysis Unit. These analyses revealed that isolates were distinguished in *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis*. Growth kinetics of biofilms on polystyrene substrate showed a peak within 48 hours remaining relatively stable for up to 72 hours when it began to decline. Details of the analysis architectural accessed by scanning electron microscopy showed more complex biofilms formed by *C. albicans*, in contrast to the more compact biofilms formed by the *C. parapsilosis* complex. The confocal laser scanning microscopy confirmed the viability of biofilms in 48 h. These assessments can provide a basis for implementing quality controls and monitoring to ensure microbiological purity of dialysis fluid, including the presence of yeast.

INDEX WORDS: *Candida parapsilosis* complex; *C. orthopsilosis*; water dialysis; biofilm; haemodialysis

INTRODUCTION

Haemodialysis (HD) is a technique that allowed treats the patient's blood through a semi-permeable membrane against a saline solution, thus eliminating excess electrolytes, some toxic wastes and water (Vorbeck-Meister *et al.*, 1999). In the most serious case, approximately 37 cubic meters per year of dialysate (saline solution) are in contact with the patient's blood (Laurence & Lapierre, 1995; Lindley *et al.*, 2001). Awareness of clinical problems led to the introduction of additional treatment such as deionization, reverse osmosis, and carbon filtration, as well as the development of national and international standards for water contaminant levels in water used for the preparation of dialysis fluid, and there is general agreement in the maximum permitted contaminant levels.

The removal of chlorine and chloramines from the feed water, together with the presence of stagnant areas within the distribution network, inadequate maintenance of tanks, dead spaces, and tubing within the haemodialysis machine make the water systems used may become contaminated with microbes due to make the system susceptible to the growth of biofilm (Marion-Ferey *et al.*, 2003; Nystrand, 2008). A variety of microorganisms are present in such films, and which release compounds such as endotoxins, muramylpeptides, and polysaccharides into the water. The molecular weight of such compounds ranges from 0.5 to 200 kDa, permitting their passage through membranes used in renal replacement. The transfer of such components is implicated in the stimulation of the immune system and the production of cytokines (Lonnemann, 2000) and can be modulated by the use of additional filtration (Pegues *et al.*, 1992; Lonnemann *et al.*, 2001).

Recently, the *C. parapsilosis* complex has been renamed as distinct species: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* (Tavanti *et al.*, 2005). The interest in a better characterization of the *-psilosis* group relies not only on the epidemiology of *C. parapsilosis* but also on the suspected differences in the antifungal susceptibility profiles. Little information is available regarding the ability of these reclassified species to form biofilms, mainly environment isolates. In this study, we characterized *C. parapsilosis* complex isolates collected from water samples in a hemodialysis center and, its capability to form biofilm.

METHODS

Isolates. A total of 100 isolates of *C. parapsilosis* complex, from the water samples from Hemodialysis Unit, were included in this study. Previously, the isolates were obtained from water, treated water (reverse osmosis method), dialysate, and reuse collected in Hemodialysis Unit located in state of São Paulo, Brazil, between March 2006 and March 2007. These isolates were maintained in the microbiology laboratory at the University of Franca, Sao Paulo, Brazil. Every two months, new ones freshly grown freeze-dried stocks replaced cultures.

DNA extraction. Genomic DNA was extracted from yeasts grown in a broth comprised of 2% glucose, 2% mycological peptone (*Difco, Detroit, Mich.*), and 1% yeast extract (*Difco*) with horizontal shaking. Briefly, cells were harvest and lysed by vortexing with 0.3-g glass beads (0.45 to 0.52 mm in diameter; *Sigma, St. Louis, Mo*) and 500 µl TES (100 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, 2% Sodium Dodecyl Sulfate). After vortexing, proteinase K (100 µg/ml) was added to the lysate and incubating at 55 °C 1h. The salt concentration was adjusting to 1.4 M with 5 M NaCl and add 1/10 vol 10% CTAB (Cethyltrimethylammonium Bromide, *Sigma*). After incubation (10 min at 65°C), the samples were centrifuged (10 min), and the supernatant was added chloroform (700 µl), incubated 30 min at 0°C. Followed centrifugation, was added RNase (10 mg/ml; *Sigma*), and incubated for 1h at 37°C. DNA was precipitated with 2 volumes of isopropanol, dried, and redissolved in 50 µl of TE buffer [10 mM Tris/HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA].

SADH gene restriction profile. Amplification of the SADH (*Secondary alcohol dehydrogenase*) gene was performed by PCR with the primers described by Tavanti *et al.* 2005. The amplification condition were as follows: a first cycle of denaturation for 7 min at 94°C, followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, 50°C for 1 min, and 72°C for 1 min, with a final step of 10 min at 72°C. The PCR products were electrophoresed in agarose gels (2%) in TBE buffer (Tris base 54 g, boric acid 27.5 g, EDTA 0.5 M 20 ml; distilled water to 1,000 ml), at 150 volts for 2 h at room temperature. Amplicons in the gel were stained with ethidium bromide (0.5µg/ml). Gels were visually analyzed and, in order to standardize the quality of the images, recorded under UV light using the Image Master VDS System (*Amersham Pharmacia Biotech, UK*). *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. orthopsilosis* ATCC 96141, and *C. metapsilosis* ATCC 96143 were used as controls. The PCR products (fragment of 716-bp) obtained from *C. parapsilosis* isolates were digested with BanI restriction enzyme (*New England Biolabs, Hitchin, United Kingdom*) in a 30µl reaction volume containing 25 µl of the PCR product, 3 µl of 10x buffer (supplied with the enzyme), and 2 µl of the 20 U/µl of BanI (Tavanti *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009). Digestion products were loaded onto a 2% agarose gel containing ethidium bromide (0.05 µg/ml), TBE buffer (Tris base 54 g, boric acid 27.5 g, EDTA 0.5 M 20 ml; distilled water to 1,000 ml) was used as the running buffer, and a 100-bp DNA ladder was used as a molecular size marker (*Promega*). DNA bands were visualized by UV transillumination.

In vitro biofilm assay. Biofilms were formed in microtiter plates (*Corning Inc., Corning, N. Y.*), on a series of time intervals (4, 6, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 84 and 96 h) at 37°C. At each time interval, the quantitative analysis of biofilm production was estimated using a modification of a previously published protocol (Pierce *et al.*, 2008). Briefly, viability of biofilm was determined using the 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (*MTT; Sigma Chemicals*) reduction assay (Berridge *et al.*, 2005; Krom *et al.*, 2006; Nuryastuti *et al.*, 2009). Followed, 20 µl of MTT solution (a stock solution containing 5 mg of MTT per ml of PBS), was added to each well, and incubated at 37°C for overnight. After staining, plates were washed for three times with PBS. Isopropyl alcohol (200 µl) was then added to solubilize the MTT formazan product, and 100 µl was transferred to a new microtiter plate and the level (OD) of the formazan present in the destaining solution was measured at 540 nm by using in a microtitre plate reader (*ASYS, Eugendorf, Salzburg, Austria*). The microtiter plate biofilm assay was performed three times for all *C. parapsilosis* complex strains, and the averages and standard deviations were calculated for all repetitions of the experiment.

At overall time points, viable counts sessile cells were assessed by extensive washing into the well and serial 10-fold dilutions in sterile PBS were performed. The inoculum size for each cell suspension was confirmed by plating aliquots of 1:10, 1:100 and 1:1000 dilutions on Sabouraud dextrose agar (*Difco*) and CFU was obtained after 48h at 37°C and the results were expressed in log CFU ml⁻¹.

SEM (Scanning Electron Microscopy). For scanning electron microscopy (SEM), *Candida* biofilms were formed on sterile PVC disks within well cell culture plates (*Corning International, Corning, N.Y.*) by dispensing cell suspensions containing 5.0 x 10⁶ cells/ml in RPMI- 1640 onto appropriate disks at 37°C. The biofilms formed on these disks were placed in fixative (2% formaldehyde (v/v), 3% glutaraldehyde (v/v) in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.2-7.4) 48 h). After three washes, the cells were post fixed with 1% (wt/vol) OsO₄, dehydrated with a series of ethanol washes (30% to 100%), critical-point dried in CO₂ (*MS 850, Electron Microscopy Sciences*), coated with gold in a *Dentron Vacuum Desk II* coater. Afterwards, specimens were visualized with a SEM (*JSM 5410: JEOL, Tokyo, Japan*). Experiments were repeated three times with at least three replicates for each time point.

Confocal scanning laser microscopy (CSLM). Biofilms staining and CSLM were performed as described previously (Kuhn *et al.*, 2002). Biofilms were formed as described above for SEM. After incubation at 37°C for 24 h, the disks were washed with PBS, removed and transferred to a new 12-well plate. Four microliters of FUN-1 (*Molecular Probes, Eugene, Oreg.*), from a 10 mM stock, and 15 μ l of Concanavalin A-alexa fluor 488 conjugate (CAAF; Molecular Probes) from a 5 mg/ml stock, were mixed into 3 ml of PBS to give final concentrations of 10 μ M and 25 μ g/ml, respectively. This mixture was added to wells containing biofilm disks. The plate was incubated for 45 min at 37°C on a rocker table. Disks were removed from wells, placed in 35-mm glass-bottom microwell dishes, inverted, and observed using a Leica TCS SP5 (*Leica Microsystems, Wetzlar, Germany*) Microscopy System using excitation at 543 nm and 488 nm, and emission at 560 and 505 nm for FUN-1 (red) and CAAF (green), respectively. Images were captured and processed using LAS AF 1.8.2 built 1465 Leica Microsystems CMS GmbH.

Statistical analysis. The optical density (OD) values from individual biofilms of *C. parapsilosis* complex were compared by using Student's *t* test and $p < 0.05$ was considered statistically significant. The analyses were performed with GraphPad Prism version 4.00 for Windows (*GraphPad Software, San Diego, CA, USA*).

RESULTS

Molecular identification of isolates. A fragment of the SADH gene (716 bp) was amplified by PCR (Fig.1-a) and the restriction analysis of the SADH PCR products was used to re-identify 100 *C. parapsilosis* complex isolates on the basis of conventional biochemical tests. According to the Ban I restriction pattern, *C. parapsilosis* has one site (at position 196), *C. metapsilosis* has three (at positions 96, 469, and 529) and *C. orthopsilosis* has no restriction site. SADH amplicons analysis led to the identification of the isolates: 53 were assigned to the most commonly encountered subtype, *C. parapsilosis*, and 47 to *C. orthopsilosis* (Fig. 1-b). No *C. metapsilosis* was found in this study.

Growth-kinetics determination. Figure 2 displays the extent of biofilm formation of *Candida* estimated by the MTT reduction assay and CFU counting. The kinetics of biofilm formation by *C. parapsilosis* complex showed a similar pattern, and as with *C. albicans* MTT reading reached their maxima at 48 h and declined thereafter. Although minor differences were observed between the metabolic activity (optical density at 540 nm, mean \pm standard deviation) in biofilm formation (Tab. 1), these differences were not statistically significant (as determined by Student's *t* test, $p = 0.332$). The Pearson correlation tests were used in order to compare the spectrometric profile with CFU counts, showing there was a significant correlation ($r = 0.940$; $r = 0.951$ e $r = 0.958$) for *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. albicans*, respectively. Maximum cell density was obtained in 48 hours and the biofilms appeared to enter a phase of declining growth in 72 hours suggested by the lower OD in 72 hours than at 48 h.

Cellular viability assessment. The viability of the biofilm was analyzed using CSLM images stained with FUN-1, fluorescent dye taken up by fungal cells; in the presence of metabolic viability, it is converted from a diffuse yellow cytoplasmic stain to red, rod-like collections. Concanavalin A-Alexafluor 488 conjugate selectively binds to polysaccharides including α -mannopyranosyl and α -glucopyranosyl residues and gives green fluorescence. FUN-1 staining showed that *Candida* cells in biofilms were metabolically active, as indicated by the red fluorescence in Fig. 5 A to B, a process which occurred by a biochemical pathway different from that of MTT, confirming that these cells were metabolically active (Fig. 3).

Ultrastructural studies. The ultrastructure of biofilms of representative isolates of *C. orthopsilosis* and *C. parapsilosis* in PVC disks was compared with reference strain *C. albicans* SC 5314, and observed by SEM which showed specific features of the species. Biofilms of *C. orthopsilosis* presented short filamentous forms, and *C. parapsilosis* were presented as aggregates of blastospores layer with irregular clusters while *C. albicans* biofilms form complex structure adding dense layers of blastospores and hyphae (Fig. 4).

DISCUSSION

Invasive disease caused by *C. parapsilosis* can occur without prior colonization and is frequently transmitted horizontally via contaminated external sources such as medical devices or fluids, the hands of health care workers, prosthetic devices, and catheters. We examined 100 *C. parapsilosis* isolates from a Hemodialysis Unit, and after molecular analysis 53% were found to be *C. parapsilosis*, while 47% corresponded to *C. orthopsilosis*. There have been very few studies looking at the prevalence of *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* among *C. parapsilosis* complex isolates. The most studies (Tavanti *et al.*, 2005; Lockhart *et al.*, 2007; Gomez-Lopez *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2009) found that *C. orthopsilosis* has less than 10% of *C. parapsilosis* complex infections overall, with substantial regional variation. However, previous study (Tay *et al.*, 2009) reported the finding of 23.8% of *C. orthopsilosis*. This study reinforces a statement of *C. parapsilosis* may be related to its ubiquitous nature, since it is commonly isolated from different environmental sources. Those sources may represent potential routes for nosocomial transmission to patients (Kojic & Darouiche, 2004).

Uremic patients are at risk of acquiring a disease associated with biofilm, since the course of treatment several devices can be used. Moreover, clots formed at the tip of the unused catheter during the inter-dialytic period provide a nutrient medium for microbial proliferation and possibly biofilm formation (Capelli *et al.*, 2005). In this study, the ability of *C. parapsilosis* complex to adhere and form biofilm on polystyrene and PVC surfaces under static conditions was demonstrated. Growth of the biofilms was monitored by colorimetric assays and viable count. Lowest variations in the metabolic activities of the biofilm formed on the polystyrene surface were detected between the *C. parapsilosis* complex isolates tested. The results probably reflect the physiological differences between the isolates and confirm the report by Lattif *et al.* (2010), that all species of *C. parapsilosis* complex formed equivalent biofilms.

Considerable number of *C. parapsilosis* (48.2%) and *C. orthopsilosis* strains (52.8%) formed biofilms. The high frequency found in our study was perhaps due to higher capacity of isolates from environmental sources to form biofilms in comparison with isolates obtained from clinical sites. Fungi and pathogenic bacteria are predominantly in biofilms, rather than free-floating, planktonic organisms (Cushion *et al.*, 2009). So far there are no descriptions of individual rates of *C. parapsilosis* complex from water for therapeutic use.

Microscopy findings confirming that *C. albicans* produces more biofilm than less *C. parapsilosis* species. Mature biofilms of *C. albicans* consist of a dense network of yeast and hyphal elements in agreement with others researches (Chandra *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2001). Mature biofilms of *C. parapsilosis* on a PVC surface are structurally similar to those described for Kuhn *et al.* (2002). Clearly, a basal blastospore layer or irregular groupings of blastospores was observed in *C. parapsilosis*, while *C. orthopsilosis* presented short filamentous forms, besides blastospores. However, images of *C. orthopsilosis* biofilms not yet had been published for comparison. Of relevance for haemodialysis, biofilm formation represents the starting point for biofouling, resistance to antibiotic chemotherapy or disinfection and bacterial regrowth (Stewart & Costerton, 2001). Moreover, tubing within the dialysis machine may be the site of biofilm development, resulting in high level contamination of dialysate (Man *et al.*, 1998). There is increasing evidence that the chemical

nature of catheter material plays an important role in the pathogenesis of device-related infections, and most of these are made of PVC. Rotrosen *et al.* (1983), observed that *C. albicans* adheres to the PVC more rapidly than Teflon. Our results demonstrate that *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis* are susceptible to biofilm formation in this material. Besides, haemodialysis monitors represent the final link of the water system chain transforming tap water into dialysate. Haemodialysis monitors have additional reasons that expose them to microbial proliferation a biofilm formation; the presence of basic and acid concentrate solutions and inlets, dialysate connectors and the drain itself (Capelli *et al.*, 2005). Additionally, infections due to *C. parapsilosis* have been associated with the ability of this fungus proliferate in high concentrations of glucose and form biofilms on prosthetic materials (Pfaller *et al.*, 1995; Trofa *et al.*, 2008).

It was shown the ability of *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis* to form biofilm, fact may confer on these organisms an ecological advantage in trying to maintain its niche as a pathogen human, resisting to antifungal treatment. Fungal biofilms may also serve as a safe reservoir for the release of infecting cells into the hemodialysis environment. To our knowledge, this is the first study to examine biofilm formation of *C. parapsilosis* complex in Hemodialysis unit to date.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Funded by Scientific Development Support Program of the School of Pharmaceutical Sciences at Unesp (PADC/FCFAR-UNESP proc. 2009/54), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We thank Prof. Arnaldo Lopes Colombo for *C. albicans* SC5314, *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. orthopsilosis* ATCC 96141, and *C. metapsilosis* ATCC 96143 strains.

REFERENCES

- Berridge, M.V., Herst, P.M., Tan, A.S. (2005).** Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* **11**:127-152.
- Capelli, G., Tetta, C., Canaud, B. (2005).** Is biofilm a cause of silent chronic inflammation in haemodialysis patients? A fascinating working hypothesis. *Nephrol Dial Transp* **20**: 266-70.
- Chandra, J., Mukherjee, P.K., Leidich, S.D., Faddoul, F.F., Hoyer, L.L., Douglas, L.J., Ghannoum, M.A. (2001).** Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res* **80**:903-908.
- Cushion, M.T., Collins, M.S, Linke, M.J. (2009).** Biofilm formation by *Pneumocystis* spp. *Eukaryot Cell* **8**: 197-206.
- Gomez-Lopez, A., Alastruey-Izquierdo, A., Rodriguez, D., Almirante, B., Pahissa, A., Rodriguez-Tudela, J.L., Cuenca-Estrella, M., Barcelona Candidemia Project Study Group. (2008).** Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:1506–1509.
- Gonçalves, S.S., Amorim, C.S, Nucci M, Padovan, A.C., Briones, M.R., Melo, A.S., Colombo, A.L (2009).** Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. *Clin Microbiol Infect.*; aug17(on line).

- Kojic, E.M. & Darouiche, R.O. (2004).** *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* **17**:255-267.
- Krom, B.P., Cohen, J.B., Feser, G.E.M., Cihlar, R.L. (2007).** Optimized candidal biofilm microtiter assay. *J Microbiol Methods* **68**, p. 421-423.
- Kuhn, D.M., George, T., Chandra, J., Mukherjee, P.K., Ghannoum, M.A. (2002).** Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:1773–1780.
- Lattif, A.A., Mukherjee, P.K., Chandra, J., Swindell, K., Lockhart, S.R., Diekema, D. J., Pfaller, M.A., Ghannoum, M.A. (2010).** Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. *Int J Med Microbiol* **300**:265-70.
- Laurence, R.A. & Lapierre, S.T. (1995).** Related quality of hemodialysis water: a 7-year multicenter study. *Am J Kidney Dis* **25**:738–750.
- Lindley, E.J., Lopot, F., Harrington, M., Elseviers, M.M. (2001).** Treating and monitoring water for dialysis in Europe. *Nephrol News Issues* **15**: 27,30,33–36.
- Lockhart, S.R., Messer, S.A., Tendolkar, S., Diekema, D.J. (2008).** Geographic distribution and antifungal susceptibility of newly described species *Candida orthopsilosis*, in comparison to the closely-related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* **46**:2659–2664.
- Lonnemann, G., Sereni, L., Lemke, H.D., Tetta, C. (2001).** Related pyrogen retention by highly permeable synthetic membranes during in vitro dialysis. *Artif Organs* **25**: 951–960.
- Lonnemann, G. (2000).** Chronic inflammation in hemodialysis: the role of contaminated dialysate. *Blood Purif* **18**: 214–223.
- Man, N-K., Degremont, A., Darbord, J-C., Collet, M., Vaillant, P. (1998).** Evidence of bacterial biofilm in tubing from hydraulic pathway of hemodialysis system. *Artif Organs* **22**:596–600.
- Marion-Ferey, K., Pasmore, M., Stoodley, P., Wilson, S., Husson, G.P., Costerton, J.W. (2003).** Biofilm removal from silicone tubing: an assessment of the efficacy of dialysis machine decontamination procedures using an in vitro model. *J Hosp Infect* **53**:64-71.
- Nuryastuti, T., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., Irvati, S., Aman, A. T., and Krom, B. P. (2009).** Effect of cinnamon oil on *icaA* expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:6850-6855.
- Nystrand, R. (2008)** Microbiology of water and fluids for hemodialysis. *J Clin Med Assoc* **71**:223-229.
- Pegues, D.A., Oettinger, C.W, Bland, L.A., Oliver, J.C., Arduino, M.J., Aguero, S.M., McAllister, S.K., Gordon, S.M., Favero, M.S., Jarvis, W.R. (1992).** A prospective study of pyrogenic reactions in hemodialysis patients using bicarbonate dialysis fluids filtered to remove bacteria and endotoxin. *J Am Soc Nephrol* **3**:1002–1007.

Pfaller, M.A., Messer, S.A., Hollis, R.J. (1995). Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **21**: 9-14.

Pierce, C.G., Uppuluri, P., Tristan, A.R., Wormley JR, F.I., Mowat, E., Ramage, G., Lopez-Ribot, J.L. (2008). A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing, *Nat Protoc* **3**:1494-1500.

Ramage, G., Walle, K.V., Wickes, B.L., López-Ribot, J.L. (2001). Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2475–2479.

Rotrosen, D., Gibson, T.R., Edwards, J.E. Jr. (1983). Adherence of *Candida* species to intravenous catheters. *J Infect Dis* **147**:594.

Silva, A.P., Miranda, I.M., Lisboa, C., Pina-Vaz, C., Rodrigues, A.G. (2009). Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol* **47**:2392-2397.

Stewart, P.S. & Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**: 135–138.

Tavanti, A., Davidson, A.D., Gow, N.A., Maiden, M.C.J., Odds, F.C. (2005). *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* **43**:284–292.

Tay, S.T., Na, S.L., Chong, J. (2009). Molecular differentiation and antifungal susceptibilities of *Candida parapsilosis* isolated from patients with bloodstream infections. *J Med Microbiol* **58**:185-91.

Trofa, D., Gácsér, A., Nosanchuk, J.D. (2008). *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* **21**:606–625.

Vorbeck-Meister, I., Sommer, R., Vorbeck, F., Horl, W.H. (1999). Quality of water used for haemodialysis: bacteriological and chemical parameters. *Nephrol Dial Transplant* **14**: 666–675.

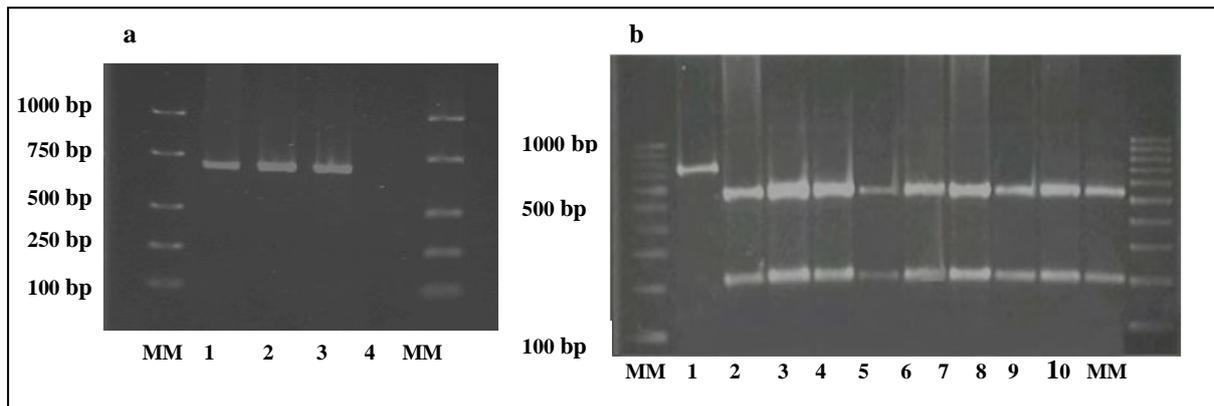


Figure 1. Discrimination of *C. parapsilosis* complex according to their SADH gene restriction profiles. (a) Amplification of a 716-bp SADH gene fragment from the genomic DNA from *C. parapsilosis* complex isolates to provide genetic confirmation. (b) Representative SADH gene restriction profile for *C. orthopsilosis* (lane 1) and *C. parapsilosis* (lane 2 to 10) isolates. Lanes MM, 100-bp ladder.

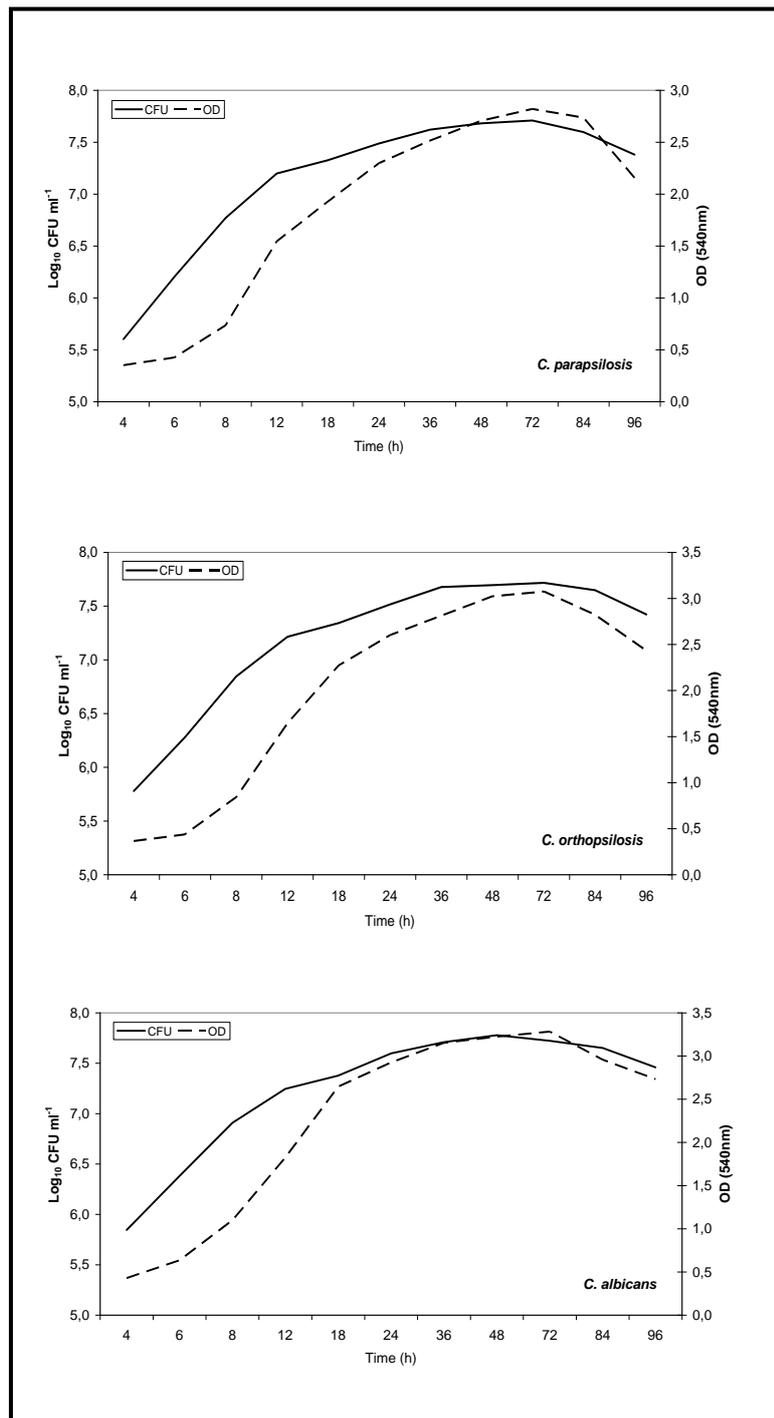


Figure 2. Biofilm formation by *C. parapsilosis* (a); *C. orthopsilosis* (b) and *C. albicans* (SC 5314) growing on microtiter plates. Assays consisted of measurements of MTT formazan formation (---) and enumeration of a viable count (—). Data are means \pm standard errors of three independent experiments done in duplicate. Errors bars are omitted because standards errors of the mean were significantly lower.

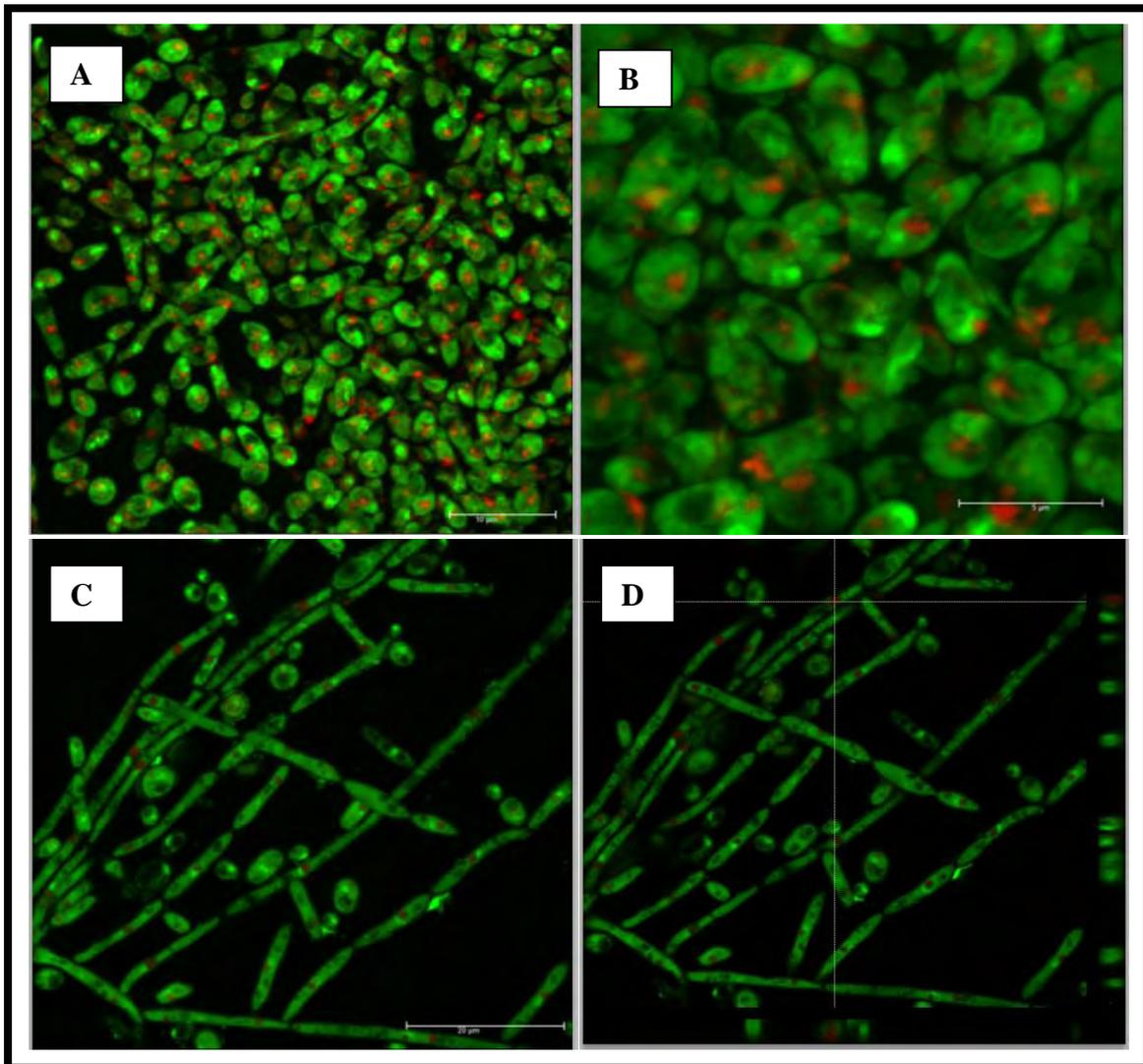


Figure 3. CSLM images of a representative areas of *C. orthopsilosis* (A), *C. parapsilosis* (B), and *C. albicans* SC 5314 (C) biofilms grown on PVC disks. Orthogonal images of hyphal elements observed *C. albicans* biofilms (D). Intense green fluorescence resulting from ConA binding to polysaccharides outlined the cell walls of the yeasts, while red color due to FUN-1staining localized in dense aggregates in the cytoplasm of metabolically active cells. Bars (A, C, D) 20 μm; (B) 5 μm.

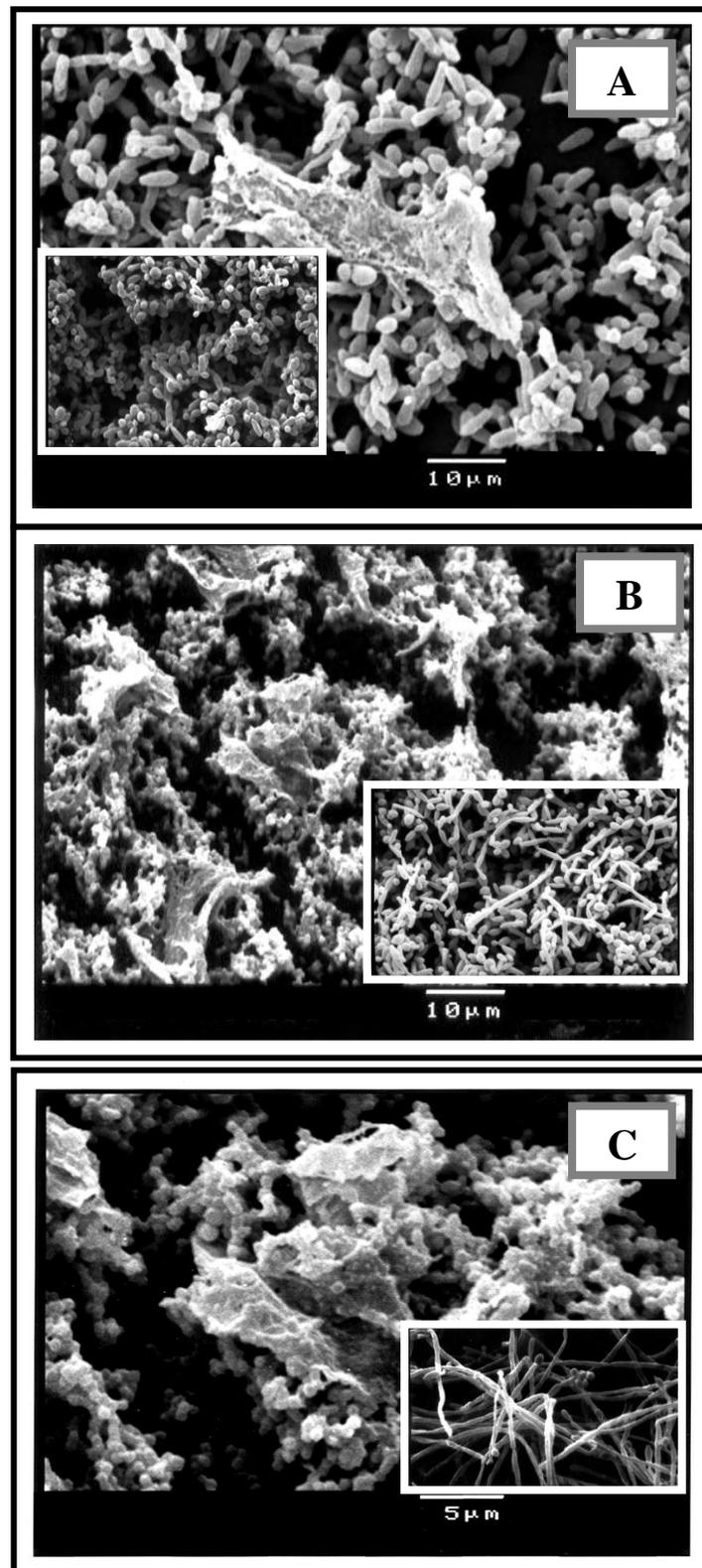


Figure 4. SEM images of mature (48-h) biofilms formed on PVC discs by different *Candida* species: (A) *C. orthopsilosis*; (B) *C. parapsilosis*; (C) *C. albicans* SC 5314. Samples were fixed prior to processing for SEM.

SUBMISSÃO DO ARTIGO

Dear Ms Regina Helena Pires

JMM paper no. JMM/2010/027151: In vitro biofilm of *Candida parapsilosis* complex from hemodialysis unit

Receipt of your submission to JMM is acknowledged. You will receive a confirmatory message from the Editorial Office when your paper has been checked and assigned to an Editor.

.

Journal of Medical Microbiology Editorial Office

Society for General Microbiology, Marlborough House, Basingstoke Road, Spencers Wood, Reading RG7 1AG, UK

Phone: +44 118 988 1800. Fax: +44 118 988 1834. jmm@sgm.ac.uk

<http://jmm.sgmjournals.org/> <http://www.sgm.ac.uk/>

Society for General Microbiology. Registered as a Charity in England and Wales, no. 264017.

A charity registered in Scotland, no. SC039250.

Company Limited by Guarantee. Registered in England No. 1039582.

Registered Office as above.

Lett Appl Microbiol. 2008 May;46(5):542-7. Epub 2008 Mar 19.

Occurrence of fungi in water used at a haemodialysis centre.

Pires-Gonçalves RH, Sartori FG, Montanari LB, Zaia JE, Melhem MS, Mendes-Giannini MJ, Martins CH.

Laboratory of Research in Applied Microbiology, University of Franca, Franca, Brazil.

Abstract

AIMS: The aim of this study was to identify and determine the diversity, occurrence and distribution of fungi in water used at a haemodialysis centre.

METHODS AND RESULTS: Samples in the hydraulic circuit for the distribution of the water, dialysate samples and samples of sterilization solution from dialysers were collected over a 3-month period, and 500 ml of each sample was filtered through membranes. All together 116 isolates of fungi were recovered from 89% of all water samples collected inside the haemodialysis unit, with prevalence of moulds in tap water samples and of yeasts in dialysate samples. *Fusarium* spp. was the most abundant genus found, whereas *Candida parapsilosis* was the predominant yeast species.

CONCLUSIONS: This study demonstrated that various fungi were present in the water system. These data suggest the inclusion of the detection and quantification of fungi in the water of haemodialysis.

SIGNIFICANCE AND IMPACT OF THE STUDY: The recovery of fungi from aqueous haemodialysis environments implies a potential risk for haemodialysis patients and indicates the need for continuous maintenance and monitoring. Further studies on fungi in haemodialysis water systems are required to investigate the organism ability to persist, their role in biofilm formation and their clinical significance.

Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2009 Jan-Feb;51(1):37-43.

Microbiological contamination of a hemodialysis center water distribution system.

Montanari LB, Sartori FG, Cardoso MJ, Varo SD, Pires RH, Leite CQ, Prince K, Martins CH.

University of Franca, SP, Brazil.

Abstract

The microbiological monitoring of the water used for hemodialysis is extremely important, especially because of the debilitated immune system of patients suffering from chronic renal insufficiency. To investigate the occurrence and species diversity of bacteria in waters, water samples were collected monthly from a hemodialysis center in upstate São Paulo and tap water samples at the terminal sites of the distribution system was sampled repeatedly (22 times) at each of five points in the distribution system; a further 36 samples were taken from cannulae in 19 hemodialysis machines that were ready for the next patient, four samples from the reuse system and 13 from the water storage system. To identify bacteria, samples were filtered through 0.22 microm-pore membranes; for mycobacteria, 0.45 microm pores were used. Conventional microbiological and molecular methods were used in the analysis. Bacteria were isolated from the distribution system (128 isolates), kidney machine water (43) and reuse system (3). Among these isolates, 32 were Gram-positive rods, 120 Gram-negative rods, 20 Gram-positive cocci and 11 mycobacteria. We propose the continual monitoring of the water supplies in hemodialysis centers and the adoption of effective prophylactic measures that minimize the exposure of these immunodeficient patients to contaminated sources of water.

Mycopathologia. 2007 Dec;164(6):255-63. Epub 2007 Sep 29.

Genetic relatedness of commensal strains of *Candida albicans* carried in the oral cavity of patients' dental prosthesis users in Brazil.

Pires-Gonçalves RH, Miranda ET, Baeza LC, Matsumoto MT, Zaia JE, Mendes-Giannini MJ.

Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP, Brazil.

Abstract

The aim of this study is to describe the degree of yeast-colonization in diabetic and hemodialysed-users of dental prostheses. Individuals (306) were examined using an oral rinse technique in order to evaluate the incidence of yeast-carriage, and genotype of *C. albicans*. Yeasts were isolated from 68.4% (91/133) individual's dental prostheses users. Dental prostheses were found to be a significant factor for the yeast colonization ($P < 0.05$). Overall, the intensity of carriage was higher in diabetic patients as compared with health and hemodialysed individuals ($P < 0.05$). The isolation rates were: *C. albicans* (51.7%), *C. parapsilosis* (20.9%), *C. tropicalis* (14.3%), *C. glabrata* (6.6%), *C. krusei* (3.3%), *C. rugosa* (1.1%), and *Pichia* (*Pichia ohmeri*, 2.2%). Ready-To-Go RAPD Analysis Beads were used and primer OPJ 6 distinguished the *C. albicans* isolates found in prostheses users. All the isolates were grouped into 11 RAPD profiles in four main clusters and, the average S (AB) for the entire collection of 47 *C. albicans* isolates were 0.779 ± 0.178 . Over 85% of isolates had a similarity level higher than or equal to 0.8 reinforcing the idea that the use of dental prostheses, independently of the host's clinical condition, probably provides the necessary conditions for these strains to gain a growth-specific advantage over others.

Mycopathologia. 2006 Aug;162(2):83-9.

Species diversity of yeast in oral colonization of insulin-treated diabetes mellitus patients.

Gonçalves RH, Miranda ET, Zaia JE, Giannini MJ.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

Abstract

The aim of this study was to investigate oral yeast colonization, antifungal susceptibility and strain diversity in insulin-dependent diabetes mellitus patients (175), as well as to evaluate the influence of dental prostheses. Oral rinse samples were cultured on selective media, in order to isolate, count and identify the yeasts recovered. More than half of the diabetic subjects (53%) carried significant amounts of *Candida* cells in the buccal cavity and these organisms were recovered at higher densities in diabetics wearing dentures. A total of 93 yeast strains were isolated from these patients, including: *Candida* spp. (n = 89); *Pichia* (n = 02); *Trichosporon* (n = 1), and *Geotrichum* (n = 1). *C. albicans* represented 56% of these strains, non-*albicans Candida* 39.8%, and other genera of yeast 4.3%. *C. albicans* was prevalent, followed by *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. rugosa* and *C. guilliermondii*. Agar disk-diffusion tests of the susceptibility of non-*albicans Candida* and other genera of yeast to fluconazole showed resistance in 21.9%, mainly in *C. rugosa* (100%), *C. glabrata* (57%) and *C. krusei* (50%). Local oral factors, such as the presence of dentures, in association with diabetes, seemed to have the effect of increasing the amount and variety of *Candida* species in the oral cavities, mainly those with lower drug susceptibilities.