

Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”
Faculdade De Ciências Farmacêuticas
Campus Araraquara

Sarah Salomon Müller

ANÁLISE PRELIMINAR DA EFICIÊNCIA DE SABONETES EM BARRA FRENTE A
CANDIDA SPP POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS AO ORGANISMO HUMANO

Araraquara – SP
2011

Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”
Faculdade De Ciências Farmacêuticas
Campus Araraquara

Sarah Salomon Müller

ANÁLISE PRELIMINAR DA EFICIÊNCIA DE SABONETES EM BARRA FRENTE A
CANDIDA SPP POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS AO ORGANISMO HUMANO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Farmácia-
Bioquímica da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade
Estadual Paulista para obtenção do grau de
Farmacêutico-Bioquímico.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Marisa Fusco Almeida
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Hérica Regina Nunes Salgado

Araraquara - SP
2011

A Deus:

Obrigada pela saúde, força e proteção em todos os momentos de minha vida e, especialmente, durante a execução deste trabalho, quando precisei de motivação e paciência.

A meus pais:

Obrigada pela confiança acima de tudo. Só eu sei como o apoio e dedicação de vocês foi fundamental para que eu chegasse até aqui, com integridade, responsabilidade e consciência. A vocês dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Obrigada Prof^a Ana Marisa Almeida pela oportunidade e confiança em me orientar nesse trabalho.

Obrigada Prof^a Hérica Salgado pelo apoio e ajuda na redação do trabalho e pelas referências disponibilizadas.

Jaqueline Derissi, obrigada por todo o apoio e dedicação. Sem você, esse trabalho não existiria!

Janaína Sardi, obrigada pela confiança e contribuição. Sua ajuda foi fundamental tanto para o trabalho, quanto para meu crescimento e aprendizado.

Rô, agradeço pela paciência nas aulas e no laboratório e pela ajuda com os resultados. Seus conhecimentos e conselhos foram importantes para realização desse trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Micologia Clínica, em especial a Tatiane Benaducci, Danielle Carvalheiro e Natalia Strohmayr, obrigada pela paciência e colaboração nos dias em que estive no laboratório. Cada um de vocês acrescentou muito para que meu trabalho se concretizasse, seja no apoio, na ajuda ou nas sugestões.

Alexandre Pazoti, obrigada pela paciência durante minhas idas à Seção de Graduação e nas trocas de e-mail. Saiba que você foi fundamental para que minha formação acadêmica se tornasse efetiva.

Agradeço a companhia e apoio incondicionais de minhas queridas amigas Nath e Fófis. O tempo de faculdade foi ótimo especialmente porque vocês estavam lá.

Agradeço também minha grande amiga Marcela, pela ajuda e amizade em todos os momentos.

Agradeço meu namorado Samuel pelo carinho, apoio e compreensão em todos os momentos. Meu lado emocional foi essencial para realização desse e de muitos outros trabalhos e você sempre me ajudou a manter a calma e o foco, sem perder a alegria e a seriedade. Obrigada meu amor!

Agradeço a meus pais, Herbert e Beatriz, a meus irmãos, Renan e Sophia e a todos da minha família que me apoiaram, incentivaram e torceram por mim durante a faculdade. O carinho de vocês foi a fonte de muita energia para trabalho duro e força de vontade nesse período.

Agradeço minha madrinha, tia Baía, por toda oração e energia positiva que me mandou. Esse trabalho também é dedicado a você.

Para minha vó, Hilda, tenho sincero agradecimento pelo alicerce familiar que proporciona e pela confiança em minha capacidade. Esse trabalho também é dedicado a você.

***“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo.”
Fernando Pessoa***

Sumário

| | |
|---|----|
| Lista de tabelas | 8 |
| Lista de ilustrações..... | 9 |
| Lista de abreviaturas e siglas | 11 |
| Resumo | 13 |
| Introdução | 15 |
| Objetivo | 23 |
| Materiais e métodos | 24 |
| 1. Pesquisa de micro-organismos em mão sem assepsia | 24 |
| 2. Controle negativo da pesquisa de micro-organismos em sabonetes | 24 |
| 3. Pesquisa de micro-organismos nas saboneteiras durante o uso compartilhado dos sabonetes | 25 |
| 4. Lavagem das mãos | 25 |
| 5. Identificação das leveduras | 26 |
| 5.1. Filamentação em lâmina de microcultivo..... | 26 |
| 5.2. Triagem por Chromagar™ | 27 |
| 5.3. Identificação por PCR..... | 27 |
| 6. Teste de sensibilidade aos sabonetes | 29 |
| 7. Formação de biofilme e avaliação da eficácia dos sabonetes..... | 30 |
| Resultados | 32 |
| 1. Pesquisa de micro-organismos em mão sem assepsia | 32 |
| 2. Controle negativo da pesquisa de micro-organismos em sabonetes | 33 |
| 3. Pesquisa de micro-organismos nas saboneteiras durante o uso compartilhado dos sabonetes | 34 |

| | |
|--|----|
| 4.Lavagem das mãos | 35 |
| 5.Identificação das leveduras | 36 |
| 5.1.Filamentação em lâmina de microcultivo..... | 36 |
| 5.2.Triagem por ChromagarTM | 37 |
| 5.3.Identificação por PCR..... | 38 |
| 6.Teste de sensibilidade aos sabonetes | 41 |
| 7. Formação de biofilme e avaliação da eficácia dos sabonetes..... | 42 |
| Discussão | 44 |
| Conclusão | 48 |
| Bibliografia | 49 |

Lista de tabelas

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – <i>Primers</i> e condições térmicas utilizados nas PCRs..... | 28 |
| TABELA 2 – Resultado de microcultivo em lâmina das colônias testadas..... | 37 |

Lista de ilustrações

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – Placas semeadas após contato com mãos sem assepsia prévia de voluntários | 32 |
| FIGURA 2 – Placas semeadas com RPMI+glicose após 24h de contato com o sabonete comum sem uso | 33 |
| FIGURA 3 – Placas semeadas com RPMI+glicose após 24h de contato com o sabonete anti-séptico sem uso | 33 |
| FIGURA 4 – Placa semeada com RPMI+glicose usado na lavagem da saboneteira do sabonete comum após uma semana de uso..... | 34 |
| FIGURA 5 – Placa semeada com RPMI+glicose usado na lavagem da saboneteira do sabonete anti-séptico após uma semana de uso | 34 |
| FIGURA 6 – Placa semeada com água da lavagem de mãos utilizando o sabonete comum | 35 |
| FIGURA 7 – Placa semeada com água da lavagem de mãos utilizando o sabonete anti-séptico | 36 |
| FIGURA 8 – Placa de Chromagar™ apresentando colônias de cor verde, o que indica <i>Candida albicans</i> | 38 |
| FIGURA 9 – Placa de Chromagar™ apresentando colônias de cor rósea, o que indica <i>Candida krusei</i> | 38 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 10 – Gel de PCR com bandas evidenciando presença de material genético purificado. Cada poço (coluna) contém o material genético de uma das leveduras obtidas nas lavagens..... | 39 |
| FIGURA 11A – Gel I contendo resultado de PCR referente a <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> e gel II contendo resultado de PCR referente a <i>C. tropicalis</i> e <i>C. glabrata</i> | 40 |
| FIGURA 11B – Legendas das bandas representadas no gel de PCR | 40 |
| FIGURA 12 – Placa de microdiluição: teste de sensibilidade ao sabonete comum frente aos inóculos de <i>C. krusei</i> e <i>C. albicans</i> obtidas nas lavagens de mãos | 41 |
| FIGURA 13 – Placa de microdiluição: teste de sensibilidade ao sabonete anti-séptico frente aos inóculos de <i>C. krusei</i> e <i>C. albicans</i> obtidas nas lavagens de mãos | 41 |
| FIGURA 14 – Placa contendo biofilme em formação. O sabonete anti-séptico não foi eficaz frente aos inóculos de <i>C. krusei</i> e <i>C. albicans</i> | 43 |
| FIGURA 15 – Placa contendo biofilme em formação. O sabonete comum não foi eficaz frente aos inóculos de <i>C. krusei</i> e <i>C. albicans</i> | 43 |

Lista de abreviaturas e siglas

μl - microlitro

μM - micromolar

AB - corante *Alamar Blue*

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C. - *Candida*

(C+) - controle positivo

(C-) - controle negativo

CIM - concentração inibitória mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

DNA - ácido desoxirribonucléico

EDTA - etilenodiamino tetracetato

h - horas

H₂O - fórmula molecular da água

mg - miligrama

ml - mililitro

M - molar

mM – milimolar

NaCl – cloreto de sódio

°C - graus Celsius

PBS - *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato-salino)

PCR - reação de polimerização em cadeia

q.s.p. - quantidade suficiente para

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

r.p.m. - rotações por minuto

SDS - dodecil sulfato de sódio

TE - solução contendo Tris-HCl 2M + EDTA 0,5M + H₂O milli-Q pH 7,4

UFC - unidade formadora de colônia

UV - ultravioleta

YCB - meio Carbono Levedura Base

YNB - meio Nitrogênio Levedura Base

YPD - meio contendo peptona 10g + extrato de levedura 20g + glicose 20g + água destilada q.s.p.1 litro em pH~5

XTT - 2,3-bis (2-metoxi-4nitro-5-sulfofenil) - 5- (fenilamnocarbonil-tetrazolium)

Resumo

O presente trabalho foi elaborado e realizado a fim de se demonstrar a importância da lavagem das mãos no cotidiano, uma vez que mãos humanas podem ser consideradas fonte de diversos agentes etiológicos de doenças que podem comprometer a saúde principalmente de pacientes debilitados.

Para tanto, foram aplicados testes de sensibilidade a sabonetes utilizando-se métodos normatizados e validados pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) e, por fim, foi verificado o efeito dos mesmos sobre biofilmes formados a partir de espécies e cepas fúngicas conseguidas por meio de lavagens das mãos de voluntários.

As amostras utilizadas foram sabonetes em barra adquiridos do comércio, um de formulação bactericida (com adição de extrato de própolis) e outro de formulação comum.

Foram realizadas lavagens com os sabonetes-amostra e água destilada, dentro de fluxo laminar, onde foi possível recolher a água usada no enxágüe. A partir do plaqueamento (em meio Sabouraud-dextrose com cloranfenicol 0,05%) das mãos voluntárias sem assepsia prévia, da água de lavagem e das mãos lavadas foram obtidas culturas fúngicas. Essas culturas foram selecionadas de acordo com a viabilidade de isolamento, e então foi feita a identificação das espécies.

Através da triagem pelo método de identificação por Chromagar™ *Candida*, foi possível identificar que duas colônias obtidas das lavagens das mãos foram identificadas como *C. krusei* e *C. albicans*. *C. albicans* ainda pôde ser confirmada

através de identificação molecular. Essas amostras foram então utilizadas nos testes de sensibilidade aos sabonetes e submetidas à formação de biofilme.

Os resultados detectaram que os sabonetes em barra analisados não foram eficazes na higienização desejada das mãos, e tampouco contra a formação de biofilme pelas leveduras citadas. Esse fato mostra que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária precisa enfatizar o controle e a fiscalização de produtos de higiene pessoal, pois estes muitas vezes estão associados à incidência de agravos indesejados à saúde que podem surgir através da não correta assepsia das mãos por produtos largamente utilizados pela população brasileira, como os sabonetes em barra.

Introdução

São muitos os fatores que podem nos predispor a infecções microbianas e, cada vez mais, precisamos de medidas profiláticas que protejam nosso organismo contra tal agressão. As micoses superficiais, ou mesmo cutâneas, são as mais comumente observadas em crianças, acometendo as camadas mais superficiais da pele, os pêlos e as unhas (FRAMIL *et al*, 2008).

As leveduras do gênero *Candida* habitam diversos ecossistemas e estão presentes nos tratos geniturinário e gastrintestinal, unha, pele, brônquios e na cavidade bucal onde podem se estabelecer como microbiota comensal normal sem causar danos ao hospedeiro (KLEINEGGER *et al*, 1996). Por outro lado, determinadas circunstâncias, como diabetes mellitus e AIDS, condições fisiológicas como gravidez, infância ou idade avançada, fatores nutricionais, tratamento com antibióticos de amplo espectro, drogas imunossupressoras e corticosteróides, além de fatores locais como xerostomia e uso de aparelhos protéticos são condições que predispõem ao desenvolvimento de infecções invasivas por *Candida sp* (TEKELI *et al*, 2004; PIRES - GONÇALVES *et al*, 2008).

Relatos de infecções por leveduras pouco usuais são descritas como: as causadas por *Trichosporon* (leveduras resistentes a anfotericina B e equinocandinas), causadas por *Rhodotorula*, (espécie encontrada em septicemia relacionada ao uso de cateteres), além de espécies de *Cryptococcus* não-*neoformans* em pacientes HIV-positivos e/ou transplantados. Entretanto, as espécies do gênero *Candida* ainda prevalecem como principal agente causador de infecções fúngicas (MICELI *et al*, 2011).

Candida spp são leveduras comensais presentes no trato gastrointestinal e genital de indivíduos saudáveis, no entanto se tornam organismos potencialmente patogênicos causando infecções superficiais e sistêmicas (RANGEL-FRAUSTO *et al*, 1999; SHAO *et al*, 2007). Apesar de as espécies de *Candida* fazerem parte da microbiota normal nos seres humanos, sua capacidade de causar infecção ocorre devido a desequilíbrios no hospedeiro, sendo a resposta imune um fator determinante do tipo de infecção causada. Na verdade, a transição do inofensivo comensal para patógeno implacável pode ser atribuída a um extenso repertório de virulência determinado por condições predisponentes adequadas (MICELI *et al*, 2011). Estes fatores de virulência são expressos dependendo do tipo de manifestação clínica, do local, estágio de infecção e também a natureza da resposta do hospedeiro e incluem a capacidade de alterar a morfologia celular (leveduras para produção de hifas), fatores responsáveis pela adesão, atividade extracelular de enzimas e produção de biofilme (NAGLIK *et al*, 2004).

As infecções por essas leveduras são associadas a altas taxas de mortalidade e aumento dos custos de duração da internação (WISPLINGHOFF *et al*, 2004; MORGAN *et al*, 2005). Recentemente, houve uma mudança no perfil epidemiológico dessas infecções, registrando-se aumento no número de casos de *Candida* não-*albicans*. Relatos de hospitais dos Estados Unidos e da Europa detectaram o aumento na prevalência das infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* como *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (VISCOLI *et al*, 1999; TRICK *et al*, 2002; PFALLER & DIEKEMA, 2007). No Brasil, em estudo realizado em pacientes HIV positivos com infecção orofaríngea, *C. krusei* foi a terceira mais freqüente entre as espécies não-*albicans* e a suscetibilidade desses

isolados mostrou-se baixa frente a cetoconazol, fluconazol e anfotericina B (FAVALESSA *et al*, 2010). Na Espanha, a infecção por *C. krusei* está entre as mais freqüente entre as espécies não-*albicans*, associada a pacientes com doenças sangüíneas, transplante de células tronco, neutropenia e uso prévio de azóis (ORTEGA *et al*, 2011).

Anfotericina B, composto pertencente à classe dos polienos, vem sendo utilizado desde o final dos anos 1950 e permaneceu por quase 30 anos como o único antifúngico efetivo disponível para o tratamento de doença invasiva. A partir da década de 90, houve uma gradual ampliação do número de compostos antifúngicos bem como as classes: polienos, azóis, equinocandinas e análogos da purina. Devido à maior disponibilidade de drogas antifúngicas ocorreu também uma utilização mais ampla, o que causou seleção e conseqüente resistência desses micro-organismos. Os médicos têm ainda a possibilidade de medicar para a profilaxia, terapia empírica, tratamento preventivo e aguardar o diagnóstico da doença, havendo assim um grau de exposição excessivo a esses agentes (RODRIGUEZ-TUDELA *et al*, 2010).

C. krusei é uma espécie intrinsecamente resistente ao fluconazol e de sensibilidade diminuída para anfotericina B e flucitosina (PFALLER *et al*, 2008). É isolada principalmente em pacientes com câncer e em ocasiões onde o fluconazol é usado como profilaxia (WINGARD *et al*, 1991; GIRMENIA *et al*, 2005). Essa levedura tem emergido como importante agente de infecções sistêmicas em pacientes hospitalizados (REX *et al*, 1995; SPELLBERG *et al*, 2006). Comparadas com infecções causadas por outras espécies de *Candida*, está associada a altas taxas de mortalidade (PEMÁN *et al*, 2002). O fenótipo de resistência exibido por *C.*

krusei é um problema em relação à escolha de tratamento para pacientes neutropênicos ou gravemente doentes, especialmente aqueles com exposição prévia ao fluconazol (PAPPAS *et al*, 2004; SPANAKIS *et al*, 2006). Apesar da resistência intrínseca ao fluconazol, *C. krusei* normalmente é sensível ao voriconazol em testes realizados *in vitro*, isso pode ser explicado pela ligação mais efetiva do voriconazol às isoenzimas do citocromo P-450 dessa espécie (PFALLER *et al*, 2007). Além disso, voriconazol foi usado com sucesso para tratar alguns pacientes infectados com *C. krusei* (KULLBERG *et al*, 2005)

Um dos principais mecanismos de resistência ao fluconazol em *C. krusei* é a diminuição da afinidade e encaixe das enzimas do citocromo P450, entre elas a esterol 14 α -desmetilase (CYP51) (FUKUOKA *et al*, 2003; GUINEA *et al*, 2006). Um mecanismo alternativo de resistência é atividade da bomba de efluxo, expressa por uma superfamília de transportadores ABC ou ATPases de transporte. Esta é a maior e mais diversificada das famílias de proteínas, envolvidas no transporte de substâncias através das membranas biológicas. As proteínas membros desta superfamília transportam uma variedade de substratos através da membrana celular, os quais incluem açúcares, aminoácidos, peptídeos, proteínas, metais, íons inorgânicos, toxinas e antibióticos (CROOP *et al*, 1998).

A versatilidade para se adaptar em diferentes habitats e a capacidade de produzir biofilme são fatores que explicam a virulência dessas leveduras. Assim, os biofilmes são definidos como comunidades microbianas ligadas a uma superfície e incorporados em uma matriz extracelular (DOUGLAS, 2002; RAMAGE *et al*, 2005; SILVA *et al*, 2009). A geração do biofilme consiste nas seguintes etapas: primeiramente ocorre a adesão (essa pode ocorrer em acessórios médicos ou no

próprio tecido do hospedeiro), então as células se proliferam e finalmente ocorre a maturação do biofilme. Nesse momento o crescimento das leveduras diminui e o das hifas aumenta, a matriz extracelular envolve então o biofilme (BLANKENSHIP & MITCHELL, 2006).

Por fazer parte da microbiota humana, *Candida* spp é facilmente encontrada em biomateriais como próteses, implantes, tubos endotraqueais, marcapassos, e vários tipos de cateteres (KOJIC & DAROUICHE, 2004). A formação de biofilmes acarreta preocupantes problemas clínicos, pois aumenta a resistência à terapia antifúngica. O mecanismo de resistência do biofilme aos agentes antimicrobianos ainda não está totalmente elucidado. Uma das hipóteses que pode explicar esta resistência é a presença da matriz restringindo a penetração dos medicamentos através da formação de uma barreira de difusão (GILBERT *et al*, 2002; KOJIC & DAROUICHE, 2004) e somente as camadas mais superficiais estariam em contato com doses letais dos antibióticos.

Para que ocorra a colonização, a célula fúngica deve primeiramente aderir. O processo de adesão de espécies de *Candida* às superfícies do hospedeiro é controlado e induzido por várias cascatas de sinalização celular tanto no fungo como também no ambiente, em prol de sua virulência. A fixação inicial de células de *Candida* a biomateriais é mediada por fatores inespecíficos (hidrofobicidade de e forças eletrostáticas) e específicos promovidos pelas adesinas presentes na superfície das células fúngicas que reconhecem ligantes, tais como proteínas séricas, fibrinogênio e fibronectina (LI *et al*, 2003). O fenômeno de adesão é conferido a proteínas especializadas de superfície celular chamadas de adesinas, que se ligam especificamente a aminoácidos ou açúcares na superfície de outras

células ou promovem a adesão a superfícies abióticas (VERSTREPEN & KLIS, 2006). Em *C. albicans*, a deleção do gene EAP1 gerou diminuição da adesão e formação de biofilme, mostrando o papel da proteína codificada por esse gene (LI *et al*, 2007). Outra família de proteínas (adesinas), a ALs3, também possui papel importante na formação dos biofilmes (NOBILE & MITCHELL, 2006). As enzimas extracelulares hidrolíticas são fatores de virulência os quais podem causar disfunções celulares, ruptura da membrana e, como conseqüência, facilita a adesão dos microrganismos (NIEWERTH & KORTING, 2001; NAGLIK *et al.*, 2003). É importante ressaltar que o sucesso da colonização e da infecção depende da capacidade de adesão do microrganismo às células hospedeiras (YANG *et al*, 2003).

Relatos têm demonstrado a importância desses fatores e, de acordo com Gokce *et al* (2007) e Costa *et al* (2010), a produção dessas enzimas é observada em maior quantidade em infecções por *C. albicans* do que por outras espécies.

Dessa forma, o estudo das micoses torna-se importante devido à grande incidência dessas infecções, o que pode gerar epidemias em diversos grupos populacionais. Existem muitos motivos que explicam tal aumento de incidência com o passar dos anos, como o uso abusivo de antibióticos, drogas citostáticas e imunossupressoras, além de diversas doenças predisponentes. Como micoses não são doenças de notificação obrigatória, é impossível conhecer a abrangência exata do problema (OLIVEIRA *et al*, 2003).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, aos produtos de higiene pessoal e cosméticos devem ser adicionados conservantes, cuja finalidade é preservá-los de danos e deteriorações causados por micro-organismos além de proteger o consumidor de contaminação durante o uso do produto.

De acordo com a Resolução 79/00 da ANVISA, cosméticos e produtos de higiene são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo, com o objetivo fundamental de limpeza e manutenção do estado saudável do corpo. A Resolução nº 162 de 11 de setembro de 2001 foi criada para estabelecer a Lista de Substâncias de Ação Conservante para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes e enfatizar que a Vigilância Sanitária tem a missão de prevenir ocorrências de agravos à saúde por meio de ações reguladoras de produtos e serviços e da aprovação e atualização de normas. No entanto, muitas vezes, as substâncias de ação conservante utilizadas nos produtos de higiene pessoal podem não mostrar a eficiência desejada contra espécies de fungos que podem colonizar a pele humana.

Através deste estudo, pretende-se realizar a verificação da dinâmica populacional das leveduras do gênero *Candida* após a lavagem das mãos com sabonetes de uso diário. Desta forma, avaliar a eficiência deste produto de higiene na desinfecção contra espécies de *Candida* potencialmente patogênicas residentes da microbiota das mãos. Adicionalmente determinar a sensibilidade a esses sabonetes por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) nestes isolados e verificar a capacidade de isolados selecionados destas espécies de importância patogênica em formar biofilmes, assim como a viabilidade destes biofilmes após tratamento com determinadas concentrações similares ao processo de lavagem das mãos.

É difícil perceber quando ficamos susceptíveis a micro-organismos que podem ser nocivos. No decorrer do dia, nossas mãos tornam-se um perigoso veículo de bactérias e fungos capazes de proporcionar problemas que poderiam ser evitados

com devidas precauções. A lavagem das mãos com frequência colabora com a redução da carga microbiana que adquirimos do ambiente, e conseqüentemente, diminui sua chance de disseminação. No entanto, a pressa do dia-a-dia acaba comprometendo esse hábito e, além disso, muitos sanitários comumente oferecem risco de contaminação através dos sabonetes de uso comum, que nem sempre são líquidos.

O uso freqüente de tais produtos faz com que a eficiência dos conservantes seja reduzida, tanto devido à contaminação do produto pelo contato com a microbiota humana ou mesmo pela evaporação das substâncias preservantes (PALMIERI *et al*, 1983). Dessa forma, nem sempre é fidedigna a capacidade anti-séptica dos produtos de higiene, especialmente aqueles de uso comum em ambientes de condições propícias, como é o caso dos sabonetes em barra.

Objetivo

Devido à importância clínica de espécies fúngicas capazes de colonizar a pele humana, e outras de evolução sistêmica, pretendeu-se com este trabalho verificar o risco de contaminação e a efetividade de sabonetes em barra na lavagem de mãos, atentando a legislação vigente (Agência Nacional de Vigilância Sanitária e sua Diretoria Colegiada) quanto ao papel dos antimicrobianos presentes nesses sabonetes, uma vez que são amplamente utilizados pela população.

Portanto, são objetivos desse trabalho:

- I - Verificar a dinâmica populacional das leveduras do gênero *Candida* após a lavagem das mãos com sabonetes de uso diário.
- II - Verificar o papel dos antimicrobianos no uso de sabonetes em barra quanto a sua efetividade e ao risco de contaminação.
- III - Atentar a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RDCs) para o risco e validade da prevenção de infecções fúngicas de importância médica por meio de produtos de higiene pessoal.

O presente trabalho também foi utilizado como conclusão para o Curso de Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

Materiais e métodos

1. Pesquisa de micro-organismos em mãos sem assepsia

Foram preparadas placas de meio Sabouraud-dextrose com cloranfenicol 0,05% e, depois de solidificadas, foi feita a pesquisa de micro-organismos presentes em mãos sem assepsia. Cinco pessoas distintas foram aleatoriamente abordadas nas adjacências da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara para terem seus dedos pressionados sobre a superfície do meio de cultura. As placas foram então incubadas a temperatura ambiente por até sete dias. Após esse período, as unidades formadoras de colônia (UFCs) de leveduras foram contadas e fotografadas.

2. Controle negativo da pesquisa de micro-organismos em sabonetes

Foram testadas duas marcas de sabonete em barra adquiridas comercialmente, sendo uma delas de atividade anti-séptica devido à presença de extrato de própolis.

Assim que abertos e retirados da embalagem primária, ambos os sabonetes comum e anti-séptico, foram umedecidos com água destilada e imediatamente colocados em placas contendo RPMI+glicose. A incubação ocorreu sob agitação a 37°C por 24h.

Em seguida, alíquotas de 50ul do RPMI+glicose da placa foram recolhidas e plaqueadas em meio Sabouraud-dextrose com cloranfenicol 0,05% e incubado por

até sete dias à temperatura ambiente para posterior verificação da presença de UFCs de leveduras.

3. Pesquisa de micro-organismos nas saboneteiras durante o uso compartilhado dos sabonetes

Ambos os sabonetes foram deixados para uso no sanitário feminino da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara por uma semana cada um. Após esse período, as saboneteiras contendo os sabonetes foram lavadas com RPMI+glicose e os lavados foram incubados a 37°C por 24h. Uma alíquota de 50ul do material foi então semeada em meio Sabouraud-dextrose com cloranfenicol 0,05% e incubado à temperatura ambiente durante até uma semana. As UFCs de leveduras foram fotografadas e contadas.

4. Lavagem das mãos

No fluxo laminar, foram realizadas dez lavagens (cinco com o sabonete comum e cinco com o sabonete anti-séptico) de mãos de voluntários aleatórios encontrados nas adjacências da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. A água destilada (para simular a situação real na qual a água para lavagem das mãos não é estéril) utilizada para enxágüe por meio de piceta foi recolhida em recipientes individuais estéreis.

Em seguida, essa água de enxágüe foi semeada em placas com meio de cultura Sabouraud-dextrose com cloranfenicol 0,05%. As placas foram então

incubadas à temperatura ambiente por até sete dias. Após esse período, as UFCs de leveduras foram fotografadas e, das colônias viáveis, foi feito repique e identificação.

Também foi feito plaqueamento das mãos com auxílio de *swab* estéril imediatamente após cada lavagem e uma, duas e três horas após cada lavagem, sendo que os voluntários se encontravam em atividade cotidiana normal.

5. Identificação das leveduras

5.1. Filamentação em lâmina de microcultivo

Colônias de levedura devem ser identificadas quando puras, ou seja, sem contaminação bacteriana ou mistura de espécies. Deve-se realizar então um repique em meio Sabouraud-dextrose de cada colônia distinta e, confirmada sua pureza, é feita a identificação (ANVISA).

A formação de tubo germinativo e a filamentação em cultivo em lâmina são as provas fisiológicas mais indicadas para identificação de *Candida albicans* e *Candida sp.* Quando a levedura forma hifas hialinas ramificadas sem fragmentação, provavelmente pertence ao gênero *Candida* e se houver formação de clamidosporos terminais característicos, trata-se de *Candida albicans* (ANVISA).

Para o cultivo em lâmina, foram selecionadas colônias em oito placas obtidas com as lavagens. Após um repique de 24 horas, as leveduras foram individualmente semeadas com agulha na forma de estrias paralelas em lâmina contendo ágar fubá (CornMeal agar[®]) com tenso-ativo *tween* 80 sobre um suporte em ambiente estéril

úmido dentro de placas de Petri. As lâminas foram recobertas com lamínulas de vidro e após incubação por 48h em temperatura ambiente, as preparações foram examinadas em microscópio ótico (ANVISA).

5.2. Triagem por ChromagarTM

O ChromagarTM *Candida* (Microbiology, France) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. Todos os oito isolados foram repicados em ágar Sabouraud e mantidos a 37°C por 24 h. Em seguida, foi feito um inóculo em PBS para que cada cepa/amostra tivesse suas células contadas em câmara de Neubauer até concentração final de 10⁶ células/ml. Então, dispensou-se 100ul do inóculo em placas de ChromagarTM contendo pérolas de vidro.

A interpretação do resultado da leitura das placas se deu através da observação da morfologia e da pigmentação das colônias (ARAUJO *et al*, 2005).

5.3. Identificação por PCR

O primeiro passo foi o crescimento dos micro-organismos selecionados em caldo YPD por 18 horas. Após esse período e homogeneização em vórtex, duas porções de 1,5 ml de cada amostra foram recolhidos em microtubos, que foram então centrifugados por 3 minutos a 10000 r.p.m. a 4°C. Foram feitas duas lavagens (até que o sobrenadante ficasse suficientemente límpido), descartando-se o sobrenadante e adicionando-se PBS estéril para nova centrifugação.

Depois de descartar o sobrenadante pela segunda vez, o DNA genômico dos isolados foi extraído conforme o protocolo descrito originalmente por *Doyle and*

Doyle (1990) e modificado por Sardi *et al* (2011). As amostras foram submetidas à solução de lise celular (NaCl 5M; Tris - HCl 1M; EDTA 0,5M; SDS – 0,5%; pH 8,5) e após agitação vigorosa, foram centrifugadas por 15 minutos a 10000 r.p.m. Em seguida, foram purificadas em solução de clorofórmio:álcool isoamílico. Após centrifugação, ao sobrenadante obtido, foi adicionado isopropanol gelado e centrifugou-se por mais 20 minutos. Os tubos contendo o DNA foram armazenados a -20°C por 48h. O DNA extraído foi então precipitado com isopropanol e etanol 70% para depois ser ressuscitado em tampão TE.

O controle positivo utilizado foi DNA purificado das espécies: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*.

Para realização de PCR espécie-específico, ao DNA extraído, foi adicionado tampão contendo dNTP 20nM; MgCl₂ 50mM; TaqPolimerase U/ul, além dos *primers* específicos *forward* e *sense*. Ao gel de agarose utilizado na eletroforese, foi adicionado 100 bp DNA ladder, Gibco, Grand Island, NY, USA e a eletroforese correu em tampão de corrida Tris-borato-EDTA (pH 8,0).

O DNA foi então corado com solução de brometo de etídio e a visualização se deu sob luz UV.

TABELA 1 – Primers e condições térmicas utilizados nas PCRs

| Espécies | Primers | Condições térmicas |
|------------------------|---|---|
| <i>C. albicans</i> | 5'-TGCTTCAGTGTTCAGTTATACCT-3' 5'-ACTGCTCAAACCATCTCTGG-3' | 38 ciclos–94°C/1min, 53°C/1min e 72°C/30s |
| <i>C. dubliniensis</i> | 5'-CACAAGGCAAATGAAGGAAT-3' 5'-GTATTTGTCGTTCCCCTTTC-3' | 38 ciclos–94°C/1min, 54°C/1min e 72°C/30s |
| <i>C. tropicalis</i> | 5'-GTGTTGTGTGCACTAACGTC-3' 5'-CACCAAACAATTACCAAGT-3' | 36 ciclos–94°C/1min, 51°C/1min e 72°C/30s |
| <i>C. glabrata</i> | 5'-TGCAAACCTTTACCTGGAT-3' 5'-GGAGATAGACTGGGCGTTAT-3' | 30 ciclos–94°C/1min, 56°C/1min e 72°C/30s |

6. Teste de sensibilidade aos sabonetes (conforme CLSI M27-A2)

O teste de sensibilidade a ambos os sabonete, comum e bactericida, foi realizado apenas com as duas cepas identificadas. Foram utilizadas apenas as linhas A, B e C (*C. krusei*) e F, G e H (*C. albicans*) das placas de microdiluição. O procedimento para cada sabonete foi feito em placas distintas.

Para a preparação das amostras, foi pesado 1g de cada sabonete que foram diluídos em 10mL de água estéril (VOLOCHTCHUK *et al*, 2000). Foi realizada então diluição 1:10 (alcançando a concentração de 1%) em meio RPMI suplementado com 2% de glicose.

Seguiu-se a metodologia padronizada CLSI M27-A2 para microdiluição em placa de 96 poços. Para tanto, nos poços 2A e 2F colocou-se 200ul de amostra de sabonete. A seguir adicionou-se 100ul de RPMI+glicose em todos os poços da coluna 3 a 12 e das linhas A, B, C, F, G e H. A coluna 12 ficou apenas com 100ul de RPMI+glicose para tornar-se o controle positivo do teste. Nas colunas de 2 a 11 das linhas A, B e C foram colocadas diluições decrescentes do sabonete, retirando-se 100ul do poço 2A e colocando no poço 3C. Com a devida homogeneização, novamente foram retirados 100ul do poço 3C e colocados no poço 4D, e assim sucessivamente, até o poço 11C, quando se desprezou o conteúdo. O mesmo procedimento se fez com as linhas F, G e H.

Para os controles negativos (primeira coluna da placa) e positivos (última coluna da placa), foi utilizado meio RPMI puro e RPMI + inóculo, respectivamente.

Para a realização desse teste, foram preparados inóculos de concentração 10^4 células/ml a partir das oito amostras obtidas anteriormente. Para isso, foi feito

repique das colônias 24h antes de sua aplicação ao teste de sensibilidade. Com auxílio da Câmara de Neubauer (lâmina de microscopia com marcações em quadrantes, de medidas conhecidas, para contagem de células), as células foram contadas em um dos quadrantes até que fosse obtida a concentração desejada de acordo com o cálculo: número de quadrantes menores (16) x número de quadrantes maiores (4) x diluição (2,5) x número de células contadas (conforme CLSI M27-A2).

Foram utilizadas placas estéreis de microdiluição descartáveis, com 96 poços. Os inóculos foram então dispensados nos poços das colunas de 2 a 12 das linhas testadas em volumes de 100 ul.

As duas placas foram incubadas sob agitação a 37°C por 24h e revelou-se colocando-se 10ul de corante *Alamar Blue* diluído 1:10 em água estéril em cada poço.

7. Formação de biofilme e avaliação da eficácia dos sabonetes

Para a formação de biofilme, as duas cepas *C. albicans* e *C. krusei* obtidas anteriormente foram repicadas em meio Sabouraud a 37°C por 24h. Foi feito um inóculo em PBS para cada cepa. Depois, as células foram contadas em Câmara de Neubauer com concentração final de 10^7 células/ml. Dispensou-se 100ul em todos os poços das linhas A, B, C para *C. krusei* e F, G, H para *C. albicans* em duas placas. A incubação a 37°C por 4h permitiu formação da pré-adesão nos poços das placas (RAMAGE *et al*, 2001, modificado).

As linhas A e F foram utilizadas como controle de crescimento do biofilme.

Às linhas B, C e G, H, foram adicionadas diluições decrescentes dos sabonetes comum e anti-séptico, respectivamente, colocando-se 200ul de inóculo em cada poço, partindo da concentração de 100% nos poços 2B e 2G.

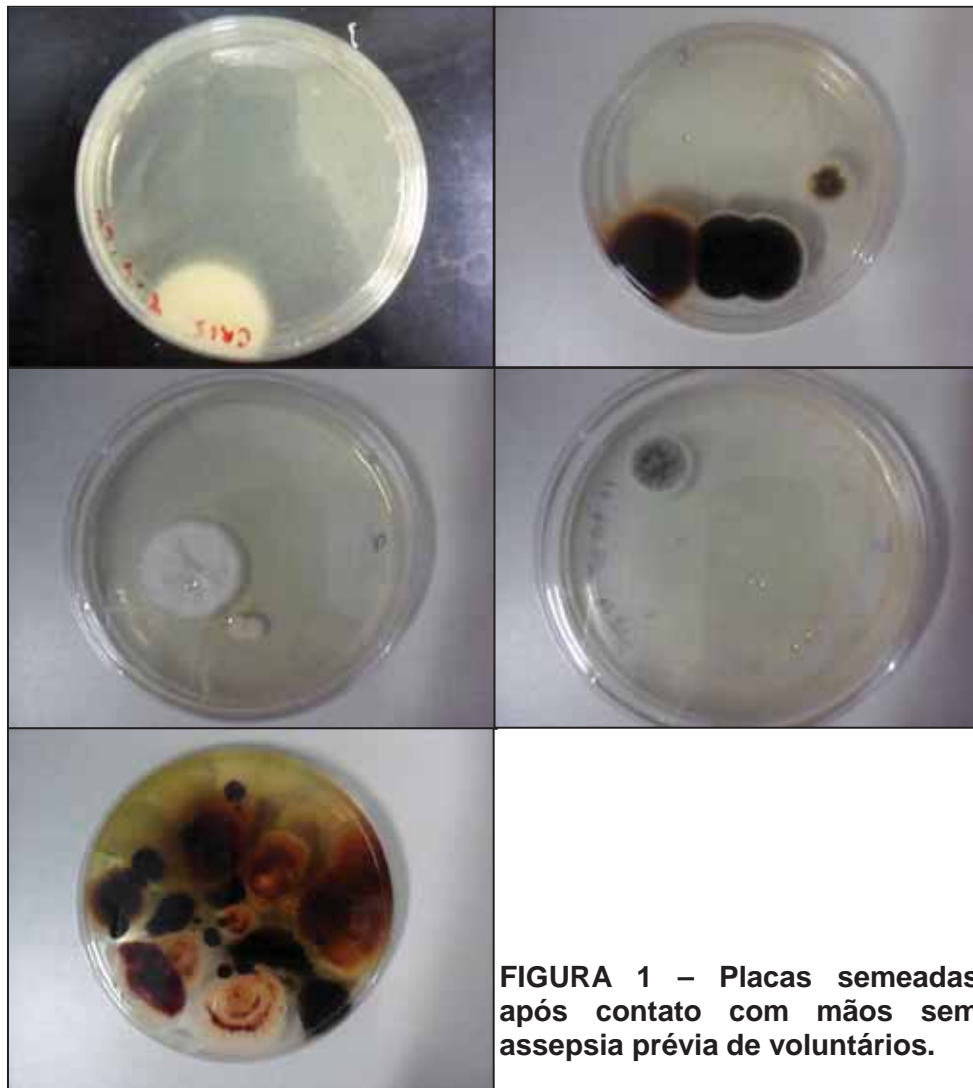
Cada concentração de cada sabonete foi feita separadamente em *ependorfs*. As placas foram incubadas sob agitação a 37°C por 24h. Em seguida, foi preparada solução 0,5mg/ml XTT em PBS estéril com 25uM/ml de menadiona. Ao biofilme, foi acrescentado 30ul da solução de XTT-menadiona em cada poço e as placas foram incubadas por 2h a 37°C.

Os sabonetes foram testados durante a formação dos biofilmes.

Resultados

1. Pesquisa de micro-organismos em mão sem assepsia

Na figura 1, é possível observar o crescimento de colônias nos meios de cultura que foram colocados em contato com os dedos das mãos de voluntários ao longo do dia. Os resultados representados na figura 1 demonstram que muitas vezes, mãos tornam-se fonte de contaminações que podem evoluir para agravos indesejados à saúde.



2. Controle negativo da pesquisa de micro-organismos em sabonetes

Foi constatado, através do controle negativo, que os sabonetes não apresentavam contaminação antes de haver o contato durante as lavagens.



FIGURA 2 – Placas semeadas com RPMI+glicose após 24h de contato com o sabonete comum sem uso. Não se observou crescimento após incubação por uma semana.



FIGURA 3 – Placas semeadas com RPMI+glicose após 24h de contato com o sabonete anti-séptico sem uso. Não se observou crescimento após incubação por uma semana.

3. Pesquisa de micro-organismos nas saboneteiras durante o uso compartilhado dos sabonetes

Saboneteiras também podem albergar micro-organismos que podem ser transmitidos devido ao freqüente contato na hora de usar o sabonete. A umidade é um fator importante na proliferação, especialmente de bolores e leveduras.



FIGURA 4 – Placa semeada com RPMI+glicose usado na lavagem da saboneteira do sabonete comum após uma semana de uso.



FIGURA 5 – Placa semeada com RPMI+glicose usado na lavagem da saboneteira do sabonete anti-séptico após uma semana de uso.

4. Lavagem das mãos

As cinco placas que foram semeadas com a água das lavagens das mãos com os sabonetes em barra comum e anti-séptico estão expostas nas figuras 6 e 7, respectivamente. As colônias cresceram após uma semana de incubação em temperatura ambiente e só então foram transferidas para tubos inclinados de meio Sabouraud acrescido de cloranfenicol 0,05%. A partir desses repiques, foram feitos os testes de triagem e identificação de 10 colônias isoladas das placas obtidas. As colônias foram escolhidas conforme a viabilidade de serem isoladas.

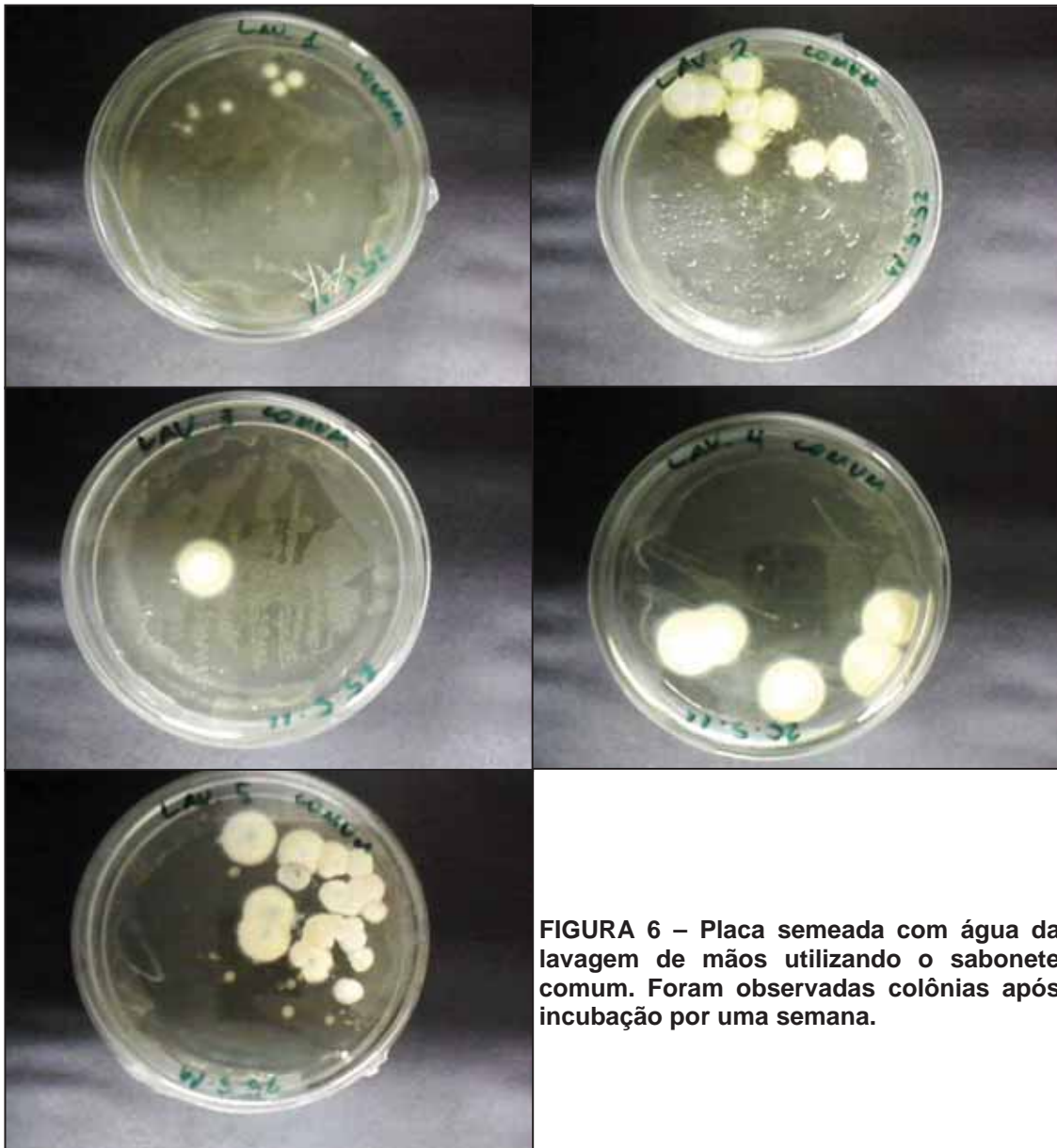


FIGURA 6 – Placa semeada com água da lavagem de mãos utilizando o sabonete comum. Foram observadas colônias após incubação por uma semana.

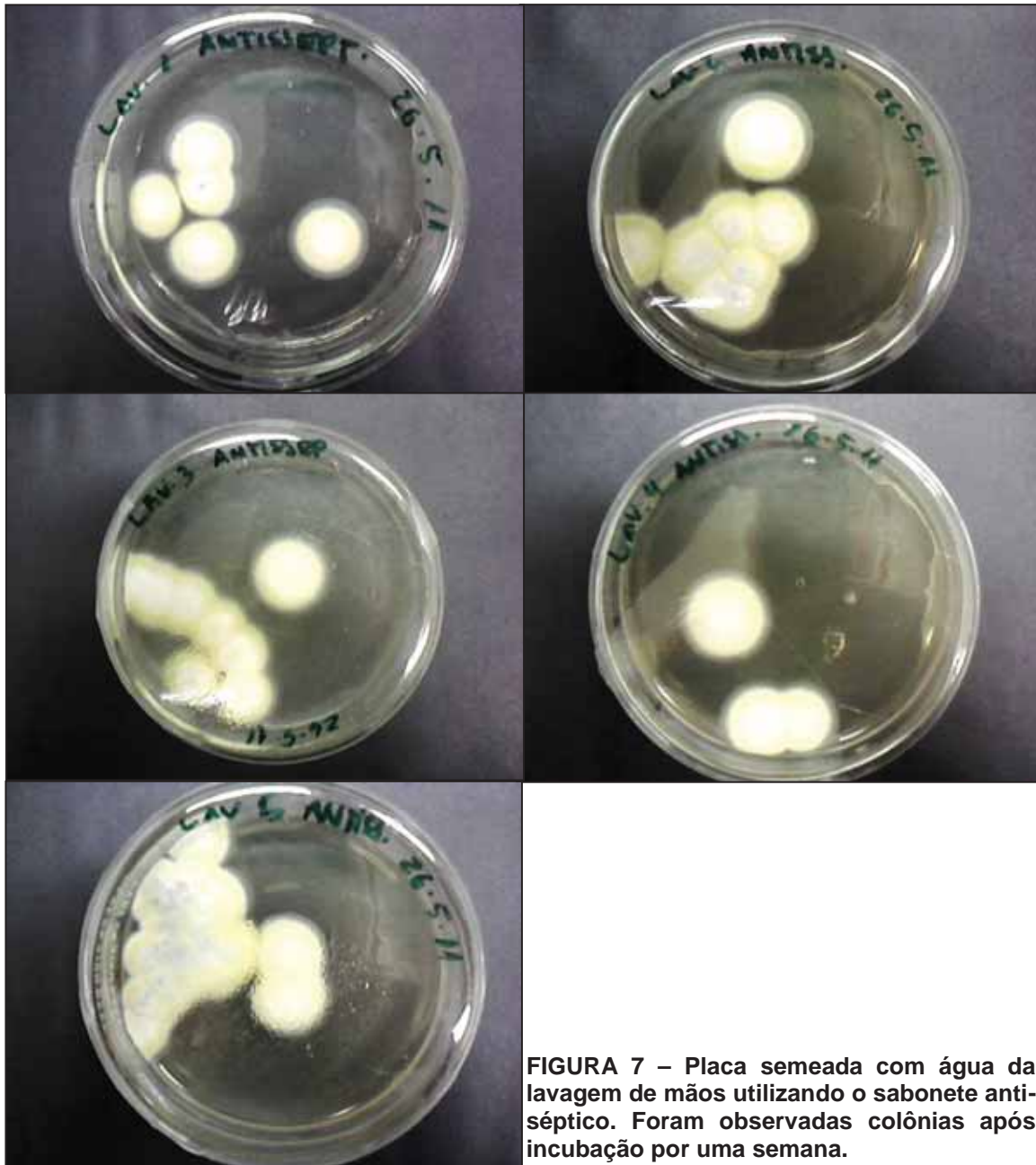


FIGURA 7 – Placa semeada com água da lavagem de mãos utilizando o sabonete anti-séptico. Foram observadas colônias após incubação por uma semana.

5. Identificação das leveduras

5.1. Filamentação em lâmina de microcultivo

Depois de passadas 24h do cultivo em lâmina, em seis das oito colônias selecionadas obtidas das lavagens das mãos foi observada filamentação, sendo que

apenas um dos resultados apresentou formação de clamidósporo terminal, caracterizando a espécie *Candida albicans*.

TABELA 2 – Resultado de microcultivo em lâmina das colônias testadas.

| Levedura | Obtida da lavagem com sabonete: | Resultado do microcultivo em lâmina |
|----------|---------------------------------|--|
| A' | Comum | Filamentação com clamidósporo terminal |
| B' | Anti-séptico | Filamentação sem clamidósporo terminal |
| C' | Comum | Não houve filamentação |
| D' | Anti-séptico | Filamentação sem clamidósporo terminal |
| E' | Anti-séptico | Filamentação sem clamidósporo terminal |
| F' | Anti-séptico | Filamentação sem clamidósporo terminal |
| G' | Comum | Filamentação sem clamidósporo terminal |
| H' | Comum | Não houve filamentação |

A presença de filamentação no microcultivo é evidência provável de as amostras se tratarem de espécies do gênero *Candida*.

5.2. Triagem por Chromagar™

Duas, das oito leveduras, puderam ser identificadas por meio da inoculação em Chromagar™. Uma delas identificou-se como *C. krusei*, pois mostrou características morfológicas e pigmentação das colônias compatíveis com esta

espécie. A segunda levedura identificada apresentou colônias de cor verde e rugosidade na parte externa, caracterizando *C. albicans*.

Os seis isolados restantes apresentaram-se indefinidos.

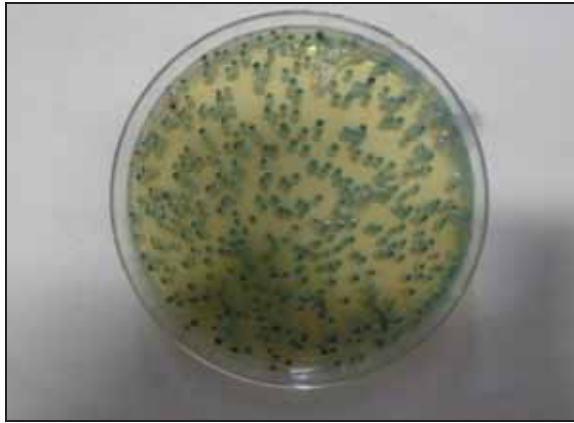


FIGURA 8 – Placa de ChromagarTM apresentando colônias de cor verde, o que indica *Candida albicans*.

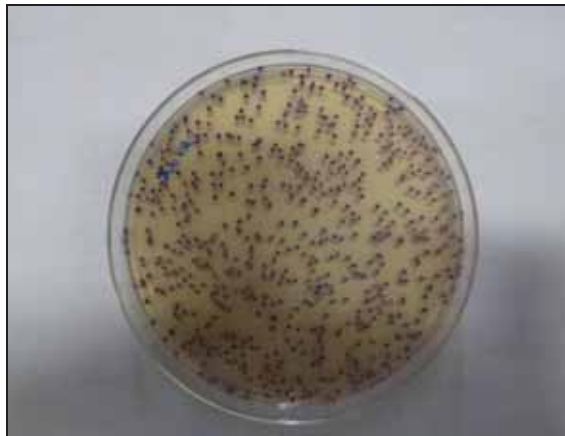


FIGURA 9 – Placa de ChromagarTM apresentando colônias de cor rósea, o que indica *Candida krusei*.

5.3. Identificação por PCR

Logo após a extração do material genético das leveduras das amostras obtidas nas lavagens, o mesmo foi submetido à eletroforese em gel de agarose para que fosse comprovada a existência de DNA purificado. Na FIGURA 10, é

possível observar bandas no gel da PCR, o que evidencia que o material genético foi extraído das células com sucesso.

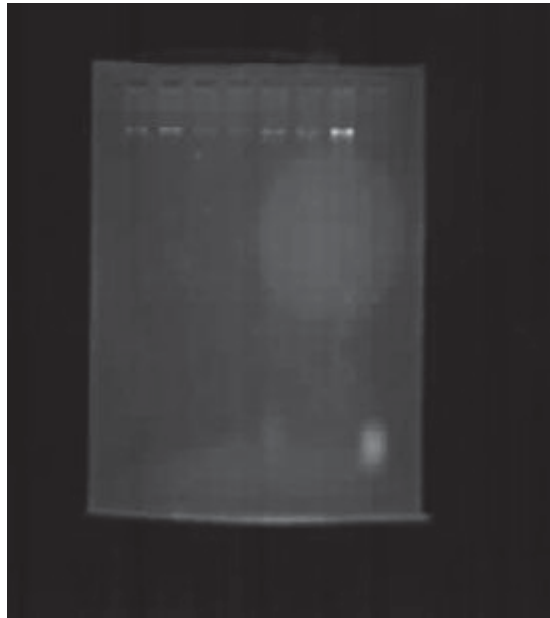


FIGURA 10 – Gel de PCR com bandas evidenciando presença de material genético purificado. Cada poço (coluna) contém amostra de uma das leveduras obtidas nas lavagens. Na última coluna está o peso molecular utilizado como referência.

Depois de realizadas as PCR com os *primers* referentes às espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, foram feitas novas eletroforeses em gel de agarose. No gel I, estão os resultados das PCRs referentes a *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e no gel II, *C. albicans* e *C. tropicalis*, nessa ordem.

Foi possível concluir que, dentre as leveduras obtidas nas lavagens, não existem exemplares de *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* e que possivelmente a levedura A' trata-se de *C. albicans*.

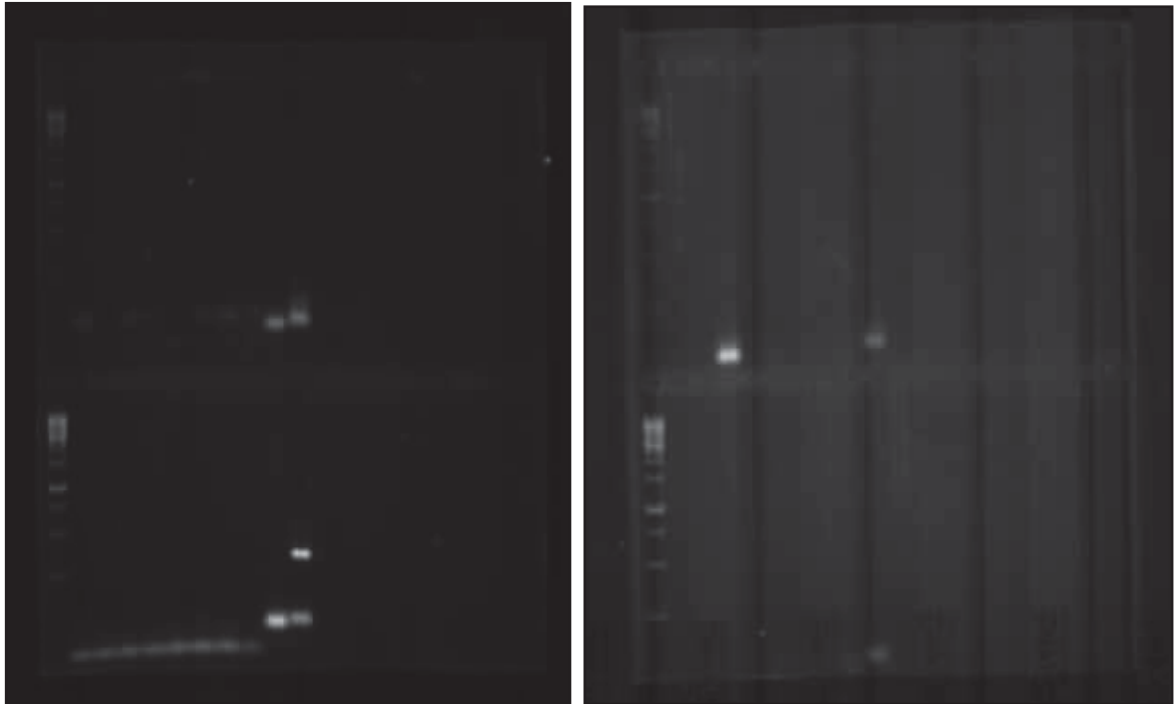


FIGURA 11A – Gel I (à esquerda) contendo resultado de PCR referente a *C. glabrata* (metade de cima do gel) e *C. dubliniensis* (metade de baixo do gel) e gel II (à direita) contendo resultado de PCR referente a *C. albicans* (metade de cima do gel) e *C. tropicalis* (metade de baixo do gel).

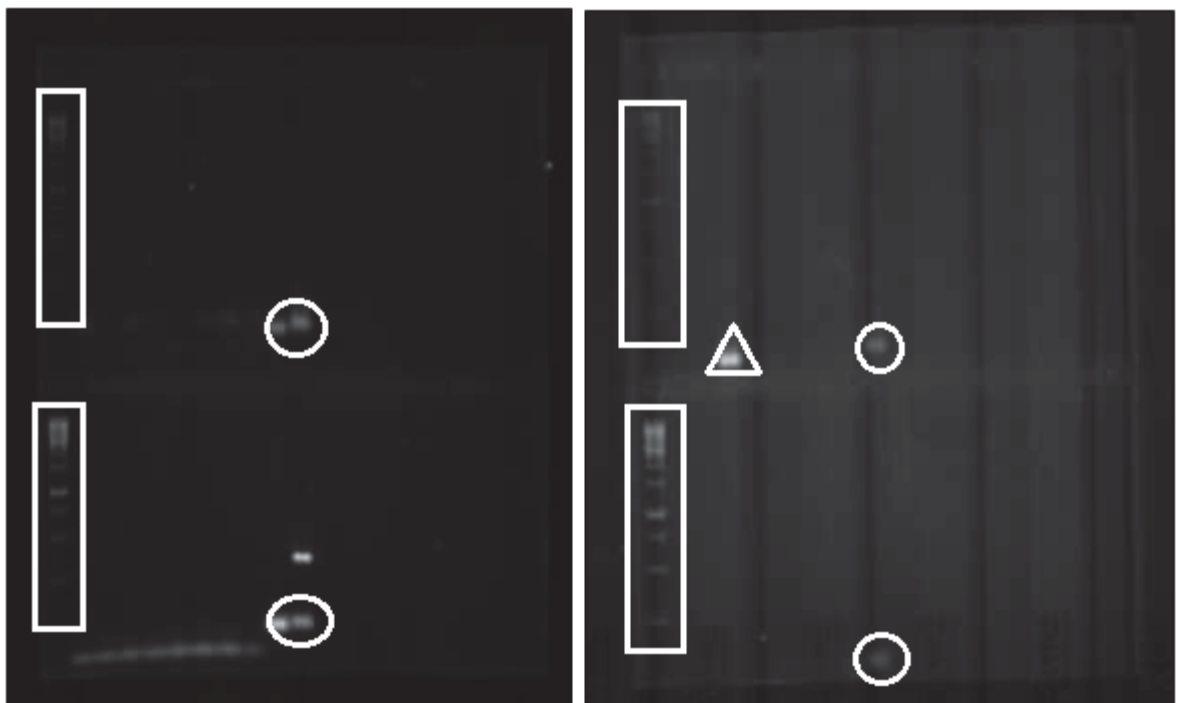


Figura 11B – Legendas das bandas representadas no gel de PCR. Os retângulos delimitam o peso molecular (*ladder*); os círculos assinalam o DNA padrão de cada espécie analisada e o triângulo mostra a banda encontrada em uma das amostras. As demais bandas representam resíduos reacionais das PCRs realizadas.

6. Teste de sensibilidade aos sabonetes

Nas figuras 12 e 13, é possível observar o resultado do teste de sensibilidade a ambos os sabonetes, comum e anti-séptico, frente aos inóculos A' e F' obtidos das lavagens de mãos e identificados como *C. albicans* e *C. krusei*, respectivamente.

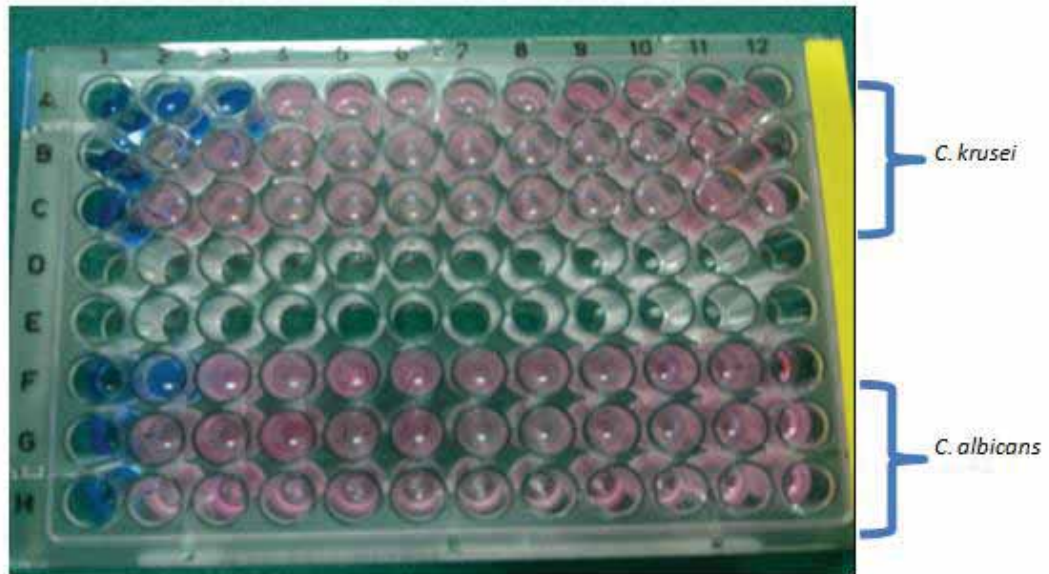


FIGURA 12 – Placa de microdiluição: teste de sensibilidade ao sabonete comum frente aos inóculos de *C. krusei* e *C. albicans* obtidas nas lavagens de mãos.

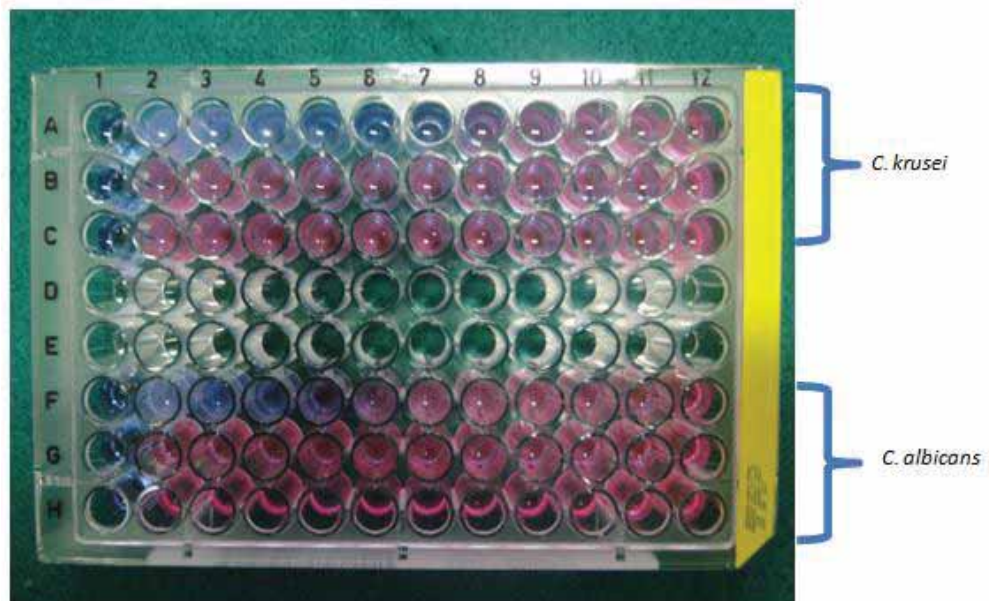


FIGURA 13 – Placa de microdiluição: teste de sensibilidade ao sabonete anti-séptico frente aos inóculos de *C. krusei* e *C. albicans* obtidas nas lavagens de mãos.

A leitura do resultado pode ser simplificada da seguinte maneira:

Os valores de CIM do sabonete comum frente aos inóculos A' e F' são 0,5ug/ml e 0,25ug/ml, respectivamente, ao passo que os valores de CIM do sabonete bactericida frente aos mesmos inóculos são 0,062ug/ml e 0,015ug/ml, respectivamente. Ou seja, até essas concentrações, os sabonetes apresentam efeito fungicida contra as cepas de *C. krusei* e *C. albicans* encontradas em mãos humanas.

7. Formação de biofilme e Avaliação da eficácia dos sabonetes

Nas placas onde há o biofilme, a leitura foi possível pela redução do XTT, que gera uma coloração alaranjada correspondente a atividade metabólica do biofilme. Portanto, todos os poços demonstram que as cepas nos biofilme estão completamente vivas, constatando que nenhum dos sabonetes foi efetivo contra as leveduras durante a formação do biofilme.

Cabe esclarecer que a leitura dos resultados foi realizada de forma visual.

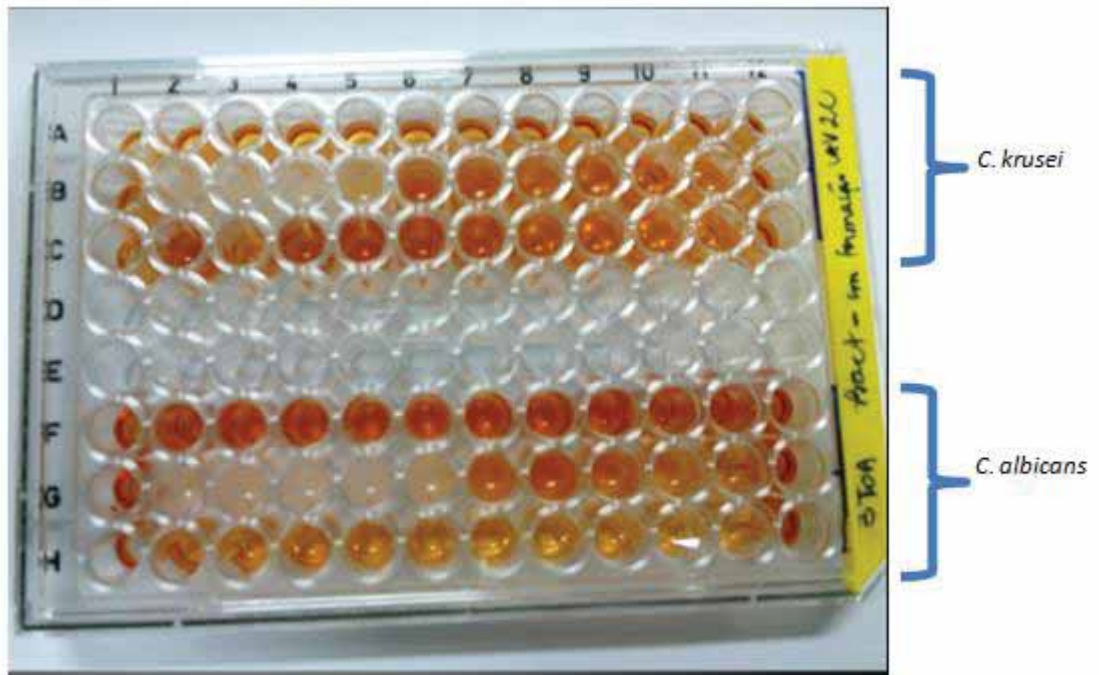


FIGURA 14 – Placa contendo biofilme em formação. O sabonete anti-séptico não foi eficaz frente aos inóculos de *C. krusei* e *C. albicans* obtidas nas lavagens de mãos.

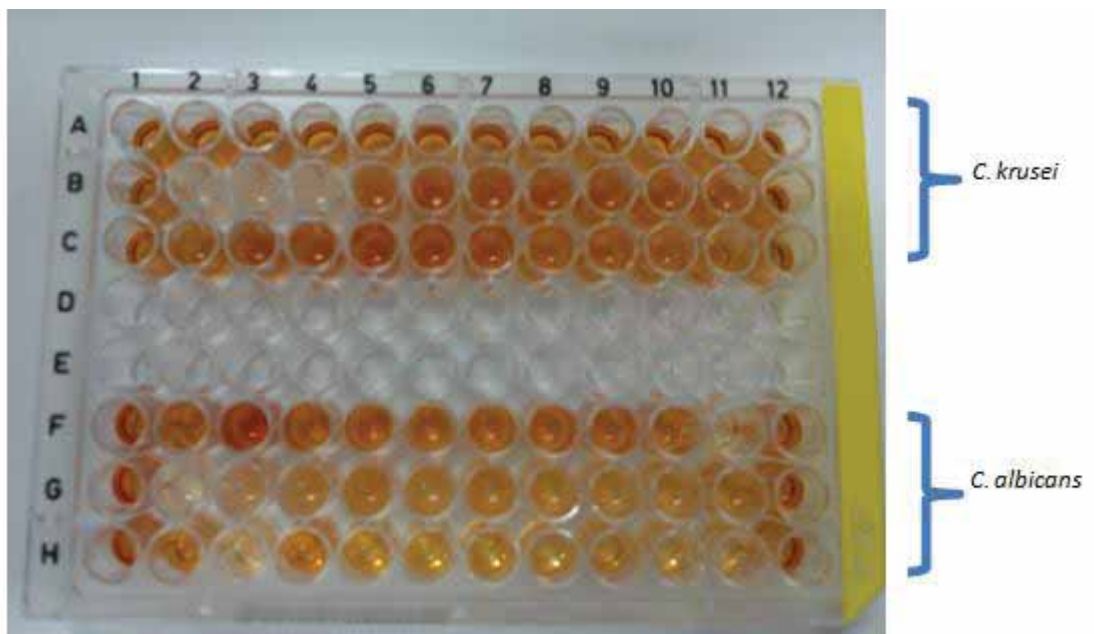


FIGURA 15 – Placa contendo biofilme em formação. O sabonete comum não foi eficaz frente aos inóculos de *C. krusei* e *C. albicans* obtidas nas lavagens de mãos.

Discussão

O presente trabalho foi idealizado e realizado a fim de se demonstrar, por meio de verificações preliminares, a importância do hábito de higiene das mãos, além de por à prova a eficiência e confiabilidade de produtos amplamente utilizados pela população brasileira: os sabonetes em barra.

Dentre as leveduras de maior importância clínica, *Candida* está entre as seis maiores responsáveis por infecções hospitalares em geral, além de ser a quarta maior causadora de infecções sistêmicas, não sendo necessariamente *C. albicans* (COLOMBO *et al*, 2000). Dessa forma, os profissionais tendem a centrar a preocupação especificamente em *C. albicans*, muitas vezes desconsiderando a importância clínica das demais espécies.

Essa grande incidência, que pode ser atribuída à capacidade de aderência de tais leveduras (TAMURA *et al*, 2003), apresenta relevância terapêutica por se tratar de uma questão de resistência observada entre as espécies *Candida* frente a diversos antifúngicos (AZEVEDO *et al*, 1999). Contudo, a identificação de *C. krusei* torna-se importante uma vez que esta espécie é considerada intrinsecamente resistente ao fluconazol (BOUCHARA *et al*, 1996).

Neste trabalho, foi ainda enfatizada a importância clínica de agentes fúngicos, como bolores e leveduras, nas infecções que podem acometer os seres humanos, principalmente aqueles cujo sistema imune é frágil, como é o caso de crianças, idosos e enfermos. Especialmente em ambientes hospitalares, é freqüente a formação de biofilme por espécies fúngicas que podem ser isoladas de cavidade bucal (LI *et al*, 2003) e atuarem como agentes infecciosos nosocomiais. A

prevalência desse fato, no entanto, é observada em cepas de espécies não *albicans* (SHIN *et al*, 2002).

Através das culturas microbiológicas obtidas a partir de mãos humanas em condições normais do dia-a-dia, foi possível evidenciar que estas certamente atuam como veículo de disseminação de muitas doenças, inclusive as de origem fúngica. Dentre elas, estão micoses que podem evoluir para formas mais graves, dependendo da resposta imune do hospedeiro.

Em geral, foi notado que nas placas de meio Sabouraud-dextrose semeadas com as amostras do sabonete anti-séptico houve maior crescimento de colônias quando comparado ao sabonete comum. Isso pode ser explicado pela ação bactericida do extrato de própolis que, ao inibir o crescimento de espécies bacterianas, contribuiu para a proliferação das espécies fúngicas por reduzir a competição ambiental entre os gêneros.

A identificação de leveduras por Chromagar™ (uma das técnicas utilizadas neste trabalho) permite uma identificação presuntiva por meio da hidrólise dos substratos enzimáticos contidos no meio com hexoaminidases presentes em cada espécie de *Candida*, permitindo a identificação da levedura de acordo com a pigmentação exibida pela colônia após o período de 24 a 48 horas (QUINDÓS *et al*, 2001). Na identificação de leveduras por esse método, comumente verifica-se a coloração rósea no caso de *C. krusei* (ODDS *et al*, 1995; COOKE *et al*, 2002). No entanto, colorações rosa a lilás também podem ser vistas em colônias de *C. parapsilosis* ou *C. glabrata*, o que dificulta a interpretação do teste. Dessa forma, faz-se sempre necessária a utilização das demais características das colônias, tais como rugosidade e extensão das bordas (GARCIA-MARTOS *et al*, 1998).

Em relação aos biofilmes formados e testados frente aos sabonetes, a conclusão que pode ser tirada é que, por se tratarem de comunidades celulares tridimensionalmente estruturadas e embebidas em uma matriz extracelular polimérica aderente (BLANKENSHIP *et al*, 2006) que confere resistência a inúmeros agentes antifúngicos, dificilmente tais estruturas cederiam ao uso de sabonetes. Ainda que testados durante a formação do biofilme e não depois dele já estabelecido, os sabonetes, tanto o comum como o anti-séptico, não se mostraram capazes de eliminar tal formação microbiana. No entanto, houve certa redução da carga fúngica uma vez que, mesmo apresentando coloração laranja do corante indicando atividade metabólica, foi percebida variação na intensidade da coloração de acordo com a concentração do sabonete. Não foi feita leitura por espectrofotometria porque o equipamento encontrava-se em manutenção no laboratório não podendo ser concluída em tempo hábil para o término deste trabalho. Portanto, tratou-se de um resultado qualitativo.

Os resultados obtidos também puderam mostrar que mesmo que a lavagem das mãos com sabonete possa, de fato, contribuir para a redução da carga microbiana que adquirimos do ambiente, muitas vezes aqueles produtos que deveriam auxiliar na desinfecção, como é o caso dos sabonetes, acabam se tornando aliados no processo de contaminação, disseminação e transmissão de micro-organismos entre as pessoas. Isso ocorre porque as substâncias conservantes nas formulações desses produtos podem não estar presentes nas condições e teores adequados.

Por fim, o sabonete anti-séptico mostrou-se mais ativo que o comum tanto no teste de sensibilidade quanto frente à formação de biofilme. É possível que o efeito

antimicrobiano do extrato de própolis seja em parte eficaz contra espécies de *Candida*, no entanto ainda devem ser estudadas a concentração ideal e as condições para que seja realmente eficiente contra os fungos patogênicos aos seres humanos.

Atualmente, são raras as pesquisas relativas à contaminação fúngica em produtos de higiene pessoal, o que torna relevante a realização de um trabalho exclusivo de verificação de contaminação fúngica nesses produtos. Agentes antimicrobianos utilizados nessas preparações devem ter segurança e eficácia comprovadas por testes de desafio do produto, pois tais substâncias apresentam toxicidade que pode causar sensibilização, alergia e até intoxicação ao usuário (EGUCHI, 2001). Teste desafio de produtos se baseia na inoculação de microorganismos conhecidos em diferentes concentrações (geralmente 30, 50, 70 e 100%) no produto que se pretende avaliar. Ao final do teste, o produto pode então ser classificado quanto a sua capacidade preservante (BRANNAN *et al*, 1987).

Devido a isso, o presente trabalho teve o intuito de atentar a legislação vigente quanto à importância do poder conservante dos produtos usados para higiene pessoal frente a espécies fúngicas, em especial no que diz respeito aos sabonetes em barra, uma vez que os sabonetes testados não foram eficazes nas lavagens de mãos em relação a leveduras de potencial patogênico.

No entanto, ainda cabem outros testes variados de identificação (como auxanograma) e maior amostragem (maior número de voluntários acompanhados por períodos mais longos), além da realização de triplicata em cada um dos testes, para que esse trabalho se torne suficientemente fiel à realidade de contaminações cruzadas, foco de disseminações, etc.

Conclusões

I – As espécies de leveduras do gênero *Candida* presentes nas palmas das mãos de indivíduos saudáveis mostraram-se possíveis focos de contaminação e disseminação de diversas doenças fúngicas que podem evoluir a formas sistêmicas ou mesmo acometer indivíduos debilitados, como ocorre nas infecções hospitalares. Verificou-se então que a higienização das mãos por meio de sabonetes em barra não é suficiente para eliminar tais cepas e evitar problemas maiores. No entanto, foi observada uma nítida redução da carga microbiana logo após a lavagem, mas que em pouco tempo já pode ser restabelecida.

II – Os antimicrobianos presentes nas formulações de sabonetes em barra, sobretudo os testados nesse trabalho, devem sempre ter segurança e eficácia comprovadas por testes de desafio do produto.

III - Concentrações e condições ideais desses agentes antimicrobianos ainda devem ser estudadas e fiscalizadas por órgãos competentes para que eles apresentem e garantam real eficiência contra as espécies de fungos patogênicos, como é o caso de *Candida spp.*

Bibliografia

ARAUJO CR *et al.* Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno Chromagar™ *Candida*. **Revista De Patologia Tropical**, v. 34, jan.-abr. 2005.

AZEVEDO RV *et al.* *Candida sp* in the oral cavity with and without lesions: maximal inhibitory dilution of Propolis and Periogard. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 30, 1999.

BOUCHARA JP *et al.* Routine use of CHROMagar *Candida* medium for presumptive identification of *Candida* yeast species and detection of mixed fungal populations. **Clin Microbiol Infect**, v. 2, 1996.

BLANKENSHIP JP & MITCHELL AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, 2006.

BRANNAN DK *et al.* Correlation of In Vitro Challenge Testing with Consumer Use Testing for Cosmetic Products. Bealutv **Car-e Division, The Procter & Gamble Company**, 1987.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 162, de 11 de setembro de 2001. Estabelece a Lista de Substâncias de Ação Conservantes para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos

e Perfumes. Publicação: **D.O.U. - Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 12 de setembro de 2001.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 79, de 28 de agosto de 2000. Regulamenta a definição de cosméticos e a classificação de produtos (Anexo I). Publicação: **D.O.U. - Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 31 de agosto de 2000.

CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentosos. Norma aprovada. Brasília, DF, 2002. (**CLSI Documento M38-A**. v. 22, n. 16)

CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras. Norma aprovada. Brasília, DF, 2002. (**CLSI Documento M27-A2**. v. 22, n. 15)

COLOMBO AL *et al.* High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, London, v. 34, 2000.

COOKE VM *et al.* New chromogenic agar medium for the identification of *Candida spp.* **Appl Envir Microbiol**, 2002.

COSTA DA *et al.* Intake and digestibility of diets with levels of palm kernel cake in sheep. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 11, 2010.

CROOP JM *et al.* Evaluatory relationships among ABC transporters. **Methods in Enzimology.**, v.292, 1998.

DOYLE JTT & DOYLE JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**; 1990.

DOUGLAS CR. **Tratado de Fisiologia aplicada a saúde.** 5. ed. São Paulo: Robe Editorial, 2002.

EGUCHI SY. Controle microbiológico em cosméticos. **Rev. Racine**, v. 64, 2001.

FAVALESSA OC *et al.* Aspectos micológicos e suscetibilidade *in vitro* de leveduras do gênero *Candida* em pacientes HIV-positivos provenientes do Estado de Mato Grosso. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 43, 2010.

FRAMIL V *et al.* Micoses superficiais na infância. **SciELO**, 2008. Disponível em: http://www.cibersaude.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=3971 Acesso em: 28 jul. 2010.

FUKUOKA T *et al.* Genetic basis for differential activities of fluconazole and voriconazole against *Candida krusei*. **Antimicrob. Agent. Chemother**, v.47, 2003.

GARCÍA-MARTOS P *et al.* Identification de leveduras de interés clínico en el medio de cultivo CHROMagar *Candida*. **Rev Iberoam Micol**, 1998.

GASPARETTO *et al.* Produção de biofilme por leveduras de cavidade bucal. **Acta Sci. Health Sci. Maringá**, v. 27, 2005.

GILBERT N *et al.* Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. **Cell**, v. 110, 2002.

GIRMENIA G *et al.* Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. **J Clin Microbiol**, v. 43, 2005.

GOKCE HI *et al.* Alterations in coagulation profiles and biochemical and haematological parameters in cattle traumatic reticuloperitonitis, **Vet Res Commu**, v.31, 2007.

GUINEA J *et al.* Fluconazole resistance mechanisms in *Candida krusei*: the contribution of effluxpumps. **Med Mycol.**, v. 44, 2006.

KLEINEGGER CL *et al.* Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, 1996.

KOJIC EM & DAROUICHE RO. *Candida* infections of medical devices. **Clin. Microbiol. Rev**, v.17, 2004.

KULLBERG BJ *et al.* Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. **Lancet**, 2005.

LI X *et al.* Quantitative variation of biofilm among strains in natural population of *Candida albicans*. **Microbiology, Spencers Wood**, v. 149, 2003.

LI F *et al.* Eap1p, an adhesin that mediates *Candida albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. **Eukaryot Cell**, v. 6, 2007.

MICELI MH *et al.* Emerging opportunistic yeast infections. **Lancet Infectious Disease**, v. 11, 2011.

MORGAN JA *et al.* Nitrogen and CO₂ affect regrowth and biomass partitioning differently in forages of three functional groups. **Crop Science**, v. 41, 2001.

NAGLIK JR *et al.* Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. **J. Infect. Dis.** 188. 2003.

NAGLIK J *et al.* *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cell. Microbiol**, v. 6, 2004.

NIEWERTH M & KORTING HC. Phospholipases of *Candida albicans*. **Mycoses**, v.44, 2001.

NOBILE CJ & MITCHELL AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. **Cell Microbiol**, v. 8, 2006.

ODDS FC & BERNAERTS R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presuntive identification of clinically important *Candida* species. **J Clin Microbiol**, 1995.

OLIVEIRA CN *et al.* Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. **Sci. Agric.**, v. 60, 2003.

PALMIERI MJ *et al.* FDA methodology for the microbiological analysis of cosmetics and topical drugs. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 34, 1983.

PAPPAS PG *et al.* Guidelines for treatment of candidiasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, 2004.

PÉMAN J *et al.* Estudio multicéntrico sobre la epidemiología de las candidemias en España. **Ver. Iberoam. Micol.**, v.19, 2002.

PFALLER MA & DIEKEMA DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, 2007.

PFALLER MA *et al.* *In vitro* survey of triazole cross-resistance among more than 700 clinical isolates of *Aspergillus* species. **J Clin Microbiol**, v. 46, 2008.

PIRES-GONÇALVES RH *et al.* Occurrence of fungi in water used at a haemodialysis centre. **Lett Appl Microbiol**, v. 46, 2008.

QUINDÓS G *et al.* Evaluación de un nuevo medio de cultivo cromógeno (*Candida* ID) para el aislamiento e identificación presuntiva de *Candida albicans* y otras levaduras de interés médico. **Rev Iberoam Micol**, 2001.

RAMAGE G *et al.* Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, No 9, 2001.

RAMAGE G *et al.* *Candida* biofilms: an update. **Eukaryotic Cell**, v. 4, 2005.

RANGEL-FRAUSTO MS *et al.* National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. NEMIS Study Group. **Clin Infect Dis**, v. 29, 1999.

REX JH *et al.* Resistance of *Candida* species to fluconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, 1995.

RODRIGUEZ-TUDELA JL *et al.* Comparison of caspofungin MICs by means of EUCAST method EDef 7.1 using two different concentrations of glucose. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 54, 2010.

SARDI JCO *et al.* Periodontal conditions and prevalence of putative periodontopathogens and *Candida spp.* in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with chronic periodontitis - A pilot study. **Archives of Oral Biology** (2011), doi:10.1016/j.archoralbio.2011.03.017

SHAO PL *et al.* Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. **Int J Antimicrob Agents**, v. 30, 2007.

SHIN JH *et al.* Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of blood stream isolates with isolates from other sources. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC, v. 40, 2002.

SILVA AP *et al.* Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. **J Clin Microbiol**, v. 47, 2009.

SPANAKIS EK *et al.* New agents for the treatment of fungal infections: clinical efficacy and gaps in coverage. **Clin Infect Dis**, v. 43, 2006.

SPELLBERG BJ *et al.* Current treatment strategies for disseminated candidiasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 42, 2006.

TAMURA NK *et al.* Evaluation of the adherence of *Candida* species to urinary catheters. **Mycopathologia, Dordrecht**, v. 156, 2003.

TEKELI A *et al.* *Candida* carriage and *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of type-1 diabetes mellitus patients. **Mycoses**, Berlin, v.47, 2004.

TRICK WE *et al.* Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, 2002.

VERSTREPEN KJ & KLIS FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Mol Microbiol**, v. 60, 2006.

VISCOLI C *et al.* Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). **Clin Infect Dis**, v.28, 1999.

VOLOCHTCHUK OM *et al.* Variações do pH dos sabonetes e indicações para sua utilização na pele normal e na pele doente. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 75, nov./dez. 2000.

WINGARD JR *et al.* Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplant and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. **New England Journal of Medicine**, v. 325, 1991.

WISPLINGHOFF H *et al.* Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 39, 2004.

YANG YL *et al.* Fluconazole resistance rate of *Candida* species from different regions and hospital types in Taiwan. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 36, 2003.