

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE
ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE ENZIMAS NA REDUÇÃO DE
BIOFILME DE *Candida albicans*

GEISIANY MARIA DE QUEIROZ

ARARAQUARA- SP
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO - UNESP”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE ENZIMAS NA REDUÇÃO DE
BIOFILME DE *Candida albicans*

GEISIANY MARIA DE QUEIROZ

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Pavarina

ARARAQUARA - SP
2014

Ficha Catalográfica

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

Q3p Queiroz, Geisiany Maria de
Produção e aplicação de enzimas na redução de biofilme de *Candida albicans* / Geisiany Maria de Queiroz. – Araraquara, 2014
181 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Coorientador: Ana Cláudia Pavarina

1. Protease. 2. Lipase 3. Amilase. 4. *Candida albicans*. 5. Biofilme. I. Pietro, Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues, orient. II. Pavarina, Ana Cláudia, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

Dedico este trabalho a todos que acreditam que por meio da fé, da aquisição de conhecimentos e do desenvolvimento científico, alcançaremos dias melhores!

AGRADECIMENTOS

A todas as boas energias que estiveram comigo ao longo dessa caminhada, por meio de minha fé e confiança e que me guiaram rumo ao alcance desse sonho.

À professora Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro, minha orientadora, amiga, e pessoa essencial, sem a qual não teria chegado até aqui, pela confiança, e por todos os ensinamentos compartilhados ao longo desses anos de convivência. Obrigada!

À professora Dra. Ana Cláudia Pavarina, minha co-orientadora, pelas palavras amigas nas horas difíceis e por toda ajuda seja na parte experimental ou científica.

Aos alunos do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara, pela companhia em todos os momentos de trabalhos, inclusive em fins de semana e feriados, e bons momentos de descontração e risos. Agradeço especialmente a Érica por sempre estar disponível a me auxiliar no desenvolvimento das técnicas e por ter me emprestado sua casa, e a Cristiane, principalmente por me auxiliar na obtenção de corpos de prova, e a ambas pelas boas conversas. Aí fiz amigos que vou levar para sempre em meu coração!

A todos os amigos do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, em especial, ao Flávio e ao Edvânio, que apesar de terem encerrado suas atividades, e mesmo distantes estiveram, de certa forma, presentes durante a realização deste trabalho. Edvânio obrigada pela ajuda, especialmente, com as eletroforeses.

Ao Rodrigo, técnico responsável pelo Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica, pela disposição em me auxiliar no que fosse preciso e por sua amizade.

A “meus” alunos de iniciação científica Luan e Juliane, que me ensinaram a transmitir um pouco do que aprendi. Obrigada pela convivência!

À Tatiana, que sempre me amparou na compreensão de técnicas, obrigada pelas boas ideias, discussões científicas e amizade.

À Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

À seção de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em especial à funcionária Cláudia, que desde meu ingresso no mestrado sempre foi muito atenciosa comigo.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

À Faculdade de Odontologia.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

À Universidade do Sagrado Coração pela confiança e apoio.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Agradeço especialmente:

À minha mãezinha querida do meu coração, minha melhor amiga, por todas as palavras sábias e pelo enorme poder de sempre me acalmar. Te amo!

Ao meu padrasto "Zé" que mesmo quando não entende muito bem o que eu quero dizer, acaba sempre me fazendo rir da vida.

Ao meu pai, que esteja onde estiver, sei que está torcendo por mim!

Ao meu irmão pela nossa união, sei que posso sempre contar com você!

A todos os meus familiares pelo apoio.

Aos meus amigos distantes, em especial: Jak, Diones, Prica, Nati, Nayarinha e Cris pela amizade sem fim, por sempre se fazerem presentes, acreditando em meus sonhos.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale à pena acreditar no sonho que se tem ou que seus planos nunca vão dar certo ou que você nunca vai ser alguém. Tem gente que machuca os outros, tem gente que não sabe amar, mas eu sei que um dia a gente aprende. Se você quiser alguém em quem confiar, confie em si mesmo!

Quem acredita sempre alcança!”

(Renato Russo)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1- Micro-organismos como fonte de produtos biotecnológicos	27
2.1.1. <i>Beauveria bassiana</i>	28
2.1.2. <i>Aspergillus oryzae</i>	29
2.1.3. <i>Aspergillus niger</i>	30
2.2. Enzimas microbianas	31
2.2.1- Proteases	32
2.2.2- Amilases	34
2.2.3- Lipases	36
2.3. Biofilme de <i>Candida albicans</i>	37
2.4. Higiene de próteses dentárias	43
3. OBJETIVO	46
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1. Material	49
4.1.1. Solventes, reagentes e meios de cultura	49
4.1.2. Equipamentos	53
4.2. Metodologias	55
4.2.1. Micro-organismos	55
4.2.2. Obtenção de inóculo	55
4.2.3. Produção das enzimas	56
4.2.3.1. Protease	56
4.2.3.2. Amilase	56
4.2.3.3. Lipase	57
4.2.4. Recuperação das enzimas	57
4.2.5. Métodos analíticos	57
4.2.5.1. Determinação do coeficiente de extinção molar	57
4.2.5.1.1 Determinação de proteínas pelo método de Lowry	58
4.2.5.1.2. Determinação de proteínas pelo método de Bradford	58

4.2.5.1.3. Determinação da atividade de protease	59
4.2.5.1.4. Determinação da atividade de amilase	60
4.2.5.1.5. Determinação da atividade de lipase	60
4.2.6. Precipitação por fracionamento salino	61
4.2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	62
4.2.8. Aplicação biotecnológica	63
4.2.8.1. Redução de biofilme de <i>C. albicans</i> em microplacas	64
4.2.8.2. Contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de biofilme de <i>C. albicans</i> em microplacas	66
4.2.8.3. Confeção dos corpos de prova	66
4.2.8.4. Efetividade de redução de biofilme de <i>C. albicans</i> dos corpos de prova e contagem de (UFC/mL) de biofilme de <i>C. albicans</i>	68
4.2.9. Análise de possíveis mecanismos de ação das enzimas	69
4.2.9.1. Influência das enzimas sobre fatores de virulência de <i>C.</i> <i>albicans</i>	69
4.2.9.1.1. Avaliação sobre fosfolipases	70
4.2.9.1.2. Avaliação sobre aspartil-proteinases	71
4.2.9.2. Influência das enzimas sobre ergosterol da parede de <i>C.</i> <i>albicans</i>	73
4.2.9.3. Influência das enzimas sobre a organização da arquitetura de biofilmes de <i>C. albicans</i>	74
4.2.9.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	74
4.2.10. Análise estatística	74
5. RESULTADOS	76
5.1. Determinação do peso úmido e peso seco	77
5.2. Precipitação por fracionamento salino	77
5.3. Perfil eletroforético das enzimas produzidas neste estudo	78
5.4. Redução de biofilme de <i>C. albicans</i> em microplacas	80

5.4.1. Capacidade de redução de biofilme por protease	80
5.4.2. Capacidade de redução de biofilme por amilase	86
5.4.3. Capacidade de redução de biofilme por lipase	91
5.4.4. Capacidade de redução de biofilme por clorexidina.....	97
5.4.5. Contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de biofilmes de <i>C. albicans</i> em microplacas.....	100
5.4.5.1. Capacidade de redução do número de UFC/mL de biofilme por enzimas produzidas neste estudo	100
5.4.5.2. Capacidade de redução do número de UFC/mL de biofilme por enzimas adquiridas comercialmente	103
5.4.5.3. Capacidade de redução do número de UFC/mL de biofilme por clorexidina	106
5.5. Efetividade de redução de biofilme de <i>C. albicans</i> dos corpos de prova	109
5.5.1. Confeção dos corpos de prova	109
5.5.2. Capacidade de redução de biofilme por protease	109
5.5.3. Capacidade de redução de biofilme por amilase	113
5.5.4. Capacidade de redução de biofilme por lipase	116
5.5.5. Contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de biofilmes de <i>C. albicans</i> em corpos de prova	120
5.5.5.1. Capacidade de redução do número de UFC/mL de biofilme por enzimas produzidas neste estudo	120
5.5.5.2. Capacidade de redução do número de UFC/mL de biofilme por enzimas adquiridas comercialmente	123

5.6. Influência das enzimas sobre fatores de virulência de <i>C. albicans</i>	126
5.6.1. Avaliação sobre fosfolipases	126
5.6.2. Avaliação sobre aspartil-proteinase	127
5.7. Influência das enzimas sobre ergosterol da parede de <i>C. albicans</i>	128
5.8. Influência das enzimas sobre a organização da arquitetura de biofilme de <i>C. albicans</i>	130
5.8.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	130
6. DISCUSSÃO	137
7. CONCLUSÃO	152
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Beauveria bassiana</i> (CG307)	28
Figura 2: <i>Aspergillus oryzae</i> (CCF-OIC3919)	28
Figura 3: <i>Aspergillus niger</i> (linhagem industrial).....	28
Figura 4: Representação da atuação de protease	33
Figura 5: Representação da atuação de alfa-amilase e beta-amilase.....	34
Figura 6: Representação da atuação de lipase.....	36
Figura 7: Ciclo de desenvolvimento de biofilme	40
Figura 8: Perfil das enzimas produzidas neste estudo, em gel SDS-PAGE, corado pela prata	79
Figura 9: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com PP	82
Figura 10: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com PP	83
Figura 11: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com PC.....	84
Figura 12: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com PC.....	85
Figura 13: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com AP.....	87
Figura 14: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com AP.....	88

Figura 15: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com AC.....	89
Figura 16: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com AC.....	90
Figura 17: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com LP.....	92
Figura 18: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com LP.....	93
Figura 19: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com LC.....	94
Figura 20: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com LC.....	95
Figura 21: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com clorexidina em diferentes concentrações.....	98
Figura 22: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com clorexidina em diferentes concentrações.....	99
Figura 23: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com enzimas produzidas.....	101
Figura 24: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com enzimas produzidas.....	102
Figura 25: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com enzimas adquiridas comercialmente.....	104

Figura 26: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com enzimas adquiridas comercialmente	105
Figura 27: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com clorexidina em diferentes concentrações.....	107
Figura 28: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com clorexidina em diferentes concentrações.....	108
Figura 29: Corpos de prova em resina acrílica	109
Figura 30: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com PP	111
Figura 31: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com PC.....	112
Figura 32: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com AP.....	114
Figura 33: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com AC.....	115
Figura 34: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com LP	117
Figura 35: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com LC.....	118
Figura 36: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com protease produzida neste estudo (PP)	121

Figura 37: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com lipase e amilase produzidas neste estudo (LP, AP)	122
Figura 38: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com protease adquirida comercialmente (PC).....	124
Figura 39: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com lipase e amilase adquiridas comercialmente (LC, AC).....	125
Figura 40: Influência das enzimas produzidas e adquiridas comercialmente sobre fosfolipases. A: meio Reduced Egg-Yolk Agar para pesquisa de fosfolipase inoculado com colônias de <i>C. albicans</i> após diferentes tratamentos. B: zona hialina (aumento de 4x).	127
Figura 41: Influência das enzimas produzidas e adquiridas comercialmente sobre aspartil-proteinasas secretoras. A: meio Reduced Bovine-Serum-Albumin Agar para pesquisa de aspartil-proteinase inoculado com colônias de <i>C. albicans</i> , após diferentes tratamentos. B: ausência de zona hialina (aumento de 4x).....	128
Figura 42: Perfil espectrofotométrico de ergosterol, na região de ultravioleta. Espectro em preto: controle sem tratamento. Espectro em vermelho: tratamento com PP. Espectro em azul: tratamento com AP. Espectro em rosa: tratamento com LP.....	130
Figura 43: Eletromicrografia mostrando a ação de protease sobre a organização da arquitetura de biofilme de 24 horas em corpo de prova de resina acrílica. A: controle sem tratamento; B: biofilme tratado com PP, durante 60 minutos	131

- Figura 44: Eletromicrografia mostrando a ação de amilase sobre a organização da arquitetura de biofilme de 24 horas em corpo de prova de resina acrílica. A: controle sem tratamento; B: biofilme tratado com AP, durante 30 minutos..... 132
- Figura 45: Eletromicrografia mostrando a ação de lipase sobre a organização da arquitetura de biofilme de 24 horas em corpo de prova de resina acrílica. A: controle sem tratamento; B: biofilme tratado com LP, durante 30 minutos 133
- Figura 46: Eletromicrografia mostrando a ação de protease sobre a organização da arquitetura de biofilme de 48 horas em corpo de prova de resina acrílica. A: controle sem tratamento; B: biofilme tratado com PP, durante 60 minutos. 134
- Figura 47: Eletromicrografia mostrando a ação de amilase sobre a organização da arquitetura de biofilme de 48 horas em corpo de prova de resina acrílica. A: controle sem tratamento; B: biofilme tratado com AP, durante 30 minutos..... 135
- Figura 48: Eletromicrografia mostrando a ação de lipase sobre a organização da arquitetura de biofilme de 48 horas em corpo de prova de resina acrílica. A: controle sem tratamento; B: biofilme tratado com LP, durante 30 minutos 136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Gel de empilhamento a 5%.....	63
Tabela 2: Gel de separação a 12%	63
Tabela 3: Preparação do meio Reduced Egg-Yolk Agar	71
Tabela 4: Preparação do meio Reduced Bovine-Serum-Albumin Agar e das soluções corante e reveladora	72
Tabela 5: Peso úmido e peso seco de biomassas	77
Tabela 6: Purificação parcial por fracionamento salino	78
Tabela 7: Massa molecular das bandas encontradas no perfil eletroforético das enzimas lipase (coluna 1), protease (coluna 2) e amilase (coluna 3)	80
Tabela 8: Porcentagem da capacidade de redução de biofilmes de <i>C. albicans</i> de 24 horas por enzimas produzidas (PP/AP/LP) e adquiridas comercialmente (PC/AC/LC).....	96
Tabela 9: Porcentagem da capacidade de redução de biofilmes de <i>C. albicans</i> de 48 horas por enzimas produzidas (PP/AP/LP) e adquiridas comercialmente (PC/AC/LC).....	97
Tabela 10: Porcentagem da capacidade de redução de biofilmes de <i>C. albicans</i> de 24 horas em corpos de prova, por enzimas produzidas (PP/AP/LP) e adquiridas comercialmente (PC/AC/LC)	119
Tabela 11: Porcentagem da capacidade de redução de biofilmes de <i>C. albicans</i> de 48 horas em corpos de prova, por enzimas produzidas (PP/AP/LP) e adquiridas comercialmente (PC/AC/LC).....	119

Tabela 12: Valor de Pz obtido após contato de biofilme de 24 horas de <i>C. albicans</i> com diferentes tratamentos	126
Tabela 13: Valor de Pz obtido após contato de biofilme de 48 horas de <i>C. albicans</i> com diferentes tratamentos	127
Tabela 14: Concentração de ergosterol de parede de <i>C. albicans</i> , após tratamento com as três enzimas produzidas neste estudo	129

ABREVIATURAS

AC: amilase adquirida comercialmente

ACECIL: Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda

ANOVA: análise de variância

AP: amilase produzida neste estudo

DC: diâmetro da colônia

DNS: ácido 3,5- dinitrossalicílico

EC: *Enzyme Commission Number*

LC: lipase adquirida comercialmente

LP: lipase produzida neste estudo

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MM: massa molecular

PBS: solução tamponada de fosfato

PC: protease adquirida comercialmente

PDA: *potato dextrose agar*

PNP: *p*-nitrofenol

pNPP: *p*-nitrofenilpalmitato

PP: protease produzida neste estudo

Pz: valor dado pela razão do diâmetro da zona hialina pelo diâmetro da colônia

RBSAA: *reduced bovine-serum-albumina agar*

REYA: *reduced egg-yolk agar*

SDA: *sabouraud dextrose ágar com cloranfenicol*

SDS: dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SmF: fermentação líquida submersa

TCA: ácido tricloroacético

UFC: número de unidades formadoras de colônia

XTT: 2,3-bis (2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H- hidróxido

tetrazólio

YNB: *yeast nitrogen base*

ZH: zona hialina

RESUMO

O surgimento de biofilmes de *Candida albicans* como uma forma de resistência microbiana em superfícies sólidas é um problema de saúde pública crescente, uma vez que as opções terapêuticas eficientes para a redução e eliminação deste são escassas, sobretudo devido à sua alta resistência a antifúngicos. As enzimas produzidas por micro-organismos despertam um grande interesse por representarem uma opção biotecnológica aos enxaguatórios e antifúngicos disponíveis no mercado. O objetivo deste estudo foi produzir, determinar a atividade, fracionar três diferentes enzimas fúngicas (protease, amilase e lipase) e estabelecer a efetividade destas na redução de biofilme de *C. albicans*, além de avaliar os possíveis mecanismos de ação destas enzimas sobre o biofilme. A produção enzimática foi realizada por diferentes linhagens fúngicas a partir de fermentação submersa em biorreator, acompanhada de estudo dos parâmetros bioquímicos de cada enzima. A avaliação da efetividade frente ao biofilme de *C. albicans* foi realizada por diferentes métodos: redução de biofilme de *C. albicans* em microplaca de 96 orifícios por XTT; redução do número de unidades formadoras de colônia de biofilme por contagem em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (SDA); redução de biofilme em corpos de prova de resina acrílica por XTT e redução do número de unidades formadoras de colônia dos corpos de prova por contagem em ágar SDA. Ainda, foi analisada também a influência destas enzimas sobre fatores de virulência, ergosterol de parede e sobre o desenvolvimento e arquitetura do biofilme com a análise por microscopia eletrônica de varredura. As três enzimas foram eficientes nos ensaios de redução de biofilme, sobretudo frente a biofilmes maduros, de 48 horas, reduzindo cerca de 80-90% deste tanto em microplacas como em corpos de prova. Nos ensaios em microplacas, a amilase foi mais ativa dentre as três, em contato de 30 minutos, enquanto protease mostrou-se mais efetiva em contato de 60 minutos e lipase foi a menos ativa nos dois tempos analisados. Observou-se a partir dos ensaios para verificação dos possíveis mecanismos de ação, que as enzimas atuam tanto reduzindo o metabolismo como causando alteração na concentração de ergosterol e das características arquitetônicas do biofilme, com degradação da matriz exopolimérica, desorganização e despreendimento celular dos corpos de prova, porém não sendo suficiente para causar morte total das células presentes no biofilme. Assim, conclui-se que as três enzimas microbianas estudadas apresentam forte potencial de redução de biofilme de *C. albicans*, cuja eficiência está diretamente relacionada à atividade específica. O modo de atuação das enzimas sobre o biofilme parece estar relacionado com a ruptura da matriz exopolimérica e despreendimento do biofilme da superfície onde antes estava aderido. Desta forma, espera-se, com este trabalho, contribuir com a busca de novas opções terapêuticas de origem biotecnológica no combate ao problema da formação de biofilmes por *C. albicans* em próteses dentárias.

Palavras chave: protease, lipase, amilase, *Candida albicans*, biofilme.

ABSTRACT

The emergence of *Candida albicans* biofilms as a form of microbial resistance on solid surfaces is an increasing public health problem, since the effective therapeutic options for the reduction and elimination, mainly due to its high resistance to antifungals. The enzymes produced by microorganisms attract great interest because they represent an option to biotechnology and antifungal mouthwashes available in the market. The aim of this study was to produce, determine the activity, fractionate three different microbial enzymes (protease, amylase and lipase), and to evaluate the effectiveness in reducing biofilm of *C. albicans* besides the possible mechanisms of action of these enzymes on the biofilm. For enzyme production were used fungal strains submitted to liquid fermentation in bioreactor, accompanied by study of biochemical parameters of each enzyme. The assessment of effectiveness against biofilms of *C. albicans* was performed by different methods: Evaluation of the ability to reduce biofilm of *C. albicans* in microplate 96 wells by XTT; Evaluation of the reduction in the number of colony forming units of biofilm by counting in Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol; Evaluation of biofilm reduction capacity of *C. albicans* in specimens of acrylic resin by XTT and reduction capacity of the number of colony forming units per count Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol. In addition, it is also analyzed the influence of these enzymes on virulence factors and the development of biofilm architecture and by analysis in scanning electron microscopy. The three enzymes were effective in reducing assays well microplate as specimens, especially against mature biofilms, 48 hours. The assays in microplates, amylase was the most active enzyme of the three, in contact of 30 minutes, while the protease was more effective in contact of 60 minutes and the lipase was less active in both periods analyzed. However, in specimens, the enzymes protease and amylase similar results in best contact times previously selected. The lipase showed significant increase compared to its action in microplates, however lower than amylase and protease. It was observed as possible mechanisms of action, that the enzymes act both by reducing metabolism (XTT) as well as causing change in the ergosterol concentration and characteristics of the biofilm architecture with extrapolymeric matrix degradation, cell detachment and disorganization of the specimens, but not enough to cause destruction of cells present in the biofilm. Thus it appears, that the three microbial enzymes obtained have strong potential to reduce *C. albicans* biofilm, efficiency being directly related to the specific activity. The action way of enzymes on biofilms seems to be related to the rupture of the exopolymeric matrix and detachment of biofilm of surface attached. Thus, it is expected to contribute to the search for new therapeutic options of biotechnological origin in combating the problem of biofilm formation by *C. albicans* in dentistry.

Keywords: protease, lipase, amylase, *Candida albicans*, biofilm.

1. *Introdução*



Os processos biotecnológicos visam à melhoria de métodos já existentes ou ainda o desenvolvimento de produtos inovadores com alta qualidade, reduzindo os custos de produção e efeitos colaterais indesejados, bem como os danos ao meio ambiente (GOGATE e KABADI, 2009).

Micro-organismos são dotados de um enorme potencial para produzirem uma diferenciada gama de produtos biotecnológicos e dentre estes se destacam as enzimas, que têm sido exploradas comercialmente ao longo dos anos (JAYANI et al., 2005). A aplicação de enzimas obtidas a partir de micro-organismos traz inúmeras vantagens, como o fato de estes serem considerados fontes de baixo custo na produção de metabólitos, podendo ser cultivados em grandes quantidades e em tempo relativamente curto. Acrescenta-se ainda o benefício da produção não estar condicionada às questões sazonais e geográficas (SAID e PIETRO, 2004; ZIMMER et al., 2009).

As enzimas protease, amilase e lipase podem ser obtidas a partir de diferentes micro-organismos, destacando-se os fungos filamentosos que são considerados bons produtores e excretores. Estas enzimas atuam sobre substratos como proteínas, açúcares e gorduras, respectivamente e por isso possuem grande importância comercial, sendo empregadas em vários segmentos industriais, inclusive na indústria farmacêutica (HAKI e RAKSHIT, 2003; SAID e PIETRO, 2004; TREICHEL et al., 2010).

Os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) do Brasil mostram que o país caminha rapidamente rumo a um perfil demográfico cada vez mais envelhecido, em concordância com o crescimento mundial da população

idosa (IBGE, 2014). Sabe-se que a busca, por parte dessa população, por produtos que melhorem sua qualidade de vida e mantenham sua auto-estima elevada será cada vez mais frequente, sendo que a saúde bucal é um fator contribuinte, que favorecerá o seu bem estar. No entanto, a maioria destes idosos, ao longo de suas vidas, passou por processos odontológicos puramente curativos e deficientes, levando agora a um grande número de indivíduos edêntulos e usuários de próteses parciais ou totais, por estas serem acessíveis à grande parte da população, uma vez que implantes dentários são procedimentos de alto custo, ficando, portanto, limitados a uma determinada parcela da população (MOIMAZ et al., 2004). Esta situação pode conseqüentemente afetar a saúde bucal destes idosos, pois uma higiene precária destas próteses pode favorecer o desenvolvimento de doenças bucais levando a importantes problemas de saúde pública (OZKAN et al., 2011; SILVA et al., 2012a).

Dessa forma, um produto ideal para a higiene destas próteses deve ser de fácil manuseio, contribuindo para que pacientes idosos não tenham dificuldades em utilizá-lo, deve ser eficaz na remoção dos depósitos orgânicos, inorgânicos, possuir ação antimicrobiana, não ser tóxico ao paciente, não causar danos aos materiais constituintes da prótese e ter baixo custo (PARANHOS et al., 2004).

Diante disso, propusemos empregar enzimas microbianas, em menor grau de purificação, na redução de biofilmes de próteses dentárias, como uma opção inovadora em relação aos produtos disponíveis no mercado.

2. Revisão Bibliográfica



2.1. Micro-organismos como fontes de produtos biotecnológicos

Há décadas, micro-organismos são utilizados para obtenção de produtos de interesse ao homem e ao meio ambiente nos mais variados setores. A diversidade apresentada por estes micro-organismos permite a observação de inúmeras características metabólicas que levam a infinitas possibilidades de aplicação (DEMIAN e ADRIO, 2008; FERRER et al., 2009). Produtos de origem microbiana geraram nos EUA cerca US\$ 100 bilhões no setor industrial (DEMIAN e ADRIO, 2008).

Os micro-organismos representam o grupo mais diversificado e abundante de organismos vivos da biosfera, constituindo 60% de sua biomassa total. Estimativas sugerem que os solos e oceanos possuam a maior quantidade de células microbianas capazes de gerar produtos com inúmeras aplicações biotecnológicas (GREEN e KELLER, 2006; SOGIN et al., 2006; DINSDALE et al., 2008; SINGH, 2009; FERRER et al., 2009; BAKUNINA et al., 2012). Além disso, são responsáveis pela manutenção do ciclo da vida, sem o qual esta não seria possível. A compreensão da diversidade microbiana, bem como de suas estruturas e funções, da biogeoquímica e de suas capacidades de gerar metabólitos de interesse é essencial para a evolução biotecnológica e a consequente sustentabilidade da vida no planeta (DINSDALE et al., 2008; SINGH, 2009; BAKUNINA et al., 2012).

Os micro-organismos utilizados neste estudo para obtenção das três enzimas, *Beauveria bassiana* (Figura 1), *Aspergillus oryzae* (Figura 2) e *Aspergillus niger* (Figura 3), são fungos filamentosos, caracterizados como seres eucarióticos heterotróficos, que formam micélios de hifas e se reproduzem por esporos de

maneira sexuada ou assexuada e são considerados bons produtores dessas enzimas. Foram obtidos de diferentes fontes e gentilmente cedidos pela Embrapa (*B. bassiana*), Fundação Oswaldo Cruz (*A. oryzae*) e pelo Prof. Dr. João Atílio Jorge da Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (*A. niger*).



Figura 1: *Beauveria bassiana*
Fonte: arquivo próprio



Figura 2: *Aspergillus oryzae*
Fonte: arquivo próprio

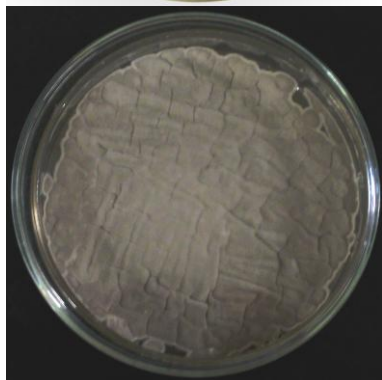


Figura 3: *Aspergillus niger*
Fonte: arquivo próprio

2.1.1. *Beauveria bassiana*

Trata-se de um fungo filamentoso entomopatogênico, ou seja, que parasita insetos, matando-os ou incapacitando-os, muito utilizado comercialmente para

este propósito em todo o mundo (ZIMMERMANN, 2007).

São comumente encontrados aderidos à superfície externa do corpo dos insetos na forma de esporos assexuados (ZIMMERMANN, 2007) e macroscopicamente apresentam colônias brancas algodonosas.

Estudos com *B. bassiana* contribuíram para o desenvolvimento de muitos produtos comerciais, sobretudo micoinseticidas. Além disso, diferentes ações biológicas, aspectos ambientais e toxicológicos foram observados nos últimos 40 anos (ZIMMERMANN, 2007).

Por possuir a capacidade de secretar proteases, quitinases e lipases, que degradam os constituintes principais da cutícula dos insetos, ou seja, proteína, quitina, e lípidos, permitindo a penetração de hifas (WANG et al., 2005; CHO et al., 2006), este fungo tornou-se importante fonte de novos produtos biotecnológicos. Estudos de modificações genéticas e de melhores condições de cultivo são extensivamente realizados com o intuito de aumentar a eficácia desse fungo na produção de metabólitos (FANG et al., 2005; RAO et al. 2006; FANG et al., 2007).

2.1.2. *Aspergillus oryzae*

Este importante micro-organismo vem sendo utilizado por diferentes indústrias para obtenção de produtos inovadores como, por exemplo, aditivos alimentares, enzimas e outros. É um fungo filamentosso aeróbio que apresenta inicialmente colônias brancas e, após desenvolvimento, colônias esverdeadas; microscopicamente apresenta conídios hialinos, se reproduzem por esporos

(conídios) assexuados, que são facilmente lançados ao ar (BARBESGAARD et al., 1992) e estão geralmente presentes em materiais de decaimento de plantas (ABARCA et al., 1994).

Esta espécie é utilizada pela população asiática há mais de mil anos para a obtenção de produtos de fermentação como o saquê e molho de soja (shoyu) (ABE et al., 2006).

A. oryzae produz muitas enzimas de interesse industrial que degradam várias biomoléculas de elevada massa molecular, tais como carboidratos, polipeptídeos e ácidos nucleicos. Estirpes de *A. oryzae* são fortemente pesquisadas por representarem uma rica fonte de genes capazes de codificar enzimas que produzem metabólitos de grande interesse biotecnológico (ABE et al., 2006). Além disso, existem inúmeros estudos buscando condições ideais para a produção, cada vez mais eficiente, destes metabólitos por este micro-organismo (CARLSEN et al., 1996; CARLSEN e NIELSEN, 2001; PEDERSEN e NIELSEN, 2000; FRANCIS et al., 2003). Este fungo tem recebido maior atenção devido à sua capacidade de secretar uma grande quantidade de proteínas com alto valor agregado como, por exemplo, a alfa-amilase (SOUZA et al., 2010).

2.1.3. *Aspergillus niger*

A. niger é um fungo filamentosos que cresce aerobicamente na matéria orgânica, sendo encontrado no solo e lixo, em adubo e em material vegetal em decomposição. É capaz de crescer em temperaturas entre 6- 47 °C (KÜCK, 1986). Produz conidiósporos que variam de castanho ao preto, que são distribuídos através do ar, com frequência maior em lugares quentes e úmidos;

macroscopicamente apresenta colônias verde-escuro que com o decorrer do tempo tornam-se castanho-enegrecidas (RIPPEL-BALDES 1955; RAPER e FENNELL, 1965; PARENICOVÁ et al., 2000; VARGA et al., 2000).

É uma espécie de grande importância econômica, objeto de intensas pesquisas nas últimas décadas que vem sendo utilizado por diferentes segmentos industriais há anos, como na indústria farmacêutica e cosmética. Desde 1919, apresenta importância uma vez que sua capacidade de produzir ácido cítrico começou a ser explorada industrialmente. Além disso, desde a década de 1960, *A. niger* tornou-se fonte de uma grande variedade de enzimas (SCHUSTER et al., 2002).

Estudos genéticos têm sido aplicados com sucesso para melhorar os processos de produção por *A. niger*, resultando em uma série de novos processos e produtos (SCHUSTER et al., 2002).

2.2. Enzimas microbianas

Enzimas são proteínas que possuem atividade catalítica, ou seja, aceleram a velocidade de reações químicas. Atualmente são empregadas em diferentes setores como terapêutico, remoção de diferentes resíduos, indústria têxtil, kits diagnósticos, indústria farmacêutica e de alimentos, entre outras tantas áreas (BARREDO, 2005). As enzimas microbianas têm se destacado como um dos principais produtos biotecnológicos utilizadas na substituição de processos químicos convencionais devido a fatores como fácil obtenção, possibilidades de modificações genéticas e políticas ambientais (COELHO, 2001; SAID e PIETRO, 2004; AGRAWAL et al., 2005; BARREDO, 2005; GOUDA et al., 2006). Os micro-

organismos são a fonte mais empregada para a obtenção das enzimas de uso industrial, sendo obtidas principalmente por processos fermentativos (BARREDO, 2005). A busca por processos biotecnológicos que utilizem enzimas microbianas semi-purificadas é de extrema importância para diferentes segmentos industriais, inclusive a indústria farmacêutica, uma vez que a partir destes, podem surgir produtos com aplicações inovadoras e de baixo custo comercial.

2.2.1. Proteases

As proteases são enzimas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas de proteínas (EC 3.4) (Figura 4). Existem diferentes classes de proteases descritas até o momento: serina (EC 3.4.21), cisteína (EC 3.4.22), aspártico-proteinasas ou endopeptidases (EC 3.4.23) e metaloproteinasas ou metaloendopeptidases (EC 3.4.24). As enzimas cujo mecanismo de ação não está completamente elucidado são classificadas no subgrupo EC 3.4.99 (RAO et al., 1998; NORONHA e MARCO, 2004; SAID e PIETRO, 2004). Estão entre os três maiores grupos de enzimas industriais, sendo responsáveis por cerca de 60% das vendas mundiais (CHELLAPPAN et al., 2006; AKCAN e UYAR, 2011). É uma classe de enzimas que se destaca tanto nos campos fisiológico como no comercial, devido à sua grande diversidade de ação (POZA et al., 2001). São empregadas em várias indústrias entre as quais: de detergentes, alimentícia, farmacêutica, tratamento de couro, preparação de fertilizantes orgânicos, indústria da seda, tratamento de resíduos industriais e na biorremediação (CHELLAPPAN et al., 2006; AKCAN e UYAR, 2011).

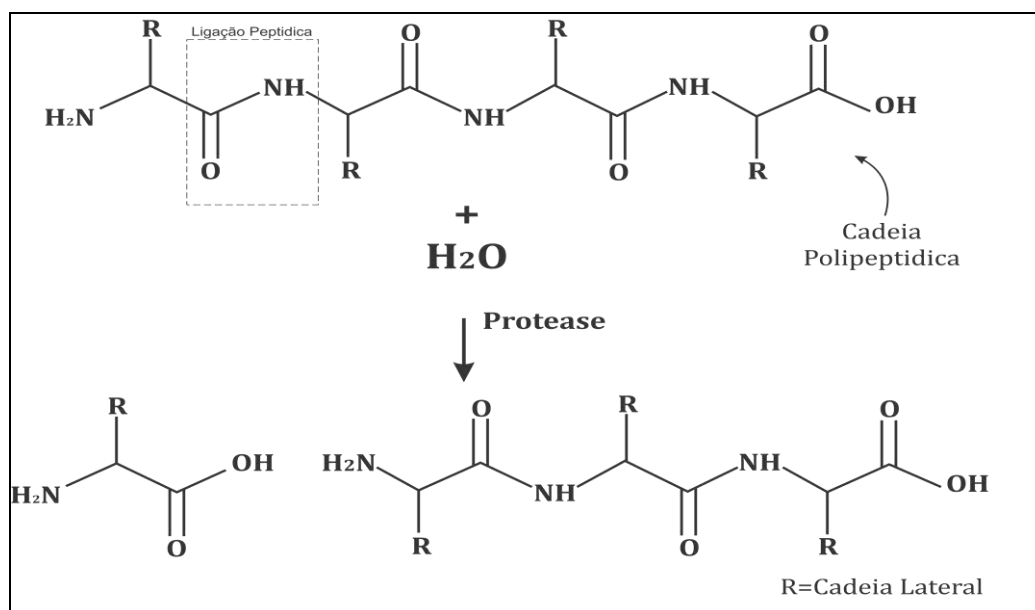


Figura 4: Representação da atuação de protease (adaptado de LIMA et al., 2007).

As proteases alcalinas são utilizadas principalmente como aditivos em diferentes detergentes como aqueles usados na lavagem de roupas, louças, e equipamentos hospitalares, sendo que sua função está relacionada com a degradação de manchas e/ou resíduos proteicos, como o sangue (PRAKASHAM et al., 2006; EL ENSHASY et al., 2008).

Com a expansão da utilização de proteases na década de 1960 houve um estímulo ao desenvolvimento comercial e as pesquisas na busca de melhorias em suas propriedades. Como as proteases produzidas por plantas e animais não atendem a demanda do mundo atual, houve um aumento do interesse de proteases microbianas (UYAR e BAYSAL 2004; KUMAR et al., 2008; AKCAN e UYAR, 2011). As proteases são produzidas por uma ampla gama de micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos utilizando principalmente fermentação submersa (PRAKASHAM et al., 2006).

Atualmente, o custo da produção de enzimas é muito elevado, principalmente quando há a necessidade de aplicação de processos de purificação. Portanto, o desenvolvimento de novos métodos para aumentar a produção juntamente com a redução de custos é altamente desejável do ponto de vista comercial (MUKHERJEE et al., 2008).

2.2.2. Amilases

As amilases estão divididas em alfa-amilases (EC 3.2.1.1) e beta-amilases (EC 3.2.1.2) dependendo da ligação onde atuam nos substratos. Estas enzimas quebram as ligações dos polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de *D*-glicose, ou seja, promovem a hidrólise do amido a açúcares redutores (Figura 5). Alfa-amilase é a mais importante para o processo sendo designada amilolítica e está entre as primeiras enzimas conhecidas (PANDEY et al., 2005; TANGPHATSORNRUANG et al., 2005; RAJAGOPALAN e KRISHNAN, 2008).

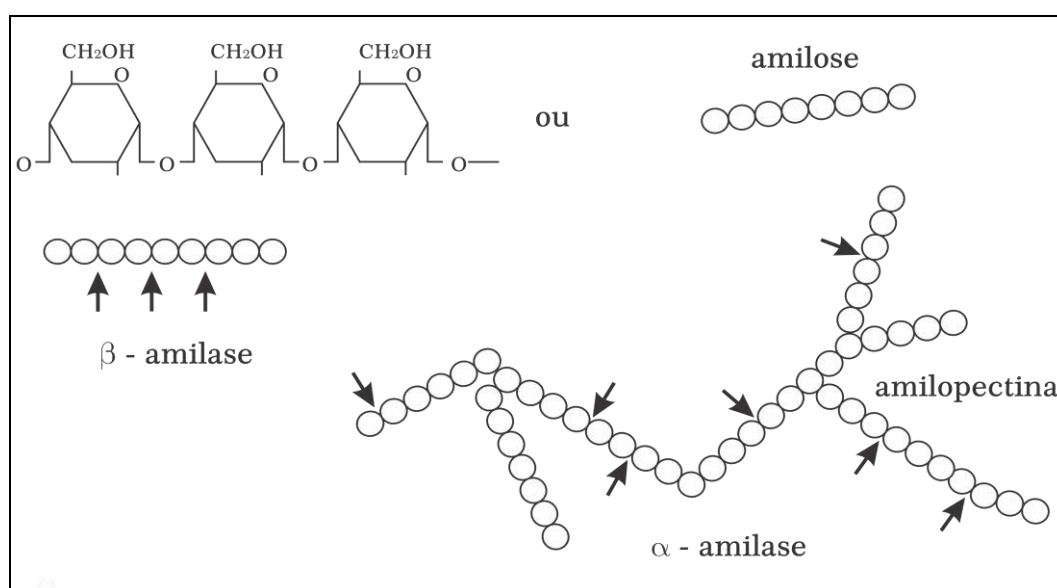


Figura 5: Representação da atuação de alfa-amilase e beta-amilase. As setas indicam as diferentes regiões de atuação das enzimas: alfa-amilase atua em qualquer ligação 1,4 da molécula do carboidrato, enquanto beta-amilase atua em ligações 1,4 próximas as pontes da molécula de amido (GAVA et al., 2008).

Esta enzima apresenta grande importância em biotecnologia, constituindo uma classe que movimenta cerca de 30% do mercado mundial de enzimas, com amplas aplicações, desde indústrias de alimentos, fermentação, têxtil, detergentes a indústrias de papel e farmacêuticas (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2005; SOUZA et al., 2010).

As amilases estão presentes em plantas e animais, porém as obtidas a partir de micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos são as mais utilizadas, devido, principalmente, à sua estabilidade, além de outras vantagens como a facilidade de manuseio e o fato de o processo de obtenção ser relativamente econômico (TANYILDIZI et al., 2005; SOUZA et al., 2010).

A fermentação submersa tem sido tradicionalmente utilizada para a produção de amilases industrialmente devido à facilidade de controle de diferentes parâmetros tais como: pH, temperatura, aeração e oxigênio (GANGADHARAN et al., 2008).

A adição de enzimas em formulações de detergentes melhora a capacidade destes agentes em remover manchas difíceis e faz com que a sua utilização seja ambientalmente segura. Amilases são o segundo tipo de enzimas usadas em formulações de detergentes enzimáticos e estas auxiliam na degradação de resíduos ricos em amido (MITIDIERI al., 2006; HMIDET et al., 2009; MUKHERJEE et al., 2009; SOUZA et al., 2010).

2.2.3. Lipases

As lipases (EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e atuam na hidrólise de triglicerídeos liberando glicerol e ácidos graxos (Figura 6) (FRANKEN

et al., 2010). Por possuírem a capacidade de realizar transformações químicas específicas, o seu uso tem se tornado cada vez mais popular em diferentes segmentos industriais. Além disso, as lipases passaram a ser muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua grande disponibilidade, baixo custo e ainda a habilidade de catalisar reações de esterificação, transesterificação, aminólise e tiotransesterificação (FRANKEN et al., 2010).

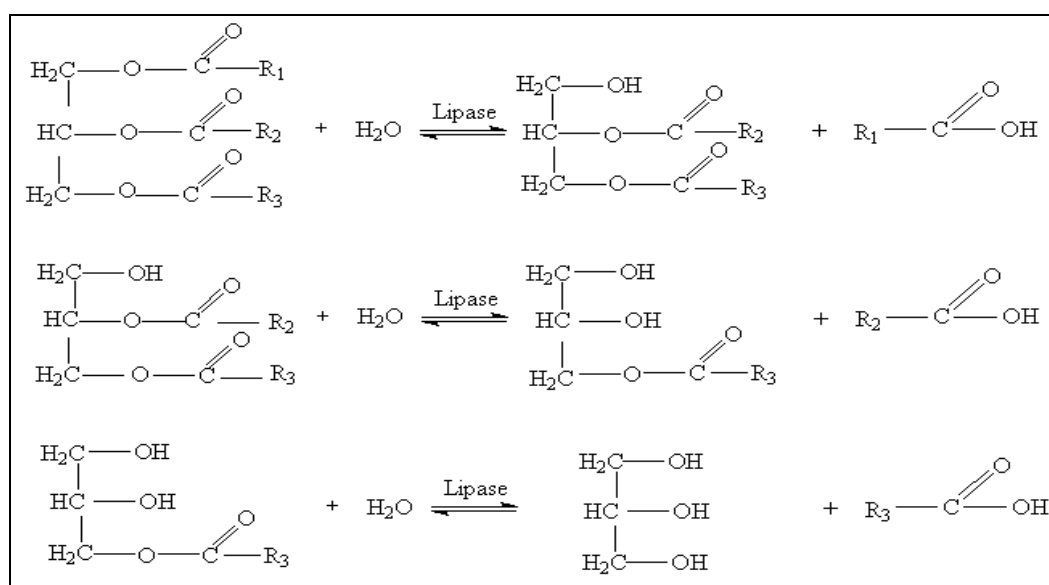


Figura 6: Representação da atuação de lipase (adaptado de MENDES e CASTRO, 2005).

Consideradas um dos principais biocatalisadores, as lipases são responsáveis pela movimentação de mais de 35% do mercado biotecnológico mundial, sendo exploradas pelas indústrias inclusive para biodegradação de resíduos (JOSEPH et al., 2008).

As lipases são produzidas por animais, plantas e micro-organismos, porém as microbianas ganharam atenção especial por parte das indústrias, representando atualmente a classe mais utilizada de enzimas em aplicações biotecnológicas e em química orgânica, sobretudo por apresentarem alta

estabilidade e seletividade a vários substratos (DUTRA et al., 2008; GRIEBELER et al., 2009; MENONCIN et al., 2009). As lipases são produzidas por bactérias, leveduras e fungos (ABADA, 2008), sendo que as obtidas a partir de fungos filamentosos, são cultivados principalmente de fermentação submersa (GUPTA et al., 2004; DUTRA et al., 2008).

Enzimas hidrolíticas com especificidade para moléculas envolvidas na arquitetura de biofilmes (formado por matriz extracelular composta de água, polissacarídeos, proteínas e restos celulares) têm sido avaliadas como agentes antiplacas, com poucos estudos focando a formação de biofilmes complexos (SUTHERLAND, 2001). Estudos recentes com enzimas adquiridas comercialmente e testadas por diferentes metodologias mostraram-se efetivas na remoção de biofilmes de associações de bactérias (CHAIGNON et al., 2007; LEDDER et al., 2009).

2.3. Biofilme de *Candida albicans*

Biofilmes podem ser definidos como comunidades microbianas estruturadas, ligadas a uma superfície biótica ou abiótica, e encapsuladas dentro de uma matriz exopolimérica (DONLAN, 2001; UPPULURI et al., 2009).

Essas comunidades microbianas foram observadas muito antes do surgimento de ferramentas que possibilitassem seus estudos mais detalhados. Em 1684 Anthony van Leewenhoek comentou sobre a grande acumulação de microorganismos que observou em sua placa dental em um relatório à Royal Society de Londres: "*O número desses animicules na placa dental de um homem são tantos que eu acredito que eles excedam o número de homens em um reino*". O estudo de micro-

organismos tomou um rumo importante em meados de 1800, quando Robert Koch desenvolveu métodos para criar um meio nutriente sólido a fim de crescer e isolar culturas puras de micro-organismos. Este desenvolvimento levou a enormes avanços na medicina, agricultura e indústria, no entanto, estes avanços foram baseados em um conceito tão simplista da vida microbiana que agora muitas das soluções geradas por essas técnicas estão sendo revertidas. Os micro-organismos têm-se revelado muito mais complexos. Em uma edição do *Jornal de Bacteriologia* de 1940, autores H. Heukelekian e A. Heller escreveram: "*Superfícies permitem que as bactérias se desenvolvam em substratos de forma diferente daquela observada em meios líquidos de crescimento, este desenvolvimento ocorre quer como lodo bacteriano ou crescimento colonial ligado às superfícies*". Claude ZoBell descreveu muitas das características fundamentais das comunidades microbianas aderidas a superfícies em 1940. No final da década de 20, vários artigos foram escritos sobre filmes microbianos ou camadas de lodo; pesquisadores alemães, por vezes, utilizavam o termo "*manto de sujidade*". Como as propriedades observadas em células microbianas aderidas a superfícies são únicas, quando comparadas a micro-organismos em forma planctônica, o emprego de um termo tornou-se útil para descrevê-lo. "*Biofilme*" foi usado coloquialmente entre os pesquisadores por alguns anos antes de ser considerado aceitável para uso em publicação. O uso mais antigo de "*biofilme*" na publicação está na revista sueca *Vatten*: Harremoës, p. 1977. "Half-order reactions in biofilm and filter kinetics". *Vatten*, 33 122-143 (CHANDKI et al., 2011; MSU, 2014).

Os primeiros pesquisadores que estudaram as implicações de biofilmes na filtração de águas residuais, incrustação de equipamentos industriais, e na placa

dentária, notaram que essas estruturas são praticamente onipresentes. A formação de biofilme também implica em corrosão microbiana, contaminação do produto, infecções relacionadas a dispositivos médicos e feridas crônicas. Biofilme também pode ser utilizado positivamente, em especial nos sistemas de pré-tratamento da água e solos contaminados (CHANDKI et al., 2011; MSU, 2014).

A cavidade bucal possui um ambiente propício para a colonização e crescimento de diferentes micro-organismos (ZAURA et al., 2009; MARSH, 2010). O desenvolvimento normal da fisiologia da cavidade bucal é influenciado pela presença desses micro-organismos em toda a superfície da boca. Esta microbiota contribui, de certa forma, para a saúde do hospedeiro, por evitar que micro-organismos potencialmente patogênicos se estabeleçam na boca e ainda para a regulação da resposta inflamatória (MARSH et al., 2011). Assim, produtos para higiene bucal devem tentar controlar os níveis de placa, ao contrário de tentar eliminá-lo, de forma a manter as propriedades benéficas da microbiota residente (ZAURA et al., 2009; MARSH, 2010).

No entanto, o uso de próteses, quer sejam parciais ou totais, pode favorecer a retenção de alimentos, levando à formação de associações de micro-organismos conhecidas como biofilme dental, uma vez que a presença de áreas retentivas de superfícies sólidas constitui-se em regiões preferenciais de colonização de determinados micro-organismos (SUGA et al., 2005; SILVA et al., 2012a).

A formação de biofilmes dentais ocorre através de uma sequência ordenada de eventos (MARSH, 2010). Inicialmente, os micro-organismos

colonizadores se anexam à superfície; esses primeiros colonizadores crescem, modificam o meio e tornam as condições adequadas para a colonização posterior por micro-organismos mais exigentes. Em seguida, passam a sintetizar o que se chama de matriz exopolimérica, que atua como um suporte para o biofilme, capaz de reter moléculas dentro da placa e finalmente a composição torna-se estável. Ao longo do tempo ocorre ainda a dispersão, levando à repetição do ciclo de vida do biofilme (Figura 7) (BLANKENSHIP e MITCHELL, 2006; JAKUBOVICS, 2010).

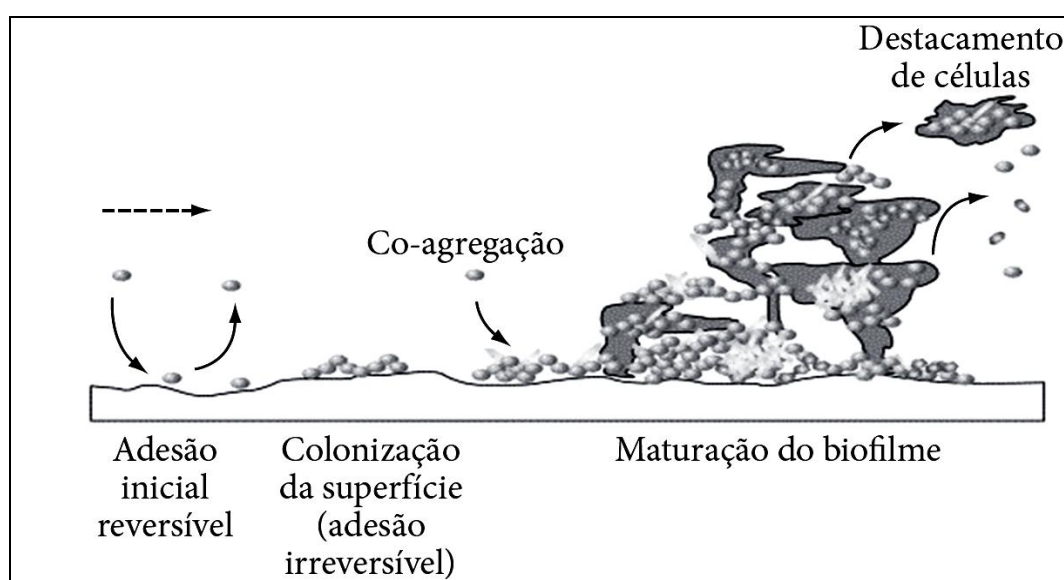


Figura 7: Ciclo de desenvolvimento de biofilme (adaptado de BOARI et al., 2009).

As características e propriedades entre mesmas espécies de micro-organismos em estado planctônico, ou seja, em cultura líquida (flutuação livre), e em biofilmes são distintas, uma vez que biofilmes possuem um fenótipo que se mostra mais tolerante a agentes antimicrobianos, estresse e defesas do hospedeiro, aumentando a complexidade de seu tratamento. Isto traz importantes implicações clínicas, sobretudo em usuários de próteses, favorecendo a ocorrência de infecções persistentes (ZAURA et al., 2009; MARSH, 2010).

Biofilmes podem ser formados por diferentes espécies de micro-organismos (bactérias, fungos e leveduras), e podem ser encontrados aderidos a diversos dispositivos médicos ou ainda em estruturas industriais, gerando além de prejuízos financeiros, sérios problemas para a saúde pública. Como resultado, estes micro-organismos, quando em biofilme, tornam-se patógenos resistentes estabelecendo infecções crônicas, tais como infecções em vias respiratórias superiores (*Pseudomonas aeruginosa*), infecções do trato urinário (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), periodontite (biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e outras bactérias), infecções em cateter e outras infecções associadas a dispositivos (*Enterococcus faecalis* e outros). Especialmente em pacientes imunocomprometidos, esta manifestação pode ser devastadora, levando a sintomas graves e em muitos casos à morte (BORDI e BENTZMANN, 2011; KOSTAKIOTI et al., 2013).

Um exemplo desses micro-organismos é a espécie *Candida albicans*, muitas vezes, comensais benignos aos seres humanos, é, contudo a espécie fúngica mais frequentemente associada à formação de biofilmes, afetando principalmente pacientes imunocomprometidos (RAMAGE et al., 2005; UPPULURI et al., 2009).

As diferentes manifestações de candidíase observadas em pacientes usuários de próteses dentais incluem candidíase orofaríngea e estomatite de dentadura que estão intimamente associados com a formação de biofilmes nestas superfícies (RAMAGE et al., 2006; PFALLER e DIEKEMA, 2007; SILVA et al., 2012a).

Biofilmes maduros de *C. albicans* consistem de uma intrincada rede de leveduras, hifas e pseudo-hifas, com canais de água ramificados dentro da matriz

exopolimérica. As características de adesão envolvem alterações que levam ao aumento no metabolismo, à capacidade de reversivelmente alternar entre leveduras e formas filamentosas em resposta a diferentes estímulos, às interações de diferentes adesinas, além de outros mecanismo presentes como o *quorum sensing* e propriedades importantes de reprodução, favorecendo o desenvolvimento de biofilmes por *C. albicans* (RAMAGE et al., 2005; NOBILE e MITCHELL, 2006).

Após a realização de diversos estudos relacionados aos biofilmes microbianos, fica claro que estes não são um simples acúmulo de células, mas sim comunidades microbianas altamente estruturadas, com um arranjo espacial ideal para facilitar o fluxo de nutrientes e eliminação de resíduos de produtos (UPPULURI et al., 2009). Atualmente, sabe-se que estes biofilmes constituem o modo predominante de crescimento para a maioria dos micro-organismos em seu habitat natural. Estima-se que cerca de 65% de todas as infecções tratadas estão associadas à formação de biofilmes microbianos, resultando em impacto negativo sobre a saúde que além de todas as implicações, se traduz em crescentes encargos financeiros para os sistemas de saúde pública mundiais (DONLAN, 2001; UPPULURI et al., 2009).

2.4. Higiene de próteses dentárias

A reabilitação oral ideal visa o tratamento de pacientes desdentados, melhorando a sua saúde através da criação de funcionalidade, além da melhoria de sua auto-estima, por meio da utilização de próteses totais ou parciais. No

Brasil, a utilização de próteses entre idosos é comum. Dados demonstram que cerca de 80% da população com 65 anos ou mais usava algum tipo de prótese até o ano de 2003 (BRASIL, 2014; BARBOSA et al., 2008; ISAKSSON et al., 2009; SILVA et al., 2012a).

O uso de próteses requer cuidados a fim de se manter tanto a saúde dos tecidos de suporte, como a conservação adequada da própria prótese. No entanto, pacientes comumente relatam que não são instruídos sobre a correta forma de limpar as dentaduras e sobre os cuidados gerais de higiene bucal (BARBOSA et al., 2008). Conseqüentemente, inúmeros trabalhos apontam a precariedade da saúde bucal de usuários de próteses (KULAK-OZKAN, 2002; MARCHINI et al., 2006; THEAN et al., 2007; SILVA et al., 2012a) e a correlação entre má higiene e lesões da mucosa oral, merecendo destaque a candidíase atrófica crônica ou estomatite de dentadura que afeta entre 11% e 67% destes indivíduos. Esta patologia é encontrada frequentemente e constitui-se na formação de biofilme em próteses parciais e totais principalmente por *Candida albicans* (PARANHOS et al., 2004; RAMAGE et al., 2006; PFALLER e DIEKEMA, 2007; PARANHOS et al., 2007; BARBOSA et al., 2008; ISAKSSON et al., 2009; SILVA et al., 2012a).

O tratamento de pacientes que apresentam estomatite consiste em remover a prótese à noite e utilizar anti-sépticos tópicos ou antifúngicos sistêmicos e em alguns casos até mesmo substituir a prótese (SHUKOR et al., 2006), o que sem dúvida gera gastos. A utilização de métodos mecânicos e/ou químicos é comum para a limpeza destas próteses, porém ambos possuem desvantagens (PARANHOS et al., 2007; BARBOSA et al., 2008; ISAKSSON et al., 2009).

Os métodos mecânicos representados por escovas, pastas e sabonetes, têm como desvantagem o difícil acesso a certas áreas de próteses, necessitando de escovas especiais. Além disso, escovas com cerdas duras e pastas abrasivas danificam a superfície da resina, deixando-a sem polimento e mais porosa, o que facilita ainda mais o acúmulo do biofilme, além de requerer certo grau de destreza manual (BARBOSA et al., 2008; ISAKSSON et al., 2009).

O método químico é utilizado com a imersão da prótese em produtos químicos com ação solvente, detergente, fungicida e bactericida, porém, seu uso é contra-indicado em certos modelos de próteses, pelo fato de alguns destes produtos terem efeito corrosivo ao metal, além do inconveniente de deixar odor residual e sabor desagradável; já os peróxidos alcalinos têm como desvantagem uma durabilidade limitada e efeitos deletérios à resina, além de não serem indicados na limpeza de alguns modelos de aparelhos ortodônticos por causarem enfraquecimento às porções metálicas (CATÃO et al., 2007; BARBOSA et al., 2008; ISAKSSON et al., 2009).

A clorexidina contribui para a redução da formação do biofilme e melhoria da condição da mucosa do paciente, combatendo a estomatite protética. No entanto, seu uso frequente pode levar ao surgimento de cepas resistentes, alterações indesejadas nas características da prótese, como manchas e efeitos adversos com o uso prolongado, como descamação reversível da mucosa, alterações do paladar e aumento dos depósitos calcificados supra gengivais (TORRES et al., 2000; CATÃO et al., 2007; BARBOSA et al., 2008).

Os limpadores que possuem enzimas desnaturam proteínas e polissacarídeos da placa dental das próteses. Esses limpadores causam menos danos à resina da prótese do que outros limpadores químicos. Estudo prévio mostrou que enzimas foram eficientes na remoção de placas de próteses apresentando ação fungicida, sem danificar a estrutura metálica e a resina das mesmas (NAKAMOTO et al., 1991).

Após a análise de dados da literatura envolvendo utilização de enzimas na redução de biofilmes, nota-se que são utilizadas enzimas comercializadas em alto grau de pureza (CHAIGNON et al., 2007; LEDDER et al., 2009) o que geraria custos elevados de aplicação e ainda a ausência de dados em relação à eficiência da redução de biofilmes de *C. albicans* por parte de enzimas fúngicas semi-purificadas, o que levaria a uma consequente redução de custos para futuras aplicações em larga escala, por exemplo, no desenvolvimento de um produto voltado para limpeza de próteses.

3. *Objetivo*



O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo produzir, a partir de *B. bassiana*, *A. oryzae* e *A. niger*, as enzimas protease, amilase e lipase, respectivamente, e avaliar suas efetividades, após precipitação, na redução de biofilme de *C. albicans*.

Para tanto, foram necessários os seguintes objetivos específicos:

- Produzir as enzimas protease, amilase e lipase sob fermentação submersa;
- Determinar a concentração de proteínas e a atividade de cada enzima no extrato enzimático bruto;
- Precipitar as enzimas com sulfato de amônio e verificar o grau de purificação obtido;
- Avaliar a efetividade de redução de biofilme de 24 e 48 horas de *C. albicans* das enzimas em microplacas e em corpos de prova de resina acrílica;
- Analisar a influência das enzimas sobre fatores de virulência das células de *C. albicans* e sobre o ergosterol de parede de *C. albicans*;
- Verificar a capacidade das enzimas causarem alterações na arquitetura do biofilme de *C. albicans*.

4. *Material e Métodos*



4.1. Material

4.1.1- Solventes, reagentes e meios de cultura

- 2,3-bis (2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H- hidróxido tetrazólio (XTT) - Sigma-Aldrich
- acetato de sódio - Sigma-Aldrich
- ácido 3,5- dinitrossalicílico (DNS) - Vetec
- ácido acético - Vetec
- ácido clorídrico - Vetec
- ácido nicotínico - manipulada (Farmácia Reativa/ Araraquara)
- ácido tricloroacético - Vetec
- ácido trifluoroacético - Vetec
- acrilamida - Sigma-Aldrich
- ágar - Himedia
- ágar batata dextrose (PDA) - Acumedia
- álcool etílico - Vetec
- amido solúvel - Synth
- amilase - Sigma-Aldrich
- azeite de oliva extra virgem - Torre de Quintela
- carbonato de sódio - Vetec
- caseína - Reagen
- cloreto de cálcio diidratado - Reagen
- cloreto de níquel hexidratado - Synth
- cloreto de potássio - J. T. Baker
- cloreto de sódio - Vetec

- cola - Super Bonder
- *D*-glicose - Synth
- dodecilsulfato de sódio (SDS) - J. T. Baker
- emulsão de ovo - Dinâmica
- ergosterol - Fluka
- extrato de levedura - Himedia
- extrato de malte - Himedia
- farinha de soja - Jasmine
- fluoreto de fenilmetilsulfonato (PMSF) - Sigma-Aldrich
- fosfato de potássio dibásico - Synth
- fosfato de potássio monobásico - Synth
- gesso pedra - Gesso-Rio
- goma arábica - Synth
- gluconato de clorexidina - manipulada (Farmácia Santa Paula/ Araraquara)
- hexano - Vetec
- hidrocloreto de tiamina - Inlab
- hidróxido de potássio - Merck
- hidróxido de sódio - Vetec
- isolante - Cel-lac
- isopropanol - Synth
- lipase - Sigma-Aldrich
- negro de amido - Inlab
- nitrato de sódio - Teclab

- *p*-formaldeído - Fluka
- peptona - Merck
- persulfato de amônio - Synth
- massa molecular - Invitrogen
- microtubos - Eppendorf
- papel de filtro - Wathman nº1
- *p*-nitrofenilpalmitato (pNPP) - Sigma-Aldrich
- *p*-nitrofenol (PNP) - Sigma-Aldrich
- placas de 96 orifícios - TPP
- ponteiros descartáveis para volume de 5 a 200 µL e 200 a 1000 µL
- pó de casca de camarão - Sigma-Aldrich
- protease - Sigma-Aldrich
- reagente de Bradford - Sigma-Aldrich
- reagente de Folin Ciocalteu - Imbralab
- resina para prótese - Vipi Wave
- riboflavina - manipulada (Farmácia Reativa/ Araraquara)
- sabouraud dextrose ágar (SDA) com cloranfenicol - Himedia
- sacarose - Synth
- silicone de condensação - Indurent gel
- solução completa de inibidor de protease - Sigma-Aldrich
- soro albumina bovina - Sigma-Aldrich
- soro bovino fetal - Cultlab
- sulfato de amônio - Synth

- sulfato de cobre - Reagen
- sulfato de cobre penta-hidratado - Vetec
- sulfato de magnésio - Sigma-Aldrich
- sulfato de magnésio hepta-hidratado - Sigma-Aldrich
- sulfato de zinco hepta-hidratado - Synth
- sulfato ferroso hepta-hidratado - Reagen
- tartarato de sódio e potássio - Vetec
- temed - J. T. Baker
- tirosina - Sigma-Aldrich
- triton® x-100 - Teclab
- trizma base - Sigma-Aldrich
- vaselina - Rioquímica
- tubos plástico cônicos tipo Falcon - TPP
- vidrarias em geral
- yeast nitrogen base (YNB) - Himedia

4.1.2- Equipamentos

- agitador de tubos tipo vórtex- Vision
- agitador magnético - Fisatom
- agitador orbital com aquecimento “shaker” - Tecnal
- autoclave vertical - Fabbe
- balança analítica - Micronal
- balança semi-analítica - Owa Labor
- banho-maria- Callmex

- bico de Bunsen
- biorreator - Tecnal
- bloco de aquecimento - Bio Plus
- bomba de vácuo - Motores Elétricos Brasil
- broca maxicut - Edenta
- câmara de fluxo laminar - Veco
- câmara de Neubauer - Boeco
- câmara de ultravioleta 254 nm UV - Prodicil
- centrífuga 5804R - Eppendorf
- contador de colônias- Phoenix
- cuba de eletroforese - SciePlas
- espectrofotômetro UV- Shimadzu
- estufa de secagem - Fanem
- leitor de microplacas - Thermo
- liofilizador- Solab
- microfiltros - Millipore
- micropipetas e multicanais com volume ajustável de 5 a 50 μL , 40 a 200 μL ,
200 a 1000 μL - High tech lab
- microscópio de varredura eletrônica - JEOL JSM-6610LV
- microscópio óptico - Carl Zeiss Jena
- mufla - Vipi STG
- paquímetro digital - Dass
- peagômetro - Phtek

- prensa hidráulica – Vipi Delta máquinas
- rugosímetro digital portátil - Surfctest SJ-400
- sistema de purificação de água Milli Q - Millipore
- speedvac – Thermo

4.2- Metodologias

4.2.1. Micro-organismos

Cepas industriais dos fungos *Beauveria bassiana* (CG307), *Aspergillus oryzae* (CCF-OIC3919) e *Aspergillus niger* (linhagem industrial) foram utilizadas para a produção das enzimas protease, amilase e lipase, respectivamente. A manutenção destes fungos se deu em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) a 28°C com repiques quinzenais. A cepa de *Candida albicans* (ATCC 90028), mantida no cepário do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, foi mantida em *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) e utilizada para a formação de biofilmes.

4.2.2. Obtenção de inóculo para a produção enzimática

Para obtenção dos inóculos, os micro-organismos foram cultivados em placas de Petri, contendo 20 mL de meio PDA e foram incubados por cerca de 10 dias em estufa a 28°C. Após este período, as placas foram raspadas e os esporos foram ressuspensos em água, previamente esterilizada, e contados em câmara de Neubauer para a obtenção da concentração 10^7 esporos/mL, utilizada em todas as produções enzimáticas.

4.2.3. Produção das enzimas

Todas as enzimas foram obtidas por meio de fermentação líquida submersa (SmF) em Biorreator modelo TECBIO- 4,5 L.

4.2.3.1. Protease

O meio de cultura e as condições de cultivo utilizados foram os descritos por Rao et al. (2006), constituído de 30 g dextrose, 10 g peptona suplementado com 10 g de extrato de levedura, 7,2 g de pó de casca de camarão, 6 g de farinha de soja, 1,9 g sacarose dissolvidos em 1 L de água purificada pelo sistema MilliQ. O pH inicial do meio foi ajustado para 7,0, com ácido e/ou base fraca; utilizou-se aeração de 0,6 vvm, 6 dias de agitação com velocidade de 150 rpm e temperatura de 26°C.

4.2.3.2. Amilase

O meio de cultura e as condições de cultivo utilizados foram os descritos por Carlsen e Nielsen (2001), com algumas modificações. Este meio consiste de 5 g de amido solúvel; 0,5 g de peptona; 0,5 g de extrato de levedura; 2,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,75 g KH_2PO_4 ; 1,0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g NaCl ; 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,5 mL solução de traços de metais. Esta solução contém por litro: 14,3 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 13,8 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O pH inicial do meio foi ajustado para 6,0, com ácido e/ou base fraca; utilizou-se aeração de 0,5 vvm; 7 dias de agitação com velocidade de 300 rpm e temperatura de 30°C.

4.2.3.3. Lipase

O meio de cultura e as condições de cultivo utilizados foram os descritos por Mahadik et al. (2004). Este meio consistiu de: 0,5 g de NaNO_3 ; 0,5 g de MgSO_4 ; 0,5 g de KCl ; 2,0 g de K_2HPO_4 ; 2,0 g de glicose; 0,5 g de extrato de levedura; 10 g de azeite de oliva extra virgem; 3,0 g de extrato de malte e 5,0 g de peptona, dissolvidos em 1 L de água purificada pelo sistema MiliQ. O pH inicial do meio foi ajustado para 5,5, com ácido e/ou base fraca; utilizou-se aeração 1,5 vvm; 7 dias de agitação com velocidade de 200 rpm e temperatura 28°C.

4.2.4. Recuperação das enzimas

Após a produção, os extratos enzimáticos foram filtrados em papel de filtro de 0,45 μm para retirada da biomassa. Determinou-se o peso úmido da biomassa produzida e o peso seco após secagem em estufa a 50°C e obtenção de peso constante. O filtrado foi armazenado a -20°C para posteriores análises.

4.2.5. Métodos analíticos

4.2.5.1. Determinação do coeficiente de extinção molar

As curvas analíticas realizadas para todos os métodos de determinação de concentração de proteínas e atividades enzimáticas foram baseadas em soluções-padrão, com substâncias específicas para cada caso, com concentrações de 0,1 a 2 mg/mL, e que foram submetidas ao mesmo procedimento das amostras. A determinação do coeficiente de extinção molar foi baseada na lei de Lambert-Beer e se deu da seguinte maneira: o gráfico da curva da absorbância x concentração da

amostra ($\mu\text{mols/mL}$) foi traçado e determinado o coeficiente angular. O coeficiente de extinção molar (ϵ) foi determinado a partir da seguinte equação: $A = \epsilon \cdot b \cdot c$, em que A = Absorbância, ϵ = absortividade, b = caminho óptico (1 cm) e c = concentração. Como $b = 1$, obtivemos: $\epsilon = A \div c$, em que ϵ é dado por $\mu\text{mols} \cdot \mu\text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Os resultados de ϵ obtidos foram os seguintes: para a curva de albumina de soro bovino, obteve-se $\epsilon = 0,0015$; para a curva de tirosina $\epsilon = 0,001$; para a curva de glicose $\epsilon = 0,002$ e para a curva de *p*-nitrofenol $\epsilon = 0,0067$.

4.2.5.1.2. Determinação de proteínas pelo método de Lowry

As amostras foram diluídas na proporção 1:10 em água MilliQ e adicionadas de 5 mL do reagente de Lowry. Incubou-se a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL do reagente de Folin Ciocalteu previamente diluído na proporção 1:1 em água MilliQ. Após uma hora procedeu-se a leitura em 660 nm em espectrofotômetro e as proteínas foram quantificadas empregando-se uma curva analítica contendo albumina de soro bovino como padrão. Os reagentes utilizados neste método foram preparados na hora do uso, da seguinte maneira: 100 mL de Na_2CO_3 a 2% em NaOH 0,1 M, 1 mL de CuSO_4 a 1%, 1 mL de tartarato de sódio e potássio a 1% (LOWRY, 1951).

4.2.5.1.3. Determinação de proteínas pelo método de Bradford

Foram adicionados em tubo de ensaio 50 μL das amostras a serem dosadas e 1,5 mL do reagente de Bradford, adquirido comercialmente. Esta mistura foi

incubada por 5 minutos em temperatura ambiente e procedeu-se a leitura em 595 nm em espectrofotômetro, as proteínas foram quantificadas empregando-se uma curva analítica contendo albumina de soro bovino como padrão (BRADFORD, 1976).

4.2.5.1.4. Determinação da atividade de protease

A quantificação da atividade proteolítica foi realizada segundo método descrito por Mahanta et al. (2008), utilizando caseína como substrato: 500 µL do extrato enzimático ou da enzima ressuspensa em tampão TrisHCl (pH 8,0) foi adicionado em um tubo contendo 3 mL da solução do substrato (0,6% de caseína em 0,1 M em tampão TrisHCl pH 8,0) e incubados a 37°C por 20 min. A reação foi interrompida pela adição de 3,2 mL de TCA e mantido em temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida filtrado em papel de filtro Wathman nº1. A absorvância do filtrado foi medida em 280 nm contra o branco que foi preparado conforme a reação da amostra, exceto pela adição do extrato enzimático ter sido realizada somente após a interrupção pela adição de TCA, além disso, esse extrato enzimático passou por processo prévio de desnaturação em banho fervente por 15 minutos. Em seguida, a atividade enzimática foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{absorbância}_{(280 \text{ nm})} \times \text{vol. ensaio}}{\varepsilon \times \text{tempo}_{(\text{min})} \times \text{vol. amostra}}$$

Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de tirosina por minuto conforme as condições experimentais.

4.2.5.1.5. Determinação da atividade de amilase

A quantificação da atividade enzimática foi realizada segundo o método descrito por Kammoun et al. (2008), com modificações, utilizando amido solúvel como substrato: 50 μL do extrato enzimático ou da enzima ressuspensa em tampão acetato (pH 5,6) foram adicionados a um tubo contendo 500 μL de solução de amido solúvel a 1% em tampão acetato (pH- 5,6), esta mistura foi incubada a 60°C por 30 minutos. Em seguida, os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) segundo Miller (1959). Em seguida, a atividade enzimática foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{absorbância}_{(540 \text{ nm})} \times \text{vol. ensaio}}{\varepsilon \times \text{tempo}_{(\text{min})} \times \text{vol. amostra}}$$

Uma unidade de amilase foi expressa como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de glicose por minuto de reação conforme as condições descritas.

4.2.5.6. Determinação da atividade de lipase

A quantificação da atividade enzimática foi realizada segundo o método descrito por Ertugrul et al. (2007), com modificações, que utiliza *p*-nitrofenilpalmitato (pNPP) como substrato: 405 μL de tampão (200 mg de Triton

X-100, 50 mg de goma arábica em 50 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 6,5) e 45 µL de substrato (15 mg de pNPP em 10 mL de isopropanol). A mistura foi pré-aquecida a 40 °C, e então 50 µL do extrato enzimático ou da enzima ressuspendida em tampão foram adicionados. Depois de 5 minutos de incubação, a reação foi interrompida com a adição de 0,5 mL de Trizma base 2%. A solução foi centrifugada a 14000 g por 3 min, e a densidade óptica do sobrenadante foi medida a 410 nm, medindo a quantidade de *p*-nitrofenol (PNP) liberado. Em seguida, a atividade enzimática foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{absorbância}_{(410 \text{ nm})} \times \text{vol. ensaio}}{\varepsilon \times \text{tempo}_{(\text{min})} \times \text{vol. amostra}}$$

Uma unidade de atividade enzimática foi expressa como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto de reação conforme as condições descritas.

4.2.6. Precipitação por fracionamento salino

Após a recuperação das enzimas, o material resultante foi fracionado com sulfato de amônio, triturado em almofariz, com saturação de 80% de acordo com a tabela de fracionamento com sulfato de amônio sólido (DAWSON et al., 1969). Esta concentração de saturação corresponde à utilizada comumente em trabalhos de caracterização das mesmas enzimas produzidas neste estudo (CARVALHO et al., 2005; DENG et al., 2010; HAN et al., 2013).

O sulfato de amônio foi adicionado lentamente às enzimas recuperadas, até atingir o índice de saturação desejado, em seguida o extrato foi deixado em

repouso durante de 12 horas em geladeira e centrifugado por 20 min a 14000 g a 4°C. Os precipitados foram suspensos nos mesmos tampões empregados na determinação da atividade enzimática. Em seguida o extrato foi levado à diálise para retirada do sulfato de amônio, sob agitação e refrigeração por 24 horas contra os tampões citados acima de acordo com cada enzima, fazendo-se três trocas. Ao final da diálise, o extrato foi congelado e liofilizado e estas amostras foram mantidas em freezer a -20°C.

4.2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

O liofilizado, de cada enzima, proveniente do processo de precipitação, foi ressuspenso nos tampões adequados para avaliação do perfil proteico, através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Além disso, utilizou ainda marcador de massa molecular, adquirido comercialmente. Foram empregados para tanto, gel de empilhamento de 5% e gel de separação de 12%. Os géis foram confeccionados utilizando-se placa de vidro medindo 10 x 10 x 0,75 cm. As Tabelas 1 e 2 trazem as concentrações e quantidades utilizadas de cada reagente. A corrida eletroforética foi realizada com tampão composto por Tris 0,075 M pH 8,3, glicina 0,57 M e SDS 0,1% e a voltagem inicialmente utilizada foi de 80 V, até a penetração no gel de separação e, a seguir, 120 V até o final do gel. Para o cálculo de concentração de aplicação de cada enzima no gel foram utilizados os dados obtidos na determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford. As três enzimas foram aplicadas no gel nas concentrações de 25 µg/mL e 65 µg/mL de proteínas. O gel foi revelado por

nitrate de prata, conforme metodologia descrita na literatura (HEUKESHOVEN e DERNICK, 1985).

Tabela 1: Gel de Empilhamento a 5%

Reagentes	Quantidade
Água purificada	5,5 mL
Acrilamida 30%	1,3 mL
Tris HCl 1,0 M pH 6,8	1,0 mL
SDS 10%	80 µL
Persulfato de Amônio 10%	80 µL
Temed	8 µL

Tabela 2: Gel de separação a 12%

Reagentes	Quantidade
Água purificada	6,6 mL
Acrilamida 30%	8,0 mL
Tris HCl 1,5 M pH 8,8	5,0 mL
SDS 10%	200 µL
Persulfato de Amônio 10%	200 µL
Temed	8 µL

4.2.8. Aplicação biotecnológica

As enzimas protease, amilase e lipase, produzidas neste estudo (PP/AP/LP), respectivamente, foram avaliadas quanto à sua efetividade na redução de biofilme formado por *Candida albicans* (ATCC 90028) em diferentes superfícies. Além destas, avaliaram-se também as enzimas protease, amilase e lipase, adquiridas comercialmente (PC/AC/LC) e clorexidina. Realizou-se ainda a análise dos possíveis mecanismos de ação das enzimas produzidas neste estudo.

4.2.8.1. Redução de biofilme de *C. albicans* em microplacas

As células de *C. albicans* foram previamente cultivadas em Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com cloranfenicol, a 37 °C, por 48 horas. Em seguida, as células recém cultivadas foram transferidas para o meio Yeast Nitrogen Base (YNB) com 100 mM de glicose e foram novamente incubadas a 37 °C, por 12-18 horas.

Após este período as células foram centrifugadas a 5000 g por 5 minutos e lavadas duas vezes com solução tamponada de fosfato (PBS). As densidades ópticas das suspensões de *C. albicans* foram padronizadas na concentração de 10⁷ cel/mL que corresponde a uma unidade de D.O. das suspensões.

O biofilme de *C. albicans* foi formado em microplacas de cultura de 96 orifícios segundo DOVIGO et al. (2011a,b), em que alíquotas de 100 µL das suspensões padronizadas do micro-organismo foram transferidas para orifícios da placa de cultura e incubados por 90 minutos (fase de adesão), a 37 °C, em agitador orbital (75 rpm). Após esse período, os orifícios foram lavados duas vezes com 150 µL de PBS. Em seguida, 150 µL do meio de cultura YNB com 100 mM de glicose foram adicionados nos orifícios e mantidos por 24 horas, e em outra ocasião por 48 horas, em agitador orbital (37 °C; 75 rpm), para desenvolvimento do biofilme.

Após a formação do biofilme, procedeu-se a duas lavagens com 200 µL de PBS para remoção de células não aderidas e as enzimas produzidas foram avaliadas em diferentes concentrações de acordo com os resultados obtidos nas reações para a determinação das atividades (U/min/mL) encontradas para cada enzima, nas condições de ensaio. As enzimas adquiridas comercialmente,

protease, amilase e lipase, também foram avaliadas em diferentes concentrações, calculadas a partir das atividades específicas, apresentadas em seus rótulos. Além disso, avaliou-se também, a capacidade de clorexidina em reduzir o biofilme em uma faixa de concentração que variou entre 1 mg/mL e 32 mg/mL. As enzimas protease produzida e a protease adquirida comercialmente foram ressuspensas em tampão TrisHCl (pH 8,0), a amilase produzida e a adquirida comercialmente foram ressuspensas em tampão acetato (pH 5,6) e a lipase produzida e a adquirida comercialmente foram ressuspensas em tampão fosfato (pH 6,5) e a influência desses tampões na redução de biofilme também foi analisada. Realizou-se ainda um controle sem tratamento.

Os testes foram realizados frente a biofilmes de 24 e 48 horas com exposição de 30 e 60 minutos, mantidos a 37 °C e sob agitação de 75 rpm.

A viabilidade celular em todas as condições experimentais foram avaliadas por meio do ensaio de redução de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-hidróxido-tetrazólio (XTT) comparando-se os biofilmes tratados aos controle sem tratamento. Para este ensaio, as amostras avaliadas foram removidas e a solução de XTT (200 µL) foi adicionada em cada orifício. As placas foram incubadas no escuro a 37°C por 3 h, e, em seguida uma alíquota de 100 µL da reação do XTT (sobrenadante) obtida em cada orifício foi transferida para o orifício de uma placa de leitura. O XTT sofre reação de redução do sal de tetrazólio a formazan, por ação das desidrogenases mitocondriais das células viáveis, resultando em uma reação colorimétrica, que permite a medida

espectrofotométrica com filtro em 492 nm (DOVIGO et al., 2011a,b). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

4.2.8.2. Contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de biofilme de *C. albicans* em microplacas

Após o contato das amostras avaliadas, enzimas e clorexidina, cada orifício da microplaca foi umedecido com 100 µL de PBS, além dos orifícios correspondentes aos controles sem tratamento e tampões, com o auxílio de hastes flexíveis com algodão nas extremidades, previamente esterilizados, o biofilme do fundo foi removido vigorosamente durante 10 segundos. Estas hastes foram então transferidas para um tubo de microcentrífuga contendo 900 µL de solução salina (NaCl 0,9%), e agitado em agitador vigorosamente durante 1 minuto para que houvesse o correto desprendimento das células. Em seguida, procedeu-se a uma diluição seriada. Alíquotas de cada diluição foram plaqueadas em SDA com cloranfenicol, as placas foram, então, incubadas em estufa a 37 °C ±1 °C por 72 horas, para contagem das unidades formadoras de colônia e determinação da redução do crescimento do micro-organismo. As análises foram realizadas em triplicatas.

4.2.8.3. Confeção dos corpos de prova

Utilizou-se resina para prótese cor-de-rosa, específica para micro-ondas em matrizes metálicas vazadas, com 10 orifícios, cada um com 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura.

A parte inferior da mufla foi isolada com isolante e preenchida com gesso pedra melhorado, sobre o qual, imediatamente, foi posicionada uma placa de vidro jateada com óxido de alumínio, cuja rugosidade aproxima-se de 3,0 μm , simulando a rugosidade encontrada na superfície interna de próteses. A matriz metálica contendo 10 orifícios foi fixada no vidro com cola e ao redor desta matriz colocou-se silicone de condensação. Sobre esta matriz foi fixada outra placa de vidro jateada com óxido de alumínio e a contra-mufla foi posicionada e preenchida com gesso, finalizando a inclusão.

Após a prensa, a mufla foi aberta e obteve-se a matriz em posição para a confecção dos corpos de prova, em seguida a matriz foi isolada com vaselina, e a resina foi preparada segundo as instruções do fabricante. Após o período de incorporação e homogeneização, a resina na fase plástica foi inserida nos orifícios da matriz. Em seguida, a mufla foi levada à prensa hidráulica e submetida à pressão de 1 tonelada por 30 minutos. Logo após, iniciou-se o processo de polimerização em micro-ondas que consiste de 20 minutos na potência baixa e 5 min na potência alta. Após o resfriamento da mufla, à temperatura ambiente, a mesma foi aberta, os corpos de prova foram retirados e os excessos laterais removidos com o auxílio de broca maxicut em baixa rotação.

Realizaram-se quatro leituras de rugosidade nos corpos de prova (duas de cada lado) por meio do rugosímetro digital portátil. A resolução utilizada foi de 0,01 μm , com velocidade de 0,5 mm/s, comprimento transversal de 2,4 mm e aferições em intervalos “cutoff length” de 0,8 mm.

Todos os corpos de prova foram confeccionados dentro de condições assépticas, porém, para garantir a eliminação dos possíveis micro-organismos presentes após a confecção, os mesmos foram esterilizados por meio de óxido de etileno (ACECIL- Central de Esterilização Com. Ind. Ltda).

4.2.8.4. Efetividade de redução de biofilme de *C. albicans* dos corpos de prova e contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL)

As células de *C. albicans* foram previamente cultivadas em SDA com cloranfenicol, a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, por 48 horas. Em seguida, as leveduras recém cultivadas foram transferidas para o meio YNB com 100 mM de glicose e foram novamente incubadas a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, por 12-18 horas.

Após este período as células foram centrifugadas a 5000 g por 5 minutos e lavadas duas vezes com PBS. As densidades ópticas das suspensões de *C. albicans* foram padronizadas na concentração de 10^7 cel/mL.

Para a contaminação dos corpos de prova foram utilizados 2 mL da suspensão de *C. albicans* em placas de 24 orifícios a 37 °C sob agitação de 75 rpm em agitador orbital, incubadas por 90 minutos (fase de adesão). Após esse período, os corpos de prova foram lavados em outra placa de 24 orifícios com 2 mL de PBS, duas vezes. Em seguida, os corpos de prova foram transferidos para uma terceira placa de 24 orifícios com 2 mL do meio de cultura YNB com 100 mM de glicose que foi mantida por 24 horas e em outra ocasião por 48 horas, em agitador orbital (37 °C ; 75 rpm), para desenvolvimento do biofilme.

Após a formação do biofilme de 24 e/ou 48 horas os corpos de prova foram novamente lavados (duas vezes) em PBS, para o desprendimento das

células não aderidas, e, em seguida, divididos aleatoriamente, em grupo controle e grupos submetidos ao tratamento.

As avaliações foram realizadas com as enzimas produzidas e as enzimas adquiridas comercialmente conforme cálculos de concentrações realizados para o ensaio em microplacas, porém no melhor tempo de contato (30 ou 60 minutos) e com o dobro da atividade enzimática (U/min/mL) em que houve maior redução de biofilme quando comparados ao controle sem tratamento, observada pelo ensaio de XTT, previamente nos testes em microplacas (DOVIGO et al., 2011).

Além dos corpos de prova utilizados para análise por XTT outros foram empregados para a contagem de UFC/mL. Após o contato com as amostras avaliadas, estes corpos de prova foram transferidos para tubos do tipo Falcon com 4,5 mL de PBS e agitados vigorosamente em agitador durante 1 minuto para que houvesse o correto desprendimento das células. Em seguida, procedeu-se a uma diluição seriada. Alíquotas de cada diluição foram plaqueadas em SDA com cloranfenicol, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 72 horas para determinação da redução do crescimento do micro-organismo. As análises foram realizadas em triplicatas.

4.2.9. Análise de possíveis mecanismos de ação das enzimas

4.2.9.1. Influência das enzimas sobre fatores de virulência de *C. albicans*

As células de *C. albicans* recuperadas na metodologia de UFC em microplacas foram avaliadas quanto aos fatores de virulência através das atividades enzimáticas de fosfolipases e aspartil-proteinases secretoras. Estas são enzimas extracelulares secretadas pelas células de *C. albicans* durante o processo

de infecção com a finalidade de favorecer a penetração de hifas no tecido do hospedeiro. Uma vez que, os meios abaixo empregados, possuem os substratos naturais para tais enzimas observa-se a formação de zonas hialinas ao redor das colônias que foram capazes de secretá-las e que conseqüentemente degradaram esses substratos (MANE et al., 2011; ABACI, 2011; MARTINS et al., 2011).

4.2.9.1.1. Avaliação sobre fosfolipases

O meio Reduced Egg-Yolk Agar (REYA) foi preparado conforme Tabela 3. O meio ágar foi autoclavado e após arrefecimento a 50 °C adicionou-se a emulsão de ovo. Placas de Petri foram inoculadas com alíquotas (5 µL) de suspensão de levedura crescida (10⁸ cel/mL) e deixadas para secar em temperatura ambiente. Após incubação a 37 °C por 5 dias, os diâmetros das colônias e das zonas hialinas ao redor das colônias foram mensurados. A atividade enzimática foi determinada segundo a fórmula abaixo, na qual se obtém o valor denominado de Pz.

$$Pz = \frac{\text{Diâmetro da colônia}}{\text{Diâmetro da colônia} + \text{Zona hialina}}$$

Valores Pz iguais a um (Pz = 1) indicam falta de atividade enzimática e valores menores que um (Pz < 1) indicam os graus de positividade para fosfolipases. Os testes foram realizados também com células não tratadas e em triplicata (MANE et al., 2011; ABACI, 2011; MARTINS et al., 2011).

Tabela 3: Composição do meio Reduced Egg-Yolk Agar.

Reagentes	Quantidade
Água	1 L
Peptona	10 g
<i>d</i> -Glicose	30 g
Cloreto de sódio	57,3 g
Cloreto de cálcio	0,55 g
Ágar	20 g
Emulsão de ovo	160 mL

4.2.9.1.2. Avaliação sobre aspartil-proteinases

O meio Reduced Bovine-Serum-Albumin Agar (RBSAA) foi preparado conforme Tabela 4. O meio albumina foi esterilizado por filtração e o meio ágar foi autoclavado, sendo misturados após arrefecimento a 50 °C. Placas de Petri foram inoculadas com alíquotas (5 µL) de suspensão de levedura crescida (10⁸ cel/mL) e deixadas para secar em temperatura ambiente. Após incubação a 37 °C por 7 dias, os halos foram corados com solução corante, durante 20 minutos, e evidenciados com solução reveladora por mais 20 minutos (Tabela 4), após secagem os diâmetros das zonas hialinas ao redor das colônias foram medidos. A atividade enzimática foi determinada pelo de valor Pz calculado como acima. Valores Pz iguais a um (Pz = 1) indicam falta de atividade enzimática, e valores menores que um (Pz < 1) indicam os graus de positividade das aspartil-proteinases. Os testes foram realizados também com células não tratadas e em triplicata (MANE et al., 2011; ABACI, 2011; MARTINS et al., 2011).

Tabela 4: Composição do meio Reduced Bovine-Serum-Albumin Agar e das soluções corante e reveladora.

Meio albumina	
Reagentes	Quantidade
Água	500 mL
Albumina bovina	1 g
Riboflavina	0,1 g
Ácido nicotínico	0,2 g
Cloridrato de tiamina	0,2 g
Meio ágar	
Água	500 mL
<i>d</i> -Glicose	10 g
Fosfato de potássio	0,50 g
Sulfato de magnésio	0,25 g
Ágar	7,5 g
Solução corante	
Água	1 L
Negro de amido	0,8 g
Ácido acético	500 mL
Metanol	500 mL
Ágar	7,5 g
Solução reveladora	
Água	1 L
Ácido acético	337,5 mL
Metanol	337,5 mL

4.2.9.2. Influência das enzimas sobre ergosterol da parede de *C. albicans*

O ergosterol foi quantificado segundo Arthington-Skaggs et al. (1999) com algumas modificações.

Realizou-se um crescimento prévio de *C. albicans* em YNB por 16 horas a 30 °C ±1 °C e 200 rpm. Após este período, adicionou-se 0,5 mL desta cultura a 50

mL de YNB (DO < 0,2) e incubou-se por mais 16 horas a 30 °C e 200 rpm, antes do término deste período, concentrações conhecidas (não apresentadas) das três enzimas produzidas neste estudo (PP/AP/LP) foram adicionadas aos frascos e deixadas em contato 30 minutos com amilase e lipase e 60 minutos com a protease. Realizou-se ainda um controle sem tratamento.

Após o contato com as enzimas as células foram centrifugadas a 3000 g por 5 minutos e o precipitado celular foi submetido ao processo de lise em frascos de vidro. Adicionou-se 3 mL de solução alcoólica de KOH a 25 %, e agitou-se em agitador vigorosamente durante 1 minuto, em seguida esta solução foi aquecida em banho a 90°C durante 1 hora. Após arrefecimento em temperatura ambiente o ergosterol foi removido por partição, adicionou-se 1 mL de água tipo I e 3 mL de hexano e agitou-se vigorosamente durante 3 minutos, os tubos foram colocados em freezer a -20 °C por 72 horas. A porção superior, que não congela, foi submetida à leitura em espectrofotômetro entre 200 e 300 nm e ainda leituras de absorbância em 281,5 e 230 nm. A presença de ergosterol foi verificada pela visualização de picos correspondentes aos esteróis e a concentração foi calculada com base no peso inicial das células e das absobâncias obtidas. Os testes foram realizados em triplicatas.

4.2.9.3. Influência das enzimas sobre a organização da arquitetura de biofilmes de *C. albicans*

4.2.9.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise por microscopia eletrônica de varredura foi realizada em corpos de prova de resina acrílica. Para tanto, os corpos de prova com biofilmes de 24 e 48 horas, dependendo da ocasião, foram lavados com PBS (duas vezes) e tratados com as três enzimas produzidas neste estudo (PP/AP/LP) em concentrações conhecidas, sendo também analisados controles sem tratamento. Após o período de contato de 30 minutos com amilase e lipase e 60 minutos com protease, os corpos de prova foram transferidos para soluções de fixação. A fixação foi realizada com *p*-formaldeído a 4% durante 1 hora, seguido dos processos de desidratação, onde os corpos de prova foram submersos por 5 minutos em cada uma das seguintes concentrações de etanol: 70%, 85% e 100%. As placas foram então mantidas abertas em temperatura ambiente para a evaporação completa do etanol. Após este período, os corpos de provas foram transferidos para *stubs* metálicos e submetidos ao processo de metalização com ouro coloidal. Posteriormente, os corpos de prova foram examinados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6610LV, operando entre 10-15 kV, no aumento de 1200 vezes, pelo software SMile View™ (SANGETHA et al., 2009).

4.2.10. Análises estatísticas

Os testes desenvolvidos neste estudo foram realizados em triplicatas. Realizou-se análise estatística por ANOVA (Análise de Variância) e considerou-se

os resultados com valor de $p < 0,05$ estatisticamente significantes. Quando possível, aplicou-se o teste comparativo de Tukey.

5. Resultados



5.1. Determinação do peso úmido e peso seco

Na Tabela 5 estão representados os resultados obtidos de peso úmido e peso seco, após pesagem em balança analítica das biomassas resultantes da produção das enzimas protease, amilase e lipase em biorreator.

Tabela 5: Peso úmido e peso seco de biomassas*.

Biomassa	<i>B. bassiana</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i>
Peso úmido	180,85	38,06	34,27
Peso seco	104,63	6,10	14,18

*Biomassa expressa em mg obtida a partir de 3 L de meio de cultivo em diferentes meios e condições de cultivo para cada enzima, conforme descritos no item 4.2.3.

5.2. Precipitação por fracionamento salino

Na Tabela 6 estão representados os resultados observados após a precipitação por fracionamento salino com sulfato de amônio, em saturação de 80% para as enzimas, protease, amilase e lipase. A dosagem de proteínas totais foi realizada por duas metodologias (Lowry e Bradford), porém a de Bradford se mostrou mais sensível e, conseqüentemente, somente os resultados obtidos nesta metodologia foram considerados para o cálculo da atividade específica de cada enzima.

O fator de purificação que revela a capacidade de concentração do sulfato de amônio foi calculado dividindo-se a atividade específica obtida para cada enzima, após precipitação com sulfato de amônio por sua correspondente no

extrato enzimático bruto. Nota-se que a lipase mostrou maior fator de purificação comparada com a protease e amilase.

Tabela 6: Purificação parcial por fracionamento salino.

Etapa da Purificação	Enzimas	Proteína	Atividade	Atividade	Fator de Purificação
		Total (mg)	Enzimática (U/min/mL)	Específica (U.mg ⁻¹)	
Extrato enzimático bruto	Protease	0,183533	27,65	150,65	1
	Amilase	0,007533	6,41	851,71	1
	Lipase	0,0382	11,44	299,47	1
Precipitado com sulfato de amônio e Liofilização	Protease	0,25	147,35	589,4	3,9
	Amilase	0,16	159,32	995,75	1,16
	Lipase	0,0202	45,47	2250,9	7,5

5.3. Perfil eletroforético do precipitado enzimático

O perfil eletroforético do precipitado enzimático está representado na Figura 8. A massa molecular (MM) utilizada contém bandas entre 10-220 kDa. Observa-se que as enzimas foram apenas precipitadas com a presença de bandas de alta e baixa massa moleculares, estas massas estão apresentadas na Tabela 7, para cada coluna. As massas moleculares das bandas apresentadas por cada proteína foram calculadas no sentido da corrida eletroforética, com base na massa molecular padrão.

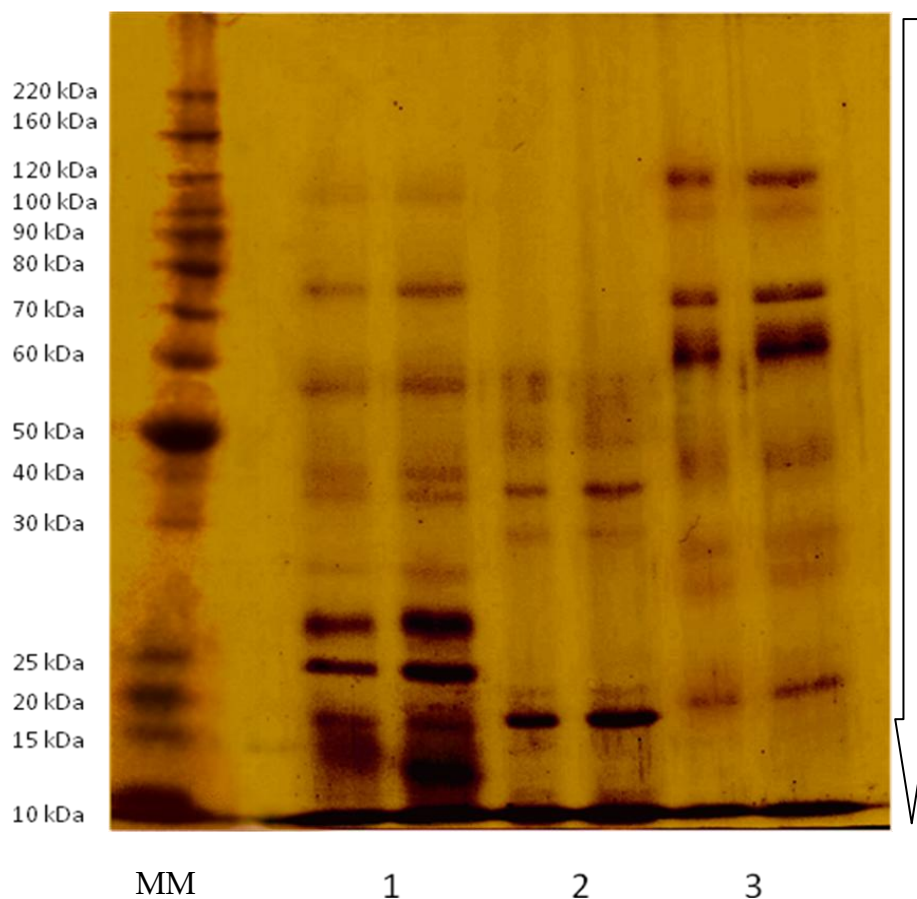


Figura 8: Perfil eletroforético do precipitado enzimático obtido após os processos de produção, em gel SDS-PAGE, corado pela prata. MM: massa molecular; 1- lipase (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 10 bandas; 2- protease (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 9 bandas; 3- amilase (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 8 bandas.

Tabela 7: Massa molecular das bandas encontradas no perfil eletroforético dos precipitados contendo as enzimas lipase (coluna 1), protease (coluna 2) e amilase (coluna 3).

Bandas (sentido da migração)	Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3
	Massa Molecular (kDa)		
1 ^a	117	59	130
2 ^a	80	57	110
3 ^a	58	50	78
4 ^a	44	40	63
5 ^a	40	30	47
6 ^a	28	21	29
7 ^a	26	16	27
8 ^a	23	15	20
9 ^a	19	12	-
10 ^a	14	-	-

5.4. Redução de biofilme de *C. albicans* em microplacas

5.4.1. Capacidade de redução de biofilme por protease

As Figuras 9 e 10 representam os resultados obtidos na redução de biofilmes de *C. albicans* de 24 e 48 horas após o contato com protease produzida neste estudo (PP) e as Figuras 11 e 12 representam os resultados obtidos na redução de biofilmes de *C. albicans* de 24 e 48 horas após o contato com protease adquirida comercialmente (PC), durante 30 e 60 minutos, respectivamente, em

comparação ao controle não tratado. Foi realizado ainda um controle com o tampão utilizado para a diluição das enzimas, revelado com XTT.

Observa-se, na Figura 9, que no contato de 30 minutos em biofilme de 24 horas, as concentrações x; x:2; x:4 e x:8 foram significativamente diferentes do controle não tratado e que o tampão TrisHCl (pH 8,0) empregado para a diluição das enzimas não interferiu nas análises. Nota-se, ainda, que para esse mesmo tempo de contato a PP foi efetiva em todas as concentrações em biofilme de 48 horas. Resultados semelhantes foram observados para o contato de 60 min (Figura 10), porém em biofilme de 24 horas nesse caso somente as concentrações x; x:2 e x:4 se mostraram significativamente diferentes do controle não tratado.

Na Figura 11 observa-se que a enzima PC mostrou-se significativamente diferente em contato de 30 min nas concentrações x e x: 2 enquanto que em biofilme de 48 horas todas as concentrações foram efetivas. Na Figura 12 nota-se efetividade ainda maior frente aos biofilmes obtidos em 24 e 48 h em contato de 60 minutos.

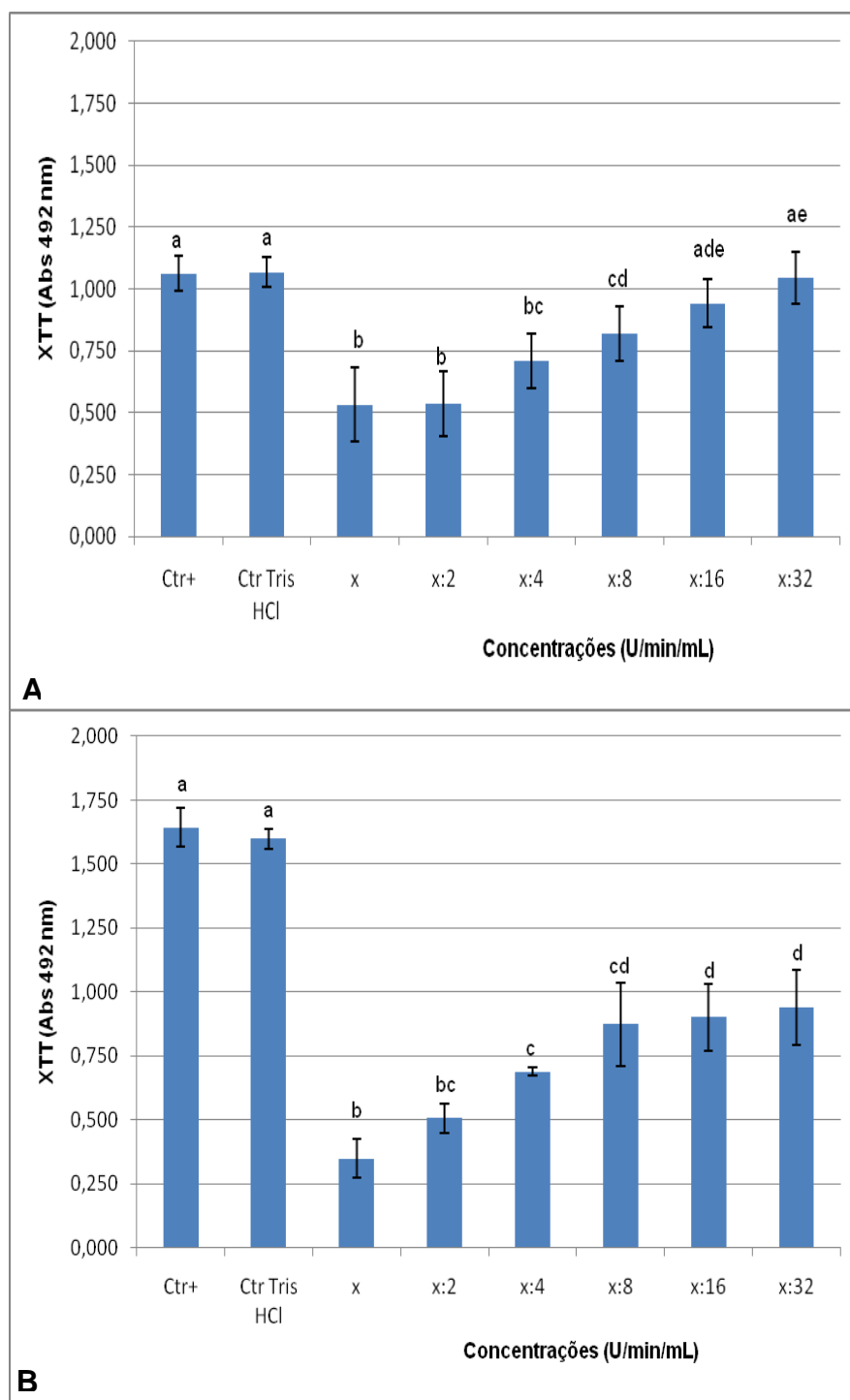


Figura 9: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com PP. Ctr+: controle sem tratamento; Ctr Tris HCl: controle com tampão; x = 30 U/min/mL. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

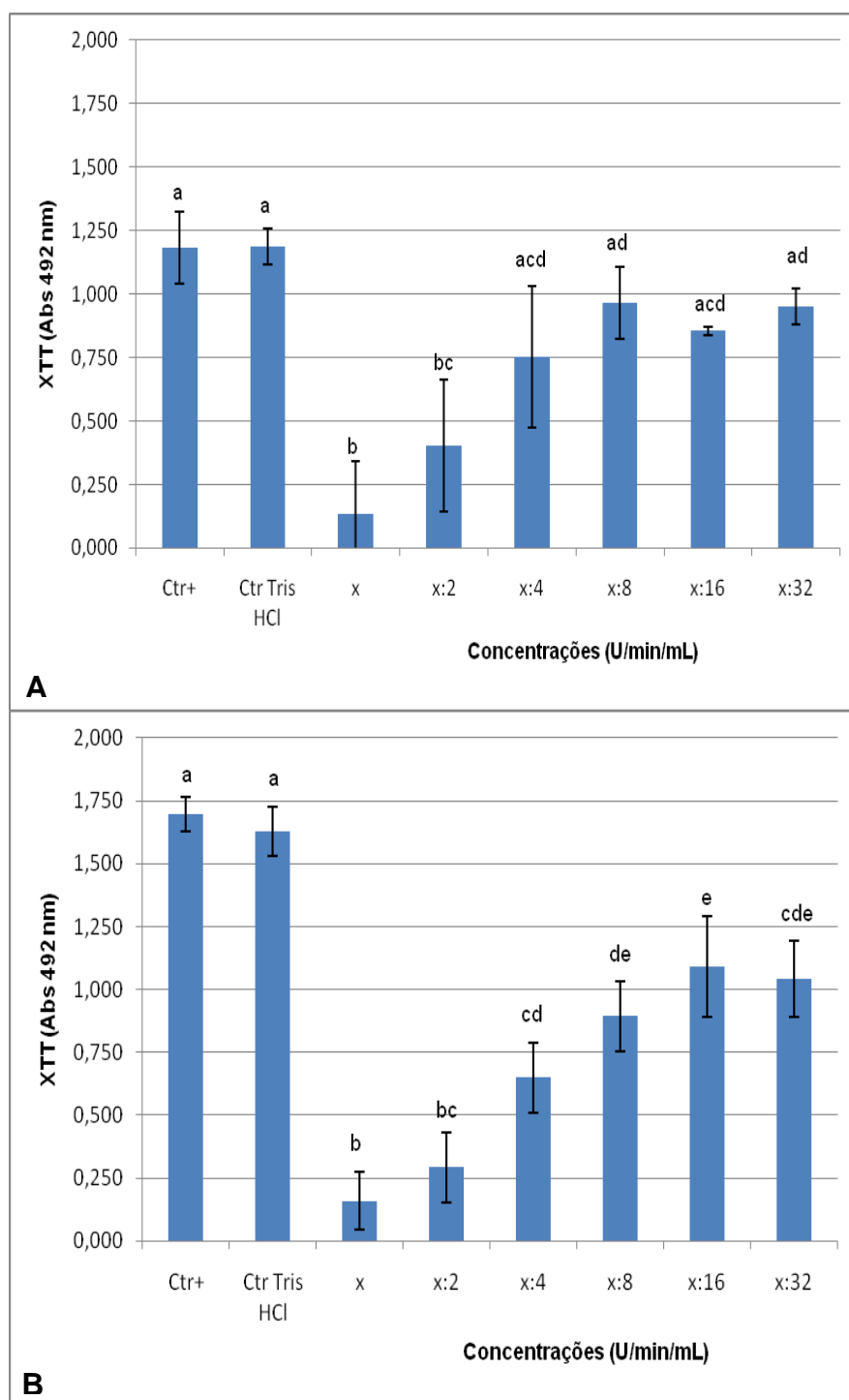


Figura 10: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com PP. Ctrl+: controle sem tratamento; Ctrl Tris HCl: controle com tampão; x = 30 U/min/mL. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

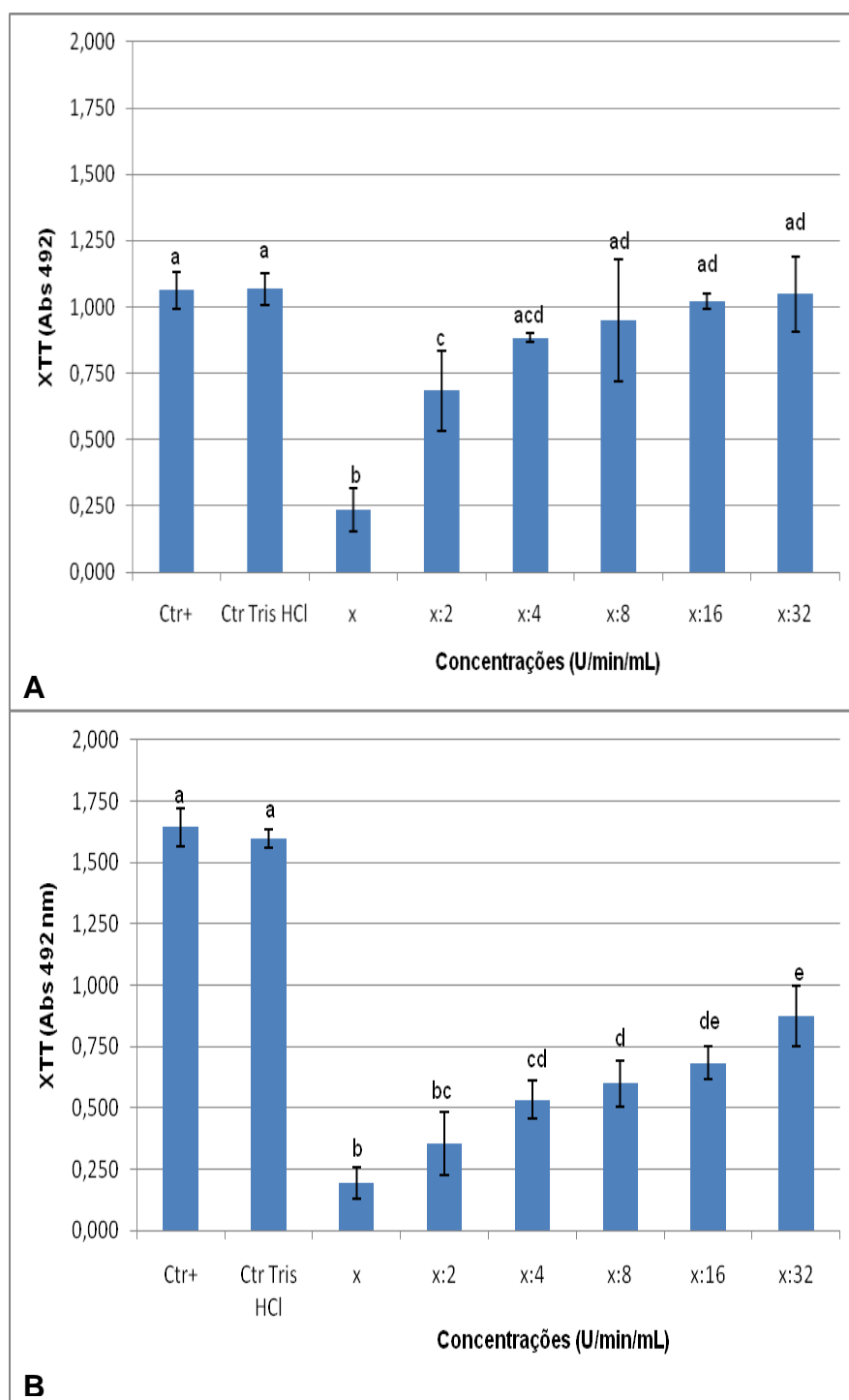


Figura 11: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com PC. Ctrl+: controle sem tratamento; Ctrl Tris HCl: controle com tampão; x = 30 U/min/mL. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

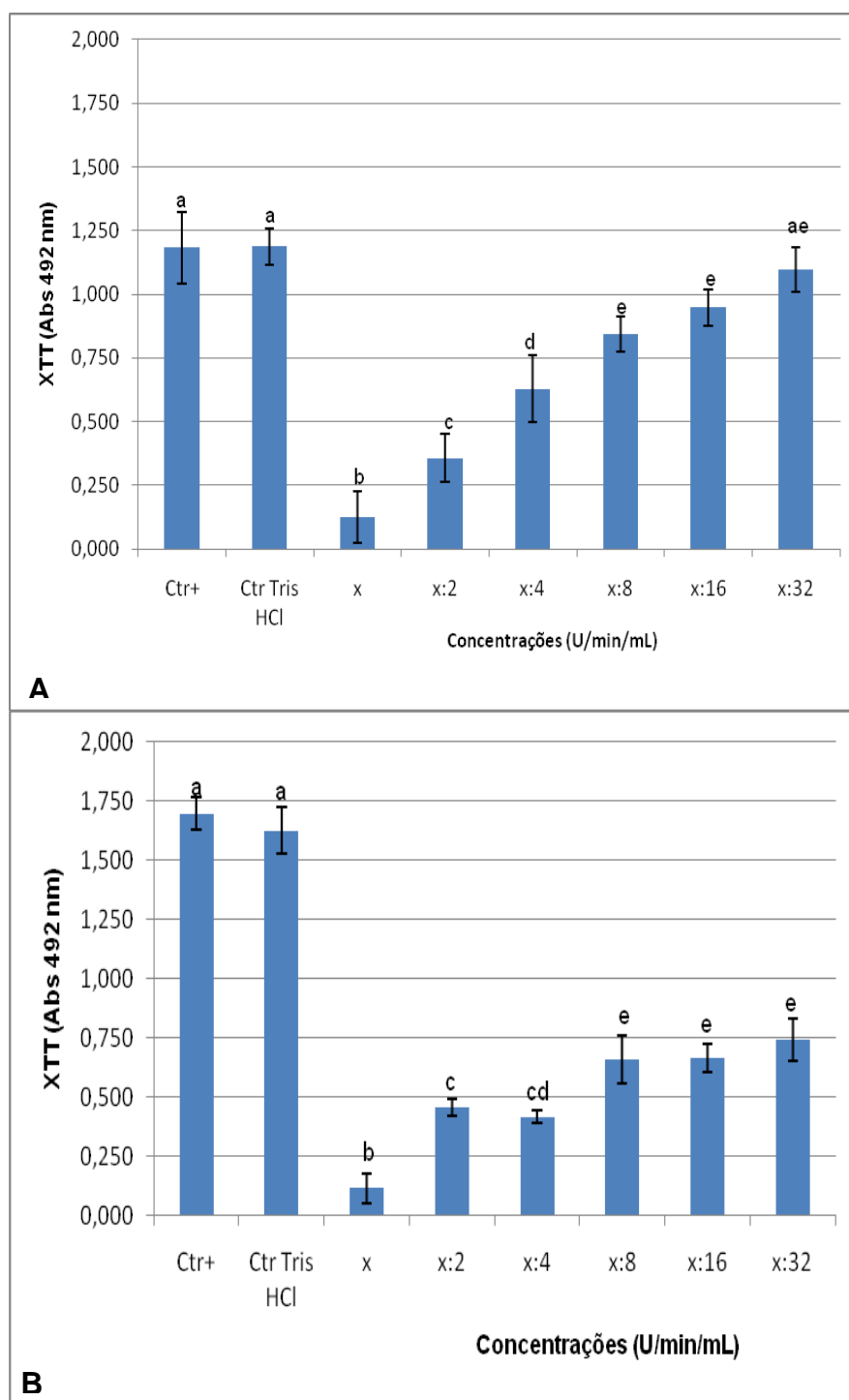


Figura 12: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com PC. Ctrl+: controle sem tratamento; Ctrl Tris HCl: controle com tampão; x = 30 U/min/mL. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.4.2. Capacidade de redução de biofilme por amilase

As Figuras 13 e 14 representam os resultados obtidos na redução de biofilmes de *C. albicans* de 24 e 48 horas após o contato com amilase produzida neste estudo (AP) e as Figuras 15 e 16 representam os resultados obtidos na redução de biofilmes de *C. albicans* de 24 e 48 horas após o contato com amilase adquirida comercialmente (AC), durante 30 e 60 minutos, respectivamente, em comparação ao controle não tratado. Foi realizado ainda um controle com o tampão utilizado para a diluição das enzimas, revelado com XTT.

Observa-se nas Figuras 13 e 14 que a AP neste estudo mostrou-se efetiva no contato de 30 minutos em biofilme de 24 e 48 horas para todas as concentrações e que no contato de 60 minutos as concentrações x; x:2; x:4 e x:8 foram significativamente diferentes em biofilme de 24 horas enquanto que de 48 horas todas as concentrações foram diferentes do controle não tratado e que o tampão acetato (pH- 5,6) não interferiu nas análises.

Nas Figuras 15 e 16 nota-se que a AC foi efetiva nas primeiras concentrações, sobretudo frente a biofilmes de 24 horas e quando comparada com a amilase produzida neste estudo, a redução do biofilme mostrou-se menor em todas as concentrações avaliadas.

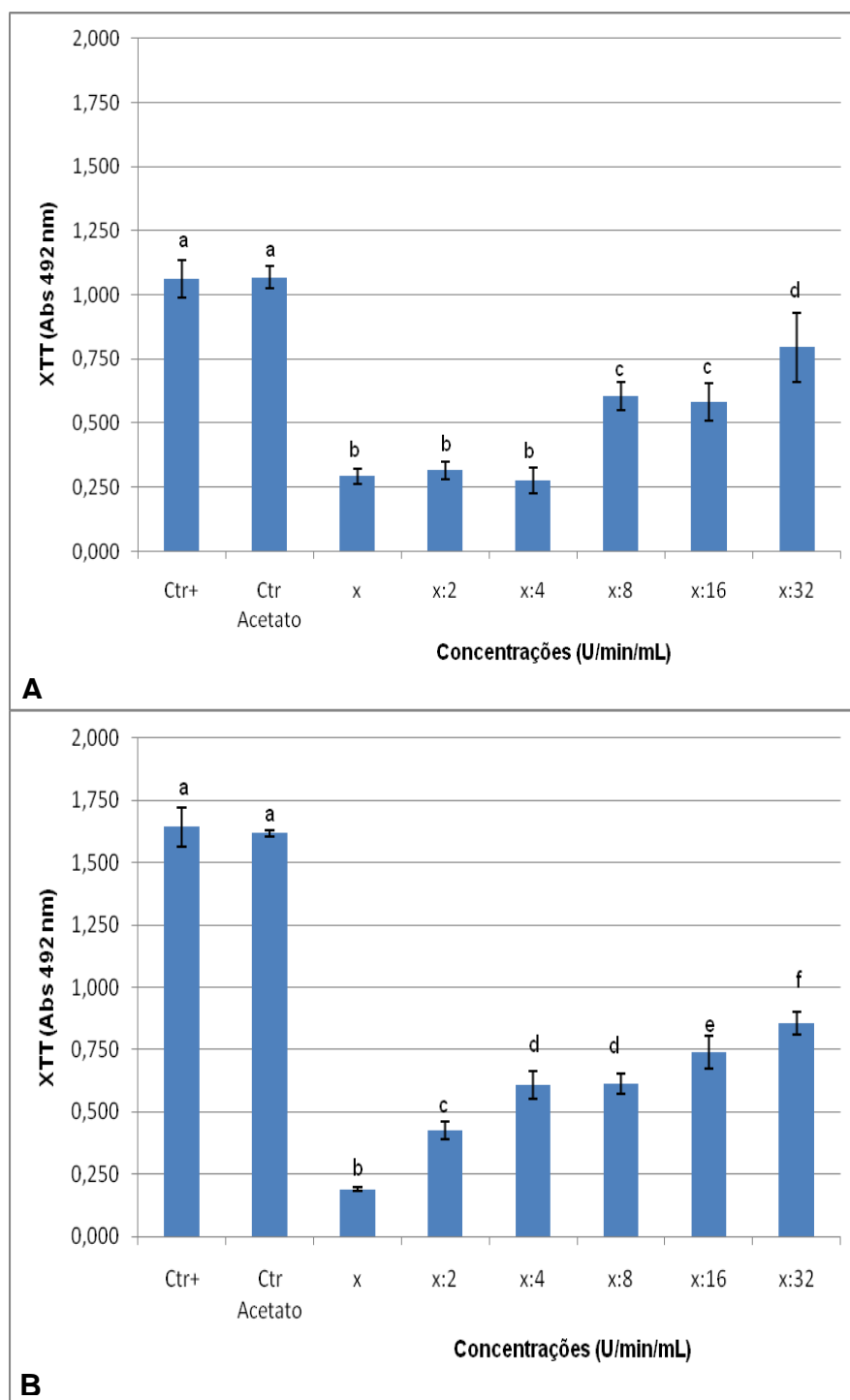


Figura 13: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com AP. Ctrl+: controle sem tratamento; Ctrl Acetato: controle com tampão; x = 30 U/min/mL. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

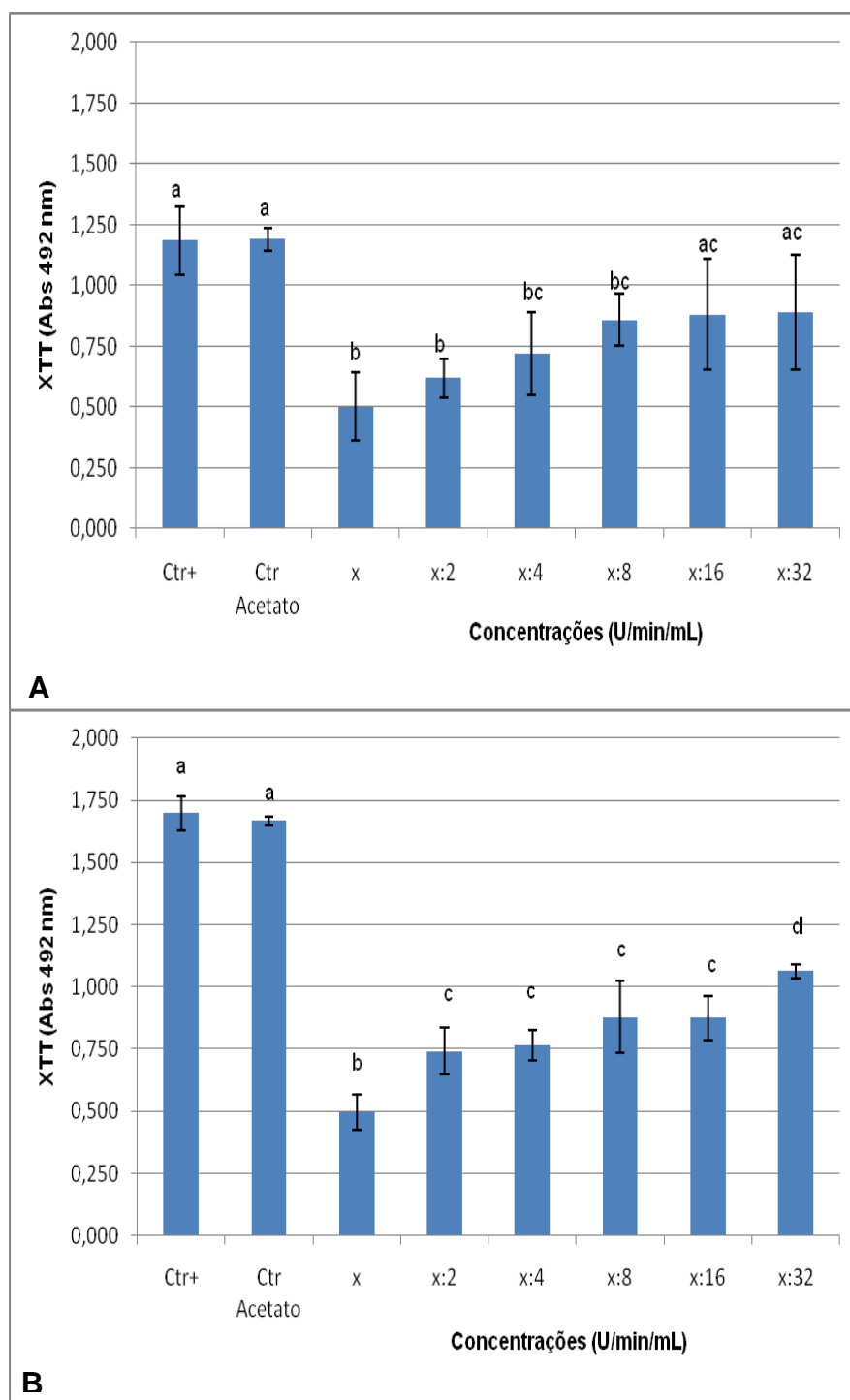


Figura 14: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com AP. Ctrl+: controle sem tratamento; Ctrl Acetato: controle com tampão; x = 30 U/min/mL. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

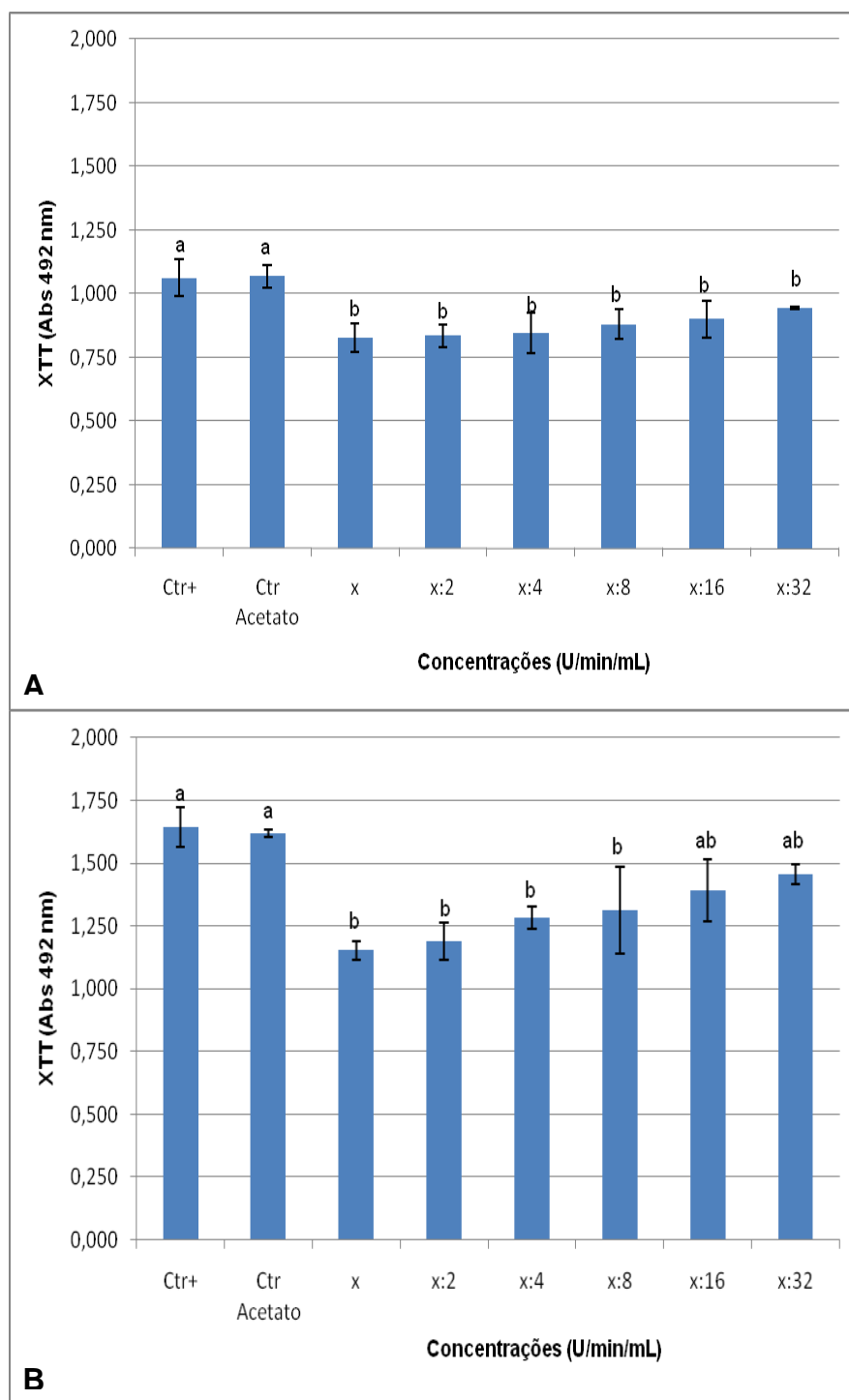


Figura 15: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com AC. Ctrl+: controle sem tratamento; Ctrl Acetato: controle com tampão; x = 30 U/min/mL. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

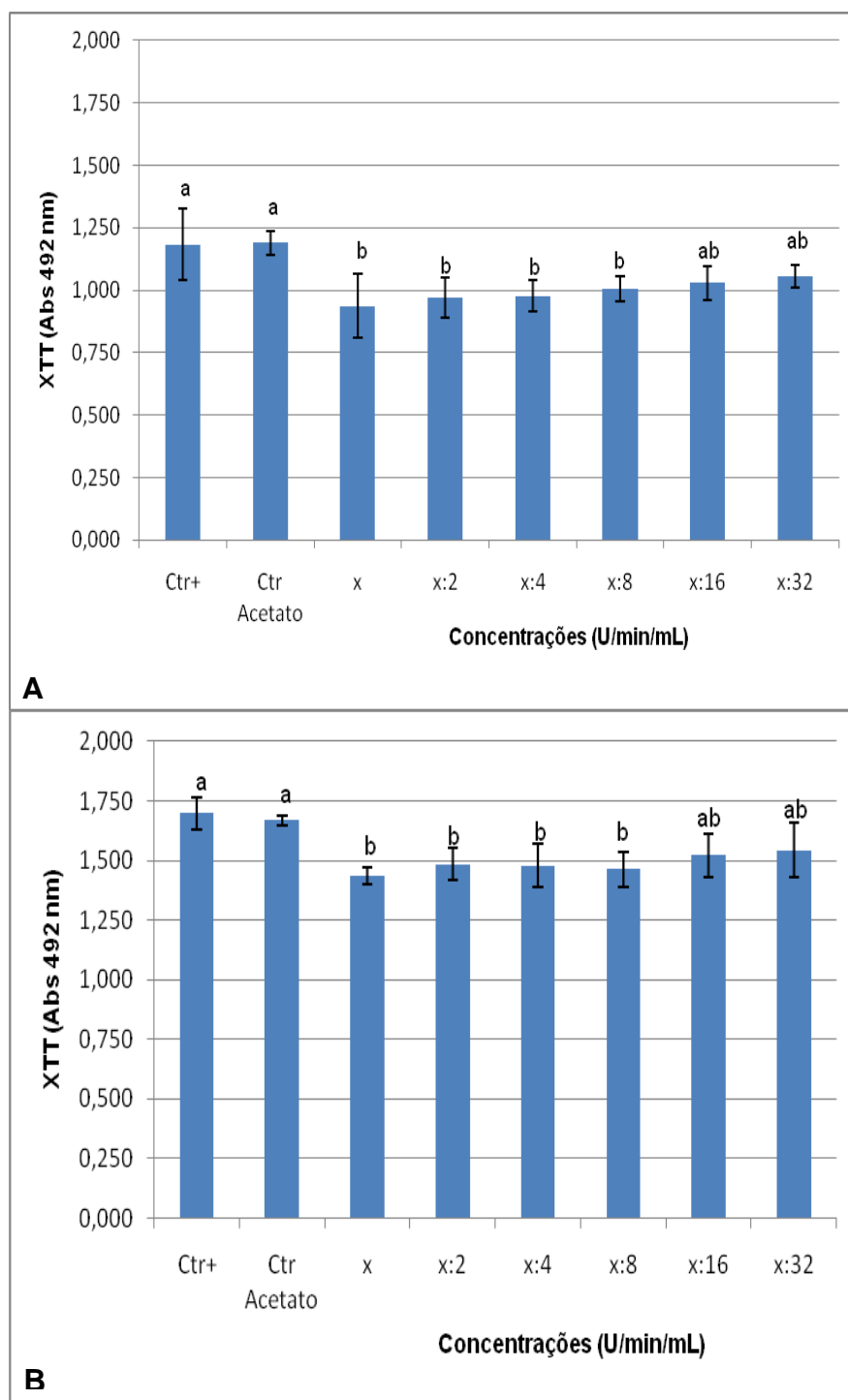


Figura 16: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com AC. Ctr+: controle sem tratamento; Ctr Acetato: controle com tampão; x = 30 U/min/mL. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.4.3. Capacidade de redução de biofilme por lipase

As Figuras 17 e 18 representam os resultados obtidos na redução de biofilmes de *C. albicans* de 24 e 48 horas após o contato com lipase produzida neste estudo (LP) e as Figuras 19 e 20 representam os resultados obtidos na redução de biofilmes de *C. albicans* de 24 e 48 horas após o contato com lipase adquirida comercialmente (LC), durante 30 e 60 minutos, respectivamente, em comparação ao controle não tratado. Foi realizado ainda um controle com o tampão utilizado para a diluição das enzimas, revelado com XTT.

Observa-se que a LP mostrou-se pouco efetiva com significância somente para a concentração x em contato de 30 minutos em biofilme de 24 horas e nas concentrações de x a $x:8$ frente a biofilme de 48 horas. Enquanto que, no contato de 60 minutos, mostrou-se significativamente diferente do controle somente nas concentrações x e $x:2$ em biofilme de 48 horas. Resultados semelhantes foram observados para LC, que se mostrou significativamente diferente do controle não tratado somente em biofilme de 48 horas em contato de 30 minutos. Nota-se ainda, que o tampão fosfato (pH- 6,5) utilizado para diluir as enzimas não influenciou nos resultados.

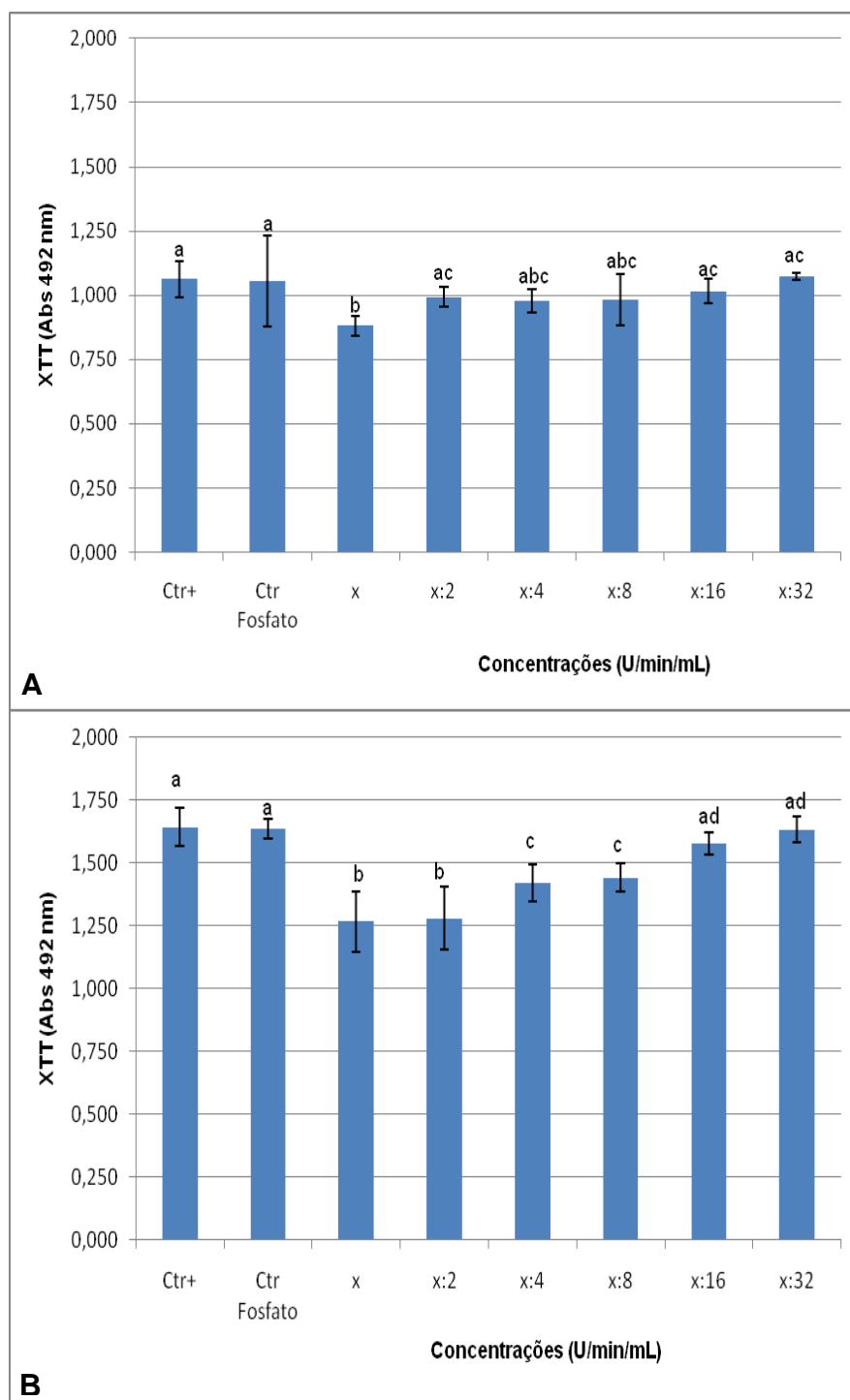


Figura 17: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com LP. Ctrl+: controle sem tratamento; Ctrl Fosfato: controle com tampão; x = 20 U/min/mL. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

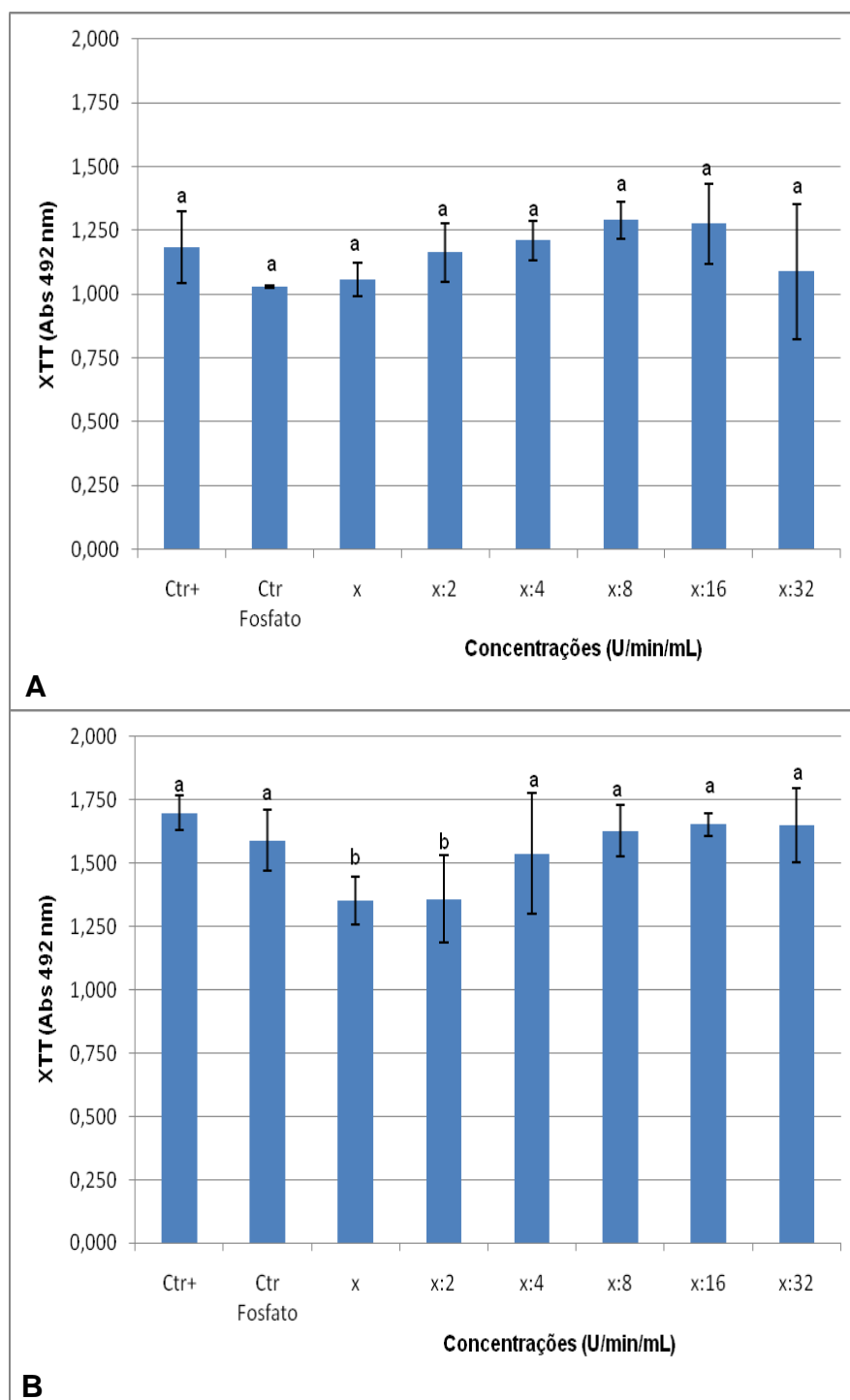


Figura 18: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com LP. Ctr+: controle sem tratamento; Ctr Fosfato: controle com tampão; x = 20 U/min/mL. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

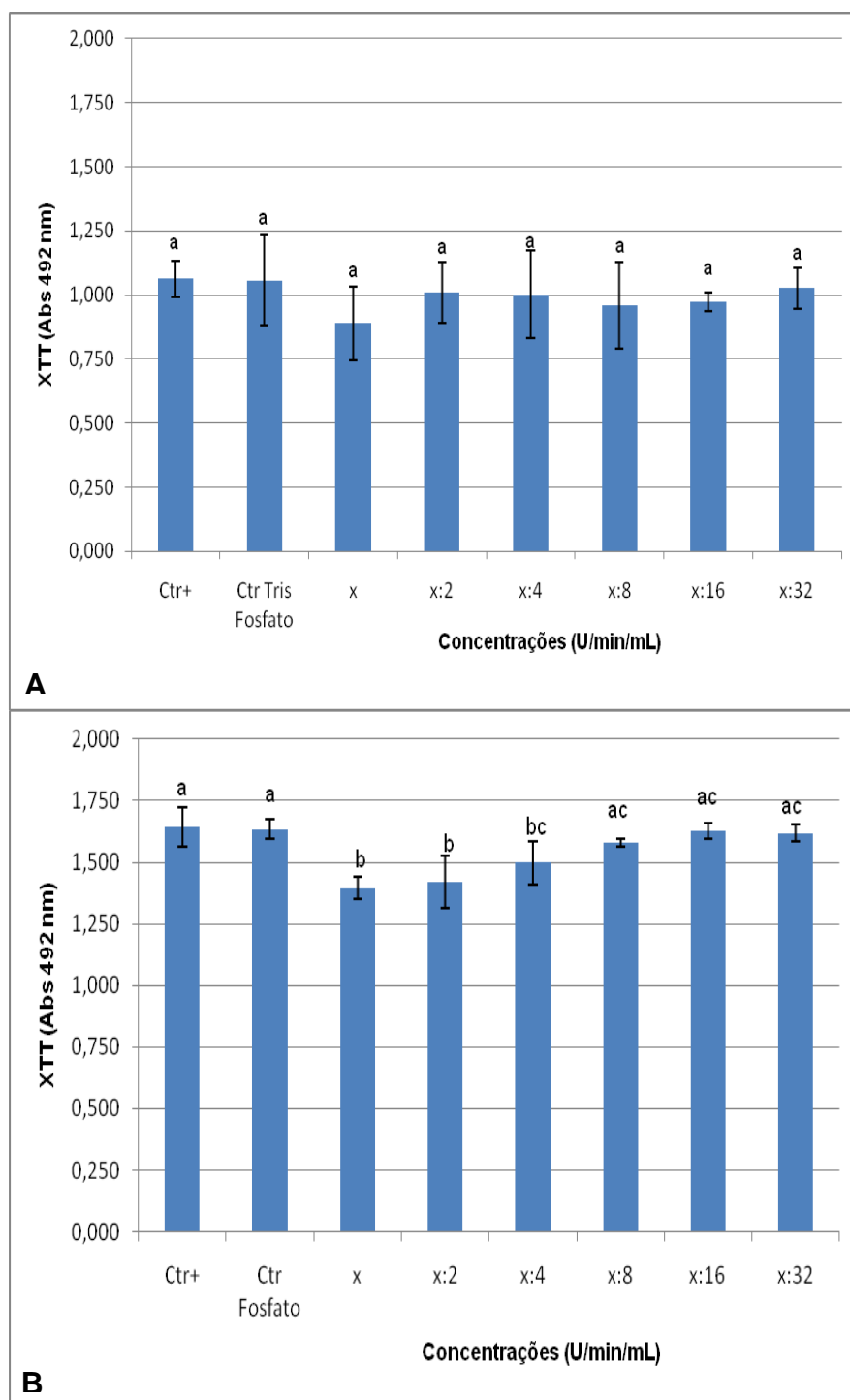


Figura 19: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com LC. Ctrl+: controle sem tratamento; Ctrl Fosfato: controle com tampão; x = 20 U/min/mL. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

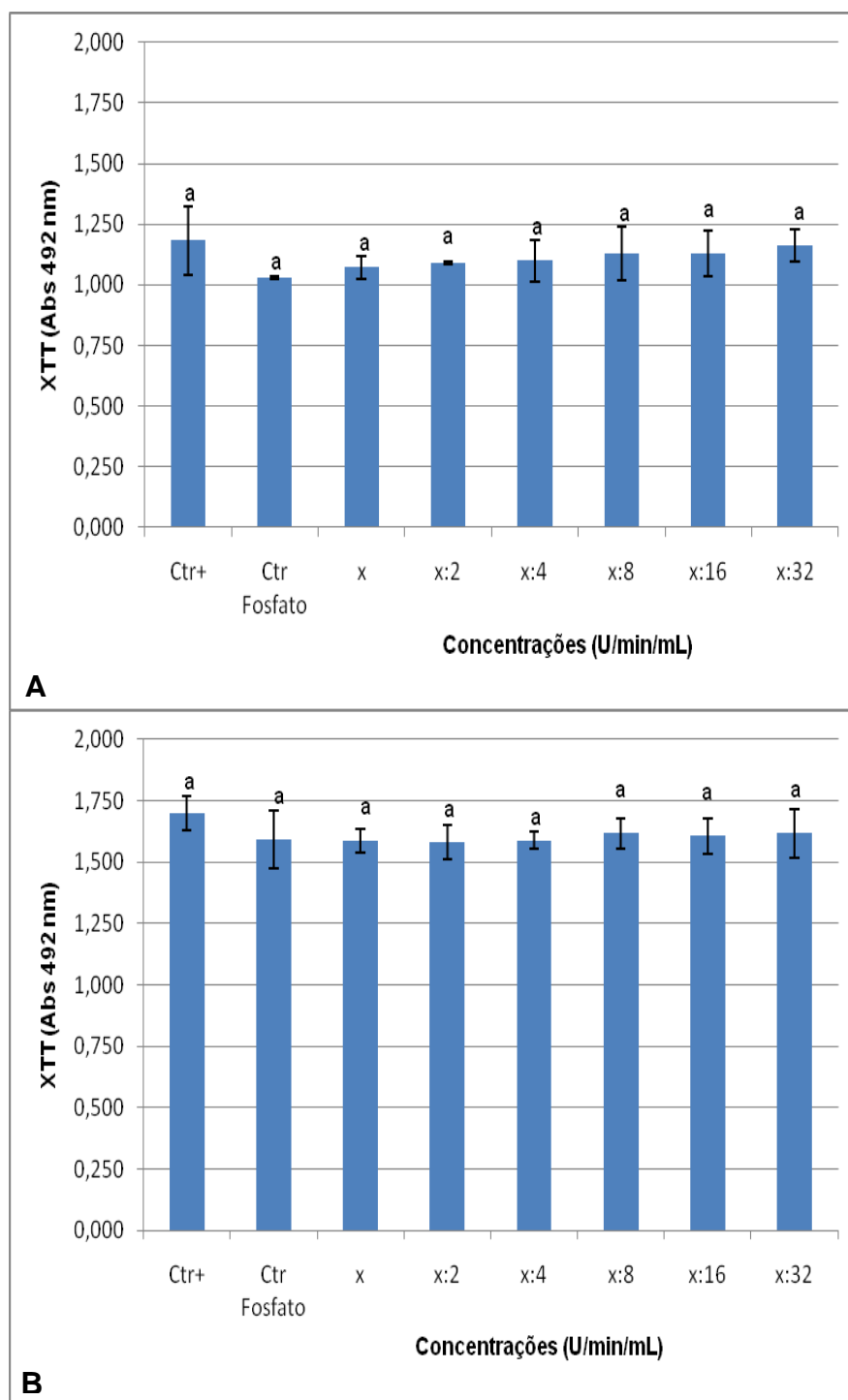


Figura 20: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com LC. Ctrl+: controle sem tratamento; Ctrl Fosfato: controle com tampão; x = 20 U/min/mL. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

As Tabelas 8 e 9 trazem um resumo da efetividade de redução de biofilmes de *C. albicans*, em termos de porcentagem, das enzimas produzidas e das adquiridas comercialmente quando comparadas com os controles não tratados.

Tabela 8: Porcentagem da capacidade de redução de biofilmes de *C. albicans* de 24 horas por enzimas produzidas (PP/AP/LP) e adquiridas comercialmente (PC/AC/LC).

Enzimas	Tempo de contato (min)	Concentrações (U/min/mL)					
		x	x:2	x:4	x:8	x:16	x:32
PP/PC	30	50/77,9	49,8/35,7	33,4/16,8	23,1/10,7	11,4/3,8	1,5/1,4
	60	88,6/89,3	66/69,8	36,6/46,9	32,6/28,6	29,2/20	26,6/7,3
AP/AC	30	72,5/22,2	70,4/21,4	74,2/20,5	43/17,2	45,3/15,2	25,2/11,3
	60	57,8/20,9	47,8/18,2	39,2/17,4	27,5/15,1	25,7/13,2	24,9/10,7
LP/LC	30	17,1/16,3	6,5/5,2	7,8/5,8	7,6/9,7	4,4/8,3	0/3,5
	60	10,7/9,4	1,8/8,1	0/7,2	0/4,6	0/4,5	0/1,8

Atividade enzimática para PP, PC, AP e AC $x = 30$ U/min/mL; para LP e LC $x = 20$ U/min/mL.

Tabela 9: Porcentagem da capacidade de redução de biofilmes de *C. albicans* de 48 horas por enzimas produzidas (PP/AP/LP) e adquiridas comercialmente (PC/AC/LC).

Enzimas	Tempo de contato (min)	Concentrações (U/min/mL)					
		x	x:2	x:4	x:8	x:16	x:32
PP/PC	30	78,8/88,2	69,2/78,5	58,1/67,6	46,8/63,6	45,2/58,4	42,8/46,8
	60	90,7/93,3	82,8/73,1	61,8/75,5	57/61,2	43,9/60,9	42,1/56,3
AP/AC	30	88,5/29,9	74,1/27,7	63,1/22	62,8/20,3	55,1/15,3	48/11,5
	60	70,9/15,4	56,5/12,7	55/13	48,4/13,9	48,5/10,5	37,5/9,2
LP/LC	30	23/15,2	22,2/13,6	13,6/8,9	12,3/4	4/1,1	0,8/1,6
	60	20,3/6,6	20,1/6,9	9,5/6,5	4,2/4,8	2,7/5,4	0/4,9

Atividade enzimática para PP, PC, AP e AC $x = 30$ U/min/mL; para LP e LC $x = 20$ U/min/mL.

5.4.4. Capacidade de redução de biofilme por clorexidina

As Figuras 21 e 22 representam os resultados obtidos na redução de biofilmes de *C. albicans* de 24 e 48 horas após o contato com clorexidina durante 30 e 60 minutos, respectivamente, em comparação ao controle não tratado, revelado com XTT.

Observa-se que a clorexidina mostrou-se efetiva com significância em todas as concentrações e tempos de contato. Nota-se ainda, que esta foi bem mais eficiente frente a biofilmes de 24 horas após contato de 60 minutos. A clorexidina foi capaz de inibir completamente o metabolismo do biofilme, em todas as ocasiões, somente em altas concentrações (32 mg/mL).

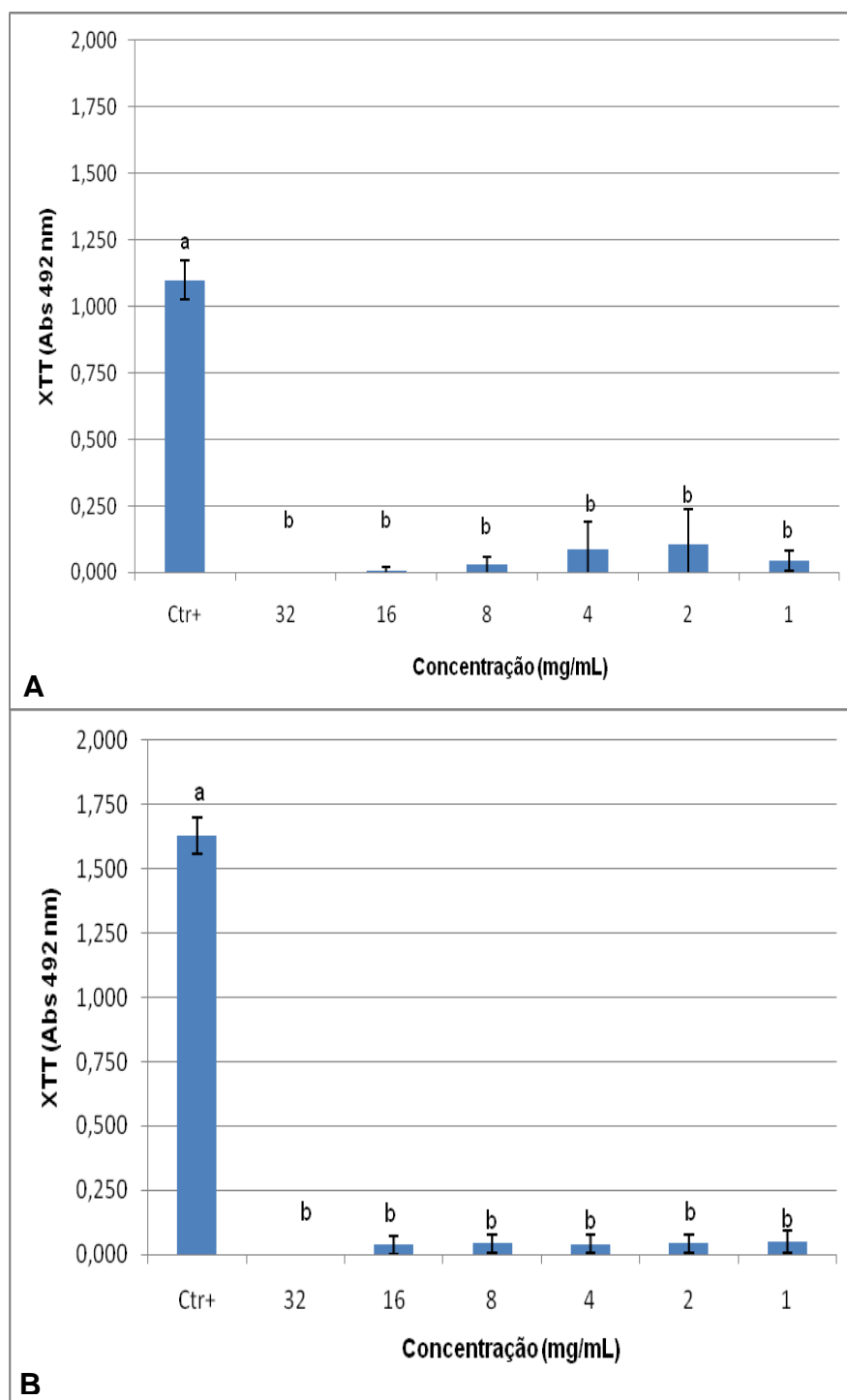


Figura 21: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com cloxidina em diferentes concentrações. Ctrl+: controle sem tratamento. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

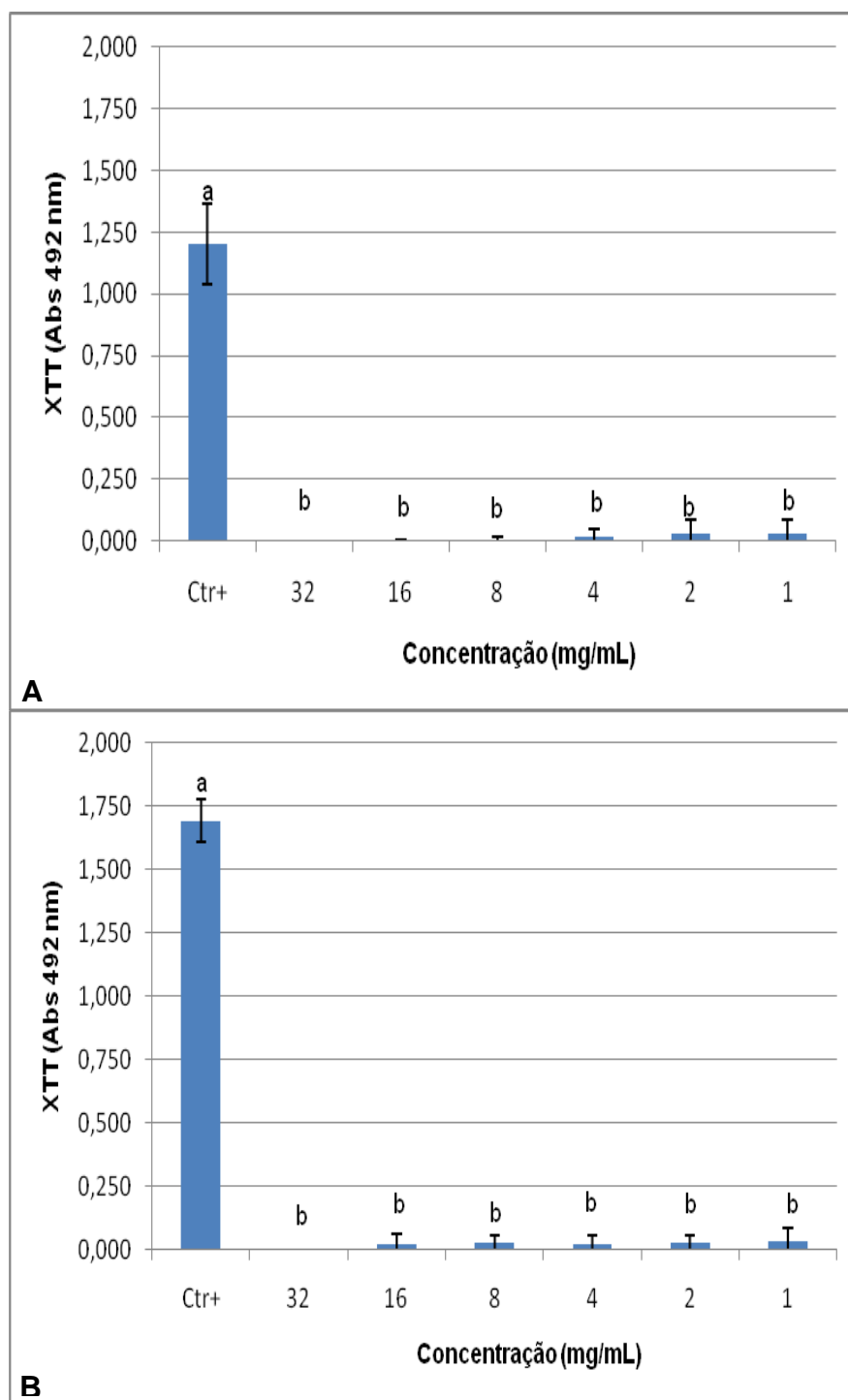


Figura 22: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com clorexidina em diferentes concentrações. Ctrl+: controle sem tratamento. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.4.5 Contagem de UFC/mL de biofilme de *C. albicans* em microplacas

5.4.5.1. Capacidade de redução do número de UFC/mL de biofilme por enzimas produzidas neste estudo

A Figura 23 demonstra a redução do número de unidades formadoras de colônias de biofilmes de *C. albicans* de 24 e 48 horas, após o contato de 30 minutos com protease, lipase e amilase, produzidas neste estudo (PP, LP, AP), respectivamente, em comparação ao controle não tratado e aos controles com os tampões utilizados para a diluição das enzimas, plaqueado em SDA e incubado por 72 horas.

A Figura 24 representa a redução do número de unidades formadoras de colônias de biofilmes de *C. albicans* de 24 e 48 horas, após o contato de 60 minutos com protease, lipase e amilase, produzidas neste estudo (PP, LP, AP), respectivamente, em comparação ao controle não tratado e aos controles com os tampões utilizados para a diluição das enzimas, plaqueado em SDA e incubado por 72 horas.

Observa-se que das enzimas produzidas as mais efetivas na redução do número de UFC/mL para ambos os biofilmes foram a protease e a amilase, reduzindo $1,5 \log_{10}$ em relação ao controle não tratado. Além disso, os controles com tampões confirmam os resultados observados nos testes revelados com XTT, demonstrando a ausência da influência destes no crescimento do biofilme.

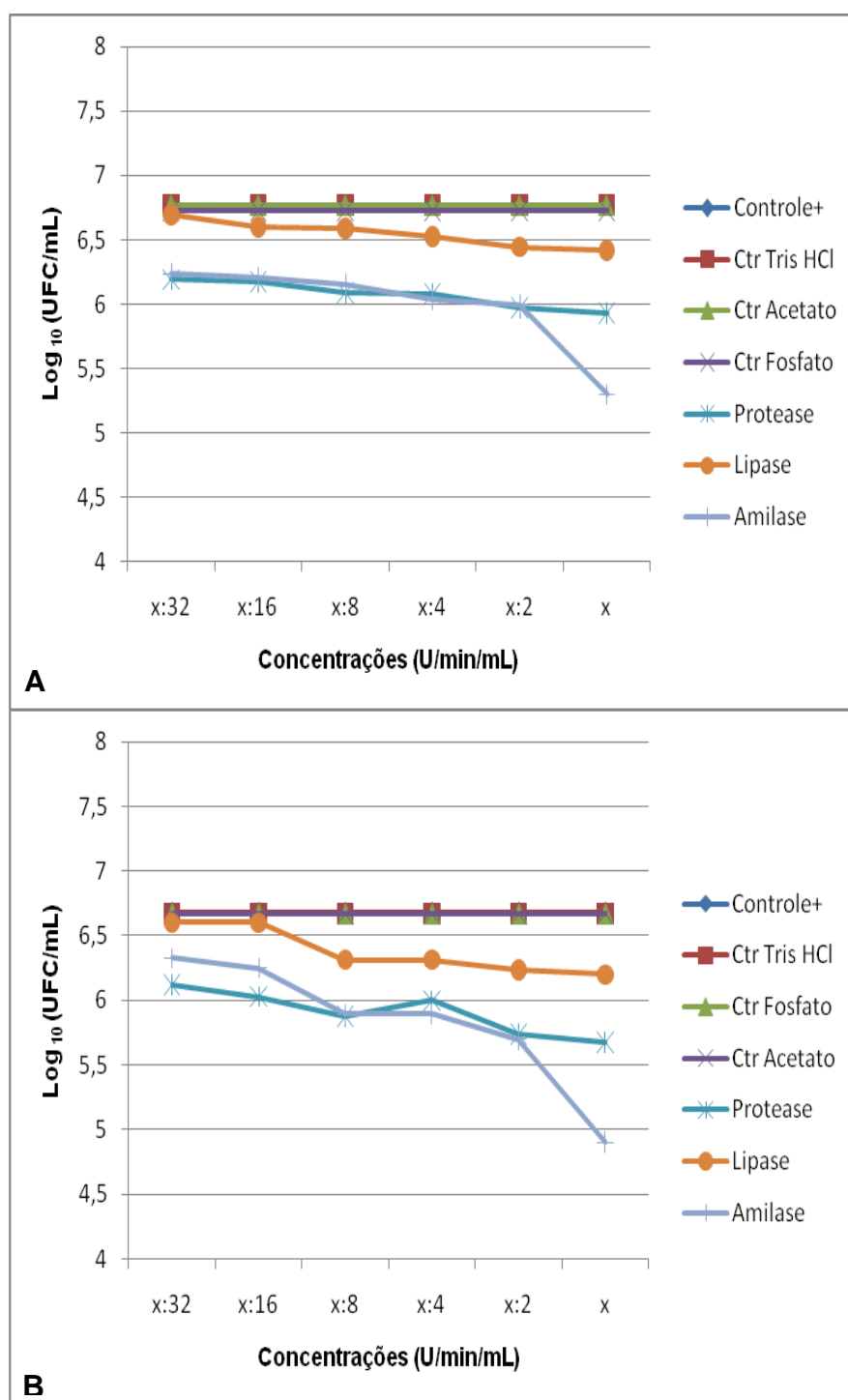


Figura 23: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com enzimas produzidas.

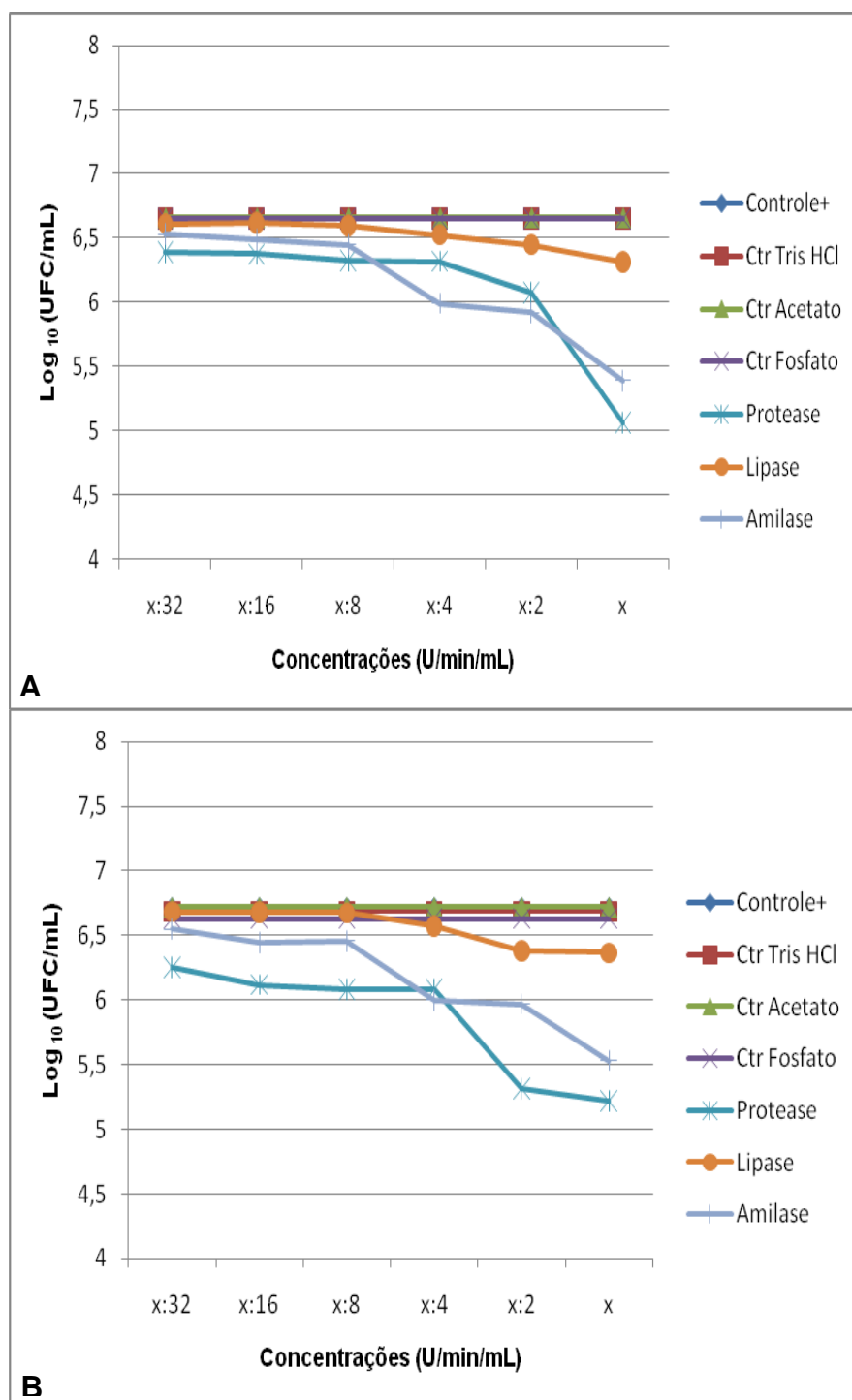


Figura 24: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com enzimas produzidas.

5.4.5.2. Capacidade de redução do número de UFC/mL de biofilme por enzimas adquiridas comercialmente

A Figura 25 demonstra a redução do número de unidades formadoras de colônias de biofilmes de *C. albicans* de 24 e 48 horas, após o contato de 30 minutos com protease, lipase e amilase, adquiridas comercialmente (PC, LC, AC), respectivamente, em comparação ao controle não tratado e aos controles com os tampões utilizados para a diluição das enzimas, plaqueado em SDA e incubado por 72 horas.

A Figura 26 representa a redução do número de unidades formadoras de colônia de biofilmes de *C. albicans* de 24 e 48 horas, após o contato de 60 minutos com protease, lipase e amilase, adquiridas comercialmente (PC, LC, AC), respectivamente, em comparação ao controle não tratado e aos controles com os tampões utilizados para a diluição das enzimas, plaqueado em SDA e incubado por 72 horas.

Observa-se que das enzimas adquiridas comercialmente a mais efetiva na redução do número de UFC/mL para ambos os biofilmes foi a protease, sendo semelhante à protease produzida. Porém, nota-se que quando comparadas a amilase e lipase produzidas nesse estudo com a amilase e lipase comerciais, estas últimas foram incapazes de causar redução significativa, uma vez que em todas as concentrações avaliadas a máxima redução observada foi de apenas um \log_{10} em relação ao controle não tratado. Além disso, os controles confirmam os resultados observados nos testes revelados com XTT, demonstrando a não influência dos tampões no crescimento do biofilme.

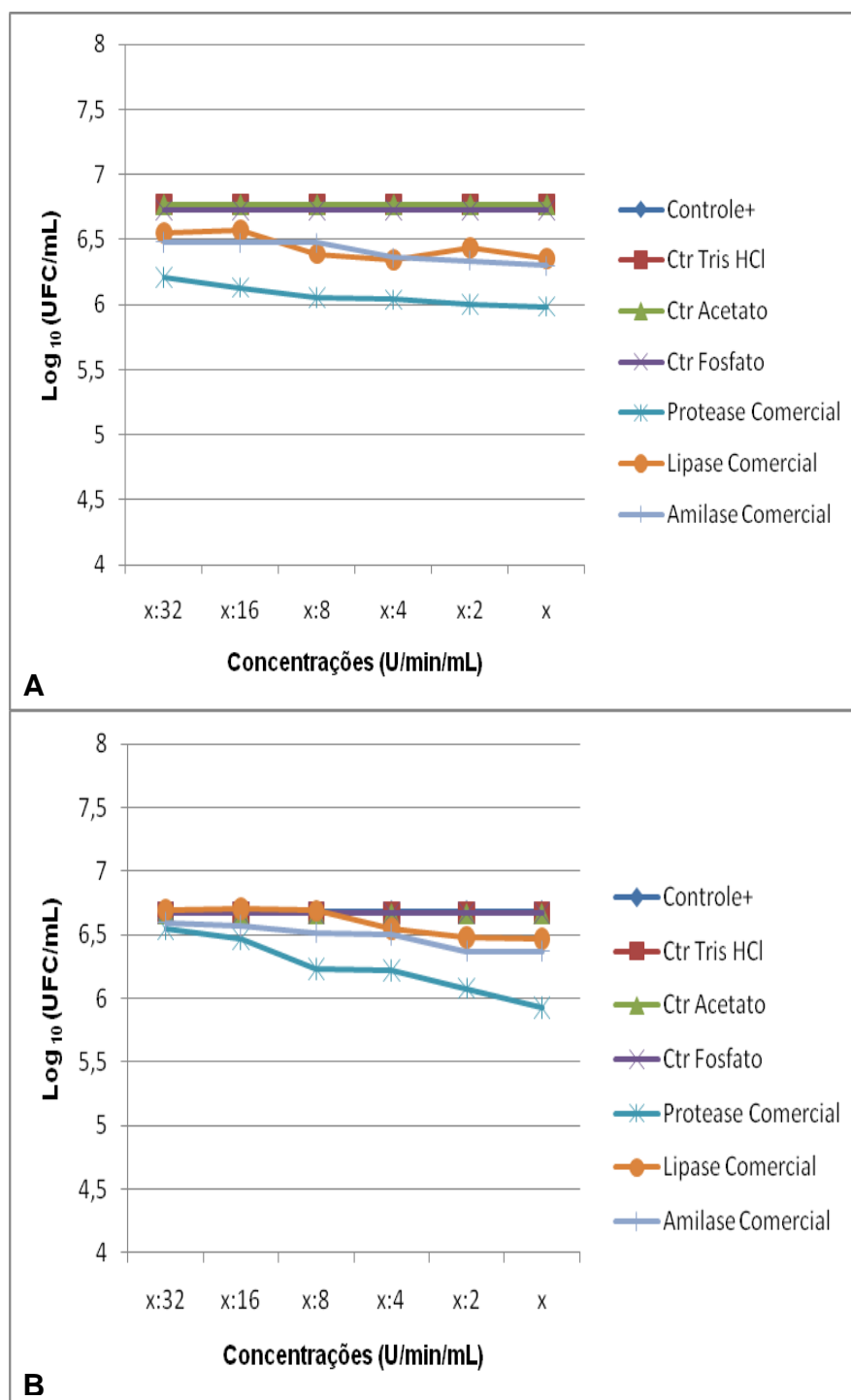


Figura 25: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com enzimas adquiridas comercialmente.

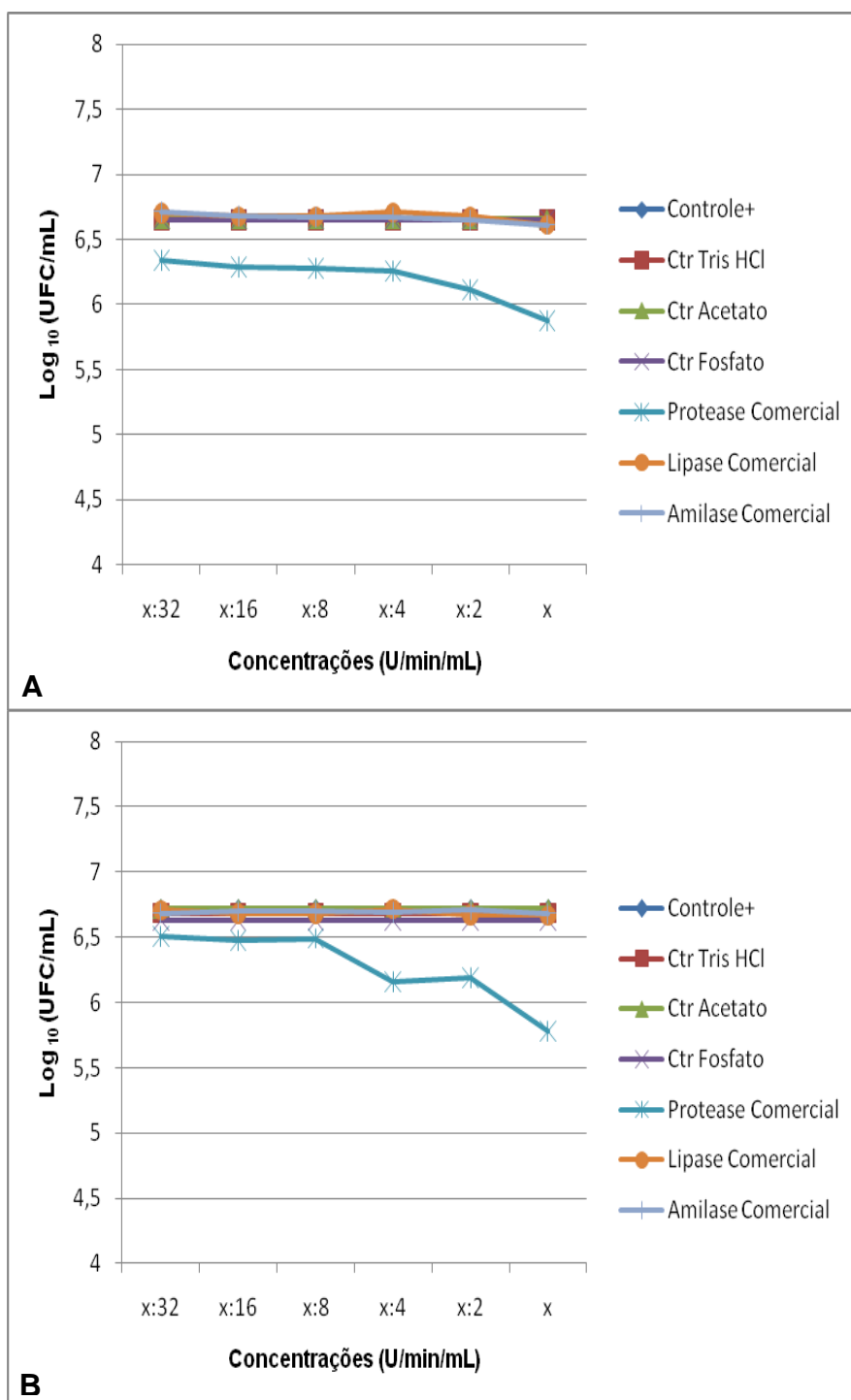


Figura 26: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com enzimas adquiridas comercialmente.

5.4.5.3. Capacidade de redução do número de UFC/mL de biofilme por clorexidina

A Figura 27 demonstra a redução do número de unidades formadoras de colônias de biofilmes de *C. albicans* de 24 e 48 horas, após o contato de 30 minutos com clorexidina em diferentes concentrações, em comparação ao controle não tratado, plaqueado em SDA e incubado por 72 horas.

A Figura 28 representa a redução do número de unidades formadoras de colônias de biofilmes de *C. albicans* de 24 e 48 horas, após o contato de 60 minutos com clorexidina em diferentes concentrações, em comparação ao controle não tratado, plaqueado em SDA e incubado por 72 horas.

Observa-se que a clorexidina atuou efetivamente na redução do número de UFC/mL para ambos os biofilmes e tempos de contato, porém nota-se que, esta foi bem mais eficiente frente a biofilmes de 24 horas após contato de 60 minutos, sendo capaz de inibir completamente o crescimento das células do biofilme, em todas as ocasiões, somente em altas concentrações (16-32 mg/mL).

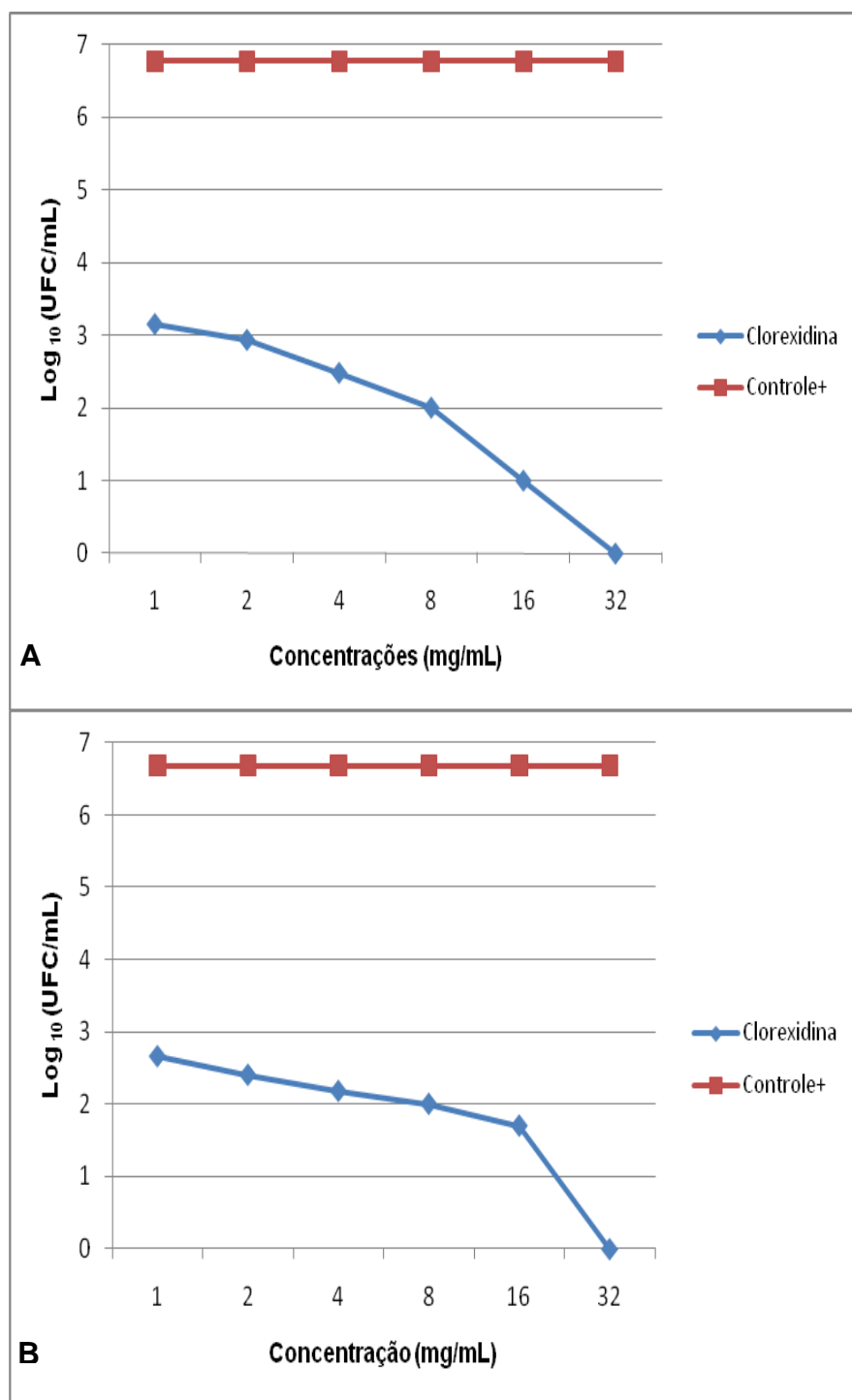


Figura 27: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com clorexidina em diferentes concentrações.

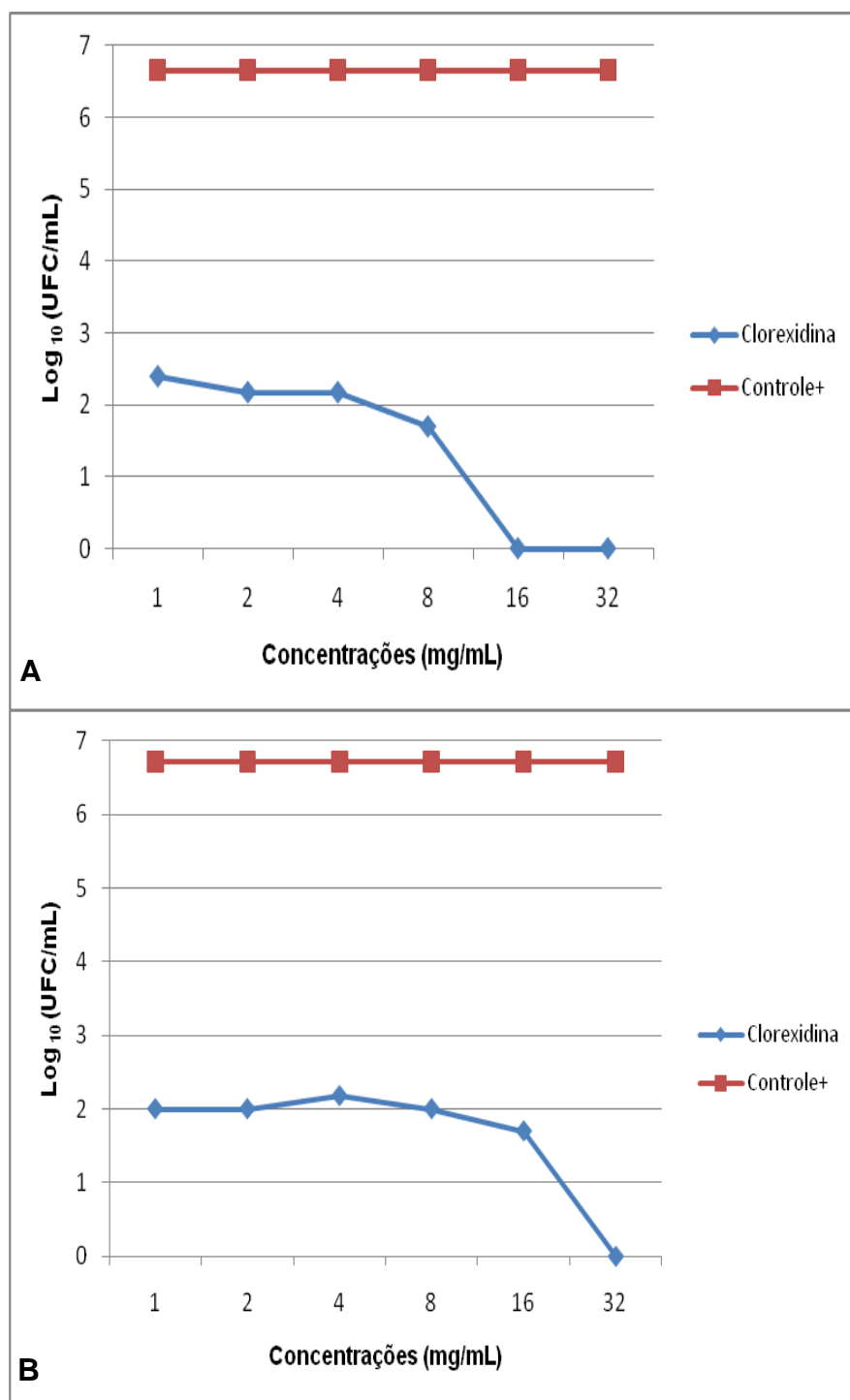


Figura 28: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com clorexidina em diferentes concentrações.

5.5. Efetividade de redução de biofilme de *C. albicans* dos corpos de prova

5.5.1. Confeção dos corpos de prova

Foram confeccionados cerca de 300 corpos de prova em resina acrílica como os observados na Figura 29, com média de leitura de rugosidade no intervalo de 2,7 a 3,7 μm .



Figura 29: Corpos de prova em resina acrílica.

5.5.2. Capacidade de redução de biofilme por protease

A protease produzida (PP) e a adquirida comercialmente (PC) foram avaliadas frente a biofilmes de 24 e 48 horas apenas em contato de 60 minutos, uma vez que neste período, foi observada maior efetividade de redução de biofilme em microplacas. Ambas as enzimas foram avaliadas em três concentrações (valores não apresentados) 2x; x e x:2. A Figura 30 mostra os resultados obtidos para a PP em biofilmes de 24 e 48 horas, formados em corpos de prova, respectivamente. A Figura 31 representa os resultados obtidos para a PC em biofilmes de 24 e 48 horas, formados em corpos de prova, respectivamente,

revelados por XTT. Nota-se que com o dobro da concentração empregada previamente em microplacas, tanto a PP como a PC, apresenta capacidade de reduzir significativamente os biofilmes de 24 e 48 h mesmo aderidos em corpos de prova.

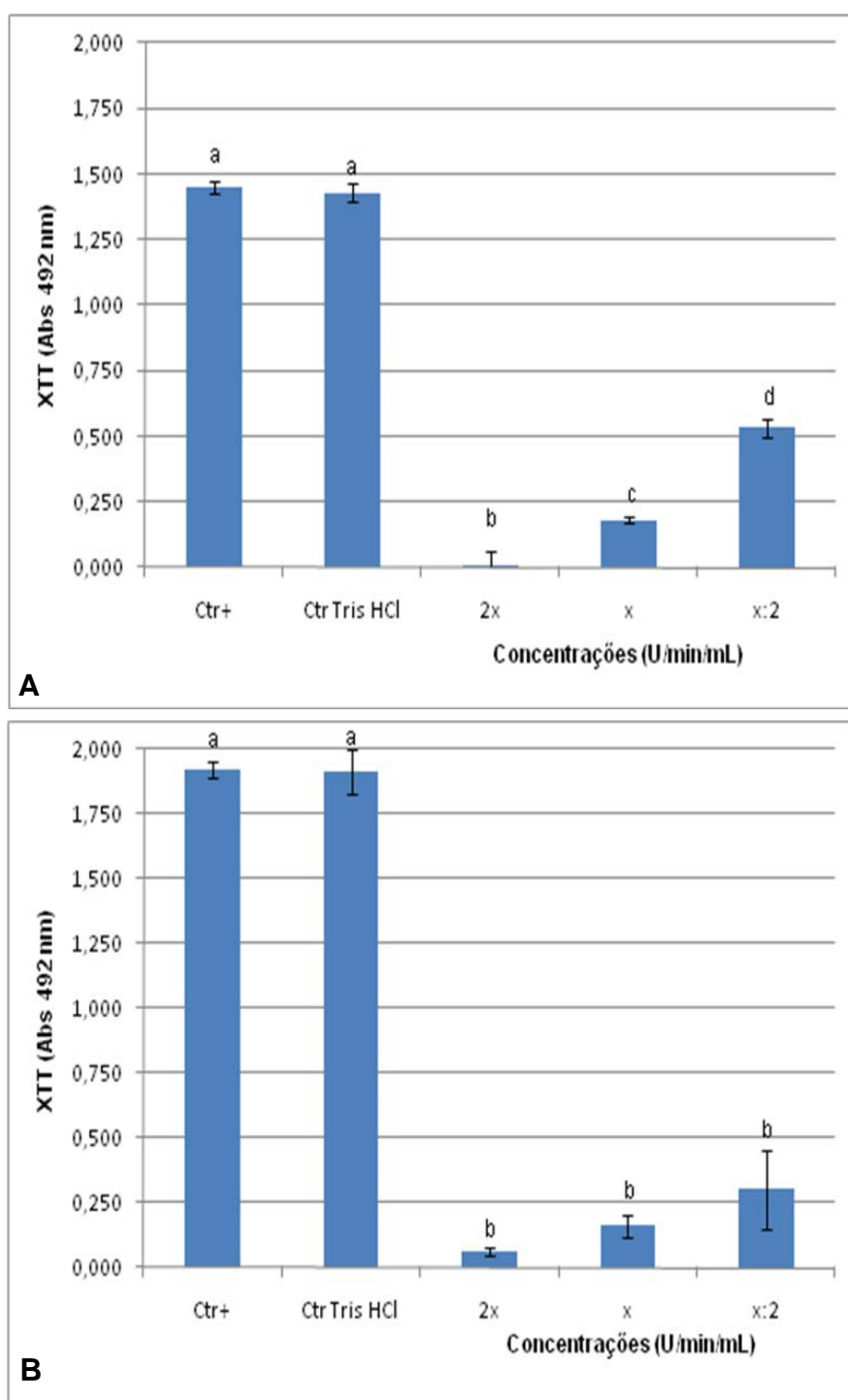


Figura 30: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com PP. Ctrl+: controle sem tratamento; Ctrl Tris HCl: controle com tampão; 2x = 60 U/min/mL. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

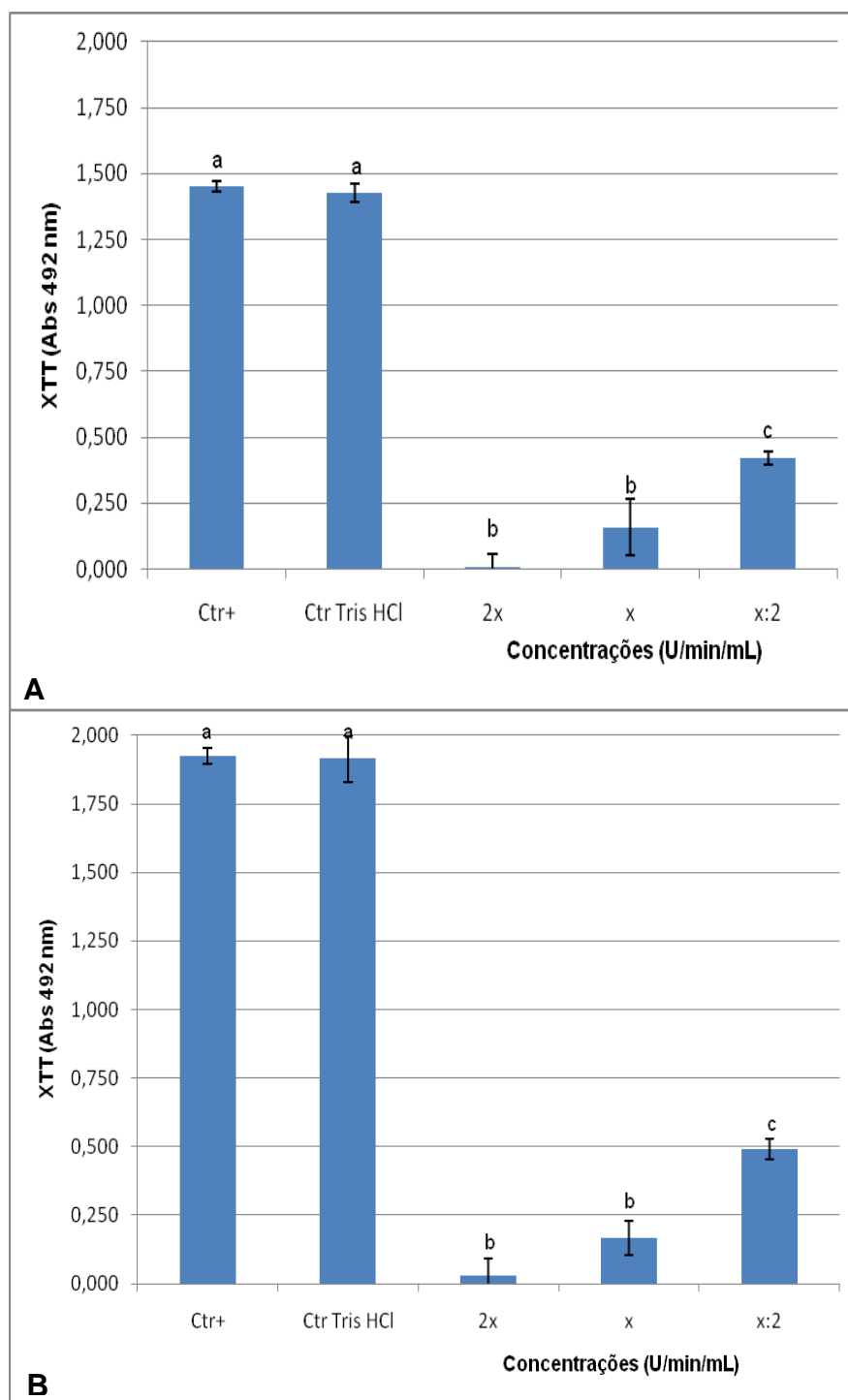


Figura 31: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com PC. Ctr+: controle sem tratamento; Ctr Tris HCl: controle com tampão; 2x = 60 U/min/mL. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.5.3. Capacidade de redução de biofilme por amilase

A amilase produzida (AP) e a adquirida comercialmente (AC) foram avaliadas frente a biofilmes de 24 e 48 horas apenas em contato de 30 minutos, uma vez que neste período, foi observada maior efetividade de redução de biofilme em microplacas. Ambas as enzimas foram avaliadas em três concentrações (valores não apresentados) $2x$; x e $x:2$. A Figura 32 mostra os resultados obtidos para a AP em biofilmes de 24 e 48 horas, formados em corpos de prova, respectivamente. A Figura 33 representa os resultados obtidos para a AC em biofilmes de 24 e 48 horas, formados em corpos de prova, respectivamente, revelados por XTT. Nota-se que com o dobro da concentração empregada previamente em microplacas, a AP mostrou capacidade de reduzir significativamente os biofilmes de 24 e 48 h mesmo aderidos em corpos de prova, no entanto, a AC foi menos eficiente em reduzir o metabolismo de ambos os biofilmes.

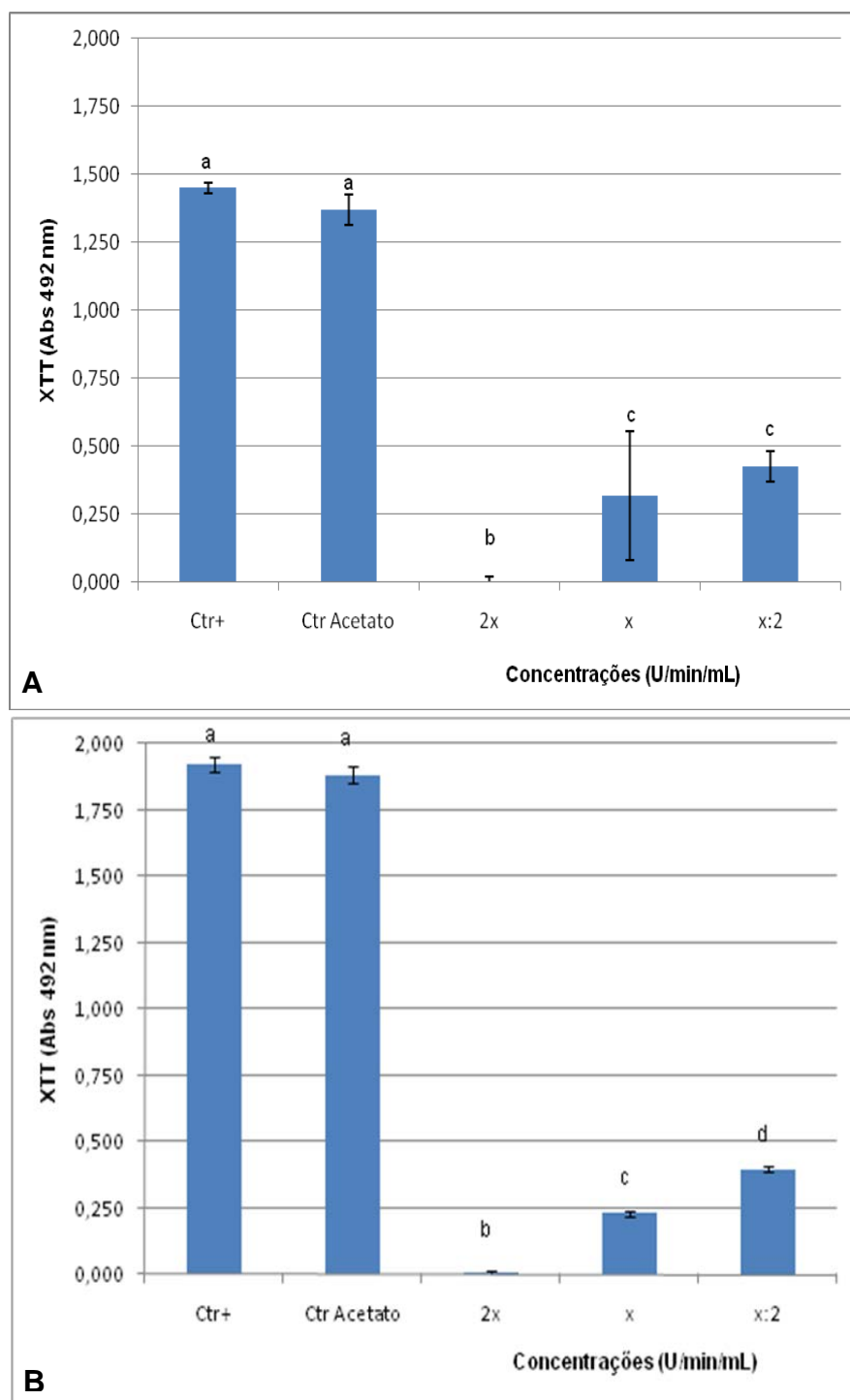


Figura 32: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com AP. Ctrl+: controle sem tratamento; Ctrl Acetato: controle com tampão; 2x = 60 U/min/mL. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

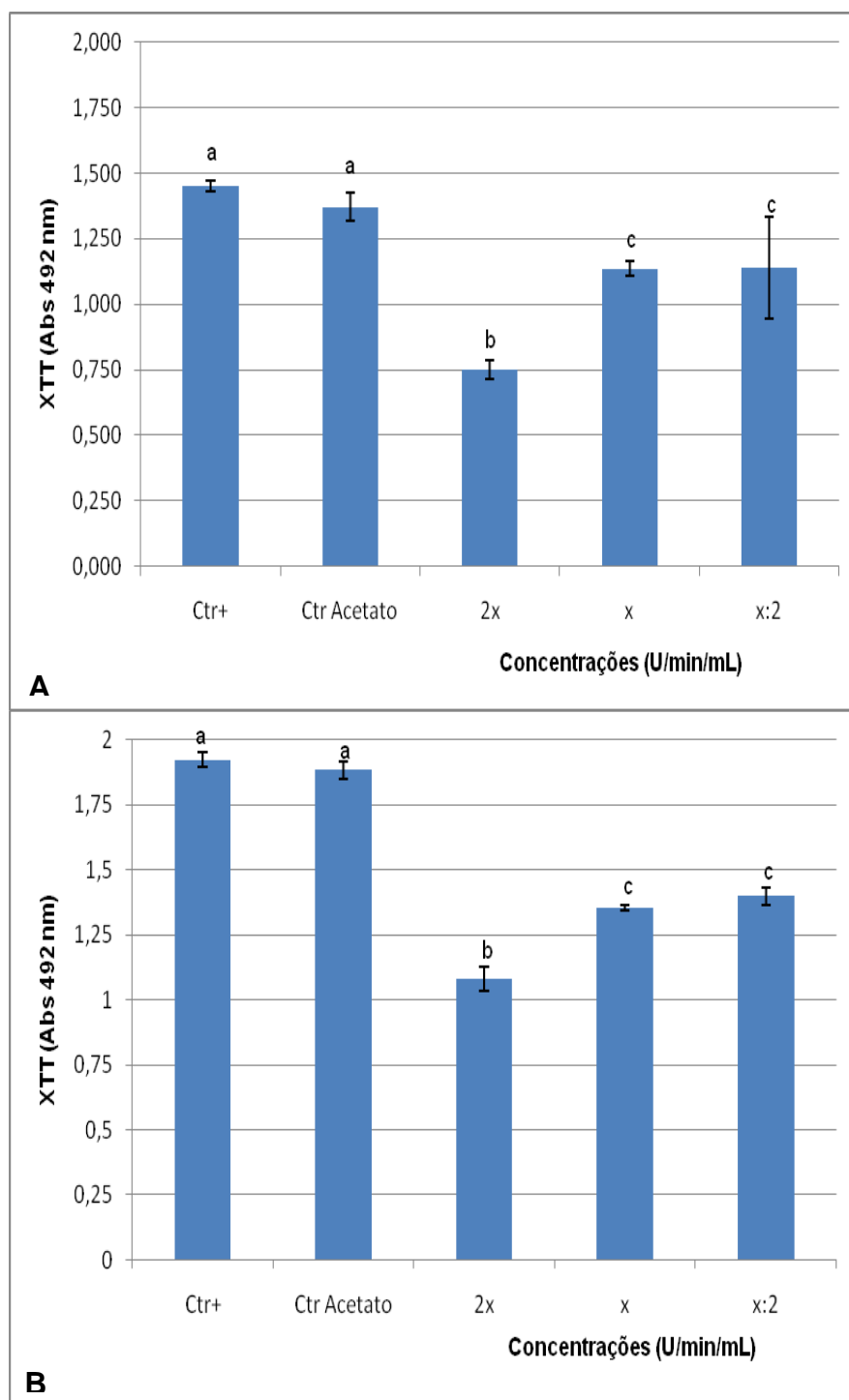


Figura 33: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com AC. Ctrl+: controle sem tratamento; Ctrl Acetato: controle com tampão; 2x = 60 U/min/mL. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.5.4. Capacidade de redução de biofilme por lipase

A lipase produzida (LP) e a adquirida comercialmente (LC) foram avaliadas frente a biofilmes de 24 e 48 horas apenas em contato de 30 minutos, uma vez que neste período, foi observada maior efetividade de redução de biofilme em microplacas. Ambas as enzimas foram avaliadas em três concentrações (valores não apresentados) $2x$; x e $x:2$. A Figura 34 mostra os resultados obtidos para a LP em biofilmes de 24 e 48 horas, formados em corpos de prova, respectivamente. A Figura 35 representa os resultados obtidos para a LC em biofilmes de 24 e 48 horas, formados em corpos de prova, respectivamente, revelados por XTT. Nota-se que com o dobro da concentração empregada previamente em microplacas, a LP mostrou capacidade de reduzir significativamente os biofilmes de 24 e 48 h mesmo aderidos em corpos de prova, no entanto, a eficiência em reduzir o metabolismo de ambos os biofilmes de LC foi ainda menor do que todas as outras enzimas adquiridas comercialmente. Observa-se ainda que a LP dentre as três enzimas produzidas neste estudo é a menos eficiente em reduzir o metabolismo de ambos os biofilmes.

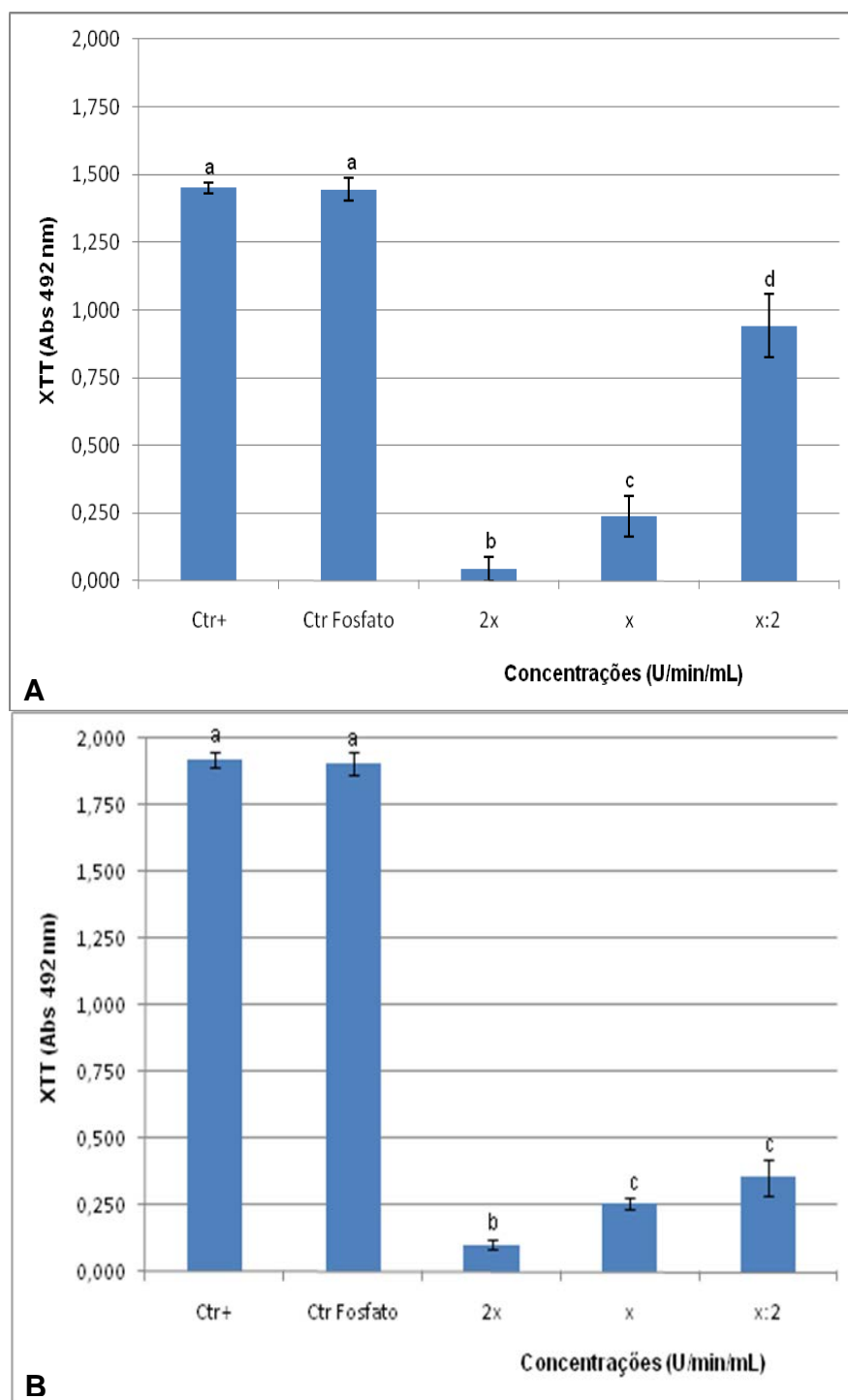


Figura 34: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com LP. Ctr+: controle sem tratamento; Ctr Fosfato: controle com tampão; x = 40 U/min/mL. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

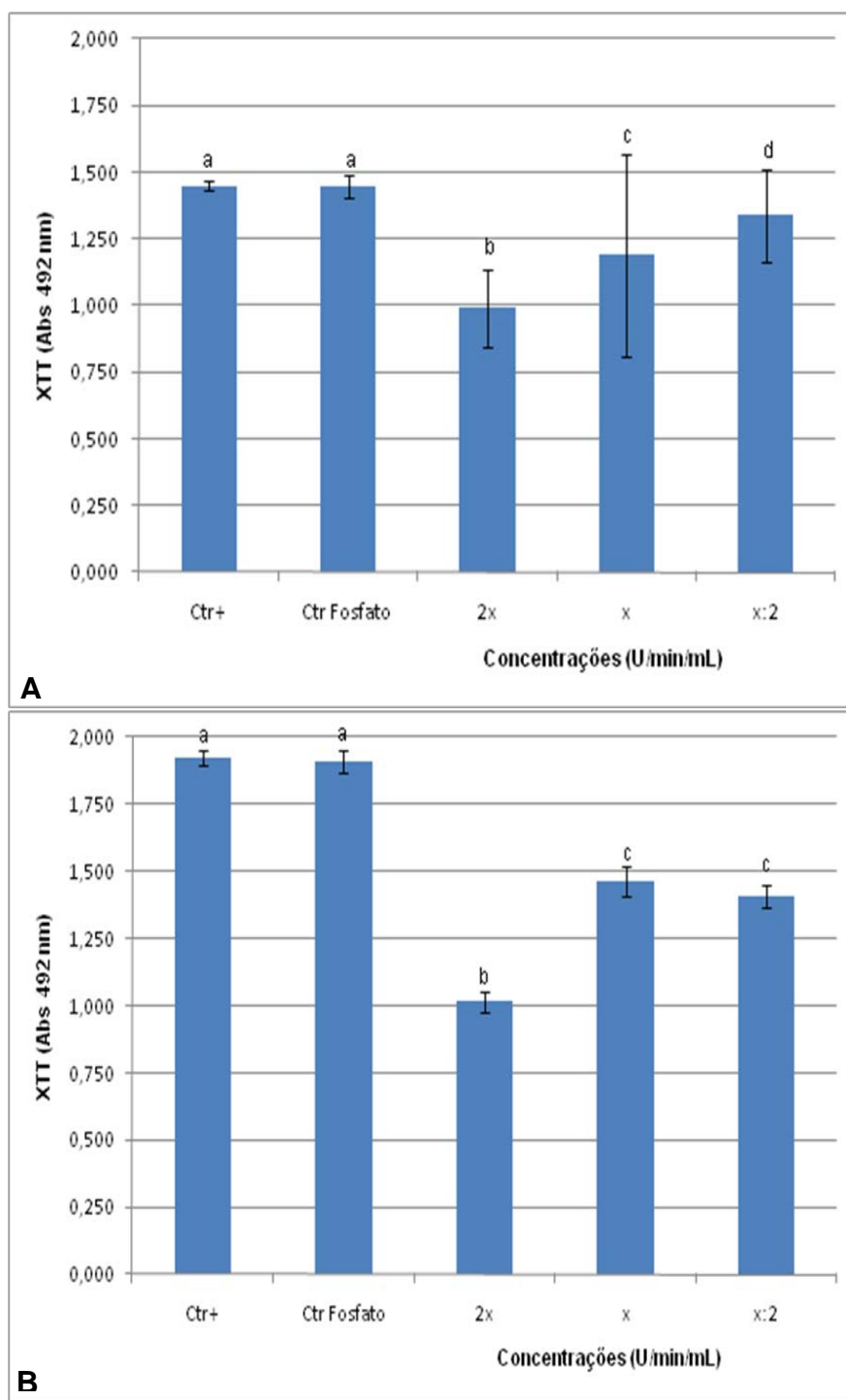


Figura 35: Redução de biofilme de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com LC. Ctrl+: controle sem tratamento; Ctrl Fosfato: controle com tampão; x = 40 U/min/mL. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

As Tabelas 10 e 11 trazem um resumo da efetividade de redução de biofilmes de *C. albicans* em corpos de prova, em termos de porcentagem, das enzimas produzidas e das adquiridas comercialmente quando comparadas com os controles não tratados.

Tabela 10: Porcentagem da capacidade de redução de biofilmes de *C. albicans* de 24 horas em corpos de prova, por enzimas produzidas (PP/AP/LP) e adquiridas comercialmente (PC/AC/LC).

Enzimas	Tempo de contato (min)	Concentrações (U/min/mL)		
		2x	x	x:2
PP/PC	60	99,4/99,5	87,5/89,1	63,4/71
AP/AC	30	99,7/47,8	77,9/21,1	70,4/20,9
LP/LC	30	96,9/31,1	83,3/17,4	34,6/7

Atividade enzimática para PP, PC, AP e AC 2x = 60 U/min/mL; para LP e LC 2x = 40 U/min/mL.

Tabela 11: Porcentagem da capacidade de redução de biofilmes de *C. albicans* de 48 horas em corpos de prova, por enzimas produzidas (PP/AP/LP) e adquiridas comercialmente (PC/AC/LC).

Enzimas	Tempo de contato (min)	Concentrações (U/min/mL)		
		2x	x	x:2
PP/PC	60	96,8/98,5	91,7/91,4	84,4/74,5
AP/AC	30	99,7/43,8	88,1/29,5	79,4/27,3
LP/LC	30	94,7/47,2	86,6/23,9	81,5/26,9

Atividade enzimática para PP, PC, AP e AC 2x = 60 U/min/mL; para LP e LC 2x = 40 U/min/mL.

5.5.5. Contagem de UFC/mL de biofilme de *C. albicans* em corpos de prova

5.5.5.1. Capacidade de redução do número de UFC/mL de biofilme por enzimas produzidas

A Figura 36 demonstra a redução do número de unidades formadoras de colônias de biofilmes de *C. albicans* de 24 e 48 horas, após o contato de 60 minutos com a protease produzida neste estudo (PP), em comparação ao controle não tratado e ao controle com o tampão utilizado para a diluição da enzima, plaqueado em SDA e incubado por 48 horas.

A Figura 37 representa a redução do número de unidades formadoras de colônias de biofilmes de *C. albicans* de 24 e 48 horas, após o contato de 30 minutos com a lipase e a amilase, produzidas neste estudo (LP, AP), respectivamente, em comparação ao controle não tratado e aos controles com os tampões utilizados para a diluição das enzimas, plaqueado em SDA e incubado por 48 horas.

Observa-se que das enzimas produzidas as mais efetivas na redução do número de UFC/mL para ambos os biofilmes foram a protease e a amilase, assim como os resultados observados em microplacas. Porém, observa-se que mesmo com o dobro de concentração ambas mantiveram a capacidade de causar redução de cerca de $1,5 \log_{10}$ em relação ao controle não tratado. Além disso, os controles com tampões confirmam os resultados observados nos testes revelados com XTT, demonstrando a não influência destes no crescimento do biofilme. Todos os resultados encontrados são semelhantes aos observados em biofilmes formados em fundo de microplacas.

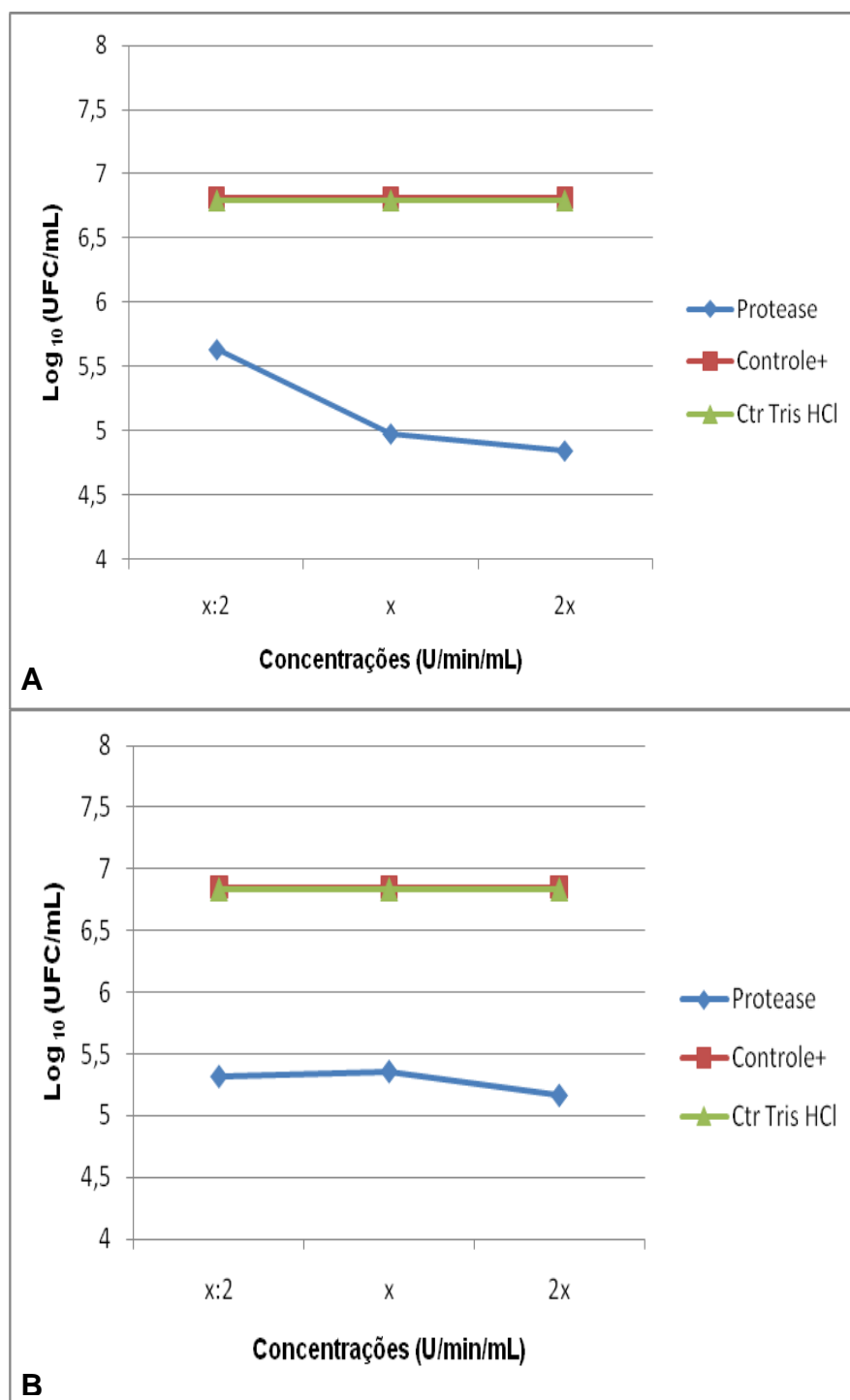


Figura 36: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com protease produzida neste estudo (PP).

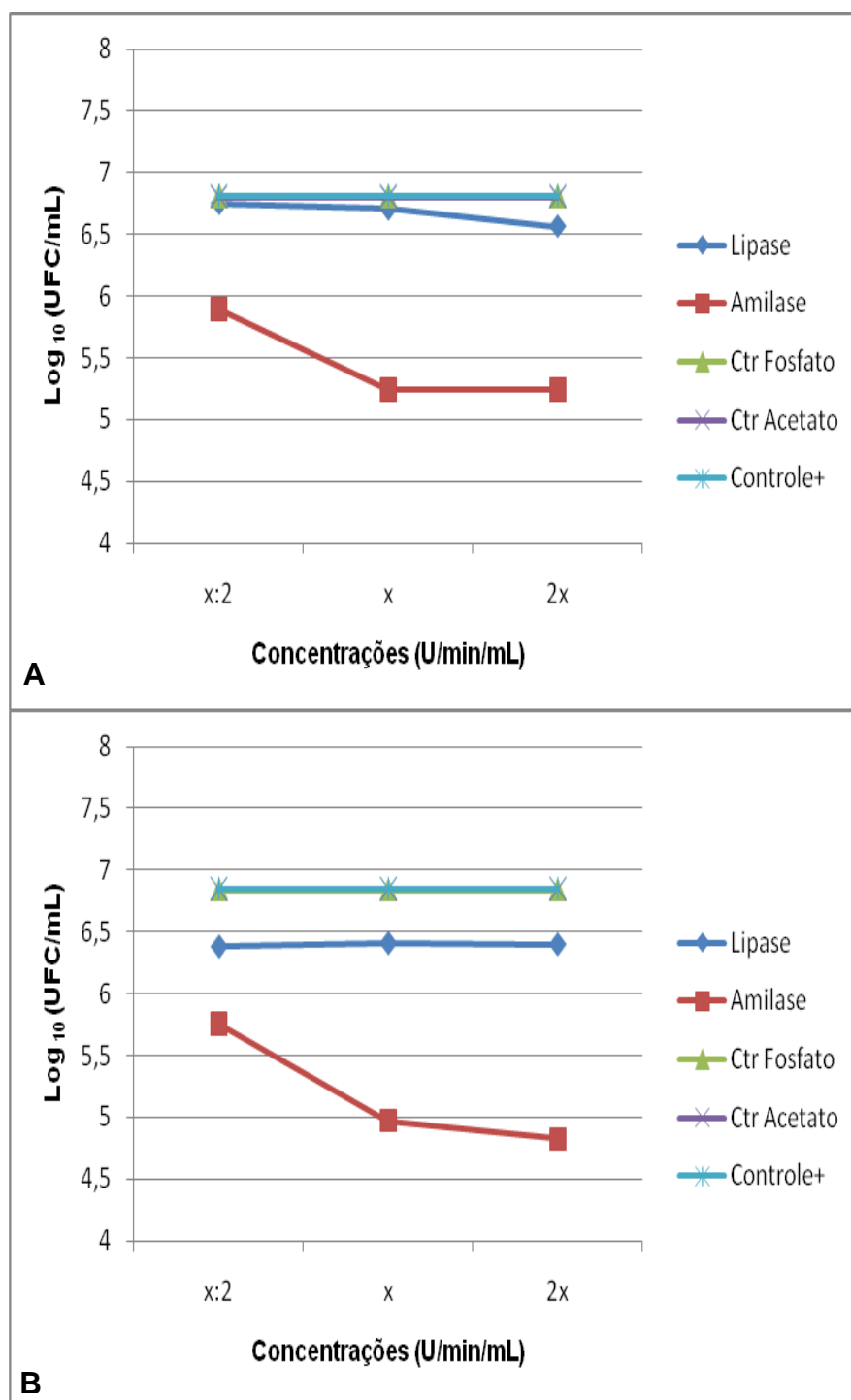


Figura 37: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com lipase e amilase produzidas neste estudo (LP, AP).

5.5.5.2. Capacidade de redução do número de UFC/mL de biofilme por enzimas adquiridas comercialmente

A Figura 38 demonstra a redução do número de unidades formadoras de colônias de biofilmes de *C. albicans* de 24 e 48 horas, após o contato de 60 minutos com a protease adquirida comercialmente (PC), em comparação ao controle não tratado e ao controle com o tampão utilizado para a diluição da enzima, plaqueado em SDA e incubado por 48 horas.

A Figura 39 representa a redução do número de unidades formadoras de colônias de biofilmes de *C. albicans* de 24 e 48 horas, após o contato de 30 minutos com a lipase e a amilase, adquiridas comercialmente (LC, AC), respectivamente, em comparação ao controle não tratado e aos controles com os tampões utilizados para a diluição das enzimas, plaqueado em SDA e incubado por 48 horas.

Observa-se que, das enzimas adquiridas comercialmente a mais efetiva na redução do número de UFC/mL para ambos os biofilmes foi a protease, mostrando eficiência semelhante a protease produzida nesse estudo. Porém nota-se que, a amilase e lipase comerciais quando comparada as produzidas foram incapazes de causar redução significativa. Além disso, os controles com tampões confirmam os resultados observados nos testes revelados com XTT, demonstrando a não influência destes no crescimento do biofilme. Estes resultados são semelhantes aos observados em biofilmes formados em fundo de microplacas.

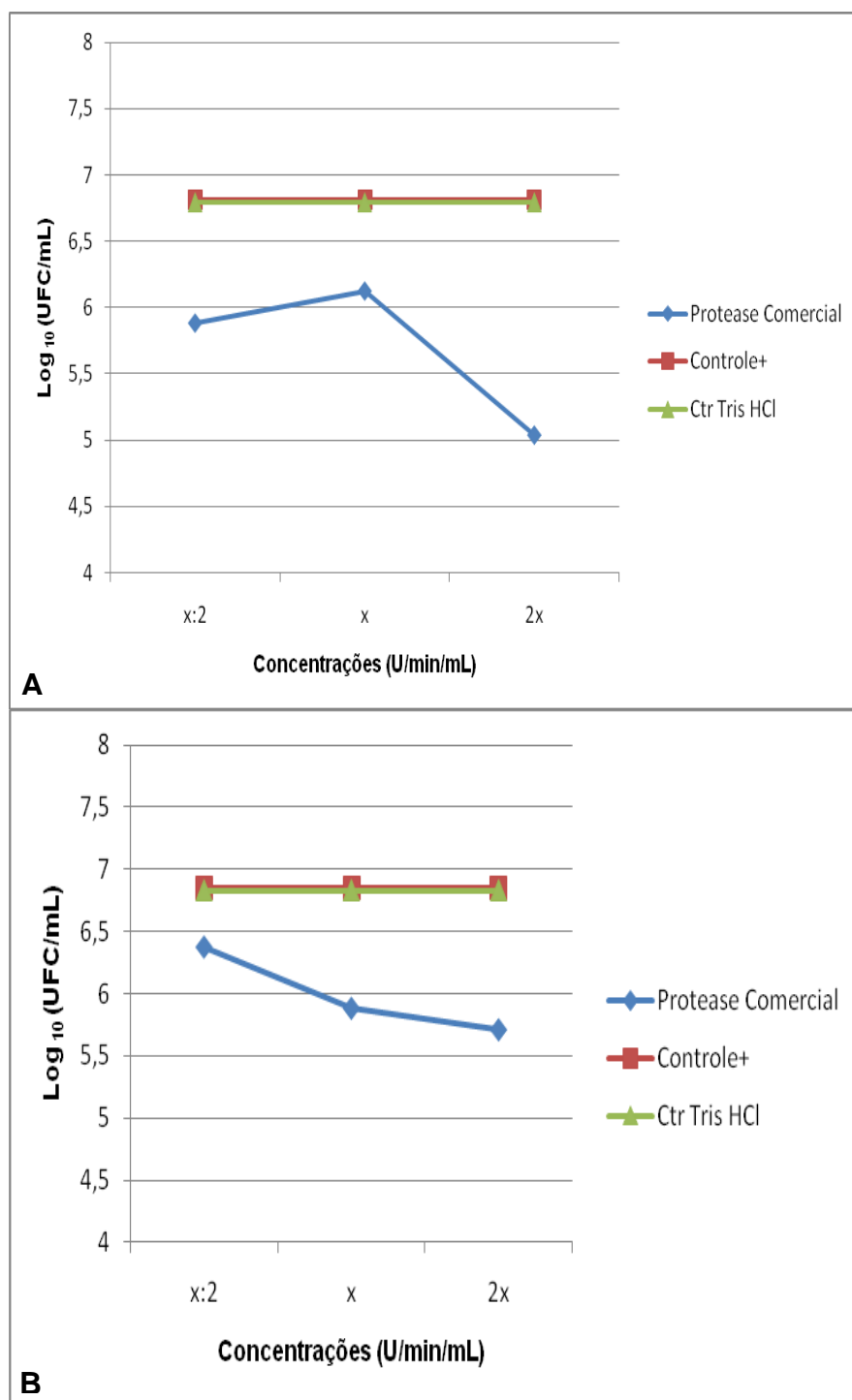


Figura 38: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 60 minutos com protease adquirida comercialmente (PC).

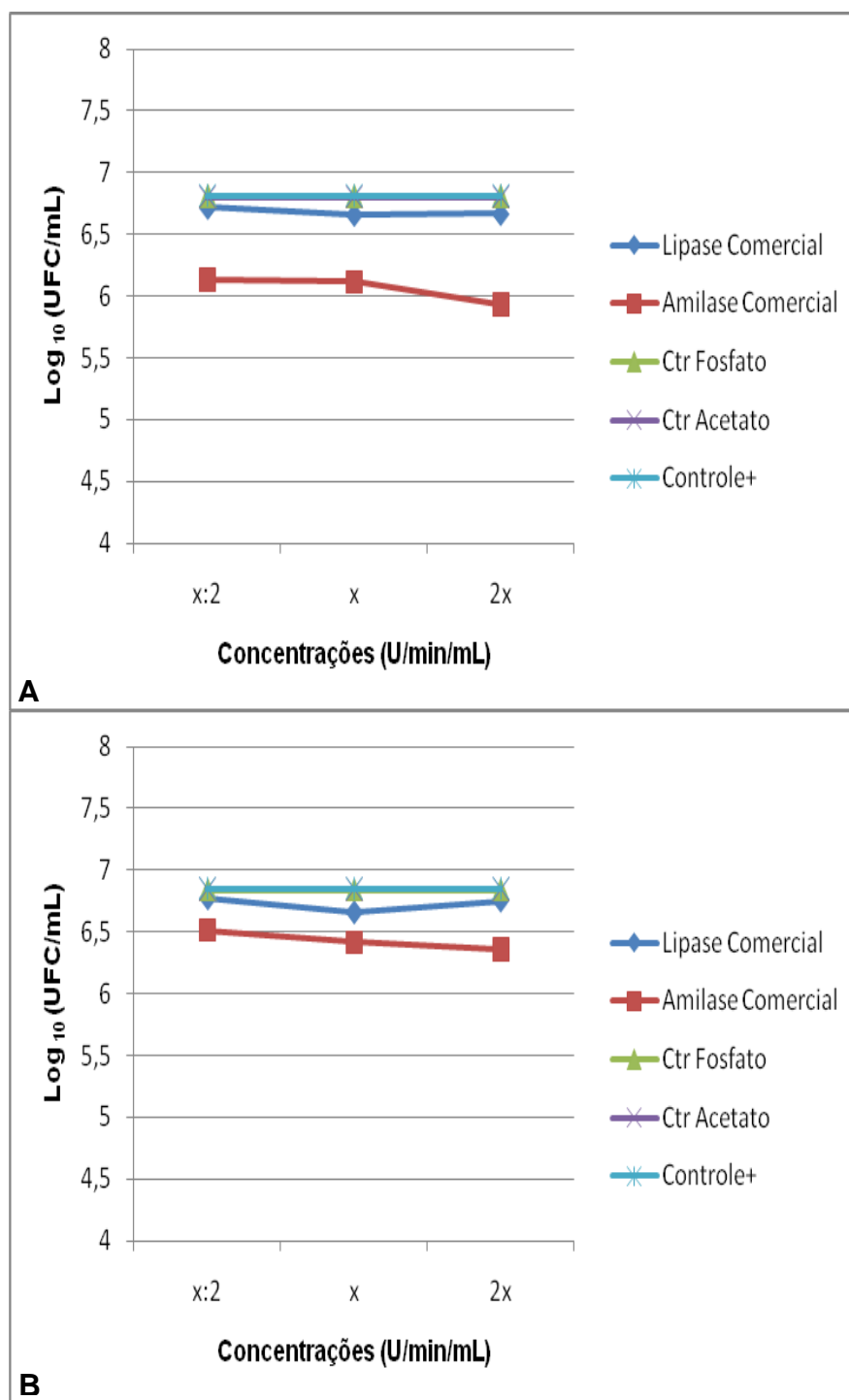


Figura 39: Redução do número de UFC/mL de biofilmes de 24 (A) e 48 (B) horas, após contato de 30 minutos com lipase e amilase adquiridas comercialmente (LC, AC).

5.6. Influência das enzimas sobre fatores de virulência de *C. albicans*

5.6.1. Avaliação sobre fosfolipases

Este fator de virulência de *C. albicans*, para todas as condições, biofilme de 24 e 48 horas, não se mostrou alterado na máxima concentração das enzimas protease, amilase e lipase, produzidas neste estudo (PP/AP/LP), bem como para as mesmas enzimas adquiridas comercialmente (PC/AC/LC) (concentrações não apresentadas), como se observa na Tabela 12 em biofilme de 24 horas e na Tabela 13 em biofilme de 48 horas, uma vez que o valor de $Pz > 1$, assim como para os controles sem tratamento. As zonas hialinas formadas mostraram diâmetros diminuídos quando comparados ao diâmetro da colônia como nota-se na Figura 40.

Tabela 12: Valor de Pz obtido após contato de biofilme de 24 horas de *C. albicans* com diferentes tratamentos

Tratamentos	Tempo de contato (min)	Média de triplicatas		
		ZH	DC	Pz
Controle sem Tratamento		15,1	14,6	0,97 ^a
PP/PC	60	16,2/15,7	15,9/15,2	0,98 ^a / 0,97 ^a
AP/AC	30	11,06/13,6	10,7/13,1	0,97 ^a / 0,96 ^a
LP/LC	30	16,2/15,6	15,7/15,1	0,97 ^a / 0,97 ^a

ZH: zona hialina; DC: diâmetro da colônia; Pz: razão do diâmetro da zona hialina pelo diâmetro da colônia.

Tabela 13: Valor de Pz obtido após contato de biofilme de 48 horas de *C. albicans* com diferentes tratamentos

Tratamentos	Tempo de contato (min)	Média de triplicatas		
		ZH	DC	Pz
Controle sem Tratamento		15,3	15,1	0,98 ^a
PP/PC	60	14,7/14,6	14,5/14,4	0,98 ^a / 0,98 ^a
AP/AC	30	15,3/15,1	14,8/14,5	0,97 ^a / 0,96 ^a
LP/LC	30	15,3/15,9	14,8/15,4	0,97 ^a / 0,97 ^a

ZH: zona hialina; DC: diâmetro da colônia; Pz: razão do diâmetro da zona hialina pelo diâmetro da colônia. Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

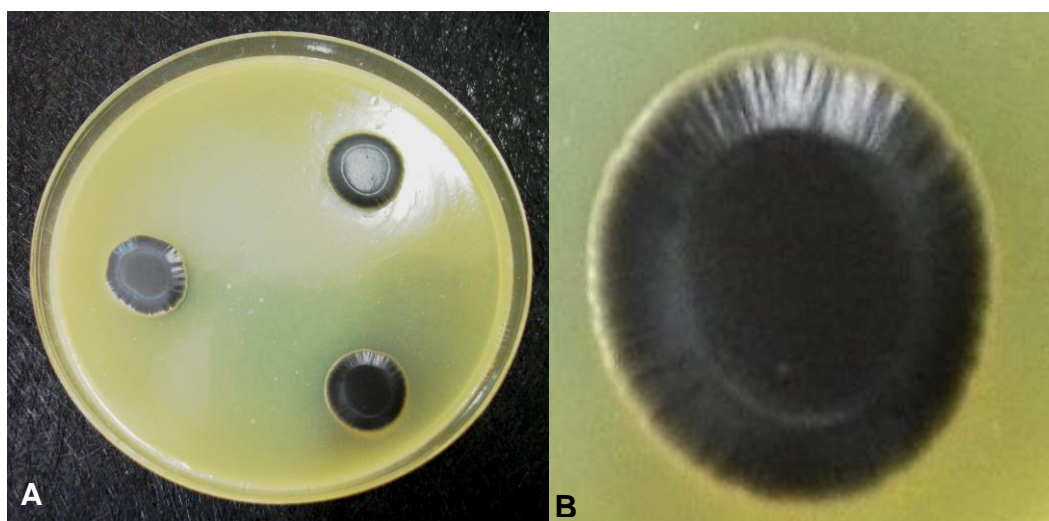


Figura 40: Influência das enzimas produzidas e adquiridas comercialmente sobre fosfolipases. A: meio Reduced Egg-Yolk Agar para pesquisa de fosfolipase inoculado com colônias de *C. albicans* após diferentes tratamentos. B: zona hialina (aumento de 4x).

5.6.2. Avaliação sobre aspartil-proteinasas secretoras

Este fator de virulência de *C. albicans*, para todas as condições, biofilme de 24 e 48 horas, não se mostrou alterado na máxima concentração das enzimas

protease, amilase e lipase, produzidas neste estudo (PP/AP/LP), bem como para as mesmas enzimas adquiridas comercialmente (PC/AC/LC) (concentrações não apresentadas), assim como para os controles sem tratamento, uma vez que não houve sequer formação de halos mensuráveis como nota-se na Figura 41.

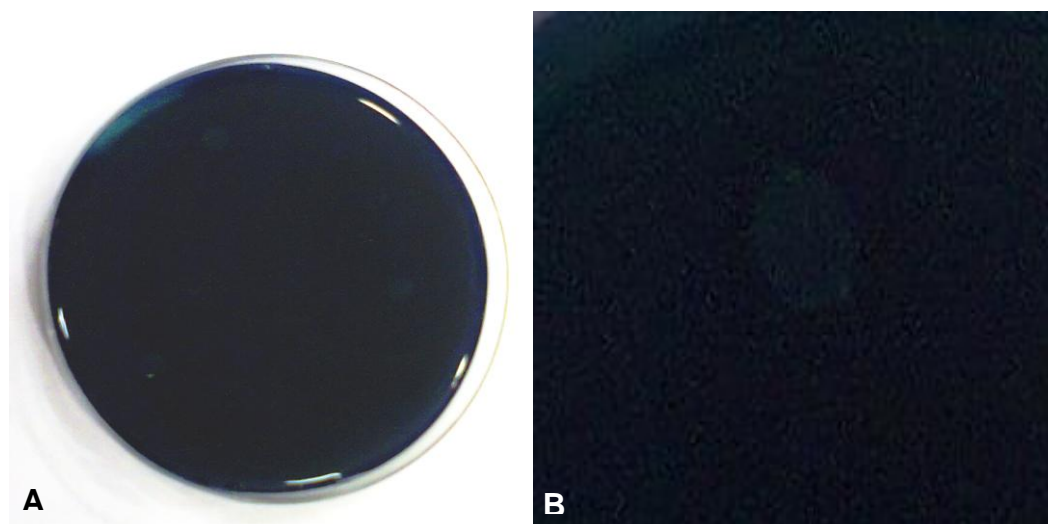


Figura 41: Influência das enzimas produzidas e adquiridas comercialmente sobre aspartil-proteinases secretoras. A: meio Reduced Bovine-Serum-Albumin Agar para pesquisa de aspartil-proteinase inoculado com colônias de *C. albicans*, após diferentes tratamentos. B: ausência de zona hialina (aumento de 4x).

5.7. Influência das enzimas sobre ergosterol da parede de *C. albicans*

O conteúdo de ergosterol foi calculado em relação ao peso do precipitado. Os resultados obtidos para cada tratamento bem como para o controle não tratado podem ser observados na Tabela 15. A quantificação do ergosterol mostrou picos espectrofotométricos característicos dos esteróis.

Porém, nota-se que enquanto as células tratadas com as enzimas amilase (30 minutos de contato) e protease (60 minutos de contato), produzidas neste estudo (PP/AP), apresentaram uma diminuição das concentrações de ergosterol,

as células tratadas com a enzima lipase (LP), durante 30 minutos de contato, apresentaram uma elevação na concentração e conseqüentemente nos picos deste esterol de membrana, quando comparadas as células não tratadas, conforme representado na Figura 39. Isto se reflete, quando calculadas as concentrações de ergosterol e aplicados os testes estatísticos, uma vez que os tratamentos com as enzimas foram estatisticamente diferentes do controle e entre si. Para a realização da leitura espectrofotométrica do ergosterol obtido após tratamento com LP foi necessário realizar uma diluição 1:2.

Tabela 14: Concentração de ergosterol de parede de *C. albicans*, após tratamento com as três enzimas produzidas neste estudo.

Tratamentos	Tempo de Contato (min)	Concentração de ergosterol (mg)
Controle sem tratamento		0,150±0,28 ^a
PP	60	0,103±0,07 ^b
AP	30	0,121±0,05 ^c
LP	30	0,176±0,03 ^{d*}

Valores seguidos de letras sobrescritas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *concentração obtida considerando diluição 1:2.

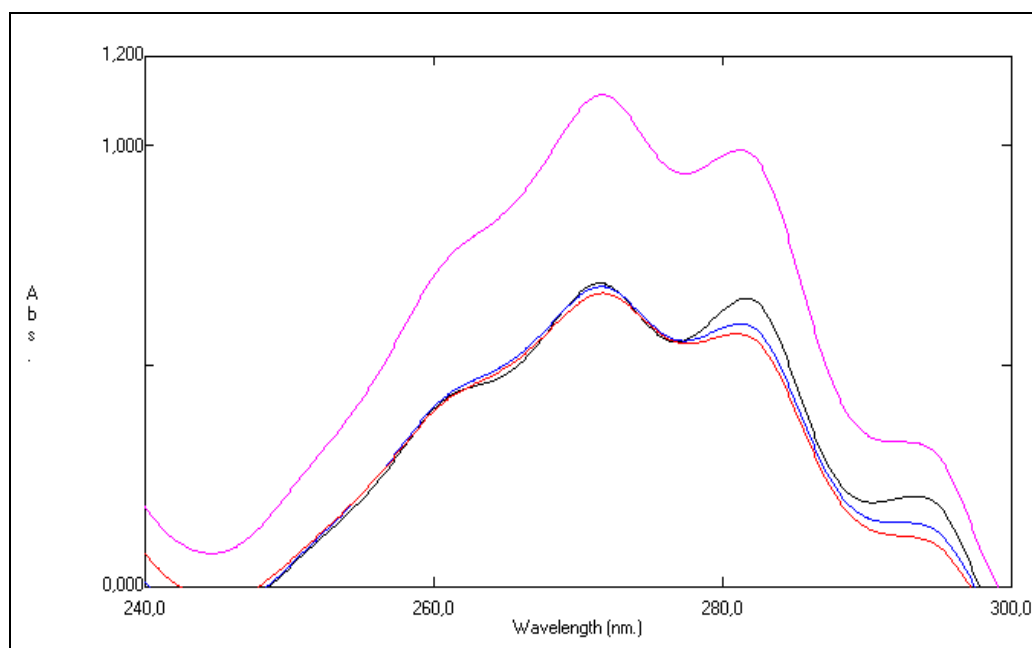


Figura 42: Perfil espectrofotométrico de ergosterol, na região de ultravioleta. Espectro em preto: controle sem tratamento. Espectro em vermelho: tratamento com PP. Espectro em azul: tratamento com AP. Espectro em rosa: tratamento com LP.

5.8. Influência das enzimas sobre a organização da arquitetura de biofilmes de *C. albicans*

5.8.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura realizadas em corpos de prova de resina acrílica, após tratamento com as enzimas produzidas neste estudo (PP/AP/LP), quando comparadas às imagens obtidas em corpos de prova que não receberam tratamento, mostram uma acentuada influência destas enzimas sobre a arquitetura de biofilmes de 24 horas como se observa nas Figuras 42-44, e 48 horas como se observa nas Figuras 45-47.

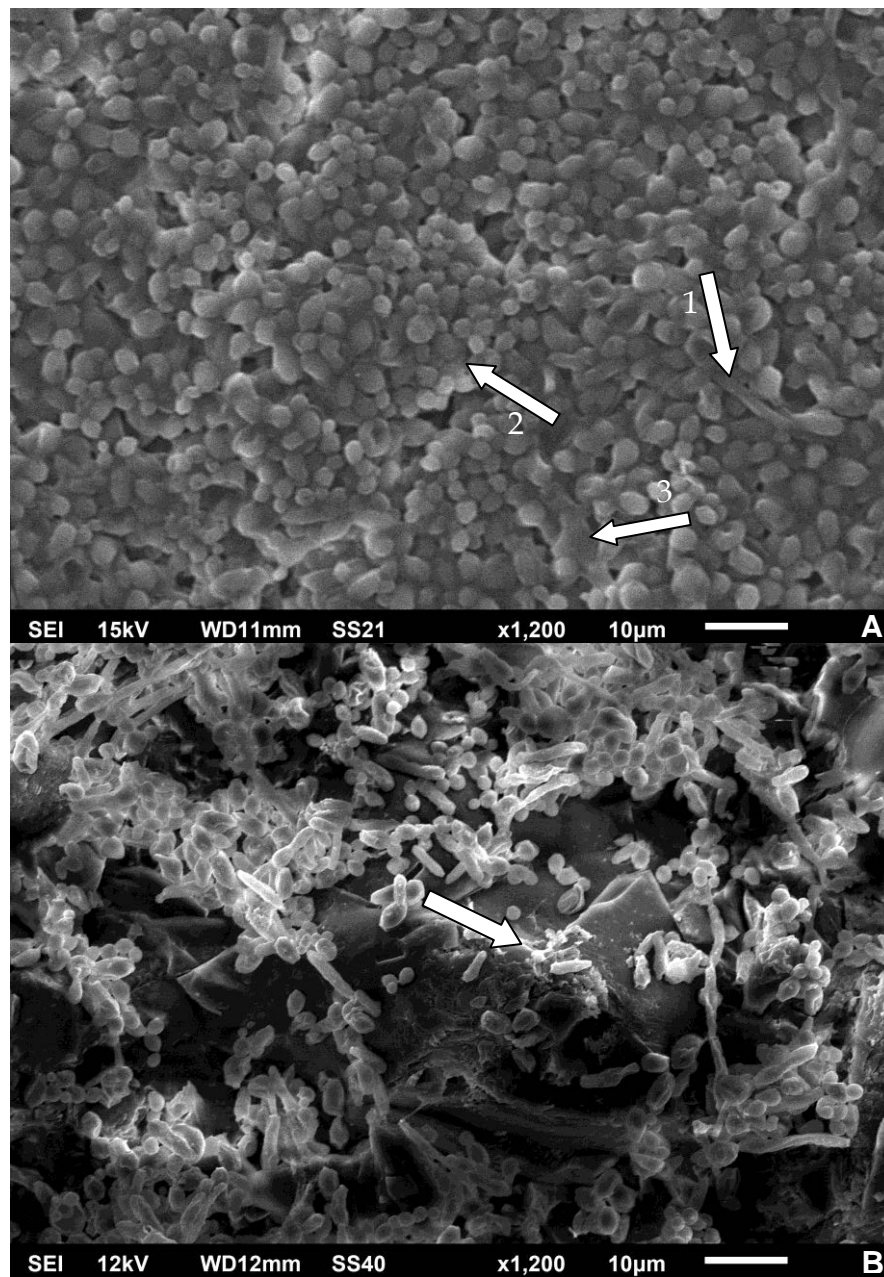


Figura 43: Eletromicrografia mostrando a ação de protease sobre a organização da arquitetura de biofilme de 24 horas em corpo de prova de resina acrílica. A: controle sem tratamento, setas 1, 2 e 3 apontam uma intrincada rede de hifas e/ou pseudo-hifas, leveduras e matrix exopolimérica, respectivamente; B: biofilme tratado com PP, durante 60 minutos, seta aponta acentuada redução do número de células com exposição da rugosidade do corpo de prova.

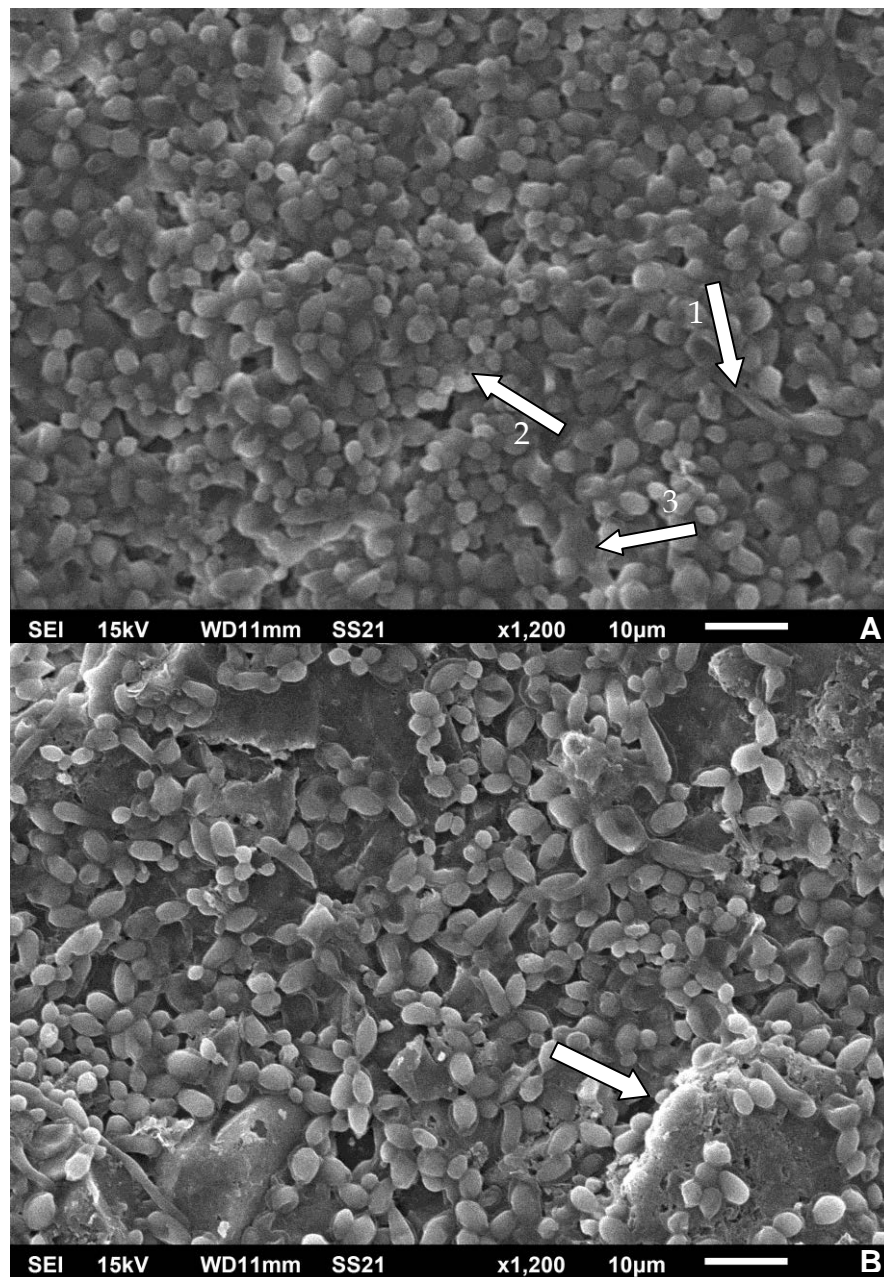


Figura 44: Eletromicrografia mostrando a ação de amilase sobre a organização da arquitetura de biofilme de 24 horas em corpo de prova de resina acrílica. A: controle sem tratamento, setas 1, 2 e 3 apontam uma intrincada rede de hifas e/ou pseudo-hifas, leveduras e matrix exopolimérica, respectivamente; B: biofilme tratado com AP, durante 30 minutos, seta aponta acentuada redução do número de células com exposição da rugosidade do corpo de prova.

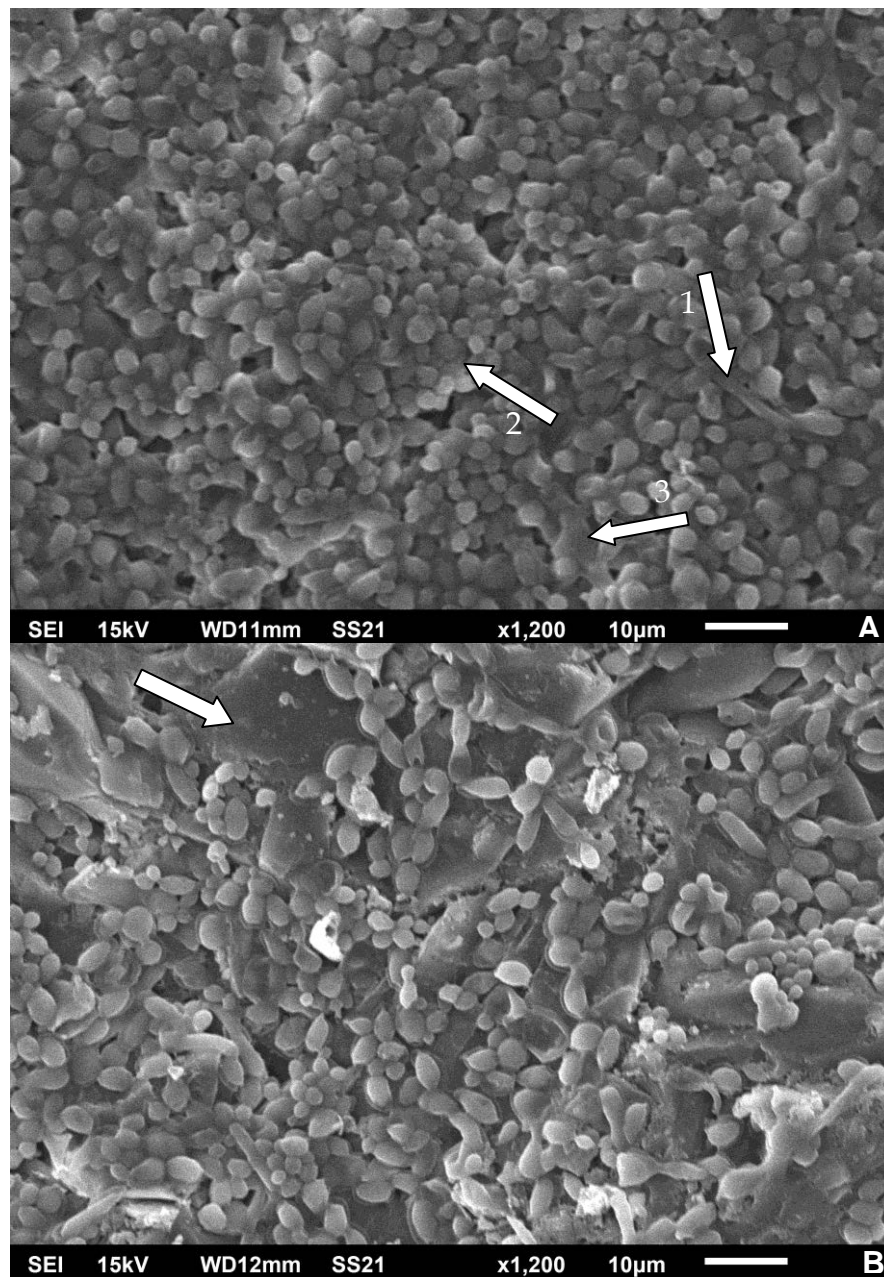


Figura 45: Eletromicrografia mostrando a ação de lipase sobre a organização da arquitetura de biofilme de 24 horas em corpo de prova de resina acrílica. A: controle sem tratamento, setas 1, 2 e 3 apontam uma intrincada rede de hifas e/ou pseudo-hifas, leveduras e matrix exopolimérica, respectivamente; B: biofilme tratado com LP, durante 30 minutos, seta aponta acentuada redução do número de células com exposição da rugosidade do corpo de prova.

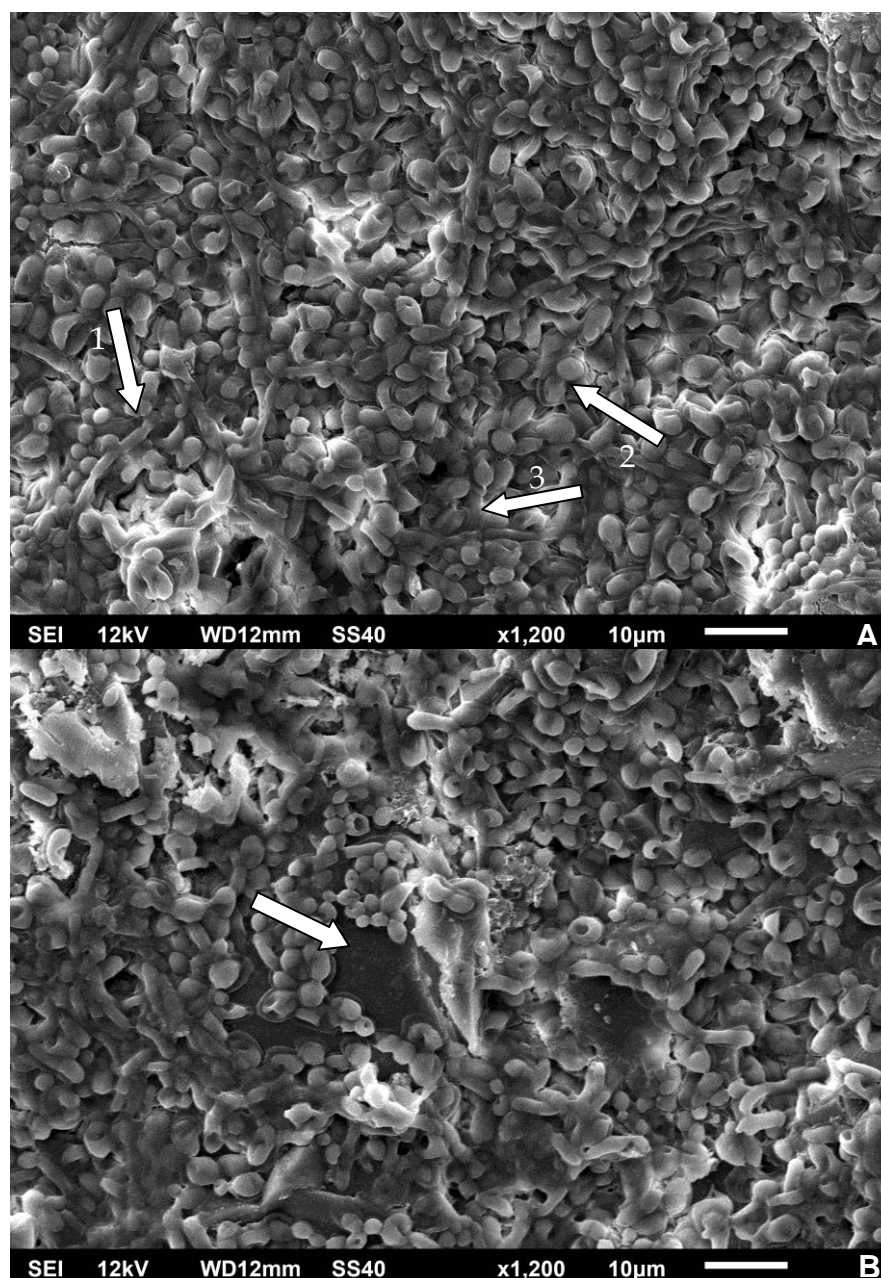


Figura 46: Eletromicrografia mostrando a ação de protease sobre a organização da arquitetura de biofilme de 48 horas em corpo de prova de resina acrílica. A: controle sem tratamento, setas 1, 2 e 3 apontam uma intrincada rede de hifas e/ou pseudo-hifas, leveduras e matrix exopolimérica, respectivamente; B: biofilme tratado com PP, durante 60 minutos, seta aponta acentuada redução do número de células com exposição da rugosidade do corpo de prova.

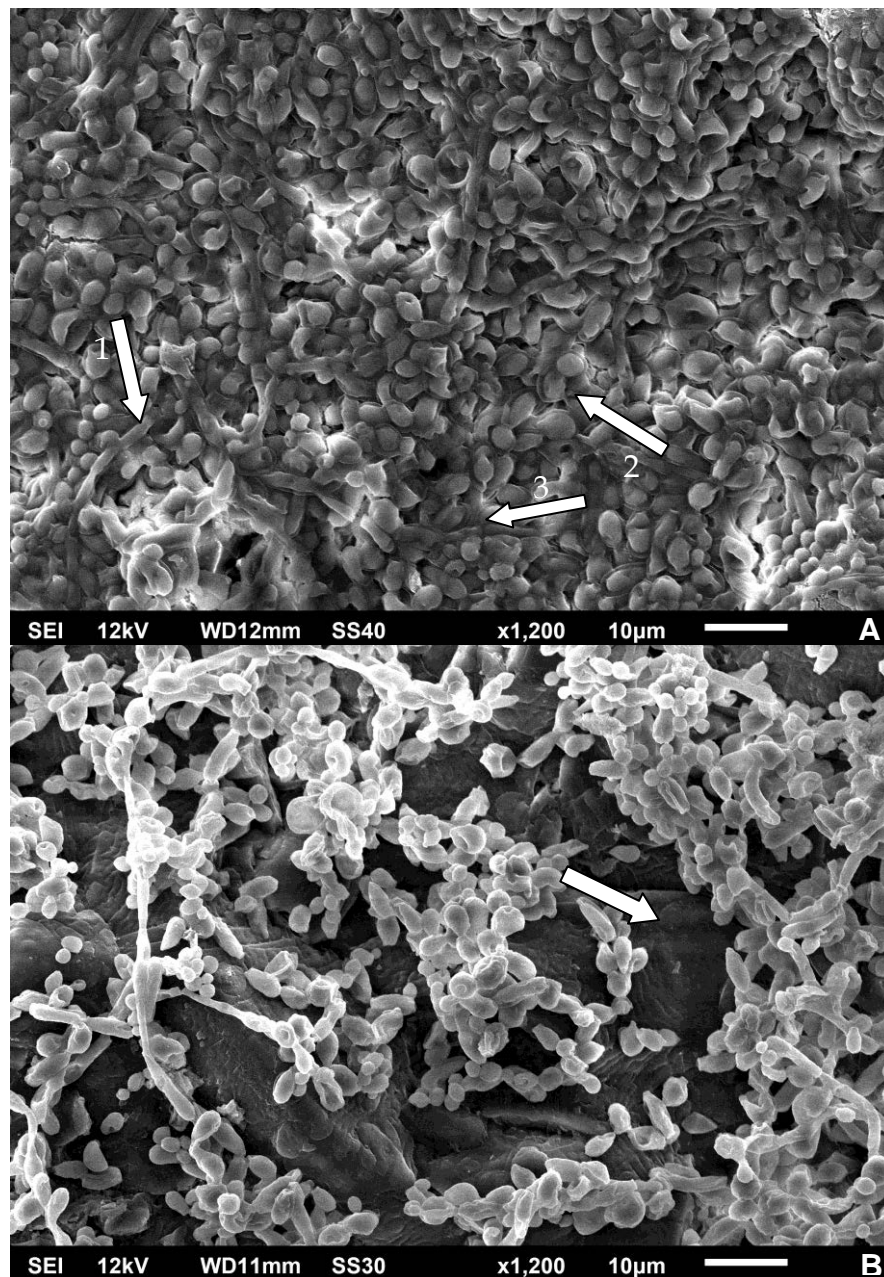


Figura 47: Eletromicrografia mostrando a ação de amilase sobre a organização da arquitetura de biofilme de 48 horas em corpo de prova de resina acrílica. A: controle sem tratamento, setas 1, 2 e 3 apontam uma intrincada rede de hifas e/ou pseudo-hifas, leveduras e matrix exopolimérica, respectivamente; B: biofilme tratado com AP, durante 30 minutos, seta aponta acentuada redução do número de células com exposição da rugosidade do corpo de prova.

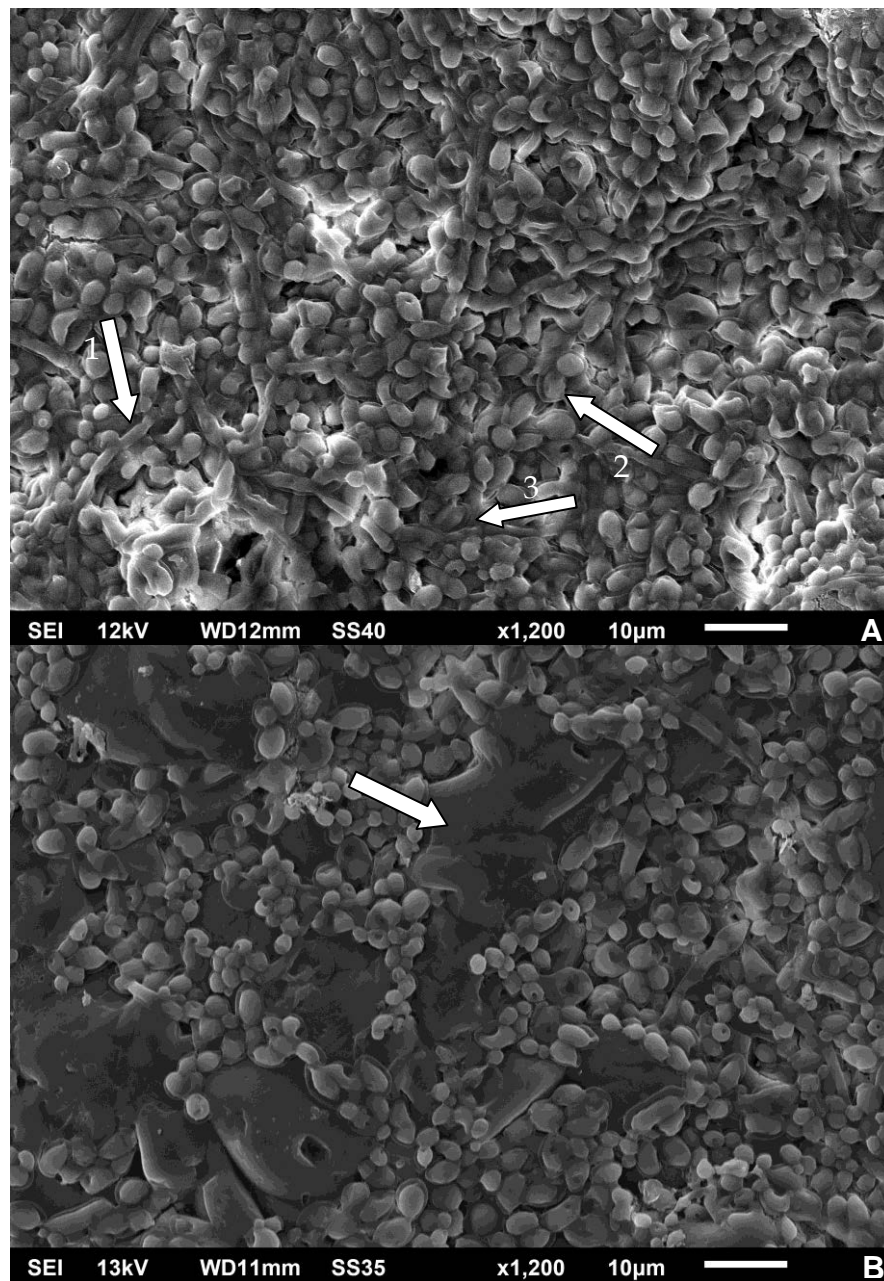


Figura 48: Eletromicrografia mostrando a ação de lipase sobre a organização da arquitetura de biofilme de 48 horas em corpo de prova de resina acrílica. A: controle sem tratamento, setas 1, 2 e 3 apontam uma intrincada rede de hifas e/ou pseudo-hifas, leveduras e matrix exopolimérica, respectivamente; B: biofilme tratado com LP, durante 30 minutos, seta aponta acentuada redução do número de células com exposição da rugosidade do corpo de prova.

6. *Discussão*



É intensa a pesquisa por produtos de origem biotecnológica, e o produto ideal deve trazer agregado algumas vantagens como: alta eficiência, fácil manuseio, baixo custo, que reduza prejuízos ao meio ambiente, entre outras. Felizmente, essa área se desenvolve em uma velocidade surpreendente e novas descobertas permitem o surgimento de produtos inovadores que trazem melhorias à condição de vida do ser humano. A obtenção de enzimas de origem microbiana com a capacidade de agir de forma efetiva frente a biofilmes de *C. albicans* formados em superfícies de próteses odontológicas representa, sem dúvida, esta preocupação.

Neste estudo, foram obtidas três enzimas microbianas: protease, amilase e lipase que foram avaliadas quanto à sua eficiência na redução de biofilmes de *C. albicans*. Sabe-se que o rendimento de biomassa pode ter relação direta com a eficiência do processo de fermentação (PELIZER et al., 2007). Entretanto, neste estudo, observou-se que o maior rendimento de biomassa foi obtido na produção da protease e que em termos de atividade enzimática, após a precipitação com sulfato de amônio, a amilase mostrou-se mais ativa. Estes resultados demonstram ainda a capacidade de precipitação pelo sulfato de amônio, uma vez que, quando comparadas as atividades específicas de cada enzima extrato bruto e no liofilizado, nota-se que o sulfato de amônio foi capaz de concentrar as enzimas de interesse.

O perfil eletroforético das enzimas mostrou a presença de bandas variando entre 14 e 117 kDa para a duplicata da coluna 1 (Figura 8), que corresponde ao liofilizado obtido da produção de lipase, aplicada em duas

diferentes concentrações no gel, com destaque para as 7^a-10^a bandas que se mostraram concentradas entre 14 e 26 kDa, semelhante a dados já descritos em estudos prévios de caracterização de lipases fúngicas (HOFELMANN et al., 1985; OHNISHI et al., 1994; NAMBOODIRI e CHATTOPADHYAYA, 2000; SAXENA et al., 2003; MHETRAS et al., 2009).

A duplicata da coluna 2 (Figura 8), que corresponde ao liofilizado obtido da produção de protease, aplicada em duas diferentes concentrações no gel, apresentou bandas entre 12 e 59 kDa, com destaque para proteína observada na 7^a banda com 16 kDa devido maior concentração, corroborando com dados de proteases fúngicas identificadas em prévios ensaios de caracterização (BIDOCHKA e KHACHATOURIANS, 1987; URTZ e RICE, 2000; SHANKAR et al., 2011).

Na duplicata da coluna 3 (Figura 8), que corresponde ao liofilizado obtido da produção de amilase, aplicada em duas diferentes concentrações no gel, houve variação entre 20 e 130 kDa, com maior expressão das 1^a; 3^a e 4^a bandas com concentração de proteínas entre 63 e 130 kDa. Diversos trabalhos descrevem a presença de bandas que correspondem a amilases fúngicas acima de 50 kDa, o que sugere que existam amilases nesse precipitado (ABE et al., 1988; KHOO et al., 1994; RAMACHANDRAN et al., 2004).

A princípio, foram utilizados dois métodos de dosagem de proteínas totais, o método de Bradford, que se baseia na ligação entre proteínas e o corante "Comassie Blue" G-250, que se liga às proteínas que são quantificadas em 595 nm, tendo este método sensibilidade, além de ser reprodutível e pouco sujeito a interferências, sendo que o método de Lowry (dados não apresentados), segundo

a literatura, sofre influência de diferentes fatores, inclusive do sulfato de amônio e do tampão Tris HCl, utilizados em diferentes procedimentos neste estudo, dessa forma, essa metodologia foi então substituída pela dosagem por Bradford (ZAIA et al., 1998).

C. albicans é a principal espécie relacionada a infecções fúngicas na cavidade bucal e o aumento de sua prevalência em candidíases bucais ocorre especialmente em usuários de próteses totais ou parciais, o que em muitos casos pode levar a infecções invasivas, que têm uma alta taxa de mortalidade, sobretudo em pacientes imunocomprometidos e idosos (CATE et al., 2009; SILVA et al., 2012a; PELLIZZARO et al., 2012; NING et al., 2013).

A formação de biofilme por *C. albicans* exerce implicações clínicas importantes, principalmente devido ao fato de que as células em biofilmes são resistentes à terapia antifúngica. Assim, a formação de biofilme é considerada um dos atributos principais de virulência em *C. albicans* e um fator que contribui para as taxas de mortalidade elevadas associadas à candidíase (UPPULURI et al., 2009; SILVA et al., 2012a; PELLIZZARO et al., 2012; NING et al., 2013).

Nota-se a partir da análise de dados da literatura, que a sensibilidade a agentes antimicrobianos é reduzida principalmente em biofilmes considerados maduros, e que as razões para isso incluem reduzida penetração do agente antifúngico, devido à presença da matriz exopolimérica (CATE et al., 2009; UPPULURI et al., 2009; LIAQAT e SABRI, 2011).

Porém, observa-se nos resultados obtidos neste trabalho, que em biofilmes formados em fundo de microplacas e revelados com XTT, a maior efetividade, das

três enzimas avaliadas, foi frente a biofilmes maduros, ou seja, de 48 horas e que a capacidade de redução de biofilmes de 24 horas, considerado em fase de formação, também se mostrou promissora, uma vez que as três enzimas foram significativamente diferentes do controle de crescimento, ao menos em uma concentração avaliada para cada condição. Percebe-se também que a protease foi mais efetiva em tempo de contato de 60 minutos, enquanto a amilase e a lipase foram mais efetivas em 30 minutos de contato. Observou-se, ainda que quando comparadas entre elas a lipase foi a menos efetiva.

As análises realizadas com clorexidina nas concentrações entre 1 e 32 mg/mL mostraram que a mesma apresentou ação fungistática entre 8 e 32 mg/mL e ação fungicida somente acima de 16 mg/mL, sendo esta ação ainda dependente do tempo de contato (30 ou 60 minutos) e do tipo de biofilme em questão, em formação (24 horas) ou maduro (48 horas). A clorexidina é o anti-séptico mais eficaz quando comparado ao fluconazol e miconazol para o tratamento de biofilmes em usuários de prótese (LAMFON et al., 2005). No entanto, estudos clínicos usando clorexidina para profilaxia de candidíase oral em pacientes imunocomprometidos têm mostrado resultados conflitantes (RIVERA et al., 2013). Além disso, a resistência à clorexidina vem sendo reportada em inúmeros estudos, sobretudo quando as células de *C. albicans* se encontram em biofilmes, uma vez que os micro-organismos que crescem em biofilmes têm um fenótipo único em comparação com os seus homólogos planctônicos. Estas células em biofilme demonstraram a capacidade de sobreviver em concentrações de antibióticos mesmo 1000 vezes acima da concentração inibitória mínima ativa contra a sua

forma planctônica (RAMAGE et al., 2001; SUCI et al., 2003; RIVERA et al., 2013). A concentração inibitória mínima de clorexidina contra formas planctônicas de *C. albicans* é de cerca de 0,00625-0,0125 mg/mL (IMBERT et al., 2003; RIVERA et al., 2013), enquanto que se observa, diante dos resultados obtidos neste estudo, que de fato, a clorexidina apresentou eficiência somente em altas concentrações o que evidencia ainda mais a necessidade da descoberta de novas opções terapêuticas eficientes para a redução de biofilmes de *C. albicans*.

A contagem do número de unidades formadoras de colônias, no entanto, mostrou que as três enzimas produzidas neste estudo, apesar de em alguns casos, apresentarem diferenças em relação ao controle não tratado, com redução de até 1,5 log₁₀, não apresentaram ação fungicida, uma vez que, quando as células recuperadas de biofilme de *C. albicans* foram colocadas em condições ideais de crescimento, estas foram capazes de se desenvolverem novamente. No entanto, quando se considera o fato de estas células estarem formando biofilme de 24 ou 48 horas, esta redução observada é relevante, segundo dados encontrados em estudos que buscam reduzir infecções de superfícies sólidas por biofilmes microbianos (ANDRADE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2013).

A confecção de corpos de provas em resina acrílica permitiu analisar a ação destas enzimas em superfícies semelhantes às encontradas em próteses odontológicas, já que se sabe que a superfície onde o biofilme se adere contribui para sua maior eficiência de adesão e consequente resistência (DONLAN e COSTERTON, 2002; ANDRADE et al., 2008). Além disso, procurou-se neste caso, aplicar as enzimas nos tempos de contato que se mostraram mais eficientes na

metodologia de microplacas tanto frente a biofilmes em formação (24 horas) quanto a maduro (48 horas).

Realizaram-se também testes, em ambas as análises, microplacas e corpos de prova, para termos de comparação, com enzimas adquiridas comercialmente e em estado altamente purificado. As atividades específicas apresentadas em seus rótulos foram utilizadas para o cálculo de suas concentrações e os mesmos tampões empregados para cada enzima produzida neste trabalho foram utilizados para a ressuspensão destas.

Nos ensaios em corpos de prova, amilase e protease produzidas neste estudo mostraram resultados semelhantes entre si e aos encontrados em biofilmes formados em fundo de microplacas, com eficiente capacidade de redução nos melhores tempos de contato previamente selecionados. Contudo, a lipase produzida neste estudo apresentou aumento significativo em relação à sua ação em microplacas, porém ainda inferior às demais.

De fato, tanto as enzimas produzidas como as enzimas adquiridas comercialmente, mostraram maior eficiência na redução do metabolismo do biofilme, portanto ação fungistática, do que capacidade de causar a total inativação dos mesmos, ação fungicida, tanto nas metodologias realizadas em fundo de microplaca, como em corpos de prova. Notou-se ainda que as enzimas produzidas neste estudo foram mais eficientes do que as adquiridas comercialmente, sugerindo que independentemente destas estarem somente precipitadas elas são tão eficientes quanto as purificadas, além disso, deve-se

considerar ainda que as enzimas adquiridas comercialmente talvez não possuam a mesma estabilidade quando ressuspensas nos tampões empregados neste estudo.

As células de *C. albicans* com inúmeros polissacarídeos intracelulares diretamente envolvidos na formação de biofilme fúngico, oferecem uma ampla gama de alvos potenciais para a intervenção terapêutica (CATE et al., 2009).

Como o biofilme de *C. albicans* é constituído ainda de matriz exopolimérica, repleta de substâncias polímeras, como proteínas ligadas a carboidratos (DIGGLE et al., 2006; AL-FATTANI e DOUGLAS, 2006), pili, flagelo, outras fibras adesivas (ZOGAJ et al., 2001; PINKNER et al., 2006; CEGELSKI et al., 2009), como por exemplo, as adesinas, que determinam a capacidade de adesão dessas células, pois permitem uma interação dos receptores de membrana ou proteínas da matriz extracelular com a superfície para que haja a adesão, além da elevada densidade de células e até mesmo DNA extracelular (VILAIN et al., 2009), estas estruturas representam, atualmente, um grande desafio (UPPULURI et al., 2009; SILVA et al., 2012b) o que justifica o fato de os resultados observados para as enzimas protease, amilase e lipase produzidas neste estudo serem altamente expressivos, mesmo em termos de ação fungistática, uma vez que estas enzimas possuem afinidade por substratos relacionados a esta composição e seriam, portanto, capazes de romper a estrutura do biofilme, quer seja, reduzindo seu metabolismo, ou até mesmo reduzindo a concentração de adesinas (LEQUETTE et al., 2010; LIAQAT e SABRI, 2011).

Além disso, procuramos avaliar neste estudo, os possíveis mecanismos de ação das enzimas produzidas sobre o biofilme e/ou sobre as células de *C. albicans*, por meio de abordagens como, por exemplo, ação sobre fatores de virulência.

Neste estudo, notamos que as três enzimas não foram capazes de alterar significativamente a expressão dos fatores de virulência como fosfolipases e aspartil-proteinases secretoras das células de *C. albicans*.

Estes fatores de virulência facilitam a penetração de hifas dentro das células e tecidos, durante o processo de infecção, contribuindo diretamente para a patogenicidade de *C. albicans* (NAGLIK et al., 2004; SAMARANAYAKE et al., 2005; SAMARANAYAKE et al., 2006; TANIGUCHI et al., 2009).

Observou-se nos resultados deste estudo que tanto as fosfolipases como as aspartil-proteinases não foram secretadas de maneira significativa pelas células de *C. albicans*, nem mesmo no controle sem tratamento. É importante ressaltar que as células utilizadas nesta etapa foram recuperadas de biofilmes, porém não estavam formando biofilmes durante as análises e que repiques prévios foram realizados, para que o emprego da técnica fosse possível.

Segundo Mahmoudabadi et al. (2010) quando o valor de Pz for igual a 1 significa que a cepa avaliada apresentou atividade negativa para fosfolipase, enquanto um valor de Pz <0,90-0,99 = a cepa avaliada apresentou fraca atividade para fosfolipase (+); 0,80-0,89 = pobre atividade (++); 0,70-0,79 = moderada atividade (+++) e <0,70 = grande atividade para fosfolipase (++++), portanto a cepa de *C. albicans* utilizada neste estudo apresentou fraca atividade para fosfolipase até mesmo no controle que não recebeu tratamento. Em estudo prévio,

onde foi empregado método quantitativo, espectrofotométrico, de determinação de fosfolipases em uma cepa de *C. albicans* diferente da utilizada neste estudo, demonstrou-se que este fator de virulência está presente em baixas concentrações, da ordem de microgramas, quando as células de *C. albicans* se encontram em biofilmes em comparação a células na forma planctônica (TANIGUCHI et al., 2009). Como em nosso estudo empregou-se um método menos sensível do que o utilizado por este autor acredita-se que isto tenha reduzido a capacidade de percepção da produção da mesma, ou ainda devido ao fato de que diferentes cepas produzem quantidades variáveis destes fatores de virulência, dependendo do seu patrimônio genético, ou ainda de estímulos ambientais, dentre outras condições (SAMARANAYAKE et al., 2005; SAMARANAYAKE et al., 2006).

As aspartil-proteinases são controladas por genes diferentes daqueles que controlam a expressão das fosfolipases e, sabe-se que este fator de virulência é expresso eficientemente em biofilmes diferindo esta característica quando em células planctônicas. No entanto, notou-se neste estudo que as três enzimas não alteraram esta expressão, e que nem mesmo no controle sem tratamento houve produção da mesma. A expressão e regulação desses genes depende do tipo e fase de infecção por *C. albicans*, das condições de pH e disponibilidade do substrato no ambiente local. Diante dos dados apresentados sugere-se que não foram observadas produções deste fator de virulência até mesmo nos controles não tratados, devido ao fato de que este seria expresso inicialmente em pH ácido, além de estes mecanismos de virulência estarem ativos *in vivo* e a cepa ATCC utilizada neste estudo, ser mantida congelada, ficando sempre ausente os indutores

necessários para tal expressão. Adicionalmente, apenas uma única linhagem de *C. albicans* (SC5314) tem sido geralmente utilizada para os estudos dos genes que expressam aspartil-proteinases e, portanto, não se sabe se esta estirpe é representativa de todas as outras estirpes de *C. albicans* que causam infecções clínicas. Além disso, a patogenicidade de *C. albicans* é um processo multifatorial que é regulado por uma rede de fatores de virulência, proteínas de adesão, *quorum sensing*, indicando etapas de evolução e adaptação para a infecção (NAGLIK et al., 2004; KUMAMOTO e VINCES, 2005; SAMARANAYAKE et al., 2006; TANIGUCHI et al., 2009; NAILIS et al., 2010).

Notou-se que as três enzimas foram capazes de alterar as concentrações de ergosterol de parede de *C. albicans* de maneira diferente. Observou-se que enquanto PP e AP reduziram de maneira significativa, quando comparado ao controle sem tratamento, a concentração deste, a LP, levou ao aumento na concentração do mesmo. Acredita-se que isto tenha ocorrido devido ao fato de que protease e amilase talvez possuam afinidades por moléculas envolvidas na biosíntese de ergosterol, enquanto que lipase pode ter promovido a liberação de ergosterol da parede de *C. albicans*, uma vez que esta enzima atua sobre moléculas como os fosfolipídeos presentes na parede e que estes, por sua vez, promovem a ancoragem do ergosterol na membrana plasmática, fazendo com que o mesmo ficasse livre e, portanto, em maior concentração (MESA-ARANGO et al., 2012).

Estudos demonstram que moléculas da via de biosíntese de ergosterol são importantes alvos de várias classes de antifúngicos utilizados para tratar infecções de *C. albicans* e, dentre esses, os polienos e os azólicos têm uma posição

dominante. Polienos como a anfotericina B atuam em nível de ergosterol, ligando firmemente a esta molécula. Isto causa danos na membrana plasmática da célula, resultando assim, em fuga de íons intracelulares. Azóis, como fluconazol, itraconazol ou voriconazol inibem a citocromo P450, principalmente a isoforma Cyp51, responsável pela desmetilação do lanosterol em 14 α e assim bloqueia a biossíntese do ergosterol (ODDS et al., 2003; ONYEWU et al., 2003). Nas etapas tardias desta via de biossíntese azóis inibem também a dessaturação da fracção de esterol. Outras classes de antifúngicos menos relevantes para o tratamento de infecções de *C. albicans* como as alilaminas (terbinafina) e morfolinás (amorolfina), inibem a biossíntese do ergosterol bloqueando a atividade de esqualeno epoxidase e esterol-redutase ou de isomerases, respectivamente. Vários mecanismos de ação têm sido documentados, no entanto os dados obtidos neste trabalho de pesquisa requerem estudos mais profundos para a real compreensão da ação das enzimas produzidas neste estudo sobre o ergosterol (SANGLARD et al., 2003; MESA-ARANGO et al., 2012).

Ainda quanto a abordagens dos possíveis mecanismos de ação das três enzimas sobre o biofilme, observou-se a capacidade de alteração por parte destas da arquitetura do biofilme de *C. albicans* por meio de imagens obtidas por MEV em corpos de prova. Nota-se a redução de adesão, assim como a redução de filamentação das células nos corpos de prova que ficaram em contato com as três enzimas, quando comparados aos controles não tratados. Estudos prévios nos quais foram empregados alquilfosfolipídeos sobre biofilmes maduros mostraram dados semelhantes aos deste estudo. Esses resultados sugerem que as enzimas

estariam atuando alterando tanto suas vias biossintéticas (redução do metabolismo), como rompendo a matriz exopolimérica, levando ao desprendimento das células da superfície dos corpos de prova, uma vez que a matriz exopolimérica, responsável pela adesão e coesão celular, possui em sua composição substratos naturais para as enzimas utilizadas neste estudo. Além da possibilidade de estas enzimas estarem influenciando ainda sobre a síntese de adesinas, por parte das células em biofilme, uma vez que também existem relatos da influência destas substâncias no processo de adesão celular (AL-FATTANI e DOUGLAS, 2006; FLEMMING e WINGENDER, 2010; LEQUETTE et al., 2010; VILA et al., 2013; KOSTAKIOTI et al., 2013).

Inúmeros estudos têm sido realizados no intuito de se buscar opções terapêuticas para o tratamento de biofilmes aderidos a próteses dentárias, além de biofilmes aderidos a outros dispositivos terapêuticos ou estruturas industriais, e uma variedade de compostos vêm sendo analisadas como possíveis redutores de biofilmes de *C. albicans*. Dentre eles, produtos sintéticos com modificações em sua farmacodinâmica, em sinergismo com compostos biocidas, inibidores enzimáticos, produtos naturais (extratos, óleos essenciais e substâncias isoladas) e terapias fotodinâmicas (KUZMA et al., 2007; CATEAU et al., 2008; DALLEAU et al., 2008; AL-BAKRI et al., 2009; DAROUICHE et al., 2009; MARSH, 2010; RUKAYADI et al., 2011; DOVIGO et al., 2011; TAWEECHASUPAPONG et al., 2012).

Porém, em nenhum deles há relatos da utilização de enzimas fúngicas, somente em estado precipitado. Além disso, considerando os tempos de contato, a facilidade de acesso para os pacientes, uma vez que, alguns destes procedimentos,

estão voltados para aplicação apenas em consultórios odontológicos, como é o caso das terapias fotodinâmicas, é evidente a importância dos dados obtidos neste trabalho de pesquisa, já que a eficiência destes compostos, em geral, é semelhante aos resultados observados neste estudo (KUZMA et al., 2007; CATEAU et al., 2008; DALLEAU et al., 2008; AL-BAKRI et al., 2009; DAROUICHE et al., 2009; MARSH, 2010; RUKAYADI et al., 2011; DOVIGO et al., 2011; TAWEECHASUPAPONG et al., 2012).

Acredita-se que o reconhecimento, por parte de pesquisadores, do papel que a formação de biofilmes desempenha durante infecções graves, especialmente em pacientes usuários de dispositivos médicos, levará a grandes avanços no tratamento destes em um futuro próximo (UPPULURI et al., 2009; SAMIMI et al., 2013; BJARNSHOLT et al., 2013). Tem-se, portanto, com este trabalho, a oportunidade de contribuir para a descoberta de produtos de origem biotecnológica capazes de atuarem de maneira efetiva sobre biofilmes microbianos.

7. Conclusão



Os resultados obtidos até o momento permitem concluir que:

- ✓ As enzimas fúngicas amilase, lipase e protease foram obtidas com sucesso, a partir de fermentação submersa em biorreator;
- ✓ A precipitação com sulfato de amônio concentrou as enzimas de interesse neste estudo de forma adequada ao uso posterior;
- ✓ As enzimas estudadas foram eficientes na redução de biofilme de *C. albicans* avaliada por XTT, em diferentes concentrações, especialmente em biofilme maduro, ou seja, de 48 horas;
- ✓ A maior efetividade de redução de biofilmes ocorreu em tempos de contato de 30 minutos para lipase e amilase e 60 minutos para protease;
- ✓ A eficiência das enzimas estudadas está diretamente relacionada à concentração de cada uma delas;
- ✓ Apesar de mostrarem capacidade de reduzir o metabolismo celular e ação fungistática, as enzimas estudadas não possuem ação fungicida altamente significativa;
- ✓ As enzimas estudadas não apresentaram efeito na alteração de fatores de virulência de células de *C. albicans*;
- ✓ As enzimas alteraram de maneira diferente as concentrações de ergosterol da parede de *C. albicans*;
- ✓ As enzimas estudadas possuem capacidade de alterar a conformação, desorganizando a arquitetura do biofilme.

8. Referências Bibliográficas



ABACI, O. Investigation of extracellular phospholipase and proteinase activities of *Candida* species isolated from individual denture wearers and genotypic distribution of *Candida albicans* strains. **Current Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1308-1314, 2011.

ABARCA, M.; BRAGULAT, M.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2650-2655, 1994.

ABE, K.; GOMI, K.; HASEGAWA, F.; MACHIDA, M. Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. **Mycopathologia**, v. 162, p. 143-153, 2006.

ABE, J.I.; AKAJIMA, C.K.; AGANO, H.I.; IZUKURI, S. Properties of the raw-starch digesting amylase of *Aspergillus* sp. K-27: a synergistic action of glucoamylase and alpha-amylase. **Carbohydrate Research**, v. 175, p. 85-92, 1988.

AGRAWAL, D.; PATIDAR, P.; BANERJEE, T.; PATIL, S. Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria feline* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1131-1136, 2005.

AKCAN, N.; UYAR, F. Production of extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* RSKK96 with solid state fermentation. **EurAsian Journal of BioSciences**, v. 5, n. 5, p. 64-72, 2011.

AL-BAKRI, A.G.; OTHMAN, G.; BUSTANJI, Y. The assessment of the antibacterial and antifungal activities of aspirin, EDTA and aspirin-EDTA combination and their effectiveness as antibiofilm agents. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 280-286, 2009.

AL-FATTANI, M.A.; DOUGLAS, L.J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 999-1008, 2006.

ANDRADE, I.P.B.; JUNQUEIRA, J.C.; FARIA, I.S.; SANTOS, S.S.F.; REGO, M.A.; JORGE, A.O.C. Vinegar effects in *Candida albicans* after the adherence *in-vitro* on the heat-activated acrylic resin. **Ciência Odontológica Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 91-98, 2008.

ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; JRADI, H.; DESAI, T.; MORRISON, C. Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3332-3337, 1999.

BAKUNINA, I.Y.; NEDASHKOVSKAYA, O.I.; KIM, S.B.; ZVYAGINTSEVA, T.N.; MIKHAILOV, V.V. Distribution of α -N acetylgalactosaminidases among marine bacteria of the phylum bacteroidetes, epiphytes of marine algae of the seas of Okhotsk and Japan. **Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 373-378, 2012.

BARBESGAARD, P.; HELDT-HANSEN, H.P.; DIDERICHSEN, B. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 569-572, 1992.

BARBOSA, L.C.; FERREIRA, M.R.M.; CALABRICH, C.F.C.; VIANA, A.C.; LEMOS, M.C.L.; LAURIA, R.A. Edentulous patients' knowledge of dental hygiene and care of protheses. **Gerodontology**, v. 25, n. 2, p. 99-106, 2008.

BARREDO, J.L. **Microbial enzymes and biotransformations**. Humana Press Totowa. In: SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. L- Glutaminase as a therapeutic enzyme of microbial origin, New Jersey. 2005. p.77.

BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Purification and Properties of an Extracellular Protease Produced by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 1679-1684, 1987.

BJARNSHOLT, T.; CIOFU, O.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; HØIBY, N. Applying insights from biofilm biology to drug development -can a new approach be developed? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, p. 791-808, 2013.

BLANKENSHIP, J.R.; MITCHELL, A.P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 588-594, 2006.

BOARI, C.A.; ALVES, M.P.; TEBALDI, V.M.R.; SAVIAN, T.V.; PICCOLI, R.H. Biofilm formation by *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel using milk and different conditions of cultivation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.

BORDI, C.; BENTZMANN, S. Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. **Annals of Intensive Care**, n. 1, p. 1-8, 2011.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde bucal coletiva, 2004. Disponível em: <http://www.fo.usp.br/wp-content/uploads/GTextoSBC> Acesso em: 03 mar. 2014.

CARLSEN, M.; NIELSEN, J. Influence of carbon source on alfa-amylase production by *Aspergillus oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 346-349, 2001.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINI F. J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.

CATÃO, C.D.S.; RAMOS, I.N.C.; SILVA NETO, J.M.; DUARTE, S.M.O.; BATISTA, A.U.D.; DIAS, A.H.M. Eficiência de substâncias químicas na remoção do biofilme em próteses totais. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 36, n. 1, p.53-60, 2007.

CATE, J.M.; KLIS, F.M.; PEREIRA-CENCI, T.; CRIELAARD, W.; GROOT, P.W.J. Molecular and cellular mechanisms that lead to candida biofilm formation. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 2, p. 105-115, 2009.

CATEAU, E.; RODIER, M.H.; IMBERT, C. In vitro efficacies of caspofungin or micafungin catheter lock solutions on *Candida albicans* biofilm growth. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 1, p. 153-155, 2008.

CEGELSKI, L.; PINKNER, J. S.; HAMMER, N. D.; CUSUMANO, C. K.; HUNG, C. S.; CHORELL, E.; ABERG, V.; WALKER, J. N.; SEED, P. C.; ALMQVIST, F.; CHAPMAN, M. R.; HULTGREN, S. J. Small-molecule inhibitors target *Escherichia*

coli amyloid biogenesis and biofilm formation. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 913–919, 2009.

CHAIGNON, P.; SADOVSKAYA, I.; RAGUNAH, Ch.; RAMASUBBU, N.; KAPLAN, J.B.; JABBOURI, S. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 125–132, 2007.

CHANDKI, R.; BANTHIA, P.; BANTHIA, R. Biofilms: A microbial home. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 15, n. 2, p. 111–114, 2011.

CHO, E.M.; BOUCIAS, D.; KEYHANI N.O. EST analysis of cDNA libraries from the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. II. Fungal cells sporulating on chitin and producing oosporein. **Microbiology**, v. 152, n. 9, p. 2855–2864, 2006.

COELHO, M.Z.; LEITE, S.F.; ROSA, M.F.; FURTADO, A.L. Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **B. CEPPA Curitiba**, v. 19, n. 1, p. 33–42, 2001.

DALLEAU, S.; CATEAU, E.; BERGES, T.; BERJEAUD, J.M.; IMBERT, C. *In vitro* activity of terpenes against *Candida* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. 6, p. 572–576, 2008.

DAROUICHE, R.O.; MANSOURI, M.D.; GAWANDE, P.V.; MADHYASTHA, S. Antimicrobial and antibiofilm efficacy of triclosan and DispersinB® combination. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 1, p. 88-93, 2009.

DAWSON, R.M.C.; ELLIOT, D.C.; JONES, K.M. **Data for biochemical research**. 2.ed. Oxford: Oxford University Press, 1969.

DEMIAN, A.L.; ADRIO, J.L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Molecular Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 41-55, 2008.

DENG A.; WUA, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, G.; WENA, T. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7100-7106, 2010.

DIGGLE, S.P.; STACEY, R.E.; DODD, C.; CAMARA, M.; WILLIAMS, P.; WINZER, K. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 1095-1104, 2006.

DINSDALE, E.A.; EDWARDS, R.A.; HALL, D.; ANGLY, F.; BREITBART, M.; BRULC, J.M.; FURLAN, M.; DESNUES, C.; HAYNES, M.; LI, L.; MCDANIEL, L.; MORAN, M.A.; NELSON, K.E.; NILSSON, C.; OLSON, R.; PAUL, J.; BRITO, B.R.; RUAN, Y.; SWAN, B.K.; STEVENS, R.; VALENTINE, D.L.; THURBER, R.V.;

WEGLEY, L.; WHITE, B.A.; ROHWER, F. Functional metagenomic profiling of nine biomes. **Nature**, v. 452, n. 7187, p. 629–632, 2008.

DONLAN, R.M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 8, p. 1387–1392, 2001.

DOVIGO, L.N.; PAVARINA, A.C.; CARMELLO, J.C.; MACHADO, A.L.; BRUNETTI, I.L.; BAGNATO, V.S. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, n. 9, p. 927–934, 2011a.

DOVIGO, L.N.; PAVARINA, A.C.; RIBEIRO, A.P.D.; BRUNETTI, I.L.; COSTA, C.A.S.; JACOMASSI, D.P.; BAGNATO, V.S.; KURACHI, C. Investigation of the photodynamic effects of *Curcumin* against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 4, p. 895–903, 2011b.

ERTUGRUL, S.; DÖNMEZ, G.; TAKAÇ, S. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, n. 3, p. 720–724, 2007.

FAN, Y.; ZHANG, Y.; YANG, X.; PEI, X.; GUO, S.; PEI, Y. Expression of a *Beauveria bassiana* chitinase (Bbchit1) in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 56, n. 1, p. 93–99, 2007.

FANG, W.; LENG, B.; XIAO, Y.; JIN, K.; MA, J.; FAN, Y.; FENG, J.; YANG, X.; ZHANG, Y.; PEI, Y. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 363-370, 2005.

FERRER, M.; BELOQUI, A.; TIMMIS, K.N.; GOLYSHIN, P.N. Metagenomics forming new genetic resources of microbial communities. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 1-2, p. 109-123, 2009.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 623-633, 2010.

FRANKEN, L.P.G.; MARCON, N.S.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; FREIRE, D.M.G.; DARIVA, C.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, J.V. Effect of treatment with compressed propane on lipases hydrolytic activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 1, p. 511-520, 2010.

GANGADHARAN, D.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Response surface methodology for the optimization of alpha-amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4597-4602, 2008.

GOGATE, P.R.; KABADI, A.M. A review of applications of cavitation in biochemical. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 60-72, 2009.

GOUDA, M.K. Optimization and purification of alkaline proteases produced by marine *Bacillus* sp. MIG newly isolated from eastern harbor of Alexandria. **Polish Journal of Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 119-126, 2006.

GREEN, B.D.; KELLER, M. Capturing the uncultivated majority. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 236-240, 2006.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.

HAKI, G.D.; RAKSHIT S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 17-34, 2003.

HAN, P.; ZHOU, P.; HU, S.; YANG, S.; YAN, Q.; JIANG, Z. A novel multifunctional α -amylase from the thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea*: biochemical characterization and three-dimensional structure. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 170, n. 2, p. 420- 435, 2013.

HMIDET, N.; EL-HADJ ALI, N.; HADDAR, A.; KANOUN, S.; ALYA, S.; NASRI, M. Alkaline proteases and thermostable alpha-amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. **Biochemical Engineering Journal**, v. 47, n. 1-3, p. 71-79, 2009.

HOFELMANN, M.; HARTMANN, J.; ZINK, A.; SCHREIER, P. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 5, p. 1721-1731, 1985.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA. IBGE, 2008. **Projeção da população do Brasil**. Revisão de 2008. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2008/projecao.pdf Acesso em: 03 março 2014.

ISAKSSON, R.; BECKTOR, J.P.; BROWN, A.; LAURIZOHN, C.; ISAKSSON, S. Oral health and oral implant status in edentulous patients with implant-supported dental prostheses who are receiving long-term nursing care. **Gerodontology**, v. 26, n. 4, p. 245-249, 2009.

JAKUBOVICS, N.S. Talk of the town: interspecies communication in oral biofilms. **Molecular Oral Microbiology**, v. 25, n. 1, p.4-14, 2010.

JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931–2944, 2005.

JOSEPH, B.; RAMTEKEA, P.W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 5, p. 457-470, 2008.

KAMMOUN, R.; NAILI, B.; BEJAR, S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5602–5609, 2008.

KHO, S.L.; AMIRUL, A.A.; KAMARUZAMAN, M.; NAZALAN N.; AZIZAN M.N. Purification and characterization of α -amylase from *Aspergillus flavus*. **Folia Microbiologica**, v. 39, n. 5, p. 392-398, 1994.

KÜCK, U., NOWROUSIAN, M., HOFF, B., ENGH, I. **Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen; Schaden, Bekämpfung**. Berlin Heidelberg: Springer, 1986. p.33-41.

KULAK-OZKAN, Y.; KAZAZOGLU, E.; ARIKAN, A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 29, n. 3, p. 300–304, 2002.

KUMAMOTO, C.A.; VINCES, M.D. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. **Annual Review of Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 113–133, 2005.

KUZMA, L.; ROZALSKIB, M.; WALENCKAC, E.; ROZALSKAC, B.; WYSOKINSKAA, H. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: Salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant *Staphylococci*. **Phytomedicine**, v. 14, n. 1, p. 31–35, 2007.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 4, p. 1-23, 2013.

LAMFON, H.; AL-KARAAWI, Z.; MCCULLOUGH, M.; PORTER, S.R.; PRATTEN, J. Composition of *in vitro* denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. **FEMS Microbiology Letters**, v. 242, n. 2, p. 345-51, 2005.

LEDDER, R.G; MADHWANI, T; SREENIVASAN, P.K.; DE VIZIO, W.; McBAIN, A.J. An *in vitro* evaluation of hydrolytic enzymes as dental plaque control agents. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 482-491, 2009.

LEQUETTE, Y.; BOELS, G.; CLARISSE, M.; FAILLE, C. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. **Biofouling**, v. 26, n. 4, p. 421-431, 2010.

LIAQAT, I.; SABRI, A.N. Biofilm dental unit water line and its control. **African Journal of Clinical and Experimental Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 15-21, 2011.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MAHADIK, N.D.; BASTAWDE, K.B.; PUNTAMBEKAR, U.S.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2031-2034, 2004.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S.K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1729-1735, 2008.

MAHMOUDABADI, A.Z.; ZARRIN, M.; MIRY, S. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolated from vagina and urine samples. **Jundishapur Journal of**

Microbiology, v. 3, n. 4, p. 169-73, 2010.

MANE, A.; PAWALE, C.; GAIKWAD, S.; BEMBALKAR, S.; RISBUD, A. Adherence to buccal epithelial cells, enzymatic and hemolytic activities of *Candida* isolates from HIV-infected individuals. **Medical Mycology**, v. 49, n. 5, p. 548-551, 2011.

MARCHINI, L.; VIEIRA, P.C.; BOSSAN, T.P.; MONTENEGRO, F.L.B.; CUNHA, V.P.P. Self-reported oral hygiene habits among institutionalized elderly and their relationship to the condition of oral tissues in Taubaté, Brazil. **Gerodontology**, v. 23, n. 1, p. 33-37, 2006.

MARSH, P.D. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. **Journal of dentistry**, v. 38, n. 1, p. S11-S15, 2010.

MARSH, P.D.; MOTER, A.; DEVINE, D.A. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. **Periodontology 2000**, v. 55, n. 1, p. 16-35, 2011.

MARTINS, J.S.; JUNQUEIRA, J.C.; FARIA, R.L.; SANTIAGO, N.F.; ROSSONI, R.D.; COLOMBO, C.E.D.; JORGE, A.O.C. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 111, n. 1, p. 71-77, 2011.

MENDES, A.A.; CASTRO, H.F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, 296-305, 2005.

MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2012.

MHETRAS, N.C.; BASTAWDE, K.B.; GOKHALE, D.V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1486-1490, 2009.

MITIDIERI, S.; SOUZA MARTINELLI, A.H.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 10, p. 1217-1224, 2006.

MOIMAZ, S.A.S; SANTOS, C.L.V.; PIZZATTO, E.; GARBIN, C.A.S.; SALIBA, N.A. Perfil de utilização de próteses totais em idosos e avaliação da eficácia de sua higienização. **Revista de Ciência Odontológica Brasileira**, v. 7, n. 3, p. 72-78, 2004.

MUKHERJEE, A.K.; BORAH, M.; RAÍ, S.K. To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular alpha-amylase

synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solidstate fermentation and exploration of feasibility for inclusion of alpha-amylase in laundry detergent formulations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 3, p. 149-156, 2009.

MSU, Montana State University, Center for Biofilm Engineering. Brief history of "biofilm". Disponível em: <http://www.biofilm.montana.edu/node/2930>. Acesso em 13 jan. 2014.

NAGLIK, J.; ALBRECHT, A.; BADER, O.; HUBE, B. Microreview: *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, v. 10, p. 915-926, 2004.

NAILIS, H.; KUCHARÍKOVÁ, S.; ŘIČICOVÁ, M.; DIJCK, P.V.; DEFORCE, D.; NELIS, H.; COENYE, T. R. Real- time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 103-114, 2010.

NAKAMOTO, K.; TAMAMOTO, M.; HAMADA, T. Evaluation of denture cleansers with and without enzymes against *Candida albicans*. **Journal Prosthetic Dentistry**, v. 66, n. 6, p. 792-795, 1991.

NING, Y.; HU, X.; LING, J.; DU, Y.; LIU, J.; LIU, H.; PENG, Z. *Candida albicans* survival and biofilm formation under starvation conditions. **International Endodontic Journal**, v. 46, n.1, p. 62-70, 2013.

NOBILE, C. J.; NETT, J. E.; ANDES, D. R.; MITCHELL, A. P. Function of *Candida albicans* Adhesin Hwp1 in Biofilm Formation. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 10, p. 1604-1610, 2006.

NORONHA, E. F.; MARCO, J. L. Proteases: características e aplicações industriais. In SAID, S.; PIETRO R.C.L.R. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 440 p.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J.; GOW, N. A. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.

OHNISHI, K.; YOSHIDA, Y.; TOITA, J.; SEKIGUCHI, J. Purification and characterization of a novel lipolytic enzyme from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation of Bioengineering**, v. 78, n. 1, p. 413-419, 1994.

ONYEWU, C.; BLANKENSHIP, J. R.; DEL POETA, M.; HEITMAN, J. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 956-964, 2003.

OZKAN, Y.; OZCAN, M.; KULAK, Y.; KAZAZOGLU, E.; ARIKAN, A. General health, dental status and perceived dental treatment needs of an elderly population in Istanbul. **Gerodontology**, v. 28, n. 1, p. 28-36, 2011.

PANDEY, A; WEBB, C; SOCCOL, C.R; LARROCHE, C. **Enzyme technology**. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005. p.760.

PARANHOS, H.F.; SILVA-LOVATO, C.H.; SOUZA, R.F.; CRUZ, P.C.; FREITAS, K.M.; PERACINI, A. Comparação dos níveis de biofilme em superfícies de próteses totais superiores por meio de método computadorizado. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 28, n. 3, p. 9-15, 2007.

PARANHOS, H.F.O.; SILVA, C.H.L.; CRUZ, P.C. Métodos de quantificação de biofilme em prótese total: Revisão da Literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 33, n. 4, p. 203-210, 2004.

PARENICOVÁ, L.; BENEN, J.A.E.; SAMSON, R.A.; VISSER, J. Evaluation of RFLP analysis for the classification of selected black aspergilli. **Mycological Research**, v. 101, n. 7, p. 810-814, 1997.

PEDERSEN, H.; NIELSEN, J. The influence of nitrogen sources on the alfa-amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 3, p. 278-281, 2000.

PELIZER, L.H.; PONTIERI, M.H.; MORAES, I.O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technoogy & Management Innovation**, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2007.

PELLIZZARO, D.; POLYZOIS, G.; MACHADO, A.L.; GIAMPAOLO, E.T.; SANITÁ, P.V.; VERGANI, C.E. Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing *in vitro* *Candida albicans* biofilm viability. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 5, p. 547-554, 2012.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PINKNER, J.S.; REMAUT, H.; BUELENS, F.; MILLER, E.; ABERG, V.; PEMBERTON, N.; HEDENSTROM, M.; LARSSON, A.; SEED, P.; WAKSMAN, G.; HULTGREN, S.J.; ALMQVIST, F. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 103, n. 47, p. 17897-17902, 2006.

POZA, M.; DE MIGUEL, T.; SIEIRO, C.; VILLA, T. G. Characterization of a broad pH range protease of *Candida caseinolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 916-921, 2001.

RAJAGOPALAN, G.; KRISHNAN, C. Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3044-3050, 2008.

RAMACHANDRAN, S.; PATEL, A.K.; NAMPOOTHIRI, K.M.; CHANDRAN, S.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 2, p. 309-317, 2004.

RAMAGE, G.; MARTINEZ, J.P.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 7, p. 979-986, 2006.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S.P.; THOMAS, D.P.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. *Candida* biofilms: an update. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 4, p. 633-638, 2005.

RAMAGE, G.; WALLE, V.K.; WICKLES, B.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2475-2479, 2001.

RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAO, Y.K.; SHIH-CHIN, LU.; BING-LAN, LIU; YEW-MIN TZENG. Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, n. 2, p. 57–66, 2006.

RAPER, K.B.; FENNELL, D.I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams and Wilkins, 1965.

RIBEIRO, A.P.D.; ANDRADE, M.C.; BAGNATO, V.S.; VERGANI, C.E.; PRIMO, F.L.; TEDESCO, A.C.; PAVARINA, A.C. Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions. **Lasers in Medical Science**, 2013, *in press*.

RIPPEL-BALDES, A. **Grundzüge der Mikrobiologie**. 3rd ed. New York: Springer, 1955.

RIVERA, L.E.C.; RAMOS, A.P.; DESGARENNES, M.C.P. Biopelículas fúngicas. **Dermatología Revista Mexicana**, v. 57, n. 1, p. 350-361, 2013.

RUKAYADI, Y.; HAN, S.; YONG, D.; HWANG, J.K. *In vitro* activity of xanthorrhizol against *Candida glabrata*, *C. guilliermondii*, and *C. parapsilosis* biofilms. **Medical Mycology**, v. 49, n. 1, p. 1-9, 2011.

SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K.M.; RAMACHANDRAN, S.; GHOSH, S.; SZAKACS, G.; PANDEY, A.; FRANCIS, F. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of alfa-amylase by *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 15, n. 2, p. 107-115, 2003.

SAID, S.; PIETRO R.C.L.R. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 412 p.

SAMIMI, D.B.; BIELORY, B.P.; MILLER, D.; JOHNSON, T.E. Microbiologic trends and biofilm growth on explanted periorbital biomaterials: a 30-year review. **Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 29, n. 5, p. 376-381, 2013.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; PARKINSON, T.; FALCONER, D.; BILLE, J. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 8, p. 2404-2412, 2003.

SAXENA, R.K.; DAVIDSON, W.S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 239-247, 2003.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J.C.; VAN DIJCK, P.W.M. On the safety of *Aspergillus niger*- a review. **Applied Microbiology and**

Biotechnology, v. 59, n. 4-5, p. 426-435, 2002.

SHANKAR, S.; RAO, M.; LAXMAN, R.S. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 579-585, 2011.

SHUKOR, S.S.A.B.D.; JUSZCZYK, A.S.; CLARK, R.K.F.; RADFORD, D.R. The effect of cyclic drying on dimensional changes of acrylic resin maxillary complete dentures. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 33, n. 9, p. 654-659, 2006.

SILVA, M.M.; MIMA, E.G.O.; COLOMBO, A.L.; SANITÁ, P.V.; JORGE, J.H.; MASSUCATO, E.M.S.; VERGANI, C.E. Comparison of denture microwave disinfection and conventional antifungal therapy in the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical study. **Oral Medicine**, v. 114, n. 4, 2012a.

SILVA, W.J GONÇALVES, L.M.; SENEVIRATNE, J.; PARAHITIYAWA, N.; SAMARANAYAKE, L.P.; DEL BEL CURY, A.A. Exopolysaccharide matrix of developed *Candida albicans* biofilms after exposure to antifungal agents. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 6, p. 716-722, 2012b.

SINGH, B.K.; CAMPBELL, C.D.; SORENSON, S.J.; ZHOU, J. Soil genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 756, 2009.

SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; HUSE, S.M.; NEAL, P. R.; ARRIETA, J.M.; HERND, G.J. Microbial diversity in deep sea and the underexplored "rare biosphere". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 32, 12115-12120, 2006.

SOUZA, P.M.; MAGALHÃES, P.O. Application of microbial alfa-amylase in industry - a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 850-861, 2010.

SUCI, P.A.; TYLER, B.J. A method for discrimination of subpopulations of *Candida albicans* biofilm cells that exhibit relative levels of phenotypic resistance to chlorhexidine. **Journal of Microbiological Methods**, v. 53, n. 3, p. 313-325, 2003.

SUGA, S.S. GUEDES-PINTO, A.C.; SIMIONATO, M.R.L. Avaliação in vitro da influência do polimento superficial de resina acrílica para aparelhos ortodônticos na adesão e remoção de *Streptococcus mutans*. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 10, n. 1, p. 94-107, 2005.

SUTHERLAND, I.W. The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 222-227, 2001.

TANGPHATSORNRUANG, S.; NACONSIE, M.; THAMMARONGTHAM, C.; NARANGAJAVANA, J. Isolation and characterization of an alpha-amylase gene

in cassava (*Manihot esculenta*). **Plant Physiology Biochemistry**, v 43, n. 9, p. 821-827, 2005.

TANIGUCHI, L.; FARIA, B.F; ROSA, R.T.; CARVALHO, A.P.; GURSKY, L.C.; ELIFIO-ESPOSITO, S.L.; PARAHITIYAWA, N.; SAMARANAYAKE, L.P.; ROSA, E.A.R. Proposal of a low-cost protocol for colorimetric semi-quantification of secretory phospholipase by *Candida albicans* grown in planktonic and biofilm phases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 78, n. 2, p. 171-174, 2009.

TANYILDIZI, M.S.; OZER, D.; ELIBOL, M. Optimization of alpha-amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 7, p. 2291-2296, 2005.

TAWEECHASUPAPONG, S.; NGAONEE, P.; PATSUK, P.; PITIPHAT, W.; KHUNKITTI, W. Antibiofilm activity and post antifungal effect of lemongrass oil on clinical *Candida dubliniensis* isolate. **South African Journal of Botany**, v. 78, n. 7, p. 37-43, 2012.

THEAN, H.; WONG, M.L.; KOH, H. The dental awareness of nursing home staff in Singapore. **Gerodontology**, v. 24, n. 1, p. 58-63, 2007.

TORRES, C. R. G.; KUBO, C. H.; ANIDO, A. A.; RODRIGUES, J. R. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. **Revista da faculdade de odontologia de São José dos Campos**, v. 3, n. 2, p. 43-52, 2000.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M.A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J.V. A Review on Microbial Lipases Production. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

UPPULURI, P.; PIERCE, C.G.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. *Candida albicans* Biofilm Formation and its Clinical Consequences. **Future Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 1235-1237, 2009.

URTZ, B.E.; RICE, W. C. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, v. 104, n. 2, p. 180-186, 2000.

VARGA, J.; KEVEL, F.; HAMARI, Z.; TÓTH, B.; TÉREN, J.; CROFT, J.H.; KOZAKIEWICZ, Z. Genotypic and phenotypic variability among black aspergilli. In: SAMSON, R.A.; PITT, J.I. (Ed.). **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. Amsterdam: Harwood, 2000. p. 397-411.

VILA, T.V. M.; ISHIDA, K.; SOUZA W.; PROUSIS, K.; CALOGEROPOULOU, T.; ROZENTAL, S. Effect of alkylphospholipids on *Candida albicans* biofilm formation and maturation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 113-125, 2013.

VILAIN, S.; PRETORIUS, J. M.; THERON, J.; BROZEL, V. S. DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 2861-2868, 2009.

WANG, C.; HU, G.; LEGER, R.J. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 8, p. 704-718, 2005.

ZAIA, D.A.M; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787, 1998.

ZAURA, E.; KEIJSER, B.J.; HUSE, S.M.; CRIELAARD, W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 259, 2009.

ZIMMER, K.R.; BORRÉ, G.L.; TRENTIN, D.S.; JÚNIOR, C.W.; FRASSON, A.P.;

GRAEFF, A.A.; GOMES, P.; MACEDO, A.J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 123-137, 2009.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 553- 596, 2007.

ZOGAJ, X.; NIMTZ, M.; ROHDE, M.; BOKRANZW.; ROMLING U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 1452-1463, 2001.