



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Thaís Soares Bezerra Santos Nunes

Efeito da N-acetilcisteína em biofilme de *Candida albicans*

Araraquara

2019



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Thaís Soares Bezerra Santos Nunes

Efeito da N-acetilcisteína em biofilme de *Candida albicans*

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral, na área de Prótese Dentária.

Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

Araraquara

2019

Nunes, Thaís Soares Bezerra Santos

Efeito da N-acetilcisteína em biofilme de *Candida albicans* / Thaís Soares Bezerra Santos Nunes. --

Araraquara: [s.n.], 2019

116 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) –
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

1. Acetilcisteína 2. Biofilmes 3. Matriz extracelular
4. *Candida albicans* 5. Farmacorresistência fúngica I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Jorge, CRB-8/5036
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Thaís Soares Bezerra Santos Nunes

Efeito da N-acetilcisteína em biofilme de *Candida albicans*

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do título de mestre em Reabilitação Oral

Presidente e orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

2º Examinador: Profa. Dra. Lívia Nordi Dovigo

3º Examinador: Prof. Dr. Valentim Adelino Ricardo Barão

Araraquara, 11 de março de 2019

DADOS CURRICULARES

Thaís Soares Bezerra Santos Nunes

NASCIMENTO: 07/08/1991 Maceió, Alagoas

FILIAÇÃO: José Helder Pessoa Nunes
Betania Soares Bezerra Santos Nunes

2010-2014 Graduação pela Universidade Federal de Alagoas- UFAL

2013-2014 Bolsista CNPq pelo projeto de iniciação científica na disciplina de Dentística restauradora da Universidade Federal de Alagoas- UFAL.
Monitoria em Prótese Fixa pela Universidade Federal de Alagoas- UFAL.

2015-2016 Experiência profissional em clínicas odontológicas

2016-2017 Especialização em Prótese dentária pela Universidade de São Paulo- USP Bauru

2017-2017 Estágio docência na disciplina de Prótese Parcial Removível II na Faculdade de Odontologia de Araraquara- FOAR.

2018-2018 Estágio docência na disciplina de Prótese Parcial Removível I na Faculdade de Odontologia de Araraquara- FOAR.

Dedico este trabalho

À Deus, por ser tão presente em minha vida, por guiar meus atos e me proteger. E por me ensinar que o mais importante em uma grande conquista não é o fim, mas sim as pessoas com quem você compartilhou o caminho.

Aos meus pais, Betania e Helder, pelo amor incondicional. Obrigada por acreditarem no meu potencial e dividirem esse sonho comigo. Vocês são meus maiores exemplos de caráter, honestidade, simplicidade e persistência. Poder contar com vocês nos momentos mais difíceis me fez uma pessoa mais forte e segura. À vocês dedico mais essa conquista.

À minha irmã, Tainá, por ter sido a primeira a apoiar a minha decisão de estudar fora do meu estado. Por ser um exemplo de disciplina e força de vontade. Obrigada por ser essa irmã tão maravilhosa em minha vida.

Ao meu amor, Pedro, por viver comigo esse sonho e me apoiar em todas as decisões. Por entender minha ausência e sempre me dar forças para continuar. Obrigada por ser o melhor namorado e amigo do mundo, e nunca polpar esforços para me ver feliz, eu te amo!

À voinha, Odete, por ser meu anjo aqui na terra. Meu maior exemplo de ser iluminado, de fé, espiritualidade, caridade, simplicidade e amor por onde passa!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” por me acolher tão bem, e pela oportunidade de concluir meu tão sonhado curso de mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima, pela dedicação, paciência e por compartilhar comigo seus conhecimentos. Obrigada por confiar no meu trabalho, e na minha capacidade de pesquisadora, essa experiência foi fundamental para meu amadurecimento profissional e pessoal. Sou imensamente grata por todo o apoio cedido no decorrer da pesquisa.

À minha amiga Marcela Dantas, irmã que Araraquara me presenteou. Está comigo desde a busca do apartamento perfeito, primeiro supermercado, até os últimos momentos do mestrado. Compartilhar com você todas as angústias, dúvidas e ansiedade do desconhecido foi algo muito mais leve e saudável. Obrigada por tornar minha rotina e nosso convívio tão agradável e especial.

Ao meu amigo Diego Dantas, por ser um amigo fiel. Compartilhando comigo bons momentos e sempre disposto a ajudar nas horas difíceis. Sempre carinhoso e atencioso. Chegou de mansinho, mas logo pude perceber o quão especial é a sua amizade.

À minha amiga Déborah Laurindo, por ter sido minha anfitriã em Araraquara e me receber tão bem em seu lar. Obrigada por todo o carinho, e por todos os momentos de descontração.

Às minhas amigas da UFAL, Amanda Palmeira e Izadora Quintela. Obrigada por serem verdadeiras amigas-irmãs, por entenderem minha ausência e sempre me incentivar na busca dos meus sonhos e objetivos.

Ao meu grupo de pesquisa, Jefferson Trigo, Vinícius Sakima e Yuliana Vega. Meu muito obrigada pela confiança, pela ajuda, dúvidas sanadas nos momentos difíceis e por cada “Oi thaís, tudo bem? Está dando certo sua pesquisa?”. Vocês foram fundamentais nessa caminhada. **À Letícia, Gabriela, Carol e Ana Cláudia**, obrigada por todo apoio e ajuda nessa caminhada.

Ao “Cursinho da Bruna”, Bruna Pimentel e Luana Dias. Vocês tornaram momentos cansativos e confusos em momentos de risos, amadurecimento e companheirismo. As considero muito, e tenho um carinho enorme pelas duas.

Aos meus amigos de turma. Mônica Tinajero, Camila Jabor, Bruna Valerrini, Carlos Moura, Laís Cardoso, Fernanda Mercante e Mariana Citta, por todo o aprendizado e companheirismo nas aulas e clínicas.

Aos amigos do laboratório de microbiologia. Sabrina Ribeiro e Erick Dante pelo companheirismo e auxílio nas atividades; **Cláudia Jordão, Camila Tasso, Lucas Portela, Elkin Florez, María Isabel, Geisi Bueno, Bruna Novelli, Carmélia Lobo, Jaqueline Colin**, por tornarem meus dias mais leves, divertidos e por toda a contribuição ao longo desses dois anos; **Midian Castillo**, especialmente na etapa final da pesquisa, que com muita paciência compartilhou seus conhecimentos com muita dedicação.

À Paula Barbugli, por toda a atenção e dedicação na etapa final da pesquisa. Por contribuir para interpretação dos meus dados com resultados mais fidedignos.

À professora Marlise Klein e ao professor Carlos Alberto, por toda assistência, zelo e sugestões que contribuíram para o benefício deste trabalho ao longo da minha pré-qualificação e qualificação.

Aos professores da banca, por aceitarem o convite e dedicarem sua atenção e conhecimentos para o crescimento deste trabalho.

Aos professores do departamento de Prótese Dentária, obrigada pela dedicação diária em transitar seus conhecimentos e paciência ao ensinar.

À CAPES, pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)- Código de financiamento 001.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2018/02513-9) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente no meu curso de mestrado, os meus sinceros agradecimentos e toda a minha gratidão!

“Que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois...

A vida é construída nos sonhos e concretizada no amor”

Chico Xavier*

*Chico Xavier. Oração: Que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente.

Nunes TSBS. Efeito da N-acetilcisteína em biofilme de *Candida albicans* [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

RESUMO

Candida albicans (Ca) é o principal fungo patógeno humano, responsável por infecções como a candidose orofaríngea e a candidemia. Essas infecções estão fortemente associadas com a formação de biofilmes. O uso abusivo de antifúngicos tem levado ao desenvolvimento de resistência fúngica. As terapias direcionadas aos biofilmes, principalmente contra a matriz extracelular (MEC), são relevantes para o desenvolvimento de novos tratamentos mais eficazes. Um dos agentes que tem demonstrado ação antibiofilme é a N-acetilcisteína (NAC). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação da NAC em biofilmes in vitro de *C. albicans* susceptível (CaS) e resistente ao fluconazol (CaR). Culturas planctônicas de CaS e CaR foram cultivadas e submetidas ao teste de susceptibilidade à NAC. Foram determinadas também a curva de inativação de ambas as cepas sob ação da NAC, seu efeito na formação do biofilme e no biofilme maduro. Por fim, foi avaliada a ação NAC na composição da MEC do biofilme, por meio da quantificação de peso seco total e do precipitado, polissacarídeos solúveis em água (WSP) e álcali (ASP), proteínas do sobrenadante e do precipitado e DNA extracelular (eDNA). Os dados obtidos foram analisados descritivamente e pelos testes ANOVA/Welch e Tukey/Gomes-Howell ou Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$). A concentração inibitória mínima da NAC com redução de 90% (CIM₉₀) foi de 25 mg/mL para ambas as cepas. Apesar de não ter sido encontrado nenhum valor de concentração fungicida mínima (CFM), a NAC reduziu ($p \leq 0,001$) a viabilidade fúngica em 1,81 a 4,06 log₁₀ em ambas as cepas avaliadas. Na curva de inativação, apenas as concentrações \geq CIM reduziram o crescimento fúngico durante 24 h, essa ação fungistática foi mais evidente entre 8-10h. Concentrações $<$ CIM aumentaram o crescimento fúngico. Em biofilmes em formação, concentrações $>$ CIM (100 e 50 mg/mL) inibiram a viabilidade (redução de 1,41 a 2,77 log₁₀) e a biomassa (redução de 39 a 88%), e para CaS a NAC 25 e 12,5 mg/mL também reduziu biomassa em 77 e 34%, respectivamente. Esse efeito inibitório também foi observado em diferentes fases da formação do biofilme (24, 12 e 6 h). Já em biofilmes maduros, apenas a NAC 100 mg/mL reduziu a viabilidade (1,12 a 2,30 log₁₀) em ambas as cepas, e em CaR 50 e 25 mg/mL de NAC reduziram 1,26 e 0,64 log₁₀, respectivamente. Na biomassa, a NAC 100 mg/mL reduziu 69-72% para ambas as cepas, e em CaR a NAC 50 e 25 mg/mL também reduziu em 64 e 48%, respectivamente. NAC 12,5 mg/mL também aumentou ($p < 0,001$) a viabilidade de CaS do biofilme maduro e em formação. Na análise dos componentes da matriz dos biofilmes, foi observada uma tendência da NAC 100 mg/mL (biofilmes maduros) e 50 mg/mL (biofilmes em formação) em diminuir o peso seco do precipitado, proteínas do sobrenadante, WSP, ASP e eDNA. Assim, a NAC apresentou efeito fungistático contra as CaS e CaR, com um efeito concentração-dependente. O efeito antibiofilme da NAC foi decorrente de sua ação fungistática, uma vez que somente as concentrações que inibiram a viabilidade fúngica reduziram a biomassa. Houve uma tendência da NAC em diminuir os componentes solúveis da matriz. Este foi um estudo experimental in vitro inicial, que visa futuramente a aplicabilidade clínica da NAC como um coadjuvante no controle de biofilme de Ca sobre a superfície de próteses dentárias.

Palavras – chave: Acetilcisteína. Biofilmes. Matriz extracelular. *Candida albicans*. Farmacorresistência fúngica.

Nunes TSBS. Effect of N-acetylcysteine on *Candida albicans* biofilm [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

ABSTRACT

Candida albicans is the main fungal pathogen in humans, responsible for local and systemic infections, such as oropharyngeal candidiasis and candidemia. These fungal infections are associated with biofilm formation. The abusive use of antifungals has led to the development of fungal resistance. The therapies towards the biofilms, mainly against the matrix, are relevant for the development of more effective new treatments. One of the agents that have demonstrated antibiofilm action is N-acetylcysteine (NAC). Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect in vitro of NAC on biofilms of *C. albicans* susceptible (CaS) and resistant to fluconazole (CaR). CaS and CaR were submitted to the susceptibility test to NAC. The time-kill curves of NAC and its effect on biofilm formation and mature biofilms were also determined for both strains. Finally, the effect of NAC on the composition of the biofilms matrix was evaluated [total and pellets's dry weight, water (WSP) and alkali soluble polysaccharides (ASP), supernatant and pellet's proteins, and extracellular DNA (eDNA)]. The data were descriptively analyzed and submitted to the ANOVA/Welch and Tukey/Gomes-Howell or Kruskal-Wallis tests ($\alpha= 0.05$). The minimum inhibitory concentration of NAC with 90% of reduction (MIC_{90}) was 25 mg/mL. Although no minimum fungicidal concentration (MFC) value was found, NAC reduced ($p \leq 0,001$) the fungal viability by 1.81 to 4.06 \log_{10} for both strains. In the time-kill curves, only concentrations $\geq MIC$ reduced the fungal growth for 24 h, this fungistatic action was most evident between 8-10 h. Concentrations $< MIC$ increased the fungal growth. For biofilm formation, concentrations $> MIC$ (100 and 50 mg/mL) inhibited the viability (reduction of 1.41 to 2.77 \log_{10}) and the biomass (reduction of 39 to 88%) for both strains, and for CaS NAC at 25 and 12.5 mg/mL reduced the biomass in 77 and 34%, respectively. This inhibitory effect of NAC was also observed in different stages of biofilm formation (24, 12, and 6h). For mature biofilms, only NAC at 100 mg/mL reduced the viability (1.12 to 2.30 \log_{10}) of both strains, and for CaR 50 and 25 mg/mL of NAC reduced 1.26 and 0.64 \log_{10} , respectively. NAC 100 mg/mL reduced the biomass in 69-72% for both strains, and for CaR NAC at 50 and 25 mg/mL also reduced the biomass in 64 and 48%, respectively. NAC 12.5 mg/mL also increased ($p < 0.001$) the CaS viability during biofilm formation and for mature biofilm. For the components of biofilms matrix, NAC at 100 mg/mL (mature biofilms) and 50 mg/mL (biofilm formation) seems to show a tendency in decreasing the pellet's dry weight, supernatant's proteins, WSP, ASP, and eDNA. Therefore, NAC showed a fungistatic effect against CaS and CaR, with a concentration-dependent effect. The antibiofilm effect was due to its fungistatic action, since only concentrations that inhibited fungal viability reduced the biofilms biomass. NAC seems to reduce the soluble components of the biofilms matrix. This is an initial in vitro study, which will drive the future clinical application of NAC as a coadjuvant in the control of Ca biofilm on the surface of dental prostheses.

Keywords: Acetylcysteine. Biofilms. Extracellular matrix. *Candida albicans*. Fungal drug resistance.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 <i>Candida albicans</i>.....	19
3.2 Biofilme.....	21
3.3 Matriz do Biofilme e sua Composição.....	25
3.4 Agentes Antifúngicos Convencionais.....	31
3.5 N-acetilcisteína (NAC).....	33
4 MATERIAL E MÉTODO	42
4.1 Material	42
4.1.1 Material de consumo.....	42
4.1.2 Instrumentais.....	43
4.1.3 Equipamentos.....	44
4.2 Métodos	44
4.2.1 Micro-organismos e condições de cultivo.....	44
4.2.2 Avaliação antifúngica da NAC.....	45
4.2.3 Curvas de inativação.....	46
4.2.4 Efeito da NAC na formação do biofilme.....	46
4.2.5 Avaliação do tempo de ação no biofilme.....	47
4.2.6 Efeito da NAC em biofilme maduro.....	48
4.2.7 Efeito da NAC na composição da matriz do biofilme.....	49
4.2.7.1 <i>Unidade formadora de colônia (UFC/mL)</i>.....	51
4.2.7.2 <i>Análise do peso seco total</i>.....	51
4.2.7.3 <i>Análise do peso seco do pellet</i>.....	51
4.2.7.4 <i>Análise de proteínas do sobrenadante</i>.....	51
4.2.7.5 <i>Análise de proteínas do pellet</i>	53
4.2.7.6 <i>Análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP)</i>.....	54
4.2.7.7 <i>Análise de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP)</i>.....	56
4.2.7.8 <i>Análise de eDNA</i>.....	59

4.2.7.9 Normalização das amostras para quantificação dos componentes da matriz.....	59
4.3 Análise Estatística	59
5 RESULTADOS	61
5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	61
5.2 Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	62
5.3 Curvas de Inativação.....	63
5.4 Efeito da NAC na Formação do Biofilme de 48 h	65
5.5 Menor tempo de Ação da NAC sobre Biofilme em Formação ..	66
5.6 Efeito da NAC sobre Biofilme Maduro.....	71
5.7 Efeito da NAC na Composição da Matriz do biofilme	73
5.7.1 Unidade formadora de colônia (UFC/mL).....	74
5.7.2 Análise do peso seco total	74
5.7.3 Análise do peso seco do <i>pellet</i>	75
5.7.4 Análise das proteínas do sobrenadante.....	76
5.7.5 Análise das proteínas do <i>pellet</i>	76
5.7.6 Análise dos polissacarídeos solúveis em água (WSP)	77
5.7.7 Análise dos polissacarídeos solúveis em álcali (ASP)	78
5.7.8 Análise de eDNA.....	78
6 DISCUSSÃO	80
7 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS	87
APÊNDICE A	96
APÊNDICE B	105
APÊNDICE C	111

1 INTRODUÇÃO

Biofilme é o nome dado a uma comunidade complexa de micro-organismos incorporados em uma matriz extracelular (MEC), aderida a uma superfície inerte ou viva¹⁻³. A formação do biofilme é dividida em algumas fases e organizada de forma cíclica e contínua³. A estrutura de um biofilme maduro proporciona vantagens para os micro-organismos em comparação com sua forma planctônica, pois a organização em comunidade facilita a captação de nutrientes, maior proteção contra desidratação e resistência a antimicrobianos⁴. Os biofilmes são responsáveis por boa parte das infecções humanas e têm ligação com a exacerbação ou amenização dos sintomas, tornando as infecções persistentes difíceis de serem eliminadas por antimicrobianos e pelo sistema imunológico¹.

A candidíase é a infecção fúngica que mais acomete os seres humanos, sendo causada por fungos do gênero *Candida*, principalmente pela espécie *Candida albicans*, que é a mais prevalente¹. *C. albicans* vive como um micro-organismo comensal nas mucosas oral e genital, trato digestivo e pele na maioria dos indivíduos saudáveis. Entretanto, sob certas condições, pode ocorrer a transição de fungo comensal para patógeno oportunista, podendo invadir tecidos e provocar infecções⁵. A capacidade de *C. albicans* mudar sua morfologia de levedura (comensal) para forma filamentosa de hifas ou pseudohifas (invasiva, infecciosa) é conhecida como polimorfismo⁶. Outro importante fator de virulência desse fungo é a sua flexibilidade de adaptação e capacidade de adesão em sítios variados, principalmente a formação de biofilme⁷. Infecções microbianas de uma forma geral, o que inclui a candidíase bucal, estão fortemente associadas a biofilmes⁸.

Dentre os fatores de risco para o desencadeamento da candidíase orofaríngea está o uso de próteses dentárias (conhecida como estomatite protética), antibióticos por tempo prolongado, terapias imunossupressoras, diabetes, má nutrição e a debilidade decorrente do tratamento do câncer (químico e radioterapia)^{9,10}. Devido à forte ligação da infecção fúngica com o estado imunológico do paciente, a candidíase já foi considerada um indicador do desenvolvimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) antes do surgimento dos antirretrovirais¹¹. Em determinados casos, a infecção bucal pode se prolongar para o trato gastrointestinal inferior ou para a corrente sanguínea, gerando um quadro de fungemia⁸. Mais de 90% dos casos de fungemia são provocados pelo

gênero *Candida* (candidemia), e essa infecção sistêmica em pacientes imunossuprimidos pode evoluir para o óbito em 40% a quase 80% dos casos^{8,12,13}. Nas últimas décadas houve um crescimento considerável dos casos de infecções nocominais geradas por fungos, aumentando conseqüentemente o índice de mortalidade; até 60% dos óbitos provenientes dessas infecções hospitalares são causadas por fungos¹⁴. *Candida* spp. vêm se destacando nesse contexto, pois corresponde a até 80% das infecções fúngicas de origem hospitalar e corresponde a quarta causa de infecção da corrente sanguínea¹⁴, geralmente associadas a uso de cateter⁷. Essas infecções são sérias, pois células organizadas em biofilme são resistentes a antifúngicos, sendo necessárias novas terapias para eliminar o biofilme⁷.

Um importante componente do biofilme é a MEC, que é responsável pela arquitetura tridimensional do biofilme e propriedades mecânicas, como força adesiva, coesão e rigidez, além de permitir agregação ou agregados de células organizadas (microcolônias)¹⁵. Esse ambiente modula a expressão gênica, o metabolismo e a sinalização celular por moléculas que influenciam o comportamento microbiano (*quorum sensing*)¹⁵. De maneira geral, a MEC do biofilme é composto por carbodratos (β -glucanos e mananas), proteínas, lipídios e DNA extracelular (eDNA)¹⁶. Entretanto, apesar desta vasta variedade na sua composição, a função de cada componente presente na MEC de *C. albicans* ainda não é conhecida¹⁶. Uma vez que a MEC protege as células dentro do biofilme e atua como uma barreira física aos agentes externos, como antimicrobianos¹⁷, novas terapias direcionadas para a desestruturação da MEC podem ser potencialmente promissoras.

Tradicionalmente a candidíase é tratada por medicamentos tópicos ou sistêmicos¹⁸. A terapia medicamentosa tópica muitas vezes têm resultados efetivos, porém sua concentração na cavidade bucal torna-se reduzida a valores subterapêuticos devido aos efeitos diluentes da saliva e à ação de limpeza da musculatura bucal, necessitando de múltiplas doses do medicamento e cooperação do paciente¹⁹. A terapia medicamentosa sistêmica, por sua vez, pode promover efeitos colaterais hepatotóxicos e/ou nefrotóxicos, o que exige muita cautela durante sua prescrição¹⁹, além do risco de desenvolver cepas resistentes devido ao uso indiscriminado dos agentes antifúngicos²⁰. Clinicamente, a resistência aos antifúngicos provoca a falha de determinada terapia antifúngica, resultando na persistência ou até progressão da infecção²¹. Em termos laboratoriais, a resistência

antifúngica é mensurada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou seja, a concentração mínima do fármaco necessária para inibir o crescimento do micro-organismo²². A partir da CIM, por meio de protocolos padrões, se estabelece uma série de concentrações do agente antimicrobiano ao longo de um período de tempo definido. Atualmente, a resistência microbiana é uma ameaça mundial e uma das maiores preocupações da área da saúde²³.

Devido às limitações apresentadas atualmente pelos tratamentos disponíveis para infecções microbianas, outros métodos antimicrobianos estão sendo pesquisados. Uma alternativa terapêutica é a N-acetilcisteína (NAC), um derivado do aminoácido L-cisteína^{24,25}. A NAC é um agente mucolítico com ampla margem de segurança e bastante difundido na prática médica²⁶⁻³¹, comercialmente conhecido como Fuimucil/Flumucil, Bromuc, etc. Sua fração ativa, sítio tiol (-sh), desempenha um papel na eliminação de radicais livres e destruição das ligações de dissulfeto intermolecular ou intramolecular em proteínas, o que reduz a viscosidade das secreções^{32,33}. A NAC é um potente antioxidante, atuando contra radicais livres oxidantes nas células do tecido pulmonar²⁵, sendo administrado na medicina por vias inalatória, intravenosa¹ e principalmente oral e intramuscular³⁴.

A NAC tem múltiplas aplicações terapêuticas, sendo mais frequentemente usada para reduzir a viscosidade do muco em bronquite crônica^{25,26,28-30,35}, em pacientes com comprometimento pulmonar, incluindo pacientes pediátricos com fibrose cística³⁰, e como desintoxicante para overdose de paracetamol^{24,29,31,36,37}. Já existem evidências de que a NAC, isolada ou em associação com antibiótico, pode diminuir o risco da intensificação de bronquite crônica, doença pulmonar obstrutiva e rinosinusite³⁴. Os bons resultados da NAC na medicina pulmonar têm despertado certo interesse em estudar seu efeito em outras doenças mediadas por biofilme²⁷. Por exemplo, na agricultura, já foi demonstrada a capacidade da NAC em controlar bactérias que atacam citrus, oliveiras, tomates e hortaliças³⁸. A bactéria *Xylella fastidiosa* forma um biofilme no xilema das plantas, que compromete o fluxo de água e sais minerais. Sob forma de pulverizador, a NAC, além de regredir a doença, possibilitou aumento na produtividade, e os frutos apresentaram maior diâmetro³⁸. Essas investigações de novas indicações de medicamentos que originalmente são designados para outra proposta são conhecidas como “reaproveitamento de medicamento” (*drug repurposing*), cujas vantagens incluem menor tempo e menor

custo de investigação, como aqueles despendidos para a avaliação clínica de segurança do medicamento³⁹.

A NAC é um composto não antibiótico que tem sido investigada com relação a suas propriedades antimicrobianas^{27,29,30}. Foi demonstrado que a NAC diminuiu a produção de polissacarídeos extracelulares, rompeu biofilmes maduros e reduziu a adesão das bactérias a superfícies^{27,31}. Na área odontológica, a NAC tem se mostrado eficiente na redução da formação dos biofilmes em uma variedade de patógenos endodônticos clinicamente importantes^{27,29}. Pesquisas recentes exploraram a capacidade da NAC em aumentar os efeitos dos antibióticos convencionais⁴⁰, seu uso na inibição da adesão de bactérias às células epiteliais e superfície de dispositivos médicos^{31,36}, e sua ação na formação de biofilme de uma gama de bactérias importantes na área da saúde, tais como: *Pseudomonas aeruginosa*^{30,41}, *Escherichia coli*⁴², *Staphylococcus epidermidis*⁴³, *Staphylococcus aureus*³¹ e *Streptococcus pneumoniae*⁴⁰.

Pesquisas in vitro sugerem que a NAC tem uma atividade antibiofilme promissora, com atividade antimicrobiana contra diferentes micro-organismos^{27,31,40-43}. Porém, ainda são desconhecidos os mecanismos dessa atividade antimicrobiana e antibiofilme da NAC, necessitando de mais pesquisas para entender melhor o potencial dessa substância nas infecções relacionadas a biofilmes. Existem algumas hipóteses para explicar o mecanismo da atividade antimicrobiana da NAC: 1. inibição competitiva da utilização de cisteína; 2. reação do grupo sulfidril da NAC com proteínas bacterianas; e 3. desorganização do equilíbrio *redox* intracelular com potenciais efeitos indiretos no metabolismo celular e vias de transdução de sinal intracelular^{41,44}. Já a atividade da NAC na dispersão do biofilme pré-formado pode ser devido à perturbação da fisiologia microbiana, ou devido a um efeito direto da NAC na arquitetura da MEC do biofilme (por quelação de cálcio e magnésio ou interação com componentes cruciais na MEC)^{41,44}.

Alguns estudos avaliaram a ação da NAC sobre *C. albicans*⁴⁵⁻⁴⁷, porém em apenas um deles foi utilizado cepas padrões⁴⁶, os outros trabalharam com isolados clínicos. Sabe-se que cepas de isolados clínicos apresentam diferenças fenotípicas que podem afetar seu comportamento, como virulência e capacidade de formação de biofilme, e por isso é importante avaliar cepas padrões. Adicionalmente, a ação da NAC contra cepas resistentes a antifúngicos ainda não foi avaliada, e, caso efetiva, pode indicar a NAC como uma alternativa aos antifúngicos convencionais.

Também não foram encontrados estudos sobre o efeito da NAC na composição da matriz do biofilme fúngico. Assim, a hipótese do presente estudo *in vitro* é que a NAC pode apresentar efeito antifúngico e/ou antibiofilme contra cepas padrões de *C. albicans* susceptível (CaS) e resistente (CaR) ao fluconazol.

Este estudo visa a possibilidade da aplicação clínica da NAC como uma solução auxiliar no controle do biofilme de Ca sobre a superfície de próteses dentárias e outros dispositivos médicos que apresentam formação de biofilme de Ca, podendo atuar na prevenção e/ou tratamento da candidíase associada ao uso de prótese (estomatite protética).

2 PROPOSIÇÃO

A proposta deste estudo foi avaliar *in vitro* o efeito da N-acetilcisteína (NAC) na viabilidade de *C. albicans* em culturas planctônicas e biofilmes e na composição da MEC do biofilme. A hipótese científica é que a NAC pode apresentar atividade antifúngica e/ou antibiofilme, ou seja, capacidade de reduzir a viabilidade e a biomassa de *C. albicans*, sua formação de biofilme, assim como alterar a composição da MEC do biofilme. Foram avaliadas 2 cepas padrões de *C. albicans*, uma susceptível (CaS) e outra resistente (CaR) ao fluconazol. Assim, os objetivos específicos deste estudo foram:

1. Avaliar a capacidade fungistática e fungicida da NAC em culturas planctônicas de CaS e CaR ;
2. Avaliar o efeito da NAC na formação de biofilme e em biofilme maduro de CaS e CaR ;
3. Avaliar o efeito da NAC na composição da MEC (Polissacarídeos solúveis e insolúveis em água; proteínas do *pellet* e do sobrenadante; e eDNA) de biofilmes de CaS e CaR.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Candida albicans*

Mais de 200 espécies de *Candida* já foram descritas na literatura⁴⁸, das quais mais de 17 espécies causam infecções em humanos⁴⁹ e aproximadamente 90% das infecções invasivas são causadas por *C. albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*⁴⁹. *Candida* é um micro-organismo comensal presente no trato gastrointestinal e genitourinário, flora normal de pele e membranas mucosas humanas, ou seja, vive em equilíbrio com o hospedeiro sem progredir para uma infecção¹⁰. Entretanto, sob determinadas condições, este micro-organismo torna-se um patógeno oportunista gerando infecção no hospedeiro^{10,50} e invadindo os tecidos⁵. Dentre as condições que possibilitam este fato, destacam-se principalmente a imunossupressão do hospedeiro¹⁰, mas também condições de desequilíbrio por fatores externos como: uso de antibióticos de amplo espectro, ruptura de pele ou mucosa¹⁰, microbiota alterada em hospedeiro saudável (disbiose)⁵⁰. Humanos com sistema imunológico íntegro dificilmente desenvolvem infecção ao serem expostos a este tipo de micro-organismo¹⁰.

A capacidade de *Candida* spp. provocar uma doença é devido a alguns fatores de virulência, como: aderência, formação de biofilme, capacidade de se defender dos agentes de defesa do hospedeiro e produção de enzimas hidrolíticas, que causam danos ao tecido (proteases, fosfolipases e proteínas hemolisinas)⁵¹. Infecções por fungos de *Candida* spp. não estão restritos a condições locais, como candidíases oral, incluindo a estomatite protética, e candidíase vaginal, mas envolvem também infecções sistêmicas (fungemia)⁵⁰.

Fungemia é caracterizada pela disseminação da infecção na corrente sanguínea, que quando causada por *Candida* spp., recebe o nome de candidemia². Cerca de 90% dos casos de fungemia são candidemia¹², que é a quarta maior infecção nasocominal com taxa de mortalidade de até 50%² e uma infecção médica extremamente grave¹². Dentre os procedimentos de maior risco para este tipo de contaminação são as cirurgias que resultam em violações no trato gastrointestinal, permitindo a disseminação de *C. albicans* que lá residem, e o uso de cateteres em unidades de terapia intensiva que resultam na formação de biofilme². Os sintomas da candidemia são bem semelhantes aos de uma septicemia (causada por bactérias), e infelizmente muitas vezes o diagnóstico demora a ser estabelecido, o

que dificulta o sucesso do tratamento com uso de antifúngicos⁵². Por esse motivo, tratamento com antifúngicos são administrados de forma profilática após procedimentos de risco como transplantes de medula óssea e cirurgias abdominais⁵².

A espécie *C. albicans* é a mais comum e significativa que acomete os seres humanos, pois corresponde a 90% dos isolados fúngicos da cavidade bucal⁵³. *C. albicans* possui três morfologias distintas: leveduras, pseudo-hifas e hifas verdadeiras²⁰. Cada morfologia apresenta forma de crescimento e patogenicidade distinta⁵⁴. A forma de leveduras é encontrada sob superfícies de pele e mucosas de indivíduos saudáveis, e a forma de hifas corresponde a morfologia patogênica capaz de invadir tecidos⁵⁵. As leveduras, por exemplo, se desenvolvem por brotamento; pseudo-hifas alongam-se sem se segmentar da célula mãe, formando filamentos alongados com constrições nas junções septais⁵⁴ e hifas verdadeiras, por sua vez, são células mais alongadas, de paredes paralelas e sem constrições nas junções septais⁵⁴.

A transição da morfogênese de levedura para hifas de *C. albicans* é uma característica regulada pelo ambiente²⁰. As hifas são influenciadas pela temperatura (acima de 35°C), pH neutro e alta concentração de CO₂⁵⁴. Leveduras são mais presentes em temperatura abaixo 30°C e pH ácido, já as pseudo-hifas se estabelecem nos ambientes de transição para hifas⁵⁴. Apesar das pseudo-hifas apresentarem formas alongadas semelhantes às hifas verdadeiras, estas apresentam mecanismo de crescimento polarizado, organização de ciclo celular e hidrólise do septo primário após a citocinese, o que sugere que as pseudo-hifas são muito mais semelhantes às leveduras do que as hifas⁵⁶.

Essa capacidade de *C. albicans* alterar sua morfologia de levedura (comensal) para forma filamentosa de hifas ou pseudo-hifas (invasiva, infecciosa) é conhecida como polimorfismo²⁰. Assim, o polimorfismo é um importante fator de virulência²⁰, pois os micro-organismos que crescem exclusivamente como leveduras são menos virulentos em modelos de camundongos de candidíase sistêmica⁵⁷; hifas expressam fatores de virulência como adesinas e proteases²⁰; a invasão em tecido epitelial subjacente ocorre com o fungo na forma de hifa⁵⁸. A presença de leveduras, pseudo-hifas e hifas desempenham um papel crucial na formação de biofilme de *C. albicans*⁵⁴; biofilmes compostos predominantemente por hifas apresentam maior resistência à compressão, ou seja, um biofilme mais difícil de ser rompido⁵⁹. *C.*

albicans ainda conta com outros importantes fatores de virulência, como a flexibilidade de adaptação, capacidade de adesão a sítios variados e, principalmente, a formação de biofilme⁷.

A candidíase oral acontece por meio da penetração de hifas de *C. albicans* no epitélio da mucosa⁵⁵. A penetração ocorre por meio de endocitose ou penetração ativa⁵⁸. Na endocitose, o processo é mediado por células epiteliais e, por isso, não requer que a célula fúngica esteja viável, enquanto que na penetração ativa a hifa viável adentra através ou entre células epiteliais⁵⁸. Essa invasão resulta em dano no epitélio por necrose e/ou apoptose⁵⁸. A maior parte das infecções causadas pelos fungos da espécie *C. albicans* estão associados à formação de biofilmes⁶⁰. A capacidade de *C. albicans* em gerar uma infecção em humanos é muito maior em biofilmes do que em células planctônicas, devido aos fatores de virulência e a resistência aos antifúngicos e à fagocitose do hospedeiro⁵⁰.

O Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos declarou que mais de 80% das doenças infecciosas são causadas por patógenos na forma de biofilmes⁶¹. Dessa forma, é importante o desenvolvimento de pesquisas para gerar novos métodos para a inibição de biofilme de *Candida* spp.

3.2 Biofilme

Biofilme é um aglomerado de vários micro-organismos estruturalmente organizados, aderidos a uma superfície, e incorporados dentro de uma MEC¹⁷. Essa aglomeração não é formada por micro-organismo aleatórios resultantes da divisão celular, e sim por uma comunidade bem específica e organizada sob controle de algumas moléculas de sinalização (*quorum sensing*)^{5,62}. A morfologia e a arquitetura do biofilme de *Candida* spp. apresenta características próprias em cada espécie; assim, biofilmes de *C. albicans* apresentam características específicas dessa espécie⁷. Apesar de *C. albicans* na forma livre (plactônica) apresentar-se susceptível a todos os antifúngicos tradicionais, sob a forma de biofilme este micro-organismo é tolerante à maioria dos antifúngicos¹. Por esse motivo, têm-se investido bastante em terapias envolvendo biofilme que utilizam um antifúngico tradicional associado a métodos/fármacos que realizem uma desestruturação mecânica do mesmo¹.

Na prática médica, o biofilme é considerado um verdadeiro desafio a ser vencido, pois se estabelece na parede interna de cateteres intravenosos, válvulas

cardíacas e outros dispositivos médicos². Na fase da dispersão do biofilme, algumas células são desprendidas e vão diretamente para a corrente sanguínea do enfermo².

C. albicans tem a capacidade de formar biofilmes quando suas células planctônicas são transportadas para uma superfície³. A formação do biofilme é dividida em algumas etapas: adesão inicial, crescimento por divisão celular, maturação e dispersão³. Durante a aderência inicial há a adesão das leveduras planctônicas de *C. albicans* a um substrato vivo ou inerte³, em seguida essas leveduras se proliferam nessa superfície produzindo projeções alongadas (tubos germinativos) que configurarão as pseudo-hifas e hifas³. Essa morfogênese é necessária para produzir uma camada densa de células de morfologia mista embebidas em uma MEC². Neste momento, já se inicia a produção de MEC, que proporciona a aderência de novas células, esculpindo assim a arquitetura inicial do biofilme³. O crescimento se dá por multiplicação celular e recrutamento de novas células³. Por conseguinte, há a maturação do biofilme, que compreende o crescimento continuado e o acúmulo da MEC, aumentando assim a biomassa do biofilme, alterando seu tamanho e forma, resultando na tolerância aos antimicrobianos³. Por fim, acontece a dispersão, em que as leveduras, células não aderidas e fragmentos do biofilme se desprendem³. Esta última fase é bem crítica, pois há sério risco de transmissão da infecção para novos sítios, possibilitando a formação de novos biofilmes em outros locais⁶³.

Uma pesquisa *in vitro* utilizando a cepa padrão de *C. albicans* (SC5314) demonstrou que o desenvolvimento do biofilme é influenciado por fatores como: superfície, meio de cultura, fonte de carboidrato e pH⁶⁴. Este estudo realizou a formação de biofilme sobre uma superfície de poliestireno e avaliou a adesão, a expressão de genes de adesão e a susceptibilidade de biofilmes maduros às equinocandinas sob diferentes meios [Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 e Yeast Nitrogen Broth (YNB)] e com diferentes valores de pH (5,6 e 7,0). Com relação à adesão, essa foi significativamente melhor em meio RPMI 1640 com pH 7,0. Sobre este mesmo pH, foi notado uma maior transição de leveduras para hifas, o que possivelmente influenciou a formação de um biofilme mais espesso em meio RPMI 1640 sob pH 7,0. Já em YNB, notou-se mais adesão do que formação de biofilme propriamente dito⁶⁴. Houve um aumento da expressão dos genes de adesão *ALS3* e *EAP1* em biofilmes formado em meio RPMI 1640 e pH 7,0, genes esses que desempenham papel fundamental para formação do biofilme *in vitro*⁶⁴. Com relação

a susceptibilidade às equinocandinas, biofilmes mais espessos (formados em meio RPMI 1640 em pH 5,6 e 7,0) foram mais tolerantes à caspofungina e anidulafungina quando comparados com os formados em YNB⁶⁴.

O resultado da pesquisa anteriormente descrita tem papel importantíssimo para concluir que as condições ambientais, no que diz respeito ao meio utilizado e pH, influenciam significativamente a arquitetura do biofilme, expressão gênica e susceptibilidade a antimicrobianos⁶⁴. Pesquisas envolvendo biofilme de *C. albicans* demonstram que as duas formas, tanto leveduras como hifas, possuem funções fundamentais durante a formação desses biofilmes^{3,7}. Já foi dito anteriormente que o polimorfismo de *C. albicans* é um importante fator de virulência²¹, e que a transição de levedura para hifas é fundamental para a formação de biofilmes densos e homogêneos⁶⁵.

Em uma revisão de literatura, foram descritos os principais genes envolvidos nas diversas fases da formação do biofilme³. Durante a fase da aderência inicial, as leveduras expressam as adesinas Eap1⁶⁶ e Als1⁶⁷ que constituem proteínas da parede celular, que por sua vez são necessárias para a adesão ao substrato⁶⁷. Em seguida, há a propagação das células já aderidas, que por sua vez expressam as adesinas Als3 e Hwp1, que irão proporcionar a ligação célula-célula⁶⁷. Com a progressão das hifas, há um acúmulo das adesinas Als3 e Hwp1, que aumentam ainda mais o poder de adesão de novas células, proporcionando uma característica extremamente pegajosa às hifas³. O fator de transcrição Efg1 e a quinase Yak1 são fundamentais para a formação de hifas⁶⁸. Acredita-se que o fator de transcrição Zap1 regula a produção de componentes dos polissacarídeos da MEC, e que o fator de transcrição Bcr1 regula a aderência, possibilitando a adesão de leveduras a superfícies⁶⁸. Os genes envolvidos durante a maturação do biofilme são os mesmos relacionados a produção de MEC ou biomassa total do biofilme³. Já na dispersão, foram identificadas as proteínas Ume6, Pes1 e Nrg1, e a superexpressão do gene *UME6* reduziu a dispersão de células, e a superexpressão de *PES1* ou *NRG1* aumentaram⁶⁹. Nesta mesma revisão de literatura³, é lançada a hipótese de que, durante a aderência inicial, tanto as leveduras, que expressam adesinas Als1, quanto as hifas, que expressam principalmente ou exclusivamente adesinas Als3, participam deste processo³.

Foram descritos acima alguns dos genes envolvidos no processo de formação do biofilme; porém, é provável que este processo sofra alterações no seu

mecanismo genético quando os fungos estão na forma de biofilmes mistos³. Este fato tem relevância clínica, já que mais de 20% das infecções sanguíneas de *Candida* spp. são polimicrobianas⁷⁰. Para se ter maior clareza dessas alterações, é importante recorrer a estudos in vitro que simulam a formação de biofilmes de *C. albicans* com bactérias, nos quais são descritas relações benéficas e antagônicas⁷¹. Como relação benéfica, existe um aumento na aderência e resistência aos antibióticos em biofilmes mistos⁷². Foi demonstrado que a associação de *C. albicans* com *Streptococcus mutans* resultou num biofilme mais patogênico quando comparado aos respectivos biofilmes monoespécies, com maior severidade de lesões de cárie num modelo de infecção roedor⁷³. Em contrapartida, algumas relações inibitórias também são demonstradas⁷¹. O farnesol produzido por *C. albicans*, por exemplo, inibe a formação de biofilmes de *Staphylococcus epidermidis* e aumenta a suscetibilidade aos antibióticos⁷⁴. Da mesma forma, a homoserina lactona, produzida por bactérias, inibe a filamentação de *C. albicans*, dificultando a formação de biofilmes fúngicos⁷⁵. O peróxido de hidrogênio e o ácido láctico produzidos por bactérias vaginais inibem a virulência e o crescimento de *C. albicans*⁷⁶. Assim, trabalhos investigando o controle de biofilme fúngico de *C. albicans* com a associação de bactérias que inibam seu metabolismo são bastantes relevantes e promissores.

Em hospitais, a conduta para infecções sanguíneas de *Candida* spp., por existir a possibilidade de estar relacionado a um biofilme misto, é o tratamento simultâneo com mais de um antimicrobiano para controlar a infecção¹.

Durante a fase de dispersão do biofilme, foi observado que a maioria das células dispersas estavam sob a forma de levedura⁶⁹. Assim, existe um processo de transição morfológica levedura-hifa na fase inicial do biofilme e hifa-levedura na fase de dispersão⁶⁹. Entretanto, um fato deve ser observado com muito zelo: foi constatado que as leveduras encontradas na dispersão apresentam um fenótipo distinto das leveduras da fase inicial, pois aquelas apresentam elevada aderência, maior capacidade de filamentação e aumento de sua patogenicidade⁷⁷. Logo, as leveduras de dispersão apresentam um potencial muito grande para formar novos biofilmes e levar a infecção para novos sítios do organismo humano⁷⁷.

Os medicamentos convencionais utilizados para tratamento de candidíase oral apresentam baixa penetração sobre biofilmes, resultando em uma ação fraca e temporária. Adicionalmente, vale ressaltar que a utilização de medicamentos em

concentrações inferiores às ideais para controle de biofilmes provoca seleção de cepas resistentes, por isso é necessária uma abordagem diferente para evitar essa realidade¹. De uma maneira geral, os biofilmes apresentam altos índices de tolerância contra tratamentos antimicrobianos, devido às suas características totalmente distintas da sua forma planctônica¹⁷. A capacidade de *C. albicans* de formar biofilme é um dos seus principais fatores de virulência, esse fato torna a eliminação de uma infecção por esse tipo de biofilme um verdadeiro desafio, comprovado pelas altas taxas de mortalidade⁴⁹.

Dentro de um biofilme, os micro-organismos de fato ocupam menos de 10% do seu peso seco, os outros 90% são ocupados pela MEC¹⁷. Essa MEC é criada pelos próprios micro-organismos, é dinâmica e sofre alterações de acordo com o meio ambiente, temperatura e pH a qual estão expostas⁷⁸. A existência da MEC extracelular é uma característica crucial no estilo de vida do biofilme de *C. albicans*, a qual desempenha papel fundamental no modo de crescimento e proteção deste biofilme e, por esse motivo, as pesquisas mais recentes têm focado na composição, estrutura e funções biológicas da MEC⁶⁰.

3.3 Matriz do Biofilme e sua Composição

A MEC é um componente intrínseco do biofilme, e indispensável para sua formação⁷. A MEC fornece às células um estilo de vida completamente distinto da sua forma planctônica, pois proporciona uma arquitetura tridimensional ao biofilme, uma espécie de gel bastante hidratado que favorece a adesão superficial, coesão celular e vias de sinalização⁷. A MEC proporciona microambientes diferentes com relação a porosidade, rigidez, nível de oxigênio, pH, disponibilidade de metabólitos e nutrientes, que resultam num ambiente altamente dinâmico, com interações constantes através de sinais químicos e físicos¹⁵. A percepção desses sinais físicos e químicos do ambiente extracelular geram respostas celulares indispensáveis, como competição interespecífica, sinergismo, mutualismo e remodelação, para regular as funções celulares¹⁵.

A patogenicidade do biofilme está vinculada às propriedades físicas, químicas e biomecânicas da MEC⁷⁹. Análises biofísicas e mecânicas do biofilme e das substâncias poliméricas extracelulares (SPE) explicam que biofilmes de difícil remoção mecânica apresentam alta viscoelasticidade, suportando melhor as tensões de cisalhamento executada pelos fluidos externos. Além disso, a medida que mais

SPE são depositadas na superfície, esses desencadeiam um aumento da coesão e resistência adesiva à superfície⁸⁰. É importante a elucidação desses processos biomecânicos da MEC, para o desenvolvimento de novos métodos que fragilizem os biofilmes patogênicos¹⁵.

Com relação a infecção, a MEC se comporta como um verdadeiro escudo contra as respostas imunológicas do hospedeiro e gera um alto nível de resistência contra os antifúngicos; dessa forma, a MEC gera consequência clínicas bem negativas⁶⁰. A MEC é responsável por imobilizar as células do biofilme através das forças adesivas e coesivas, propiciando co-agregação de micro-organismos e consequentemente formação de microcolônias¹⁷. As microcolônias são separadas da MEC por canais de água, que facilitam a circulação de nutrientes dentro do biofilme¹⁷, da mesma forma que possibilita o acesso de um agente antimicrobiano ao biofilme. Entretanto, alguns componentes da MEC podem retardar a ação dos antimicrobianos devido a adsorção ou neutralização do fármaco⁷. Esse processo varia de acordo com a natureza química do medicamento, a espessura e a composição da MEC⁷. Assim, a composição da MEC do biofilme está fortemente associada com a característica do biofilme de resistir a determinadas concentrações de agentes antimicrobianos⁷.

A associação entre susceptibilidade antimicrobiana e MEC foi citada primeiramente por Al-Fattani et al.⁷ em 2006, quando os biofilmes de *C. albicans* cultivados em condições dinâmicas apresentaram menor tolerância à anfotericina B cinco vezes superior à concentração do CIM (forma planctônica). Foram analisadas ainda a composição química e a resistência dos biofilmes de *Candida tropicalis* e *Staphylococcus epidermidis*, concluindo que a composição da MEC tem papel fundamental na resistência aos fármacos⁷. Em uma pesquisa laboratorial, utilizando fluconazol radiomarcado sobre biofilmes intactos e sobre biofilmes com MEC parcialmente removidas (através de sonicação em banho suave), foi observado que a concentração de fluconazol radiomarcado foi 30% maior no espaço intracelular de biofilmes com MEC parcialmente removida¹⁶. Esse fato sugere que a presença da MEC dificulte a penetração do fármaco no interior das células do biofilme¹⁶.

A MEC de um biofilme de *C. albicans* é composta por todas as principais classes de macromoléculas e envolve o biofilme, proporcionando proteção contra o ambiente externo⁶⁰. Um estudo in vitro analisando os principais componentes da MEC do biofilme de *C. albicans* cita como componentes: carboidratos, proteínas,

hexosamina, fósforo, ácido urônico e DNA extracelular (eDNA)⁷. A heterogeneidade da composição da MEC do biofilme de *C. albicans* gera muita dúvida sobre o peso que cada componente desempenha no biofilme¹⁶. Independentemente do tipo de biofilme, é atribuída à MEC atuação na adesão dos micro-organismos às superfícies, proteção ao ambiente externo, integridade estrutural e ativação enzimática de recursos nutricionais¹⁷. É muito importante o conhecimento aprofundado dos componentes da MEC, para que a partir daí se desenvolvam novas terapias eficientes para o controle de infecções por biofilme de *C. albicans*⁶⁰.

Para a análise química da composição da MEC do biofilme de *C. albicans*, formado a partir da cepa NCYC 1467 em meio YNB, Al-Fattani et al.⁷ 2006 utilizaram enzimas hidrolíticas para desprendê-lo. A composição da MEC do biofilme foi de: 39,6% de carboidratos, sendo 32,2% de glicose; 5% de proteína; 3,3% de hexosamina; 0,5% de fósforo e 0,1% de ácido urônico⁷. Sob ação enzimática com proteinase K, quitinase, DNase I e β -N-acetilglucosaminidase, houve redução significativa da densidade óptica em um comprimento de onda de 570 nm, indicando que essas enzimas degradam parcialmente a MEC do biofilme. Houve uma redução ainda maior da densidade óptica com a liticase, que degrada o β -1,3-glucano. Além do β -1,3-glucano ser um importante constituinte da parede celular, esse último fato sugere que o β -1,3-glucano também seja um importante polissacarídeo da MEC⁷.

Entretanto, a técnica de sonicação para segregação da MEC sobre a parede celular do biofilme utilizada por Al-Fattani et al.⁷ 2006 recebeu algumas críticas em virtude da perda em miligramas de materiais da MEC⁶⁰. Na metodologia realizada por Zarnowski et al.⁸¹ 2016, as amostras de biofilme de *C. albicans*, formadas a partir de isolado clínico e cultivado em meio RPMI, foram formadas dinamicamente em um sistema de garrafas rolantes, passando pela fase de aderência e maturação sob esses movimentos contínuos⁸¹. Posteriormente, a MEC formada foi separada da biomassa por sonicação, em potência que não comprometesse a parede celular, e por centrifugação⁸¹. Em seguida o sobrenadante, contendo a MEC fracionada, foi submetido a uma filtração sequencial, diálise e liofilização, gerando assim uma matriz pura e sem componentes da parede celular⁸¹. Essa metodologia garante que a parede celular não sofra dano nem vazamento de células. As amostras ainda foram analisadas sob microscopia eletrônica de transmissão para confirmar se houve apenas a remoção da MEC⁸¹.

Contraditoriamente à Al-Fattani et al.⁷ 2006, Zarnowski et al.¹⁶ 2014 realizaram um estudo extensivo sobre a MEC de *C. albicans* in vitro e in vivo (modelo animal), no tocante a sua composição bem como o papel dos componentes da MEC na resistência aos medicamentos. Como já foi explicado, houve o cuidado de não gerar dano às células da parede celular durante a segregação, já que o vazamento de conteúdo das células pela parede pode se misturar ao sobrenadante e confundir no momento da detecção dos componentes da MEC¹⁶. A análise de carboidratos foi realizada por cromatografia gasosa, ressonância magnética nuclear, espalhamento de raios-X em ângulo reduzido e análise em microscopia confocal e eletrônica sob marcação com anticorpos. Lipídeos, ácidos graxos e esteróis foram analisados por cromatografia gasosa, sendo as prostaglandinas avaliadas por cromatografia líquida de alta performance e espectroscopia de massas. Uma análise proteômica foi realizada para identificação de proteínas da MEC, e o eDNA foi analisado espectrofotometricamente e por sequenciamento genético. O estudo revelou que a MEC de biofilme in vitro é composta em peso seco por: 25% de carboidratos, 55% de proteína, 15% de lipídios e 5% de eDNA¹⁶. No estudo realizado por Al-Fattani et al.⁷ 2006, as proteínas da MEC correspondiam a apenas 5%⁷.

Com relação aos polissacarídeos, a metodologia de Zarnowski et al.¹⁶ 2014, as amostras foram expostas à Ressonância Magnética Nuclear (RMN), e constataram a presença de três grupos de polissacarídeos na matriz: as mananas foram o componente mais abundante, correspondendo a aproximadamente 87% (principalmente o α -1,2-ramificado e α -1,6-mananas); o β -1,6-glucano, presente em uma porcentagem média de 13%; e por fim, o β -1,3-glucano, distribuído em níveis extremamente baixos. Apesar do β -1,3 glucano ser o maior polissacarídeo da parede celular, este apresentou uma pequena concentração na MEC¹⁶. Este fato vai de encontro com que havia sido publicado até então por Al Fattani et al.⁷ 2006, segundo o qual o β -1,3-glucano é apontado como um importante componente da MEC. Para Zarnowski et al.¹⁶ 2014, o β -1,3-glucano não estabelece um papel relevante na resistência aos agentes antimicrobianos do biofilme. Outra diferença entre esses estudos^{7,16} foi com relação à quitina, polissacarídeo presente na parede celular; ao contrário de Al-Fattani et al.⁷ 2006, Zarnowski et al.¹⁶ 2014 não detectaram esse componente na MEC¹⁶.

Como citado anteriormente por Zarnowski et al.¹⁶ 2014 há uma ínfima presença dos β -1,3-glucano na MEC¹⁶. Entretanto, foi evidenciado um número significativo de β -1,6-glucano e α -mananas, que juntos dão origem a um Complexo Manana-Glucano (CMG)¹⁶. Cada componente do CMG da MEC apresenta uma característica e uma função bem distintas da estabelecida na parede celular¹⁶. A manana, encontrada na MEC, é uma estrutura muito maior do que a manana da parede celular¹⁶. Da mesma forma, o β -1,6-glucano da MEC apresenta-se como uma cadeia linear, enquanto que na parede celular é altamente ramificado¹⁶. Vale salientar ainda que nenhum componente do CMG foi encontrado em culturas planctônicas, o que prova que esses componentes apresentam contribuição específica para biofilme, mais especificamente para a MEC⁸².

O CMG foi apontado como crucial para a resistência do biofilme de *C. albicans* a tratamentos antimicrobianos através de uma combinação de abordagens genéticas e bioquímicas⁸². Assim, qualquer substância que venha a interferir na formação do CMG será um tratamento promissor⁸². Mitchel et al.⁸² 2015 desenvolveram sua pesquisa utilizando uma abordagem genética, bioquímica e farmacológica buscando a interferência que os polissacarídeos (β -1,6-glucano, β -1,3-glucano e α -mananos) exercem sobre a MEC do biofilme de *C. albicans*. Cada um dos três principais componentes da MEC é necessário para a formação e funcionamento da MEC⁸². Manipulações genéticas sugerem que os três polissacarídeos apresentam comportamento mútuo e coordenado no acúmulo de SPE da matriz, pois a intervenção na síntese ou exportação de algum desses polissacarídeos altera a concentração dos outros⁸². A formação da MEC pode ocorrer de forma extracelular, como reflexo de ações comunitárias de células do biofilme⁸².

Não foram encontradas ligações diretas, através da ressonância magnética nuclear (RMN), que demonstrem que o β -1,6-glucano seja ligado covalentemente às mananas, mas por microscopia confocal é possível observar que as duas substâncias apresentam íntima relação¹⁶. Na MEC de *C. albicans*, o β -1,3-glucano e o eDNA são citados como contribuintes para os mecanismos de resistência antifúngica, em que o β -1,3-glucano dificulta a penetração de tais fármacos^{83,84}. β -1,3 glucano atua como uma espécie de esponja para fármacos, impedindo a difusão do antifúngico pela MEC⁸³. O trabalho desenvolvido por Zarnowski et al.¹⁶ 2014, evidencia a importância de se estudar a interação da MEC com os diferentes

fármacos¹⁶. Sugere-se ainda que outros componentes da matriz atuem nesta ligação matriz-biofilme, e esse têm sido o foco dos próximos estudos¹⁶.

Um estudo avaliou os componentes da matriz do biofilme de cepas susceptíveis e resistentes ao fluconazol (CaS-ATCC 9002; CaR-ATCC 96901; *C.glabrata* susceptível- ATCC 2001; *C.glabrata* resistente- ATCC 200918), formados sobre placas de 24 poços com meio RPMI⁸⁵. Foi observado que o fluconazol reduziu a biomassa total e os polissacarídeos solúveis em água (WSP) em todas as linhagens avaliadas⁸⁵. Esse achado sugere a ação desse antifúngico ocorre principalmente sobre os polissacarídeos solúveis em água⁸⁵.

As proteínas juntas ocupam uma proporção em peso seco bastante superior aos polissacarídeos na MEC do biofilme de *C. albicans*, entretanto o papel da maior parte delas permanece desconhecido¹⁶. Flemmin et al.¹⁷ 2010 realizaram uma extensa revisão sobre os componentes da MEC de biofilmes, tanto envolvendo biofilmes bacterianos como fúngicos. Eles afirmam que as proteínas constituintes da MEC encontram-se sob as formas de: proteínas enzimáticas e proteínas não enzimáticas¹⁷. Enzimas são proteínas que através da liberação de substratos específicos desencadeiam reações metabólicas; proteínas não enzimáticas equivalem às estruturais, envolvidas na formação e estabilização da MEC¹⁷.

As proteínas em forma de enzimas atuam no metabolismo, degradam componentes da MEC, funcionando como um sistema digestivo externo¹⁷. Esse processo ainda não está muito claro, mas pode ter o objetivo de fornecer nutrientes ou mesmo de separar células para o processo de dispersão do biofilme¹⁶. Outras proteínas enzimáticas podem atuar como fatores de virulência dos biofilmes durante um processo infeccioso¹⁷. As proteínas não enzimáticas da MEC, também conhecidas como proteínas estruturais, fazem a ligação da superfície celular com os carboidratos extracelulares¹⁷. Essas proteínas estão relacionadas com a formação e estabilização da rede de matriz polimérica e ligação da superfície do fungo com os polissacarídeos extracelulares¹⁷. Entretanto, Zarnowski et al¹⁶. 2014 não identificaram nenhuma proteína da MEC associada à parede celular de *C. albicans* que justifique os processos de adesão e de crescimento do biofilme¹⁶.

O eDNA, também é apontado com contribuinte do mecanismo de resistência antifúngica^{83,84}. Entretanto, a real contribuição que o eDNA desempenha em biofilmes de *C. albicans* ainda é muito pouco elucidada⁸⁴. Martins et al.⁸⁴ 2010 desenvolveram um estudo utilizando a MEC de biofilme de *C. albicans* formados em

condições de fluxo a partir da cepa padrão SC5314, com o objetivo de examinar a presença e quantidade de eDNA, bem como as consequências da adição de DNase (enzima que degrada o DNA) e DNA exógeno⁸⁴. Sob as condições utilizadas nesse experimento⁸⁴, foi observado um maior teor de eDNA e proteína na MEC em biofilmes formados em RPMI ($3045,4 \pm 227$ ng eDNA/mg de proteína), um valor consideravelmente maior que no meio YNB ($13,0 \pm 8,8$ ng eDNA/mg de proteína)⁸⁴. A adição da DNase não exibiu efeitos importantes sobre as células aderidas de *C. albicans* nos primeiros tempos de formação do biofilme (0, 1 e 2 h); já em biofilmes pré-formados (24 h), a DNase em concentrações superiores a 0,03 mg/ml apresentou um efeito inibitório geral. A concentração de 0,13 mg/ml de DNase apresentou uma redução de 40% da biomassa. Já a adição de DNA exógeno em células aderidas de *C. albicans* não aumentou o crescimento do biofilme. Entretanto, em biofilmes maduros concentrações superiores a 160 ng/ml resultaram em um aumento da biomassa. A adição de 320 ng/ml de DNA exógeno aumentou a biomassa em 63%⁸⁴.

Utilizando-se da técnica de cromatografia gasosa, foi possível identificar 8 diferentes classes de lipídeos na MEC de *C. albicans*¹⁶. Dentre os lipídeos da MEC, os glicerolipídeos corresponderam a 99,5% (dos quais 89,2% são glicerolipídeos neutros e 10,4% glicerolipídeos polares) e os esfingolipídeos, a 0,5%¹⁶. Dentre os glicerolipídeos neutros, destacam-se os ácidos graxos livres e os triacilgliceróis; enquanto que nos glicerolipídeos polares, destacam-se as fosfatidiletanolaminas¹⁶.

3.4 Agentes Antifúngicos Convencionais

Convencionalmente a candidíase oral é tratada por medicamentos tópicos ou sistêmicos¹⁸. Os tópicos apresentam como limitação o próprio ambiente oral, onde a presença da saliva juntamente com a musculatura bucal resultam em uma ação de limpeza natural do organismo, reduzindo para níveis subclínicos a concentração do fármaco⁸⁶. Devido à limitação da cavidade oral, os medicamentos sistêmicos aparentam ser mais interessantes, mas eles promovem efeitos colaterais hepatotóxicos e/ou nefrotóxicos, o que exige muita cautela durante sua prescrição⁸⁶.

Os agentes antifúngicos convencionais são divididos em três categorias: polienos, azóis e equinocandinas^{18,87}.

Os polienos alteram a permeabilidade da parede celular, e por isso são fungicidas; dentro dessa classe encontram-se a anfotericina B e a nistatina^{18,19}. Os

azóis são inibidores da biossíntese de ergosterol, e como o ergosterol constitui o principal esterol presente na membrana plasmática fúngica, sua inibição interfere no metabolismo do fungo e, por isso, são fungistáticos⁸⁷. Porém, recentemente foi verificado que, em elevadas concentrações, o fluconazol apresenta ação fungicida⁸⁸. Os azóis são ainda divididos em duas subclasses: imidazólicos (clotrimazol, miconazol e cetoconazol) e triazólicos (fluconazol e itraconazol)^{18,19}. As equinocandinas são a classe mais recente de antifúngicos desenvolvidos e inibem a síntese de β -1,3-glucano da parede celular⁸⁹, componente específico do fungo, o que elimina a toxicidade do fármaco às células mamíferas. Dentro desta categoria existem a caspofungina, a micafungina e a anidulafungina. Azóis tem origem sintética e recebem sua classificação (imidazólicos e triazólicos) de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel azol⁹⁰. O cetoconazol é o único dos imidazólicos que pode ser usado sistematicamente, entretanto, quando comparado com os triazólicos, apresenta atividade inferior e reações adversas menos favoráveis, sem contar ainda com a melhor disponibilidade oral dos triazólicos. Diante disso, imidazólicos são considerados antifúngicos de segunda opção⁹¹.

Hoje em dia a equinocandina é uma das categorias de antifúngicas mais eficientes contra biofilmes de *Candida* spp. O fato desta categoria inibir a síntese de β -1,3-glucano da parede celular⁸⁹ levantou a hipótese de que este fármaco reduza também o β -1,3-glucano da MEC⁹², entretanto essa hipótese ainda não foi confirmada. β -1,3-glucano foi o primeiro polissacarídeo associado à resistência antimicrobiana^{7,93}, por evitar que o fármaco penetre na MEC e alcance seu alvo celular⁹². Entretanto, alguns problemas são relatados com o uso das equinocandinas, como efeito paradoxo (altas concentrações do medicamento causam crescimento fúngico), o qual ainda não é bem compreendido, e resistência fúngica⁹².

Resistência antifúngicos é caracterizada pela persistência ou até mesmo a progressão da infecção após o tratamento antimicrobiano, e pode ser classificada como primária ou secundária^{20,21}. A resistência primária, também conhecida como intrínseca, é quando o micro-organismo tem baixa suscetibilidade ao tratamento sem ter passado por uma exposição prévia ao medicamento. Já a resistência secundária é desenvolvida pelo micro-organismo após demasiada exposição aos antifúngicos²⁰.

Sob a forma de biofilme, a *C. albicans* apresenta tolerância aos agentes antifúngicos, que está associada a: superexpressão de bombas de efluxo de

medicamentos, o estado fisiológico das células e a proteção exercida pela MEC. O β -1,3 glucano se ligam aos antifúngicos e dificultam sua difusão pela MEC⁸³. Dessa forma, um estudo envolvendo a análise de cepas resistentes torna o trabalho e seus resultados mais robustos.

O uso contínuo de azóis tem selecionado cepas mais resistentes ao tratamento⁹⁴. Dentre os mecanismos envolvidos nessa resistência podemos citar superexpressão de alguns genes: MDR1, principal gene da bomba de efluxo; CDR, genes da bomba de efluxo do transportados ABC; e o ERG11, gene da enzima alvo do azol²¹. Também têm sido relatados mecanismos de resistência às equinocandinas, como mutações do gene FKS1 (responsável pela síntese de proteína alvo das equinocandinas), redução de sensibilidade a tais fármacos e mecanismos de recuperação da parede celular por superegulação da síntese de quitina⁹⁵.

Diante das limitações apresentadas pelos antifúngicos tradicionais, têm-se a necessidade do uso de um agente que venha a complementar as lacunas existentes, que possa controlar uma infecção de *C. albicans* sem provocar os efeitos colaterais encontrados nos antifúngicos convencionais.

3.5 N-acetilcisteína (NAC)

A N-acetilcisteína (NAC), um derivado do aminoácido L-cisteína²⁴, é um medicamento amplamente utilizado na prática médica como agente mucolítico, bastante utilizado para tratamento de fibrose cística com grande margem de segurança²⁵. Não é um composto antibiótico, entretanto apresenta propriedade antibiofilmes²⁶, pois estudos apontam para a diminuição da produção de polissacarídeos extracelulares, rompimento de biofilmes maduros e redução da adesão das bactérias a superfícies^{27,31}. A NAC é um potente antioxidante, atuando contra radicais livres oxidantes nas células do tecido pulmonar³⁷. Sua fração ativa (sítio tiol -sh) tem a função de eliminar os radicais livres e romper as ligações de dissulfeto intermolecular ou intramolecular nas proteínas, reduzindo a viscosidade das secreções^{32,33}.

Ainda são desconhecidos os mecanismos dessa atividade antimicrobiana e antibiofilme da NAC, necessitando de mais pesquisas para entender melhor o potencial dessa substância nas infecções relacionadas a biofilmes. Existem algumas sugestões para explicar o mecanismo da atividade antimicrobiana da NAC: 1.

inibição competitiva da utilização de cisteína; 2. reação do grupo sulfidrilo da NAC com proteínas bacterianas; e 3. desorganização do equilíbrio *redox* intracelular com potenciais efeitos indiretos no metabolismo celular e vias de transdução de sinal intracelular^{41,44}. Já a atividade da NAC na dispersão do biofilme pré-formado pode ser devido à perturbação da fisiologia microbiana, ou devido a um efeito direto da NAC na arquitetura da matriz do biofilme (por quelação de cálcio e magnésio ou interação com componentes cruciais na matriz)^{41,44}. Entretanto, analisando criteriosamente esses artigos^{41,44}, bem como os artigos citados pelos menos, nota-se que essas sugestões não foram embasadas em estudos científicos, o que torna essas hipóteses inconsistentes.

Em uma revisão de literatura a respeito das múltiplas aplicações clínicas da NAC, foram citadas as ações comprovadamente eficientes do medicamento²⁴: Tratamento de intoxicação por acetaminofeno (paracetamol); prevenção da exacerbação da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) em estudos controlados randomizados (ECR); prevenção de nefropatia induzida por contraste, por meio de ECR; redução e prevenção da infecção por influenza em idosos frágeis, com base em ECR; diminuição do dano da função pulmonar na fibrose pulmonar idiopática, com evidências de ECR²⁴.

Em uma revisão sistemática de ensaios randomizados realizada em 2000²⁵, a NAC foi eficaz na redução dos riscos de exacerbações e na melhora da sintomatologia de pacientes com bronquite crônica e não foi observado um aumento no risco dos efeitos adversos²⁵. Entretanto, o artigo deixa claro que são necessários mais estudos que justifiquem o uso rotineiro da NAC a longo prazo²⁵.

No que diz respeito aos efeitos colaterais, eles são citados como raros em doses de até 1.200 mg duas vezes ao dia, mas os efeitos são principalmente gastrointestinais²⁴. Deve-se ter cuidado com a interação da NAC em pacientes que usam nitroglicerina e medicamentos relacionados, devido a ação vasodilatadora da NAC²⁴. A dosagem varia de acordo com o objetivo, para profilaxia da exacerbação da DPOC, a dose é de 600 mg a 1.200 mg dividida em doses diárias; na prevenção de nefropatia induzida por contraste, 1.200 mg antes do procedimento e 1.200 mg após o procedimento duas vezes ao dia por 48 h; atenuação de influenza, 600 mg duas vezes ao dia pelo período da doença; diminuição do dano da função pulmonar na fibrose pulmonar idiopática, 1.800 mg em doses divididas²⁴.

Na dosagem de 1.200 mg duas vezes ao dia ou menos, a NAC é bem tolerada. Nessas dosagens, os efeitos colaterais são incomuns, mas existe a possibilidade do paciente apresentar: náusea, vômito, diarreia, erupção cutânea transitória, rubor, dor epigástrica e constipação³⁷. Em dosagens muito superiores, geralmente utilizada para tratar casos de superdosagem de acetaminofeno, a NAC não costuma ser bem tolerada, nesses casos é comum acontecer dor de cabeça, zumbido, urticária, erupções cutâneas, calafrios, febre e reações anafilactóides (pseudoanafilaxia)³⁷. Como dito anteriormente, deve-se ter cuidado ao administrar NAC em pacientes que fazem uso de nitroglicerina e outros medicamento relacionados, pois a NAC potencializa o efeito desses fármacos, podendo gerar quadros de hipotensão³⁷.

A NAC está disponível sob fórmula de cápsulas (500 a 1.000 mg), sendo a concentração de 600 mg a mais comumente encontrada. Sob a forma intravenosa, a NAC está disponível em 200 mg/mL²⁴. Na medicina, ela é administrada por vias inalatória, intravenosa¹ e, principalmente, oral e intramuscular³⁴.

A NAC também é uma precursora da Glutadiona, o tiol mais abundante de células eucarióticas⁹⁶. Ela está envolvida em processos biológicos, como metabolismo, atividade enzimática, síntese de proteínas e eDNA⁹⁶. Em um estudo experimental acerca da glutadiona, mostra que *C. albicans* possui a enzima (γ -glutamilcisteína sintetase – GCS1) que metaboliza a mesma. A ruptura dessa enzima (GCS1) resultou em apoptose de células. Este fato sugere a glutadiona como um metabólito essencial em Ca^{96} .

Evidências encontradas em estudos anteriores com a NAC³⁴ demonstram que, isoladamente ou associada a algum antibiótico, ela pode diminuir o risco da intensificação de bronquite crônica, doença pulmonar obstrutiva e rinosinusite, doenças associadas a presença de biofilme³⁴. Essas evidências positivas da NAC na área médica vêm motivando a elaboração de novos estudos, a fim de investigar seus efeitos sobre outras doenças mediadas por biofilme²⁷. A NAC tem se mostrado eficiente na redução da formação dos biofilmes em uma variedade de bactérias clinicamente importantes nos tratamentos endodônticos^{27,29}.

A NAC têm demonstrado capacidade em aumentar os efeitos dos antibióticos convencionais⁴⁰. A NAC ainda possui atividade anti-inflamatória, devido a sua capacidade de inibir a ativação e liberação de várias citocinas pró-inflamatórias,

como: a fator nuclear kappa B, fator de necrose tumoral α , metaproteinase-9 da MEC, interleucinas 6 e 8⁹⁷.

Em um estudo experimental analisando a formação de biofilmes de *Streptococcus pneumoniae* sobre placas de poliestireno, a NAC isoladamente não apresentou uma redução significativa sobre micro-organismos planctônicos e em biofilme⁴⁰. Porém, quando associada a amoxicilina, eritromicina e levofloxacina, a NAC reduziu o biofilme em \log_{10} de $1,78 \pm 0,86$, $2,27 \pm 0,28$ e $1,52 \pm 0,14$, respectivamente⁴⁰. Os mesmos antibióticos, isoladamente, apresentaram uma redução em \log_{10} inferior à associação com a NAC, $1,33 \pm 0,58$, $1,99 \pm 0,85$ e $1,42 \pm 0,56$ respectivamente⁴⁰.

Em um estudo experimental que avaliou a ação da NAC na formação de biofilme de 10 cepas bacterianas diferentes sobre superfícies de aço inoxidável, foi proposto que a ação da NAC na redução da adesão bacteriana à superfície é tanto química como biológica⁴⁴. A NAC aumentou a molhabilidade da superfície, o que gerou uma diminuição da adesão bacteriana inicial. Ainda neste estudo⁴⁴, a NAC teve seu efeito estudado na produção de polissacarídeos extracelulares dessas cepas, bem como para uma cultura multiespécie (7 cepas). Para esta análise foi utilizada uma versão modificada do método de hidrólise ácida de Dall e Herndon⁹⁸. Os polissacarídeos foram precipitados em etanol, e em seguida passaram por um processo de desidratação com ácido concentrado de furfural e triptofano, que juntos formam um produto de condensação de cor violeta acastanhada. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 500 nm. A NAC 0,5 mg/mL reduziu a produção de EPS na maioria das cepas avaliadas, mesmo em concentrações em que o crescimento não foi inibido⁴⁴, com uma redução média de $58\% \pm 20\%$ para as bactérias testadas.

Outra pesquisa também utilizou a versão modificada de hidrólise ácida de Dall e Herndon⁹⁸, porém as amostras foram medidas em 490 nm, para estudar o efeito da NAC por 24 h sobre polissacarídeos extracelulares de biofilmes de 18 isolados clínicos de *P. aeruginosa* pré-formados durante 48 h⁴¹. Como resultado desta pesquisa, houve uma redução significativa dos polissacarídeos extracelulares na presença da NAC, com redução média de 27,46% e 44,59% na presença de 0,5 mg/mL e 1 mg/mL de NAC, respectivamente.

Foram encontrados alguns trabalhos⁴⁵⁻⁴⁷ estudando o efeito da NAC sobre biofilmes de *C. albicans*. Em um deles⁴⁵, foram determinadas as CIMs de cetoconazol e NAC pela técnica da zona de inibição em ágar contra 10 isolados

clínicos de *C. albicans* de lesões orais e vaginais⁴⁵. Foi observado que valores de CIM variaram de 0,4 a 0,8 µg/mL para cetoconazol e de 16 a 20 mg/mL para NAC. Foi avaliada também a influência desses fármacos na formação de biofilme e em biofilme maduro das cepas avaliadas, mensurada pela técnica do violeta cristal utilizando concentrações de CIM e 2xCIM para cetoconazol e de 4 e 8 mg/mL para NAC (menor que CIM)⁴⁵. A porcentagem de redução na formação de biofilme do cetoconazol foi de 25% a 87,4%, da NAC foi de 32,8% a 87,8% e a associação de ambos fármacos foi de 57,2% a 100%⁴⁵. Em biofilmes maduros ou pré-formados, o cetoconazol reduziu a formação de biofilme em 22% a 80,70%; a NAC, em 50% a 95,2%; e a associação de ambas de 54,07% a 100%⁴⁵. Apesar desses resultados promissores, verifica-se uma grande variação entre os isolados clínicos, os quais não foram comparados com uma cepa padrão. Adicionalmente, a viabilidade do biofilme tratado com NAC não foi avaliada, uma vez que o cristal violeta é uma técnica de coloração de todo biofilme, incluindo células vivas, mortas e MEC⁴⁵.

Em outro estudo, biofilme de isolados clínicos de *C. albicans* foram cultivados por 24 h e expostos à NAC⁴⁶. O valor de CIM que reduziu 50% do metabolismo dos biofilmes foi 32 mg/mL após 48 h⁴⁶. Análise de microscopia confocal demonstrou redução significativa da biomassa e da espessura do biofilme monoespécie e polimicrobiano de *C. albicans* e *S. epidermidis* expostos à NAC 8 mg/mL por 24 h⁴⁶. NAC 16 mg/mL promoveu redução de colônias de *C. albicans* somente no biofilme monoespécie até 72 h de exposição, porém não no biofilme polimicrobiano⁴⁶. Além disso, também foi observado sinergismo de NAC e anfotericina B contra as cepas de *C. albicans*, porém não houve sinergismo entre a NAC e fluconazol contra uma das cepas fúngicas avaliadas⁴⁶. Porém, tanto a determinação de CIM como a do sinergismo da NAC com antifúngicos foram realizadas por meio de metabolismo celular (ensaio de XTT), o qual pode apresentar resultados distintos e superestimados quando comparados com a viabilidade microbiana por crescimento de colônias⁹⁹. A avaliação da viabilidade microbiana por unidades formadoras de colônias (UFC) é considerada fundamental na avaliação antimicrobiana/antibiofilme, e somente é considerado antimicrobiano o agente que promove redução de 3 log₁₀ nos valores de UFC¹⁰⁰.

Aslam e Darouiche⁴⁷ 2011 estudaram o efeito da NAC sobre alguns microorganismos, tanto na sua forma planctônica como biofilme, quanto a viabilidade, espessura do biofilme e a composição dos MEC⁴⁷. Além de *C. albicans*, foram

analisados ainda: *S. aureus* sensível e resistente à metilina (MSSA, MRSA), *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina (VRE), *P. aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e *C. krusei*⁴⁷. De maneira geral a CIM das bactérias foi de aproximadamente 5 mg/mL, e a concentração fungicida mínima (CFM) apresentou o mesmo valor ou uma diluição acima, exceto para *C. albicans* que apresentou valores de CIM e CFM de 40 mg/mL e 160 mg/mL, respectivamente⁴⁷. A NAC a 80 mg/mL foi bactericida, com uma redução superior a 99,9% para todas as espécies estudadas⁴⁷. Entretanto, nessa mesma concentração, ela foi apenas fungistática para *C. albicans* e *C. krusei*⁴⁷. A avaliação de biofilmes foi realizada somente para as espécies bacterianas em microscopia confocal, em que foi verificada a espessura da biofilme, a quantidade de células não viáveis, e a intensidade de fluorescência verde como marcador de polissacarídeos da MEC⁴⁷.

Alguns estudos avaliaram o efeito da NAC em micro-organismos da cavidade oral. Um biofilme multiespécies oral foi isolado de uma criança com alto risco a cárie e formado em discos de hidroxiapatita na presença da NAC por 24 h²⁸. Foi observado um efeito dose-dependente da NAC na biomassa total do biofilme, pois as concentrações 10 mg/mL e 100 mg/mL da NAC reduziram consideravelmente a biomassa aderente dos biofilmes²⁸. Houve redução também na MEC do biofilme quando expostos a essas concentrações²⁸. Os componentes celulares do biofilme e número de células aderentes totais (vivas ou mortas) tiveram um efeito dose-dependente²⁸. Entretanto, na análise de microscopia de fluorescência, a proporção de bactérias vivas comparadas às mortas não diminuiu acentuadamente quando expostas a 1 mg/mL, 10 mg/mL e 100 mg/mL de NAC²⁸. Análises microscópicas demonstraram que a NAC 10 mg/mL e 100 mg/mL promoveram dispersão dos componentes celulares e da MEC, além de reduzir a co-agregação²⁸. A análise da ecologia microbiana por sequenciamento genético revelou a presença dos seguintes gêneros no biofilme: *Abiotrophia*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Porphyromonas*, *Streptococcus*, e *Veillonella*²⁸. Por outro lado, a NAC na concentração de 10 mg/mL promoveu pouca alteração ecológica, com redução significativa somente para *Fusobacterium*²⁸.

Quando o periodontopatógeno *Prevotella intermedia* foi avaliado, a NAC demonstrou valor de CIM de 3 mg/mL¹⁰¹. A formação de biofilme foi reduzida na presença de NAC 1,5 mg/mL, e a maior redução da biomassa foi observada na presença de NAC 3 mg/mL¹⁰¹. Entretanto, não foi observado sinergismo da NAC

com os antibióticos ampicilina, ciprofloxacina, metronidazol e tetraciclina, tanto em relação aos valores de CIM como na redução do biofilme maduro¹⁰¹. Esses resultados demonstraram que a incubação do micro-organismo com a NAC por 24 h foi efetiva em inibir a formação do biofilme, mas não em erradicar o biofilme já formado¹⁰¹.

A ação da NAC em bactérias encontradas em infecções endodônticas (*Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus mutans* e *E. faecalis*) demonstrou valores de CIM entre 0,78 e 1,56 mg/mL²⁹. Também foi observada redução da biomassa total de biofilmes mono e multiespécies das bactérias avaliadas, cultivados na presença de NAC nas concentrações de 0,78 a 3,13 mg/mL. Imagens de microscopia eletrônica de varredura demonstraram que o biofilme multiespécies formado em disco de hidroxiapatita pré-condicionados com saliva por 3 semanas foram desestruturados após tratamento com NAC por 10 minutos (min) em concentrações entre 25 e 200 mg/mL (equivalentes a 16,03 até 256,41 vezes os valores de CIM)²⁹. Após 24 horas de tratamento, observou-se 99% de redução da viabilidade dos biofilmes maduros, quando comparado ao grupo controle²⁹. Também após 24 horas de tratamento, a desorganização do biofilme multiespécies e a redução de viabilidade causados pela NAC 50 mg/mL foram significativamente maiores do que o hidróxido de cálcio saturado ou solução de clorexidina a 2%²⁹.

A NAC apresentou valores de CIM e concentração bactericida mínima (CBM) de 1,56 e 12,5 mg/mL, respectivamente, contra *E. faecalis*, com ação mais efetiva em pH=11²⁷. Enquanto que o efeito antibacteriano de hidróxido de cálcio incubado com pó de dentina foi abolido, a incubação com pó de dentina não interferiu na ação antibacteriana da NAC²⁷. Além disso, biofilmes de 21 dias formados em amostras de dentina apresentaram menor viabilidade após incubação com NAC 50 mg/mL por 7 dias, cuja ação antibacteriana foi superior a do hidróxido de cálcio²⁷. A ação bactericida da NAC 12,5 mg/mL e 25 mg/mL foi mantida mesmo após 14 dias e 21 dias, respectivamente, de pré-incubação com pó de dentina²⁷.

Outros estudos verificaram ação antibacteriana da NAC em micro-organismos responsáveis por infecções médicas. A NAC foi avaliada quanto a sua eficácia como um agente auxiliar na redução de UFC de bactérias na ponta de um duodenoscópio, pois essa área têm sido relatada como um reservatório de contaminação bacteriana persistente¹⁰². A submersão da ponta do duodenoscópio em NAC 20% (200 mg/mL)

por 30 min reduziu significativamente as UFC bacterianas (redução média de 41,6%), quando comparadas ao grupo controle tratados com água estéril (redução média de 8,8%)¹⁰². Entretanto os autores não relataram se a redução obtida com a NAC foi clinicamente significativa para a saúde dos pacientes¹⁰². A combinação da NAC e ciprofloxacina apresentou o maior efeito tanto na erradicação do biofilme de *P. aeruginosa*, como na redução da aderência bacteriana à superfície de cimento ósseo comparada aos efeitos da NAC e ciprofloxacina isolados³⁰.

Foram determinadas as CIM da NAC contra *E. faecalis*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Mycobacterium smegmatis*, *Propionibacterium acnes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* e 14 cepas clínicas de estafilococos coagulase-negativos (SCN)³¹. Os valores de CIM obtidos foram de: 0,098 mg/mL para *M. smegmatis*; 6,25 mg/mL para *P. acnes* e 25 mg/mL para as demais cepas³¹. Foi constatado que a aderência de *E. faecalis*, *S. epidermidis* e nove cepas SCN foram significativamente reduzida em concentrações inferiores à CIM da NAC³¹. Entretanto, a formação de biofilme de *E. faecalis*, *S. aureus* e duas cepas SCN aumentou em concentrações sub-CIM de NAC³¹. O efeito da NAC no crescimento planctônico e na formação de biofilmes de *M. smegmatis* foi tempo-dependente. A NAC 12,5 mg/mL reduziu significativamente a formação de biofilme e crescimento de cultura mista de *P. acnes* e *S. epidermidis*. A NAC também reduziu a biomassa de biofilme maduro de *M. smegmatis* em duas vezes em relação ao controle (sem NAC) e de biofilme misto de *P. acnes* com *S. epidermidis* (redução de 61%)³¹.

Com intuito de melhorar as propriedades físico-químicas, toxicológicas e biológicas do cloranfenicol, a NAC foi analisada juntamente com a β -ciclodextrina para a obtenção de um complexo de inclusão desse antibiótico¹⁰³. A atividade antimicrobiana desse complexo contra *E. coli* e *S. aureus* foi semelhante ao cloranfenicol isolado. Com a complexação multicomponente foi observada redução da atividade metabólica e da biomassa de biofilmes de cepas resistentes e susceptível de *S. aureus*¹⁰³.

A NAC a 10 mg/mL por 10 min potencializou a inativação fotodinâmica de biofilme de *S. aureus* mediada pela hipericina e luz LED, com reduções de 5,2 a 6,3 log₁₀¹⁰⁴. Foi também demonstrado que a aplicação de plasma não térmico em solução de NAC inativou 7 log₁₀ de culturas planctônicas de *E. coli* via produção de peroxinitrito (espécie reativa de nitrogênio), além de promover acidificação do meio,

o qual, apesar de essencial para inativação bacteriana, não promoveu por si só efeito bactericida¹⁰⁵.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Material

4.1.1 Material de consumo

- Ácido morfolinepropanesulfônico (MOPS- Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA).
- Água destilada.
- Água MilliQ.
- Alça de Drigalsky (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil).
- Alça de inoculação 10 µL, estéril (Plastbio, Curitiba, PR, Brasil).
- Cepas de *C. albicans* [SC5314 (CaS) e ATCC 96901 (CaR) Rockville, MD, EUA].
- Cloreto de Potássio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Cloreto de Sódio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Cristal violeta (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Metanol (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Ácido acético (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Cubeta de 2 mL (Cartel, SP, Brasil).
- Dispensador de repetição (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha)
- Fluconazol F8929 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- Fosfato de Potássio dihidratado (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Fosfato de sódio monohidratado (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Glicose (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Lâmina de vidro (Precision Glass Line).
- Lamínula de vidro (Precision Glass Line).
- Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar com 0,1 g/L de cloranfenicol (SDA, Acumedia Manufacturers Inc., Baltimore, MD).

- Meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB - Difco, Detroit, MI, EUA).
- Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- N-Acetyl-L-Cysteina (NAC- Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- Bovine serum albumin (BSA- Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- Solução de Bradford (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- Tampão TE pH 8,0 (Tris-EDTA- Thermo fisher, Waltham, MA, EUA).
- Acetato de sódio 3M pH 5,5 (Thermo fisher, Waltham, MA, EUA).
- Clorofórmio;fenol;alcool isoamílico (Thermo fisher, Waltham, MA, EUA).
- Microtubos tipo Eppendorfs Graduado de 2 mL (Axygen, Curitiba, PR, Brasil).
- Parafilm (Laboratory film 38m X 10cm) (BOECO).
- Placas de 96 poços de fundo “U” e estéril (TPP Techno Plastic Products).
- Placas de 96 poços de fundo “Chato” e estéril (Kasvi, China).
- Placas de Petri 90 X 15 mm descartáveis e estéreis (J Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil).
- Ponteiras amarelas para micropipeta 20-200 μ L (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA).
- Ponteiras azuis para micropipeta 100-1000 μ L (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA).
- Ponteiras para micropipeta 10 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA).
- Pote coletor 50 mL (Alibaba, Shanghai, China).
- Sistema de filtração de 500 mL (Kasvi, China) k15-1500.
- Tubos tipo Falcon de 15 mL, estéril (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça).
- Tubos tipo Falcon de 50 mL, estéril (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça).

4.1.2 Instrumentais

- Béquer graduado (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil).
- Bico de Bunsen (J.Prolab, São José do Pinhal, Paraná, Brasil).
- Micropipetas de 0,5 – 10 μ L, 100-1000 μ L e de 20-200 μ L (BOECO, Hamburgo, Alemanha).
- Pipetas de 1-10 mL e 1-5 mL (PZ HTL AS, Warsaw, Polônia).

- Provetas graduadas (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil).

4.1.3 Equipamentos

- Agitador de tubos Modelo: AP 56 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, SP, Brasil).
- Autoclave vertical Modelo: AV 60. N°6614 (Phoenix Ind. e Com. De Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil).
- Balança de precisão Modelo: BG 400. N°016450 (GEHAKA – Ind. e Com. Eletroeletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, SP, Brasil).
- Câmara de fluxo (BIOSAFE B2, Brasil).
- Centrífuga, Modelo: 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha).
- Contador de colônias CP 600 PLUS, Modelo: CP-600. Nr-série: 919 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil)
- Espectrofotômetro – Biospectro Modelo: SP-220 (Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil).
- Estufa bacteriológica Modelo – MA 0324. Série – 9819011 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil).
- Estufa para secagem e esterelização Modelo: MA 033. Série: 9819 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil).
- Freezer -80°C (Thermo Scientific, EUA).
- Incubadora de bancada shaker Modelo: Q816M20 (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil)
- Leitora de Microplacas (FLUOstar Omega S-N 4152596, BMG Labtech, Alemanha)
- Concentrador de amostras (RVC 2-18C D, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode, Alemanha)

4.2 Métodos

4.2.1 Micro-organismos e condições de cultivo

Uma cepa padrão de *C. albicans* susceptível (SC5314, CaS) e uma resistente ao fluconazol (ATCC 96901, CaR) foram descongeladas e reativadas individualmente em meio de cultura SDA a 37°C por 48 h. Em seguida, cinco colônias foram transferidas para o meio Yeast Nitrogen Broth com 100 mM de

glicose (YNB_g) e incubadas a 37 °C por *overnight* (em média 18 h). Após incubação, a suspensão fúngica foi diluída nas razões de 1:10 e 1:20 no mesmo meio de cultura fresco, o qual foi incubado a 37 °C até que a densidade óptica em 540 nm (DO₅₄₀) atingisse a metade da fase de crescimento exponencial (*mid-log*) do micro-organismo de acordo com sua curva de crescimento (CaS: 0,424 ± 0,042 e CaR: 0,460 ± 0,030). Essa concentração da suspensão foi equivalente em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) a 6,64 x10⁶ ± 2,72 x 10⁶ UFC/mL para CaS e 6,32 x10⁶ ± 1,49 x 10⁶ UFC/mL para CaR. Em seguida, a suspensão fúngica foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min a 25 °C, o sobrenadante foi descartado e resuspendido em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640. O RPMI utilizado nos experimentos continha glutamina e fenol vermelho, não possuía bicarbonato, foi tamponado com ácido morfolinepropanesulfônico (MOPS) e suplementado com D-glicose 2%, pH 7,0⁶⁴. A DO da suspensão fúngica em RPMI foi também determinada (CaS: 0,585 ± 0,167 e CaR: 0,498 ± 0,005).

4.2.2 Avaliação antifúngica da NAC

A NAC foi preparada de acordo com a instrução do fabricante com pequena modificação. Após mensuração da sua massa em balança de precisão, a diluição foi realizada em meio de cultura RPMI 1640 ao invés de água, como recomendado. Foi obtida uma solução estoque de 100 mg/mL (concentração máxima recomendada pelo fabricante).

A susceptibilidade das suspensões *C. albicans* à NAC foi avaliada por meio do teste de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standard Institute*²². Uma alíquota de 100 µL de cada suspensão fúngica foi individualmente incubada com o mesmo volume de diluições seriadas de NAC em RPMI 1640 por 24 e 48 h a 37° C (concentração final do inóculo de 0,5-2,5 x 10³ UFC/mL) em placas de 96 poços com fundo em "U"²². Para CaS foram utilizadas as concentrações de NAC de 0,195 a 50 mg/mL, já em CaR foram utilizadas apenas concentrações que apresentaram efeito nos experimentos previamente realizados com CaS, 12,5 a 50 mg/mL. Amostras controles consistiram de cada inóculo fúngico com meio de cultura estéril e somente de meio de cultura estéril sem inóculo. A turvação do meio foi lida em espectrofotômetro a 540 nm (FluosStar Omega®). A menor concentração de NAC que promoveu a inibição do

crescimento fúngico (ausência de turvação) foi considerada a CIM. As amostras foram então diluídas em tampão de fosfato e salina (PBS, NaCl 0,136 M; KH₂PO₄ 1 mM; KCl 2 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; pH 7,4) e plaqueadas em duplicatas em placas de SDA, que foram incubadas por 48 h a 37° C para crescimento de colônias. A menor concentração de NAC que inibiu o crescimento de colônias foi a CFM. Após a contagem, foi obtida a média entre as duplicatas de cada amostra e o número de UFC/mL foi calculado utilizando a fórmula a seguir:

UFC/mL = (número de colônias X 10ⁿ) / q, onde “n” equivale ao valor absoluto da diluição (1, 2, 3 ou 4), e “q” equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição quando nas semeaduras das placas (0,025 mL).

4.2.3 Curvas de inativação

Determinadas as CIM e CFM, em seguida foi estabelecida curva de inativação da NAC em culturas planctônicas de ambas as cepas de *C. albicans*. O mesmo procedimento descrito acima foi realizado utilizando-se as concentrações da NAC avaliadas no teste de CIM e CFM incubadas com cada suspensão fúngica; porém, a DO₅₄₀ foi registrada de 2 em 2 horas até 24 h em um aparelho automático incubador e leitor de absorvância (FLUOstar Omega).

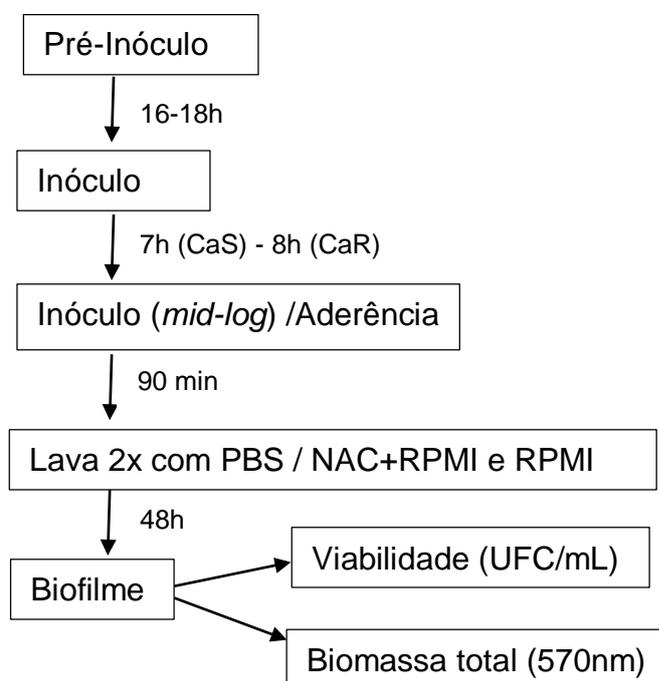
4.2.4 Efeito da NAC na formação de biofilme

O protocolo para formação de biofilme de *C. albicans* (Figura 1) foi baseado no reportado por Chandra et al.¹⁰⁶ 2008 com modificações. Ao final da execução de todos os experimentos de formação do biofilme, obtiveram-se as seguintes concentrações do inóculo para as cepas de *C. albicans*: 6,40 x10⁶ ± 6,28 x 10⁵ UFC/mL para CaS e 6,39 x10⁶ ± 7,80 x 10⁵ UFC/mL para CaR. Assim, alíquotas de 200 µL de cada suspensão fúngica foram individualmente pipetadas em orifícios de placas de 96 poços de fundo chato e incubadas por 90 min a 37 °C (fase de aderência). Em seguida, o meio de cultura foi aspirado e cada poço foi lavado 2 vezes com PBS para remoção de células não aderidas. Então, 200 µL de diferentes concentrações de NAC diluída em RPMI 1640 (100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL e 12,5 mg/mL) foram adicionados e incubados a 37 °C por 48 h para formação do biofilme. A amostra controle negativo recebeu somente meio de cultura sem NAC.

Após incubação, o biofilme formado foi quantificado por viabilidade fúngica (UFC/mL) e biomassa total. Para avaliação da viabilidade, o biofilme foi lavado 2

vezes com 200 μL de PBS e desprendido do fundo e das paredes do orifício por raspagem utilizando a ponta da pipeta por 30 seg em cada poço. Em seguida, diluições seriadas decimais de cada amostra do biofilme desprendido foram plaqueadas em SDA, que foram incubadas por 48 h a 37 °C para crescimento de colônias (UFC/mL). Para avaliação da biomassa total do biofilme (biomassa celular e da MEC), após a incubação, as amostras foram lavadas duas vezes com 200 μL de solução de PBS. Uma alíquota de 200 μL de metanol 80% foi adicionada em cada poço e mantida durante 15 min. Em seguida, o metanol foi removido e o corante cristal violeta 1% foi adicionado e mantido por 5 min. Posteriormente, as amostras foram lavadas com PBS, e em seguida, foi adicionado 200 μL de ácido acético 33% para remoção do corante. Uma alíquota de 200 μL desse produto resultante foi transferida para o poço de uma placa de leitura de 96 poços, e sua absorbância foi mensurada utilizando-se o espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm (FLUOstar Omega)¹⁰⁷.

Figura 1 - Fluxograma para análise do efeito da NAC sobre biofilmes em formação



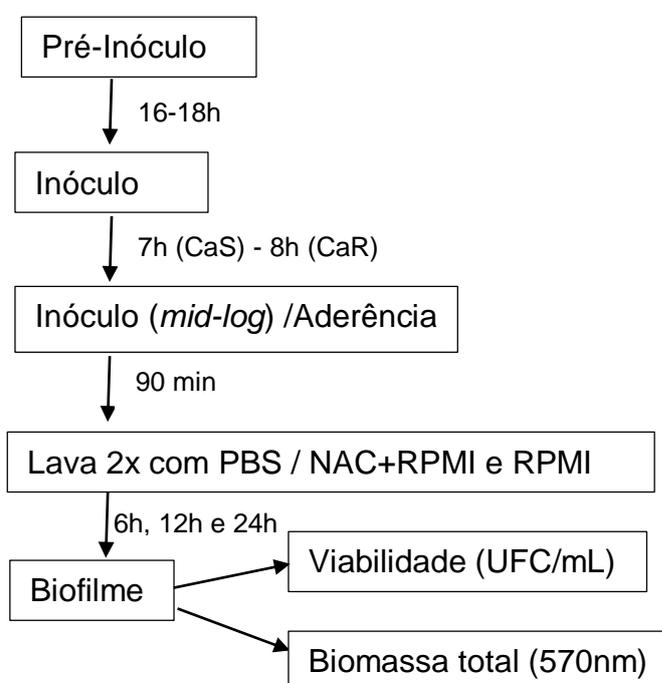
Fonte: Elaboração própria.

4.2.5 Avaliação do tempo de ação no biofilme

Determinadas as concentrações que reduzem a viabilidade/biomassa dos biofilmes, em seguida foi avaliado o menor tempo necessário para promover tal

redução sobre biofilmes em formação. Assim, as concentrações de NAC 100 mg/mL e 50 mg/mL foram adicionadas em meio RPMI nos poços previamente aderidos com células de CaS e CaR (CaS $6,69 \times 10^6 \pm 2,06 \times 10^6$ UFC/mL e CaR $5,87 \times 10^6 \pm 8,80 \times 10^5$ UFC/mL) e incubadas a 37 °C por períodos de 6h, 12h e 24h. Para o período de 6h, por se tratar da fase inicial da formação do biofilme, a NAC CIM (25 mg/mL) foi incluída na análise, uma vez que esta concentração foi fungistática para células planctônicas. Em seguida, a viabilidade (UFC/mL) e biomassa total (cristal violeta) foram mensurados conforme descrito acima (Figura 2).

Figura 2 - Fluxograma para análise do efeito da NAC sobre biofilmes em formação em tempos de 6h, 12h e 24h



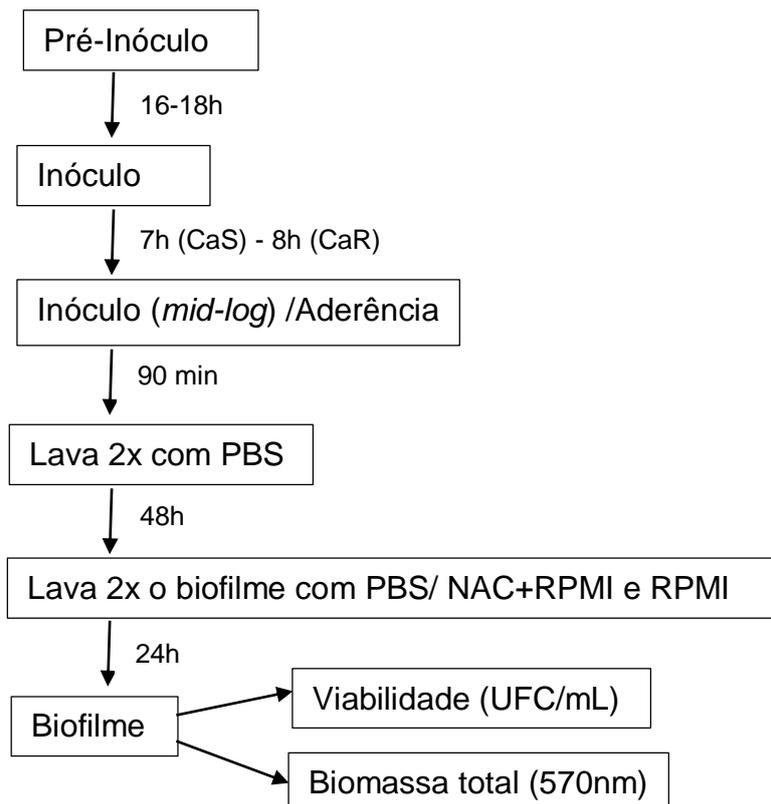
Fonte: Elaboração própria.

4.2.6 Efeito da NAC em biofilme maduro

Alíquotas de cada suspensão de *C. albicans* (CaS $6,39 \times 10^6 \pm 7,80 \times 10^5$ UFC/mL e CaR $7,74 \times 10^6 \pm 1,84 \times 10^6$ UFC/mL) foram individualmente transferidas para orifícios de placa de cultura de 96 poços de fundo chato para aderência celular, conforme descrito acima¹⁰⁶. Após lavagem com PBS, 200 µL de RPMI 1640 foi adicionado e incubado por 48 h para formação do biofilme maduro¹⁰⁶. Em seguida o meio de cultura foi removido e o biofilme foi lavado 2 vezes com PBS. As amostras receberam 200 µL de NAC nas concentrações de: 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL

e 12,5 mg/mL. As amostras foram incubadas a 37° C por 24 h. Amostras controle negativo receberam somente meio de cultura. Após incubação, o biofilme foi lavado 2 vezes com PBS e avaliado por viabilidade fúngica (UFC/mL) e biomassa total, conforme descrito acima (Figura 3).

Figura 3 - Fluxograma para análise do efeito da NAC sobre biofilmes maduros



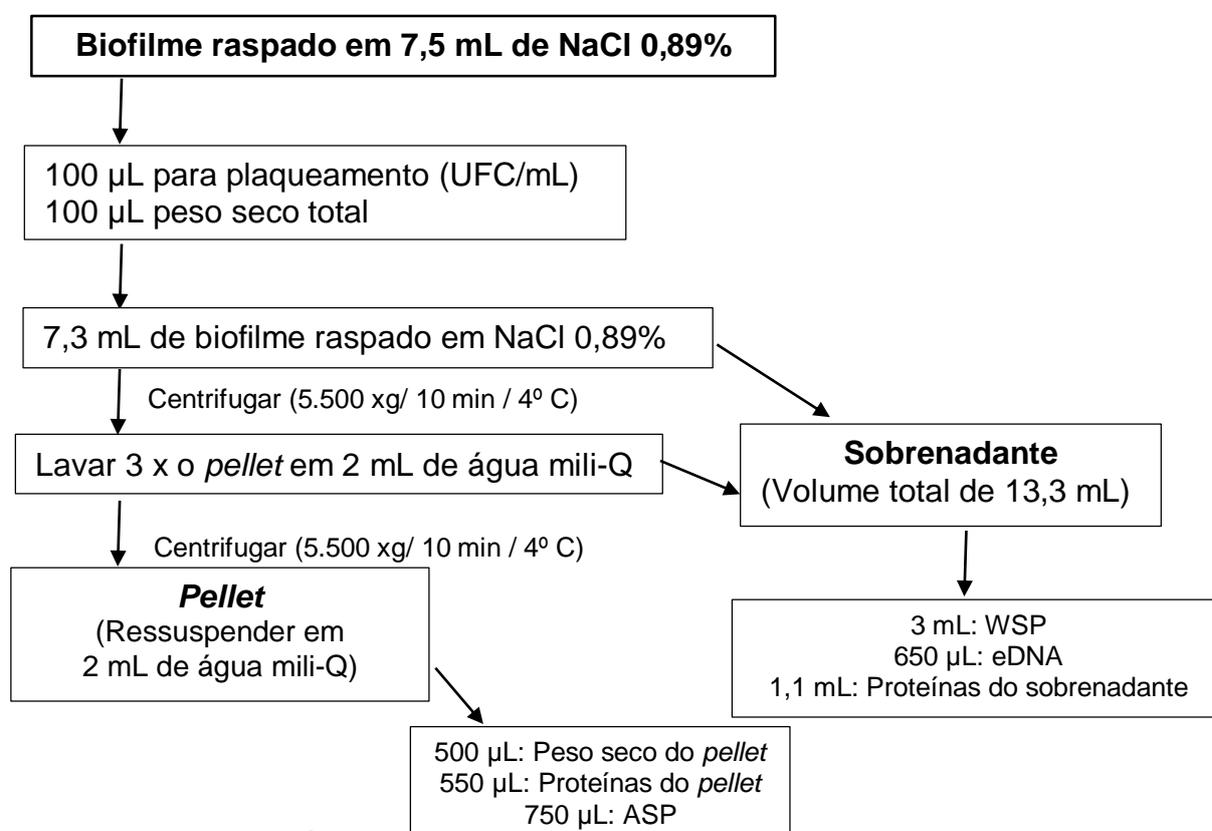
Fonte: Elaboração própria.

4.2.7 Efeito da NAC na composição da matriz do biofilme

Os biofilmes tratados ou não com NAC nas concentrações 100mg/mL (para biofilme maduros), 50 mg/mL e 25 mg/mL (biofilme em formação de 48h) tiveram sua composição da MEC analisada por meio de polissacarídeos solúveis em água (*water soluble polysaccharide*, WSP), polissacarídeos solúveis em álcali (*alkali soluble polysaccharide*, ASP), proteínas totais, DNA extracelular (eDNA) e lipídios, conforme descrito em estudos anteriores¹⁰⁸⁻¹¹¹. Para isso, o biofilme foi formado por 48 h conforme descrito anteriormente, porém em placas de fundo chato de 24 orifícios contendo 2,5 mL de inóculo em cada orifício. Após sua formação, os biofilmes foram lavados 2 vezes com mesmo volume de NaCl 0,89%, desprendidos do poço com a

ponta da pipeta por 1 min em cada poço e suspensos em 2,5 mL de NaCl 0,89%. O conteúdo referente ao biofilme raspado de 3 poços (7,5mL) foi transferido para um tubo falcon de 15mL. Deste volume, 100 µL foi destinado para plaqueamento em SDA e outros 100 µL foi destinado para o peso seco total, restando assim 7,3mL. A amostra foi centrifugada a 5.500 xg por 10 min (4° C). O sobrenadante foi armazenado em outro tubo Falcon de 15 mL e o *pellet* (precipitado celular com os componentes insolúveis da MEC) foi lavado 3 vezes com 2 mL de água Mili-Q (5.500 xg/ 10 min / 4° C), ao final de cada centrifugação o novo sobrenadante foi adicionado ao mesmo tubo Falcon de 15 mL com os sobrenadantes anteriores. Portanto, o sobrenadante total foi de 13,3 mL. Os sobrenadantes armazenados (13,3 mL) foram utilizados para os testes de WSP, eDNA e proteínas do sobrenadante. O *pellet* foi ressuspensão em 2 mL de água, dos quais 500 µL foram utilizados para cálculo do peso seco, 50 µL para quantificação de proteínas do pellet, e 750 µL para a determinação de ASP e 200 µL para quantificação de lipídios (Figura 4).

Figura 4 - Fluxograma para análise dos componentes da matriz do biofilme



Fonte: Elaboração própria.

4.2.7.1 Unidade formadora de colônia (UFC/mL)

Uma alíquota de 100 μ L do biofilme raspado em NaCl 0,89% foi reservador para o plaqueamento em SDA para obtenção das unidades formadoras de colônia.

4.2.7.2 Análise do peso seco total

Uma alíquota 100 μ L do biofilme raspado em NaCl 0,89% foi pipetado em um eppendorf previamente pesado e etiquetado. A amostra foi centrifugada (12.000 rpm/ 15 min / 4° C), o sobrenadante descartado e em seguida foram adicionados 300 μ L de etanol 99%⁸⁵. O conteúdo foi homogeneizado e armazenado por 18h em freezer (-80° C)⁸⁵. Em seguida a amostra foi centrifugada (12.000 rpm/ 10 min / 4° C) e o sobrenadante descartado⁸⁵. A amostra foi lavada 3 vezes com etanol 75%, sempre descartando o sobrenadante⁸⁵. Ao final da última centrifugação o *pellet* foi seco ao ar, e novamente pesado⁸⁵. A diferença entre o peso inicial e o final é o peso seco total da amostra, utilizado para normalização dos dados.

4.2.7.3 Análise do peso seco do pellet

Da alíquota previamente separada, 500 μ L foram pipetados e colocados em um papel alumínio previamente pesado e etiquetado⁸⁵. As amostras foram secas em estufa de secagem a 100° C, e novamente pesadas na balança⁸⁵. A diferença entre o peso inicial e o final foi o peso seco total da amostra, o qual foi utilizado para normalização dos dados de ASP e proteínas do *pellet*.

4.2.7.4 Análise de proteínas do sobrenadante

Esta etapa utilizou o método de Bradford¹¹² para determinação das proteínas do sobrenadante. Uma alíquota de 1,1 mL do sobrenadante foi armazenada, e deste volume 500 μ L foi misturado com 500 μ L do reagente de Bradford em placa de 48 poços (em duplicata).

Realizou-se uma curva padrão com albumina sérica bovina (BSA) a 200mg/mL diluído a 100 μ g/mL, solução padrão para a construção dos pontos da curva padrão, apresentados no Quadro 1. Na curva padrão, também foram utilizados 500 μ L de cada ponto da curva com 500 μ L do reagente de Bradford em placa de 48 poços (em duplicata).

Em seguida, a placa devidamente aliquotada foi colocada em incubadora orbital por 20 min. A absorbância das amostras em 595 nm foi determinada em

espectrofotômetro (FluorStar), onde o utilizando-se água em lugar de solução-padrão para o branco (*blank*).

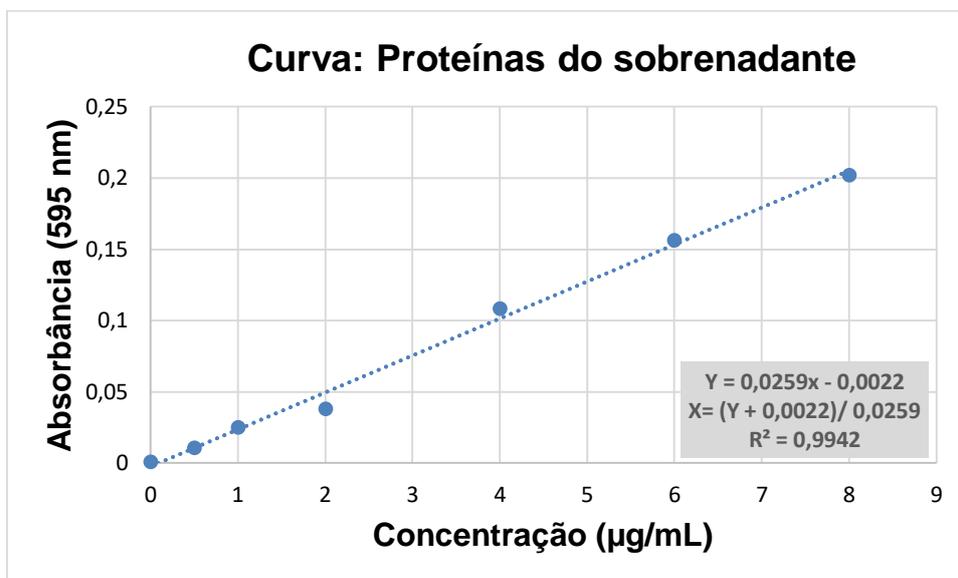
Quadro 1 – Pontos da curva padrão para quantificação das proteínas do sobrenadante

Curva padrão em µg/mL		
Concentração de BSA (µg/mL)	Vol. De BSA à 100 µg/mL (solução padrão)	Vol. De água mili-Q
0	0 µL	1.000 µL
0,5	5 µL	995 µL
1	10 µL	990 µL
2	20 µL	980 µL
4	40 µL	960 µL
6	60 µL	940 µL
8	80 µL	920 µL

Fonte: Elaboração própria.

Após a leitura, os valores foram plotados para obtenção da equação da reta [$y = ax + b$, na qual “y” correspondia ao valor de DO (variável dependente); “x”, à concentração de proteínas (variável independente); “a” e “b” eram os valores de coeficiente linear e coeficiente angular, respectivamente; e R^2 , o coeficiente de determinação] (Figura 5). Quando o R^2 estava próximo a 1 (0,99-0,97), os valores de DO_{595} das amostras eram substituídos pelo Y na equação da reta, convertendo-os em concentração de proteínas.

Figura 5 - Curva padrão de proteínas do sobrenadantes em $\mu\text{g/mL}$



Fonte: Elaboração própria.

4.2.7.5 Análise de proteínas do pellet

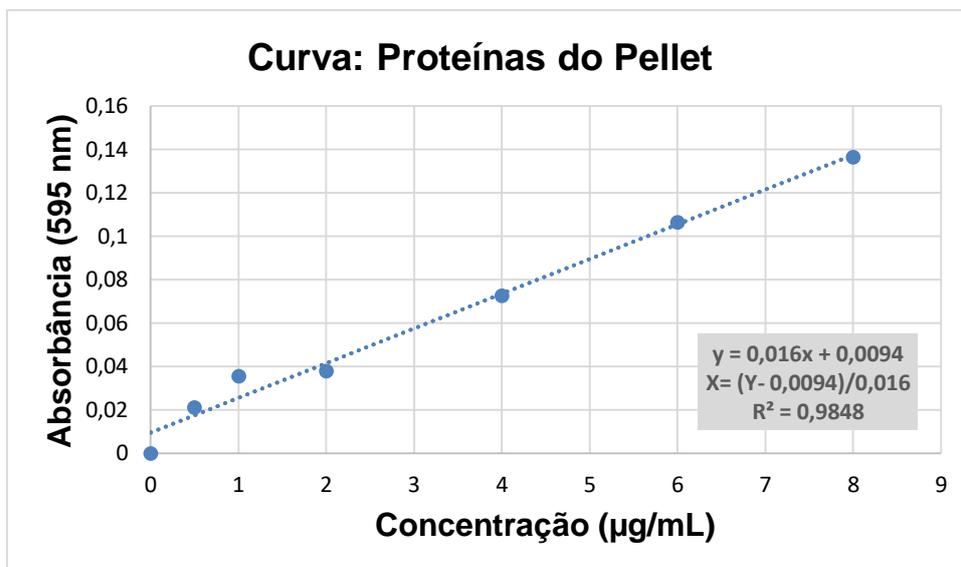
Para esta etapa foi reservado um volume de 550 μL do pellet. Por se tratar de uma amostra mais concentrada, foi necessário realizar uma diluição das amostras para que estas se enquadrassem na curva padrão. Dessa forma, foram utilizadas alíquotas entre 40 e 50 μL diluídas em 460 e 450 μL de água mili-Q respectivamente. A esta amostra diluída adicionou-se 500 μL do reagente de Bradford em placa de 48 poços (em duplicata).

A curva padrão foi feita com albumina sérica bovina (BSA) diluída a 100 $\mu\text{g/mL}$, solução padrão para a construção dos pontos da curva padrão, conforme explicado anteriormente nas proteínas do sobrenadante (Quadro 1). Na curva padrão, também foram adicionados 500 μL do reagente de Bradford a cada ponto da curva em placa de 48 poços (em duplicata).

Em seguida, a placa devidamente alíquotada foi colocada em incubadora orbital por 20 min. As respectivas absorbâncias a 595 nm foram determinadas em espectrofotômetro (FluorStar), onde o utilizando-se água em lugar de solução-padrão para o branco (*blank*).

Após a leitura, os valores foram plotados para obtenção da equação da reta e do R^2 (Figura 6), conforme descrito anteriormente. Quando o R^2 estava próximo a 1 (0,99-0,97), os valores de DO_{595} das amostras eram convertidos em concentração de proteínas através da substituição pelo Y na equação da reta.

Figura 6 - Curva padrão de proteínas do *pellet* em $\mu\text{g/mL}$



Fonte: Elaboração própria.

4.2.7.6 Análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP)

Uma alíquota de 3 mL do sobrenadante foi transferido a um tubo Falcon de 15 mL, a este tubo foi adicionado 7,5 mL de etanol 99%. O conteúdo do tubo foi homogeneizado e armazenado em freezer (-20°C , por 18h) para a precipitação dos polissacarídeos solúveis em água.

Após a precipitação, todas as amostras foram removidas do freezer, agitadas em vórtex e centrifugadas ($9.500 \text{ xg} / 20 \text{ min} / 4^{\circ}\text{C}$). Os sobrenadantes foram descartados. As amostras foram lavadas 3 vezes com etanol a 75%, sempre descartando o sobrenadante no final de cada centrifugação. Posteriormente à lavagem, o *pellet* foi seco ao ar, e então o *pellet* ressuspensão em 1 mL de água MiliQ. Prosseguiu-se com agitação para misturar bem o *pellet* na solução. Assim, as amostras ficaram prontas para a quantificação de carboidrato total, através do método com ácido sulfúrico e fenol¹¹³.

Este experimento utilizou glicose 0,1% e água mili-Q em tubos de ensaio (13mm x 100mm) para a curva padrão. As respectivas concentrações estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2 - Curva padrão para quantificação das WSP

Volume (μL)	Concentração de glicose ($\mu\text{g/mL}$)								
	0	3,75	6,25	12,5	25	50	75	100	125
Água	200	199,25	198,75	197,5	195	190	185	180	175
Glicose 0,1%	0	0,75	1,25	2,50	5	10	15	20	25
TOTAL	200	200	200	200	200	200	200	200	200

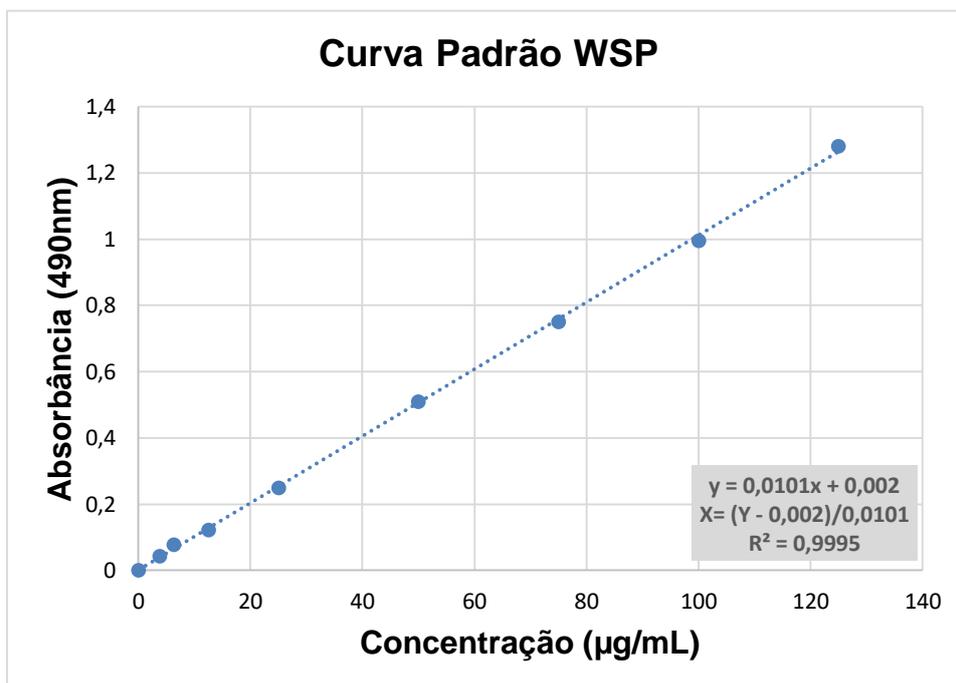
Fonte: Elaboração própria.

Após alicotar os 200 μL de cada ponto da curva (em duplicata), prosseguiu-se com a reação do fenol com ácido sulfúrico, esta deve ser realizado dentro de uma capela de exaustão de gases. Foi adicionado 200 μL de fenol 5% com o auxílio de um dispensador de repetição (Eppendorf), o conteúdo foi agitado cuidadosamente. Então, foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico a cada tubo, onde os mesmos foram agitados imediatamente. Depois de 20 min de reação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de luz de 490 nm.

Após a leitura, os valores foram plotados para saber se os mesmo estavam dentro das normas (Slope: 0,008-0,010; R^2 estava próximo a 1). Só após esta constatação é que as amostras eram processadas (Figura 7).

Um volume de 200 μL de cada amostra foi aliquoteado em cada tudo de vidro (triplicata). Da mesma forma que foi realizado na curva-padrão, adicionaram-se 200 μL de fenol 5% e em seguida 1 mL de ácido sulfúrico. Por fim, os valores de DO_{490} das amostras foram convertidos em concentração de WSP através da substituição pelo Y na equação da reta obtida pela curva padrão.

Figura 7 - Curva padrão de WSP em mg/mL



Fonte: Elaboração própria.

As amostras que apresentaram valor de DO acima da curva-padrão foram diluídas e quantificadas novamente pelo método de ácido sulfúrico e fenol. O novo valor de DO gerado por essa amostra diluída, foi então corrigido de acordo com a diluição realizada.

4.2.7.7 Análise de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP)

Uma alíquota de 750 µL da suspensão de biofilme foi alicotado em microtubos previamente pesados e centrifugado (13.000 xg/ 10 min/ 4° C). O sobrenadante foi cuidadosamente removido do tubo e descartado. Então, o *pellet* foi seco por centrifugação em concentrador de amostras (RVC 2-18C D) por aproximadamente 4h30. Após totalmente seco, os microtubos foram novamente pesados, a diferença entre o peso foi registrada.

De acordo com o peso obtido, foi adicionado a cada tubo 300 µL de 1N NaOH para cada 1 mg do peso seco do *pellet*. Os tubos foram incubados por 2 h em estufa orbital. Terminado o período de incubação, as amostras foram centrifugadas (13.000 xg/ 10 min). Os sobrenadantes foram cuidadosamente coletados com o auxílio de uma pipeta e transferidos para um novo microtubo, preservando o *pellet*. Novamente, o mesmo volume de 1N NaOH (300 µL de 1N NaOH/ 1 mg do peso

seco) foi adicionado aos microtubos contendo os *pellets*. Os microtubos foram agitados (com vórtex) para romper o *pellet* e em seguida foram incubados por mais 2h em estufa orbital. As amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante foi cuidadosamente coletado e adicionado ao mesmo microtubo citado anteriormente (com o sobrenadante previamente coletado). Procedeu-se com mais uma adição de 1N NaOH (300 µL de 1N NaOH/ 1 mg do peso seco) aos microtubos contendo os *pellets*, e nesta terceira adição as amostras não foram incubadas por 2h, mas apenas vórtexadas e centrifugadas. Este último sobrenadante é adicionado ao sobrenadante previamente coletado e o *pellet* descartado.

Após a extração do ASP, foi adicionado etanol 99% num volume de 3 vezes o de NaOH anteriormente coletados, que foram misturadas e levadas ao freezer (-20° C) pelo período de pelo menos 18 h. Passado esse período da precipitação dos polissacarídeos solúveis em álcali (ASP), então, os tubos foram removidos do freezer, agitados e centrifugados (13.000 xg/ 20 min/ 4° C). O sobrenadante foi descartado e as amostras lavadas 3 vezes com etanol 75%. As amostras de ASP foram lavadas da mesma forma que as amostras de WSP.

Posteriormente à lavagem, o *pellet* foi seco ao ar. O *pellet* foi ressuspenso em 1N NaOH (volume total de NaOH anteriormente adicionado). Enfim, as amostras ficaram prontas para a quantificação de carboidratos totais usando o método com ácido sulfúrico e fenol¹¹³, como descrito para análise de WSP. Os dados foram posteriormente normalizados pelo peso da alíquota utilizada no ensaio (750 µL) e pelo peso seco do biofilme.

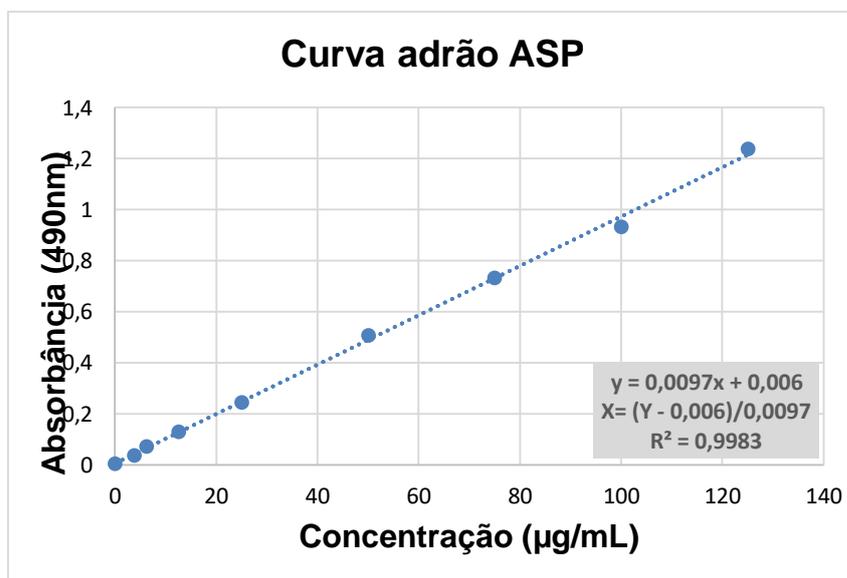
Para a curva padrão foi utilizado a glicose 0,1%, água mili-Q e NaOH 1N em tubos de ensaio (13mm x 100mm), em duplicata, com as concentrações citadas no Quadro 3. Com os pontos da curva corretamente aliqüotados em tubos de vidro, seguiu-se a técnica de ácido sulfúrico e fenol, a mesma descrita no WSP (200 µL de fenol e 1mL de ácido sulfúrico).

Quadro 3 - Curva padrão de glicose para quantificação de ASP

Volume (μL)	Concentração de glicose ($\mu\text{g/mL}$)								
	0	3,75	6,25	12,5	25	50	75	100	125
Água	100	99,25	98,75	97,5	95	90	85	80	75
Glicose 0,1%	0	0,75	1,25	2,50	5	10	15	20	25
NaOH	100	100	100	100	100	100	100	100	100
TOTAL	200	200	200	200	200	200	200	200	200

Fonte: Elaboração própria.

Com a curva de glicose dentro das normas (Slope: 0,008-0,010; $R^2 \cong 1$) (Figura 8), um volume de 100 μL de cada amostra de ASP foi aliqotado em cada tubo de vidro (duplicata). Em seguida realizou-se a técnica de ácido sulfúrico e fenol (200 μL de fenol e 1mL de ácido sulfúrico), e após 20 min, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 490 nm. Os valores de DO_{490} foram anotados e convertidos em concentração de ASP através da substituição pelo Y na equação da reta obtida pela curva padrão.

Figura 8 - Curva padrão de ASP em mg/mL

Fonte: Elaboração própria.

4.2.7.8 Análise de eDNA

A quantificação de eDNA foi realizada de acordo com metodologia descrita por Rice et al.¹¹⁴ Para extração do eDNA foi utilizada uma alíquota de 650 µL do sobrenadante das suspensões de biofilme com 650 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). O conjunto foi centrifugado (10.000 rpm/ 5 min/ 4° C) e o 500 µL do sobrenadante foi removido e transferido para outro microtubo. Realizou-se uma segunda extração adicionando igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Seguiu-se com uma nova centrifugação (10.000 rpm/ 5 min/ 4° C), onde 400 µL do sobrenadante foi removido e transferido para outro microtubo.

A fase aquosa de cada amostra foi misturada com 3 volumes de etanol 99% e 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M (pH 5.2) e armazenada à -20° C/18 h. O eDNA precipitado com etanol foi coletado por centrifugação (13.000 xg/ 20 min/ 4° C), e lavado 3 vezes com etanol 70% a 4° C, secado ao ar, e então dissolvido em 20 µL de tampão Tris-EDTA (TE). A quantidade de eDNA foi determinada usando nanoespectrofotômetro com comprimento de onda de 260 nm.

4.2.7.9 Normalização das amostras para quantificação dos componentes da matriz

Ao final de cada leitura, os valores obtidos com as amostras (100 µL peso seco total, 500 µL peso seco do pellet, 5 µL proteínas do pellet, 500 µL proteínas do sobrenadante, 200 µL WSP, 100 µL ASP e 1,25 µL eDNA) passaram por um processo de normalização dos dados. A normalização dos dados teve como objetivo proporcionar o valor encontrado na amostra com o volume de total de sobrenadante/pellet. Os componentes da matriz oriundos da porção insolúvel (proteínas do pellet e ASP) tiveram seus dados normalizados quanto ao peso seco do pellet também. Para melhor entendimento, a normalização dos dados está descrita no APÊNDICE C.

4.3 Análise Estatística

Esse é um estudo experimental *in vitro* com as seguintes variáveis manifestas, dependentes e quantitativas contínuas: UFC/mL, absorvância (biomassa total e eDNA) e massa (peso seco, proteínas, WSP, ASP). Como variáveis manifestas, independentes e qualitativas nominais tiveram os grupos de tratamento (controle negativo e tratamento com NAC) e cepas (susceptível e resistente a

fluconazol). Todos os experimentos com culturas planctônicas e biofilmes foram realizados em quadruplicatas com o mínimo de três ocasiões distintas (n=10 a 13). Essa variação no valor do n foi decorrente da remoção de *outliers* apontados pelo software. Inicialmente, foi feita uma análise exploratória dos dados (estatística descritiva) com medidas de resumo (tendência central e de dispersão). Os dados obtidos para UFC/mL foram convertidos em logarítimo na base 10.

Para as análises de viabilidade (UFC/mL) e biomassa total, a normalidade e a homogeneidade de variância dos dados foram avaliados pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Atendido o pressuposto de normalidade, os dados foram analisados pelos testes de ANOVA com ou sem correção de Welch, seguidos pelos testes pós-hoc de Games-Howell (dados heterocedásticos) ou Tukey (dados homocedásticos), respectivamente. Para os dados que não atendiam o pressuposto de normalidade, estes foram analisados por Kruskal-Wallis e Dunn. O nível de significância adotado será de 5% ($\alpha=0,05$). Para essas análises, foi utilizado o software SPSS (versão 20,0, IBM, Chicago).

A fim de facilitar a interpretação gráfica dos dados que não apresentaram distribuição normal, após a execução dos testes de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, estes foram analisados também por ANOVA/Welch e pós-teste adequado. Coincidindo a interpretação das diferenças estatísticas entre os grupos, optou-se pela apresentação gráfica desses dados por média e desvio padrão.

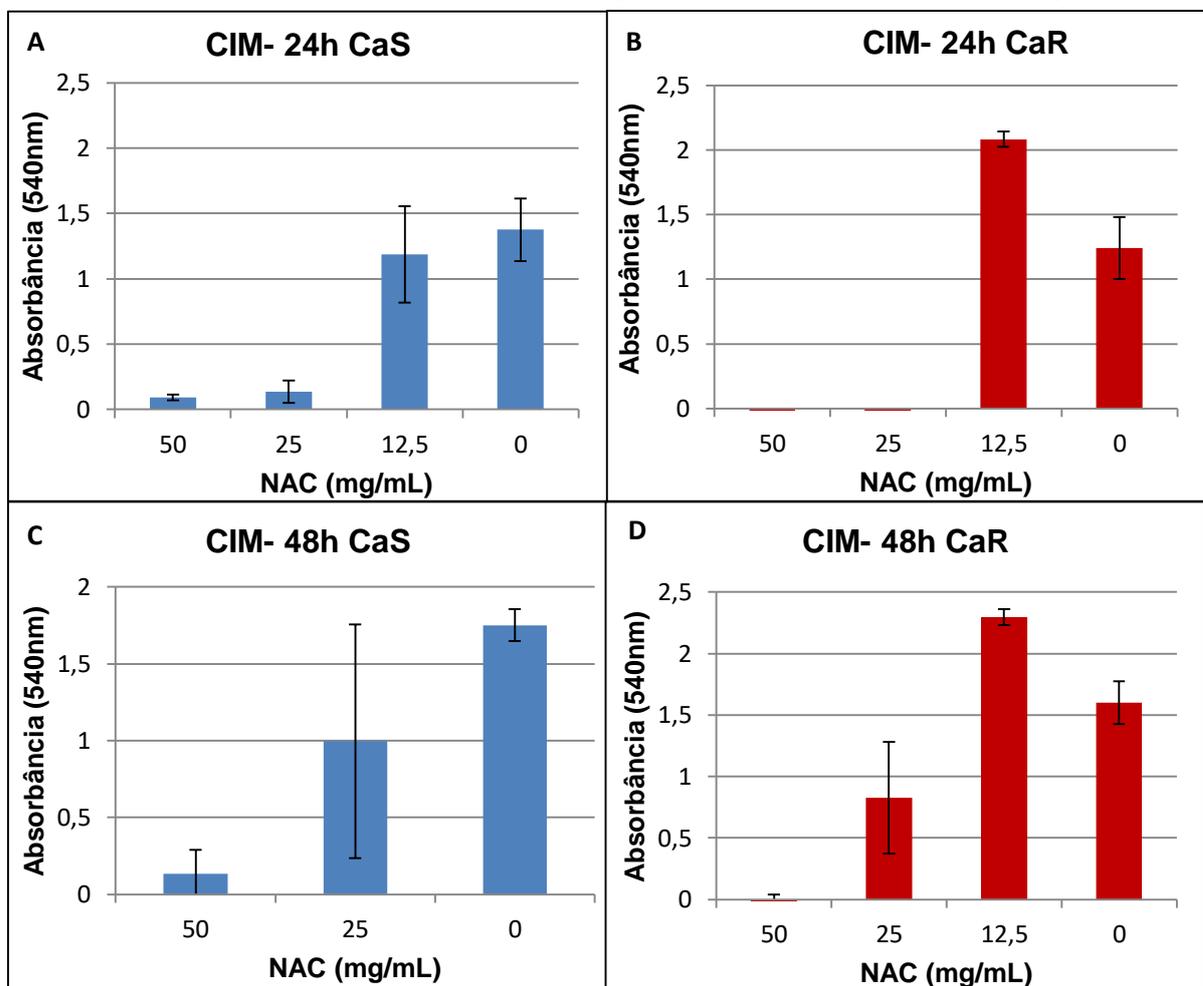
Na análise dos componentes da MEC do biofilme, os valores obtidos na amostra de cada um dos componentes (WSP, ASP, eDNA, proteínas do pellet e do sobrenadante) foram proporcionado para o volume de biofilme total a que ele se originou, sobrenadante ou pellet. Em seguida realizou-se uma análise descritiva de cada um desses componentes da matriz, com base na média e desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

No experimento da CIM após 24 h (CIM 24h), verificou-se que, com ambas as cepas, as concentrações de 25 e 50 mg/mL reduziram os valores de DO em relação ao controle negativo (Figura 9, A e B). Portanto, a CIM, tanto da cepa CaS como de CaR, foi de 25 mg/mL. Já com 48 h (CIM 48h), somente a concentração de 50 mg/mL reduziu os valores de DO em relação ao controle negativo em ambas as cepas (Figura 9, C e D).

Figura 9 - Valores médios de DO (540 nm) obtidas para CIM 24h de CaS (A, n= 11) e CaR (B, n= 12); CIM 48h de CaS (C, n= 11) e CaR (D, n=12). Barras de erro: desvio-padrão



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.2 Concentração Fungicida Mínima (CFM)

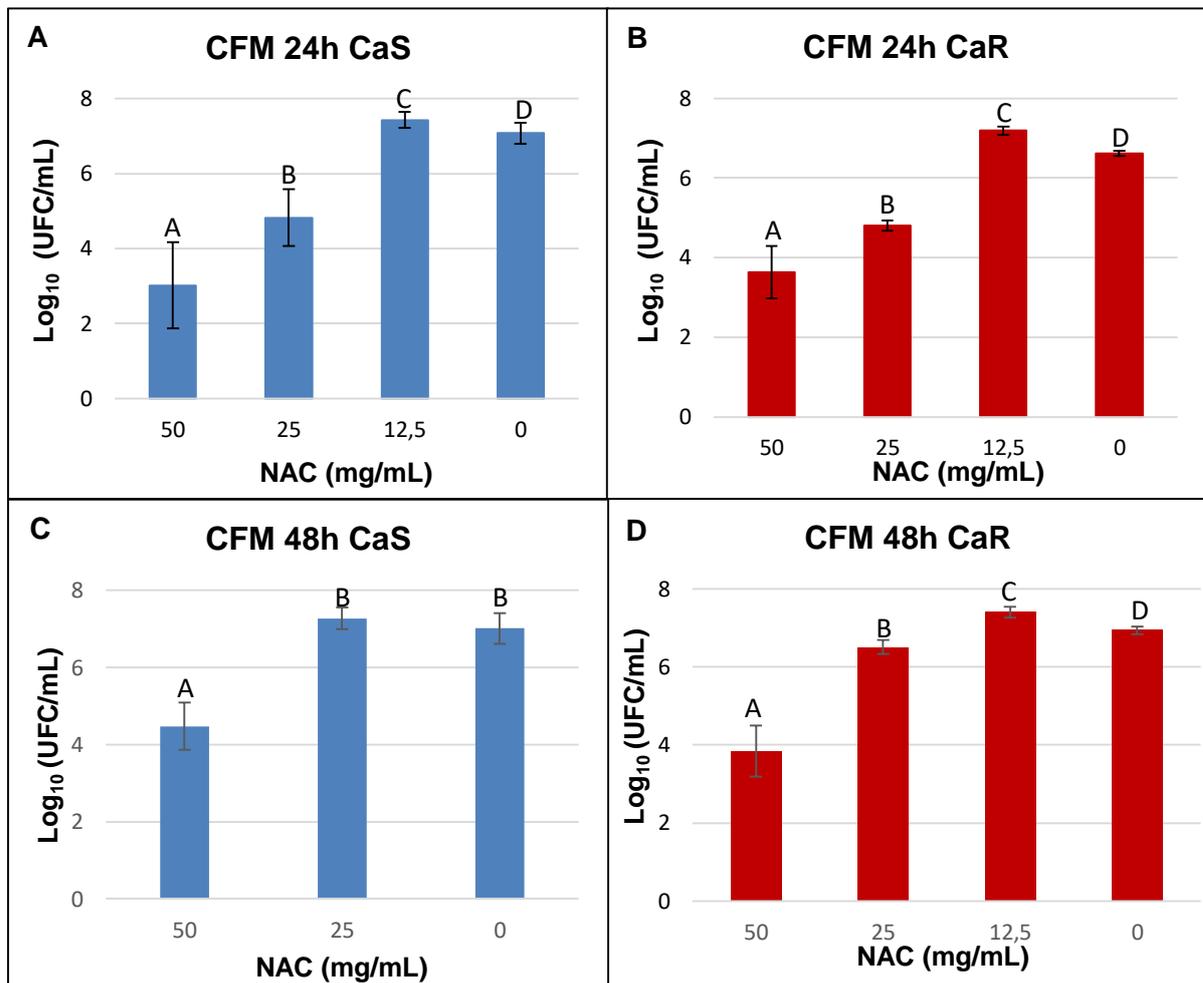
Nenhuma das concentrações avaliadas apresentou efeito fungicida, ou seja, nenhuma concentração de NAC eliminou o crescimento de colônias de CaS e CaR. Após 24 h, para CaS, o resultado da ANOVA com correção de Welch (Tabela A1a) demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). Verificou-se que as concentrações 50 mg/mL e 25 mg/mL demonstraram diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,001$), com reduções de $4,06 \log_{10}$ e $2,25 \log_{10}$ respectivamente (Figura 10A). A NAC 12,5 mg/mL resultou em um aumento médio significativo de $0,34 \log_{10}$ em relação ao controle ($p = 0,012$). As concentrações de 50 mg/mL e 25 mg/mL apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,001$).

Para CaR após 24 h, foi verificada diferença significativa entre os grupos através da ANOVA com correção de Welch ($p < 0,001$, Tabela A1b). Verificou-se que as concentrações de 50 mg/mL e 25 mg/mL foram significativamente diferentes do controle ($p \leq 0,001$), com reduções de $2,98 \log_{10}$ e $1,81 \log_{10}$, respectivamente (Figura 10B). A NAC 12,5 mg/mL resultou em um aumento médio significativo de $0,57 \log_{10}$ em relação ao controle ($p < 0,001$). As concentrações de 50 mg/mL e 25 mg/mL apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,001$).

Após 48 h, os dados de UFC/mL para CaS não apresentaram uma distribuição normal ($p \leq 0,002$). Por este motivo realizou-se o teste de Kruskal-Wallis (Tabela A1c), onde apenas a concentração de 50 mg/mL reduziu significativamente a viabilidade fúngica em relação ao controle ($p = 0,001$). Para facilitar a interpretação gráfica, esses dados foram representados por média e desvio padrão, já que quando analisados por ANOVA/Welch e pós-teste de Games Howell apresentaram a mesma interpretação de que apenas a concentração 50 mg/mL reduziu significativamente a viabilidade fúngica (Figura 10 C). A concentração de 50 mg/mL apresentou uma redução de $2,53 \log_{10}$ em relação ao controle, baseado nos valores médios.

Para CaR, os dados de UFC/mL de 48 h, através do teste ANOVA com correção de Welch, demonstraram diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$, Tabela A1d). Verificou-se que as concentrações de 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL e controle foram significativamente diferentes entre si ($p < 0,001$). As concentrações de 50 mg/mL e 25 mg/mL reduziram os valores de UFC/mL em $3,10 \log_{10}$ e $0,43 \log_{10}$, respectivamente, em relação ao controle (Figura 10D). A NAC 12,5 mg/mL resultou em um aumento médio significativo de $0,463 \log_{10}$ em relação ao controle ($p < 0,001$).

Figura 10 - Valores de UFC/mL obtidas para CFM 24 h CaS (A, n=12) e CaR (B, n = 12). CFM 48 h de CaS (C, n=12) e CaR (D, n = 12). Barras: médias; barras de erro: desvio-padrão



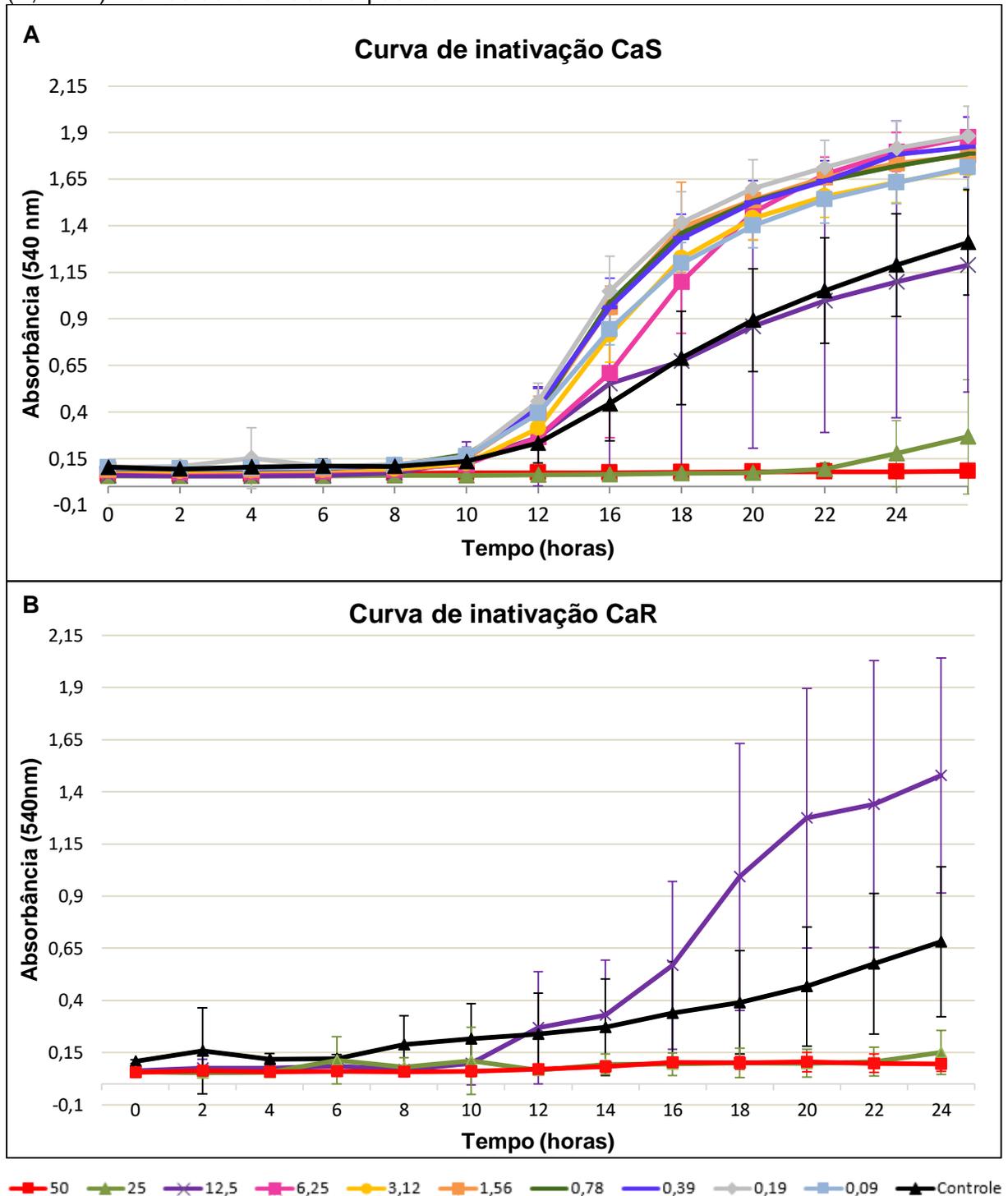
Letras diferentes sobre as barras denotam diferença estatística significante ($p \leq 0,012$).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.3 Curvas de Inativação

Quando a curva de inativação de *C. albicans* pela NAC foi avaliada (Figura 11), observou-se que para ambas as cepas, tanto o controle quanto as concentrações inferiores à CIM (sub-CIM) apresentaram aumento dos valores de DO à partir de 6 h. Somente as concentrações maior e igual à CIM (50 e 25 mg/mL) apresentaram valores de DO abaixo dos demais grupos, tanto para CaS como para CaR. Entretanto, depois de 22 h, a concentração de 25 mg/mL para CaS apresentou um leve aumento dos valores de DO. Surpreendentemente, as concentrações sub-CIM mostraram valores maiores que o controle após 12 h.

Figura 11 - Valores médios de DO (540 nm) obtidas após 24 h com CaS (A, n=12) e CaR (B, n=11). Barras de erro: desvio-padrão



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.4 Efeito da NAC na Formação do Biofilme de 48h

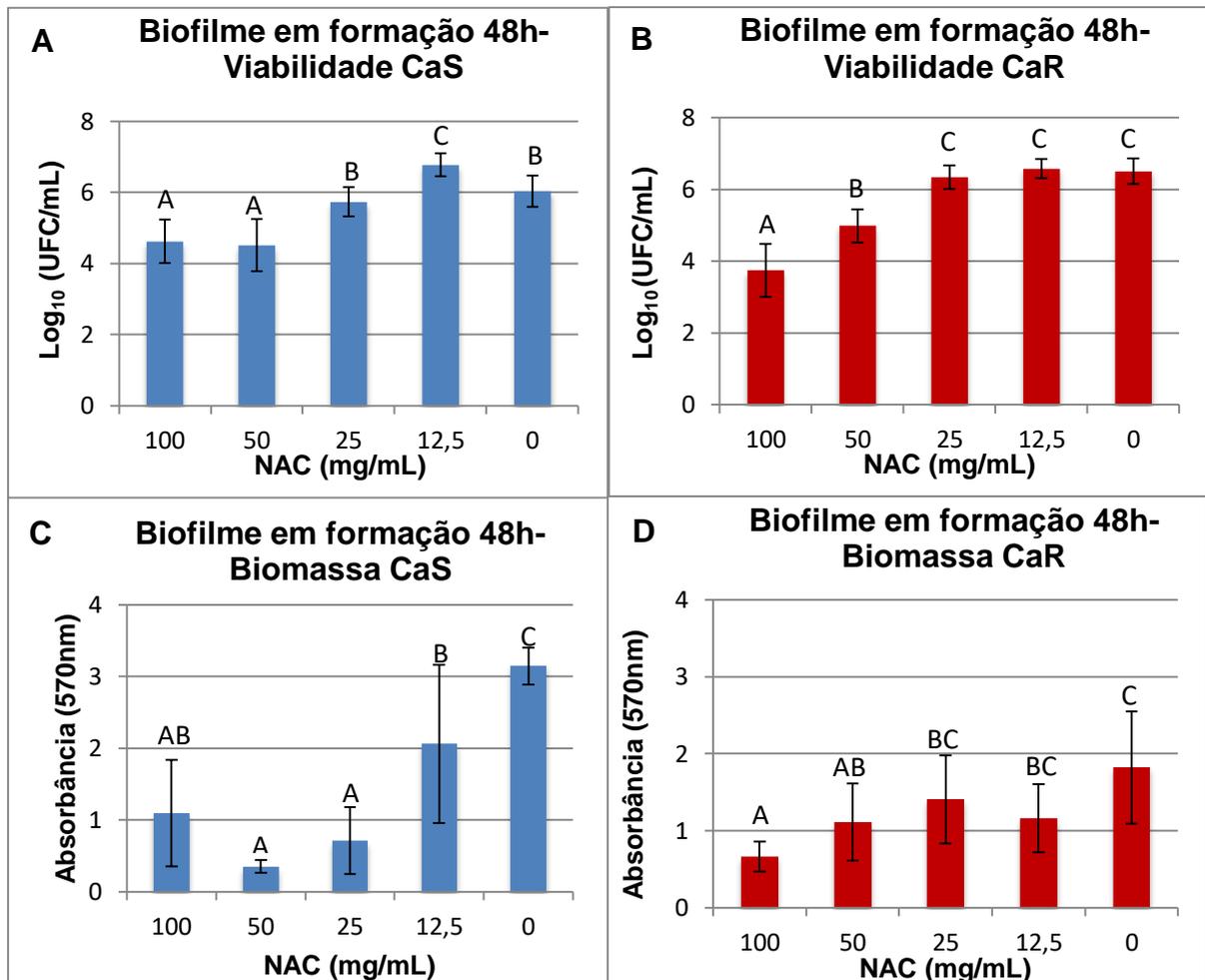
Após o desenvolvimento de biofilme de CaS na presença da NAC por 48 h, quanto à viabilidade (UFC/mL), o resultado da ANOVA com correção de Welch (Tabela A2a) demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). As concentrações 100 mg/mL e 50 mg/mL reduziram significativamente a formação do biofilme em relação ao controle ($p < 0,001$) em $1,41 \log_{10}$ e $1,52 \log_{10}$, respectivamente (Figura 12A). As concentrações de 100 mg/mL e 50 mg/mL não apresentaram diferenças significativas entre si ($p = 0,985$), ao passo que a concentração de 12,5 mg/mL aumentou significativamente a formação do biofilme em $0,74 \log_{10}$ ($p < 0,001$).

Para CaR, os dados de UFC/mL foram analisados pelo teste de ANOVA com correção de Welch (Tabela A2b), que demonstrou diferença entre os grupos ($p < 0,001$). As concentrações 100 mg/mL e 50 mg/mL reduziram significativamente a formação do biofilme em relação ao controle ($p < 0,001$) em de $2,77 \log_{10}$ e $1,52 \log_{10}$, respectivamente (Figura 12B), e não apresentaram diferença significativa entre si ($p=0,001$).

Quando a biomassa total do biofilme foi avaliada (ensaio do cristal violeta), os valores de absorvância de CaS foram analisados por ANOVA com correção de Welch (Tabela A2c), que demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). As concentrações 100, 50, 25 e 12,5 mg/mL incubadas com as células aderidas por 48 h reduziram significativamente a biomassa total do biofilme ($p \leq 0,039$) em 65, 88, 77 e 34%, respectivamente, em relação ao controle (sem NAC, Figura 12C).

Para CaR, o teste de ANOVA (Tabela A2d) mostrou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,001$) para os valores de biomassa. Após incubação da NAC com as células aderidas por 48 h, somente as concentrações de 100 e 50 mg/mL reduziram significativamente ($p \leq 0,045$) a biomassa total do biofilme em 64 e 39%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 12D).

Figura 12 - Valores médios de UFC/mL para CaS (A, n=20) e CaR (B, n=12) e absorvância (570 nm) para CaS (C, n=12) e CaR (D, n = 12) obtidas durante a formação do biofilme na presença da NAC Barras de erro: desvio-padrão



Letras diferentes sobre as barras denotam diferença estatística significativa ($p \leq 0,045$).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.5 Menor tempo de Ação da NAC Sobre Biofilme em Formação

Após a análise do desenvolvimento de biofilmes na presença da NAC por 48 h, foi realizado a viabilidade (UFC/mL) e a biomassa total (ensaio do cristal violeta) em tempos menores (24 h, 12 h e 6 h).

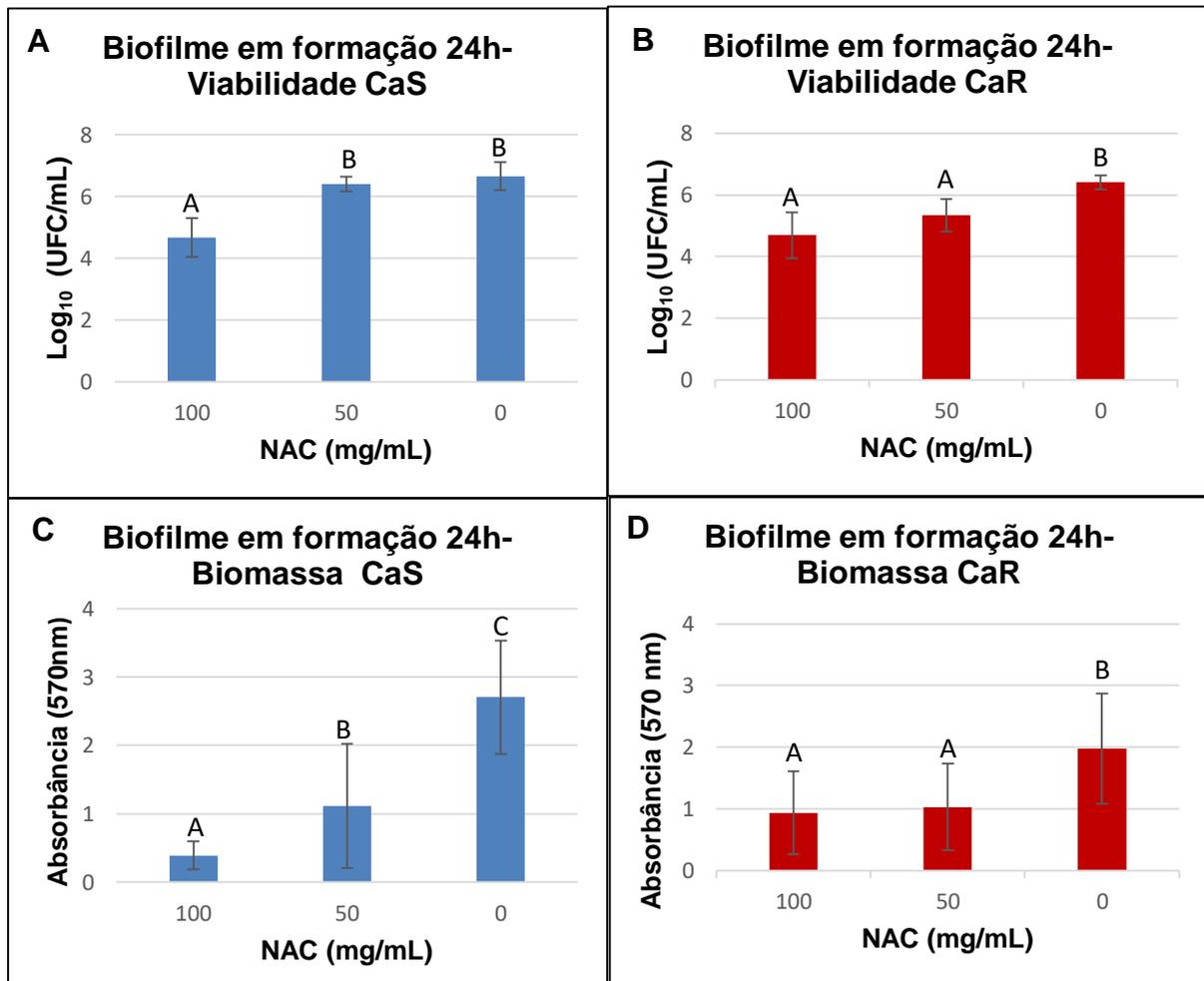
No tempo de 24 h, quanto à viabilidade (UFC/mL) para CaS, o resultado da ANOVA com correção de Welch (Tabela A3a) demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). A concentração de 100 mg/mL reduziu significativamente a formação do biofilme em relação ao controle ($p < 0,001$) em 1,98 log₁₀ (Figura 13A). A concentração de 50 mg/mL e controle negativo não apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,225$).

Para CaR, os dados de UFC/mL foram analisados pelo teste de ANOVA com correção de Welch (Tabela A3b), que demonstrou diferença entre os grupos ($p < 0,001$). As concentrações de 100 mg/mL e 50 mg/mL reduziram significativamente a formação do biofilme em relação ao controle ($p < 0,001$) em $1,71 \log_{10}$ e $1,07 \log_{10}$, respectivamente (Figura 13B), e não apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,076$).

Quanto à biomassa total (ensaio de cristal violeta) para CaS, os dados não apresentaram distribuição normal ($p \leq 0,048$). Por este motivo realizou-se o teste de Kruskal-Wallis, onde as concentrações 100 mg/mL e 50 mg/mL reduziram estatisticamente a biomassa total em relação ao controle ($p \leq 0,015$) (Tabela A3c). Para facilitar a comparação gráfica, esses dados foram representados por média e desvio padrão, já que quando analisados por ANOVA/Welch e pós-teste de Games Howell, apresentaram a mesma interpretação (Figura 13C). A concentração de 100 e 50 mg/mL reduziram 85,7 e 58,8% em relação ao controle, baseado nos valores médios.

Para CaR, em tempos de 24h, os dados de biomassa total foram analisados pelo teste de ANOVA (Tabela A3d), que demonstrou diferença entre os grupos ($p = 0,003$). As concentrações 100 mg/mL e 50 mg/mL reduziram estatisticamente a biomassa total ($p \leq 0,012$) em 53 e 48%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 13D).

Figura 13 - Valores de UFC/mL para CaS (A, n=12) e CaR (B, n=11) e de absorvância (570 nm) para CaS (C, n=12) e CaR (D, n=12) obtidas durante a formação do biofilme na presença da NAC por 24h. Barras: médias; barras de erro: desvio-padrão



Letras diferentes sobre as barras denotam diferença estatística significativa ($p \leq 0,015$).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

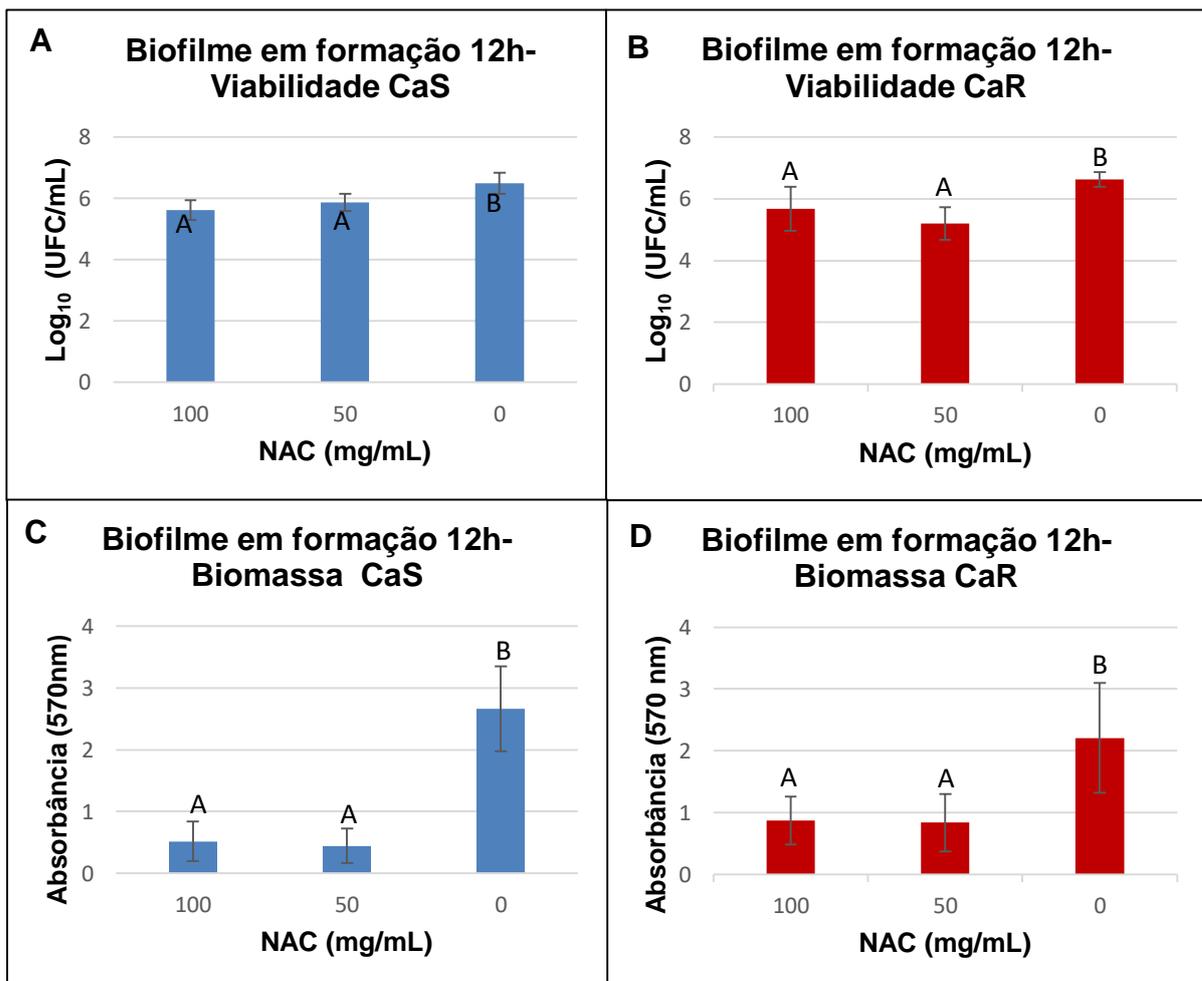
No tempo de 12 h, quanto à viabilidade (UFC/mL) para CaS, o resultado da ANOVA (Tabela A4a) demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). As concentrações de 100 e 50 mg/mL reduziram significativamente a formação do biofilme em relação ao controle ($p < 0,001$) em 0,87 e 0,63 \log_{10} (Figura 14A). As concentrações de 100 e 50 mg/mL foram estatisticamente semelhantes ($p = 0,147$).

Para CaR, os dados de UFC/mL foram analisados pelo teste de ANOVA com correção de Welch (Tabela A4b), que demonstrou diferença entre os grupos ($p < 0,001$). As concentrações 100 mg/mL e 50 mg/mL reduziram significativamente a formação do biofilme em relação ao controle ($p \leq 0,002$) em 0,94 e 1,42 \log_{10} , respectivamente (Figura 14B), e não apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,17$).

Com relação à biomassa, os dados de CaS foram analisados por ANOVA (Tabela A4c), que demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). As concentrações 100 mg/mL e 50 mg/mL reduziram significativamente a biomassa total ($p < 0,001$) em 81% e 83%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 14C).

Para CaR, em tempo de 12 h, os dados de biomassa total foram analisados pelo teste de ANOVA com correção de Welch (Tabela A4d), que demonstrou diferença entre os grupos ($p < 0,001$). As concentrações 100 mg/mL e 50 mg/mL reduziram estatisticamente a biomassa total em relação ao controle ($p = 0,001$) em 60 e 62%, respectivamente (Figura 14D).

Figura 14 - Valores médios de UFC/mL para CaS (A, n=12) e CaR (B, n=12) e valores médios de absorbância (570 nm) para CaS (C, n=12) e CaR (D, n=12) obtidas durante a formação do biofilme na presença da NAC por 12 h. Barras de erro: desvio-padrão



Letras diferentes sobre as barras denotam diferença estatística significativa ($p \leq 0,002$).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

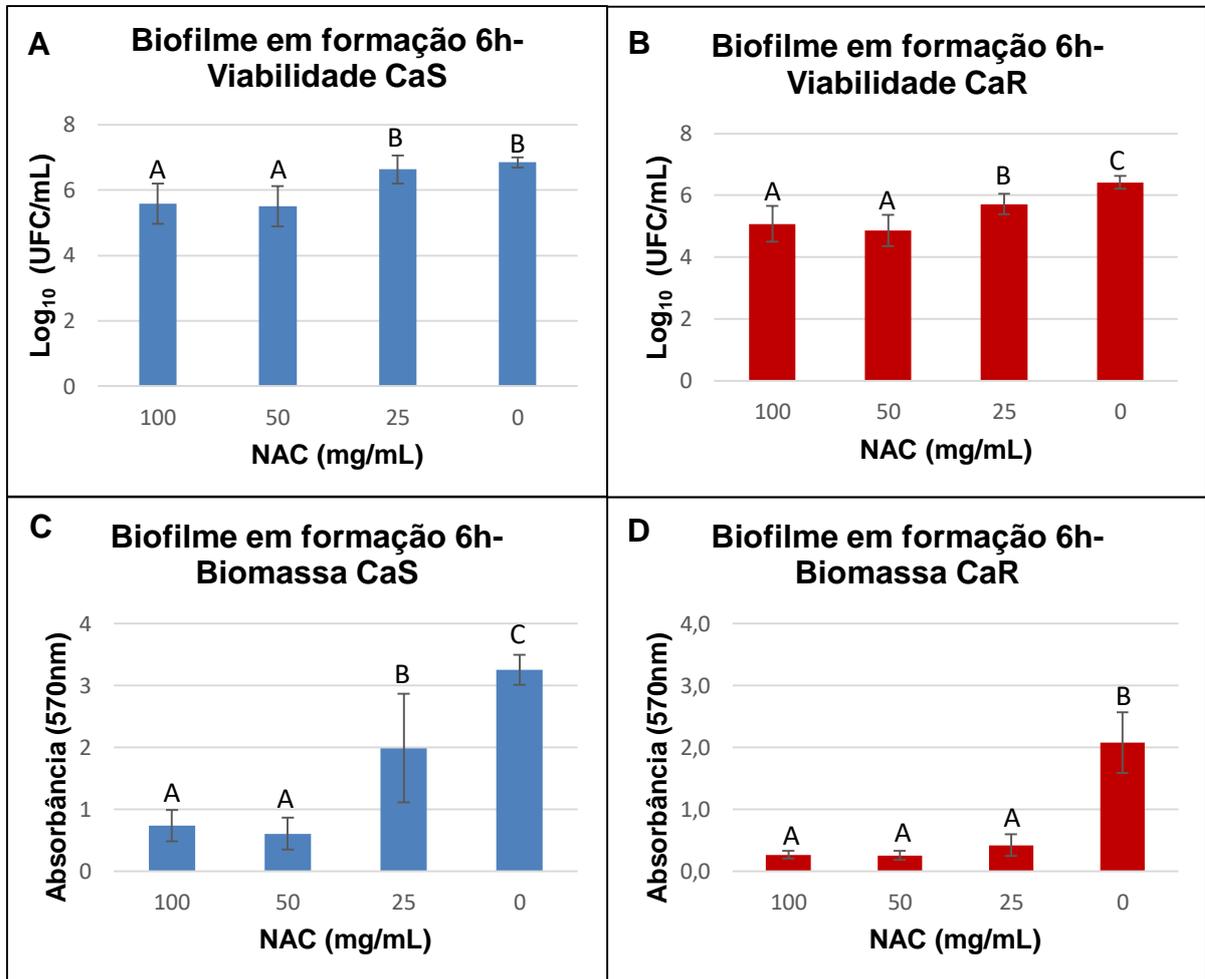
Após 6 h de formação do biofilme, quanto a viabilidade (UFC/mL) para CaS, os resultados não apresentaram distribuição normal ($p \leq 0,016$). Por este motivo realizou-se teste de Kruskal-Wallis (Tabela A5a), onde as concentrações de 100 mg/mL e 50 mg/mL reduziram significativamente a formação do biofilme em relação ao controle ($p < 0,001$). Ao analisar esse mesmo dados por ANOVA/Welch e Games-Howell obteve-se a mesma interpretação do teste não paramétrico, diante disso optou-se pela ilustração desses dados por meio da média e desvio padrão (Figura 15A). As concentrações de 100 e 50 mg/mL redução nos valores médios $1,27 \log_{10}$ e $1,35 \log_{10}$, respectivamente, em relação ao controle negativo.

Para CaR, o resultado da ANOVA (Tabela A5b) demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). O teste de Tukey demonstrou que as concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL reduziram significativamente a formação do biofilme em relação ao controle ($p \leq 0,002$) em $1,34$; $1,56$ e $0,70 \log_{10}$ (Figura 15B). As concentrações de 100 e 50 mg/mL foram estatisticamente semelhantes ($p = 0,588$).

No tempo de 6 h, os valores de absorvância de CaS foram analisados por ANOVA com correção de Welch (Tabela A5c), que demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). As concentrações 100, 50 e 25 mg/mL reduziram significativamente a biomassa total ($p \leq 0,002$) em 77, 81 e 38%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 15C).

Os valores de absorvância para CaR apresentaram diferença estatística entre os grupos através do teste de ANOVA com correção de Welch ($p < 0,001$) (Tabela A5d). As concentrações 100, 50 e 25 mg/mL reduziram estatisticamente a biomassa em relação ao controle ($p < 0,001$) em 87,32; 87,75 e 79,98% respectivamente (Figura 15D).

Figura 15 - Valores médios de UFC/mL obtidos durante a formação do biofilme na presença da NAC por 6 h para CaS (A, n=12) e CaR (B, n=12) e valores médios de absorbância (570 nm) para CaS (C, n=12) e CaR (D, n=10) obtidas durante a formação do biofilme na presença da NAC por 6 h. Barras de erro: desvio-padrão



Letras diferentes sobre as barras denotam diferença estatística significativa ($p \leq 0,002$).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.6 Efeito da NAC Sobre Biofilme Maduro

Os biofilmes maduros de 48 h foram incubados com diferentes concentrações da NAC por 24 h. Para CaS, com relação à viabilidade (UFC/mL), a ANOVA com correção de Welch (Tabela A6a) demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). Verificou-se que somente a concentração de 100 mg/mL reduziu significativamente ($p < 0,001$) a viabilidade do biofilme em 1,12 \log_{10} em relação ao controle (Figura 16A).

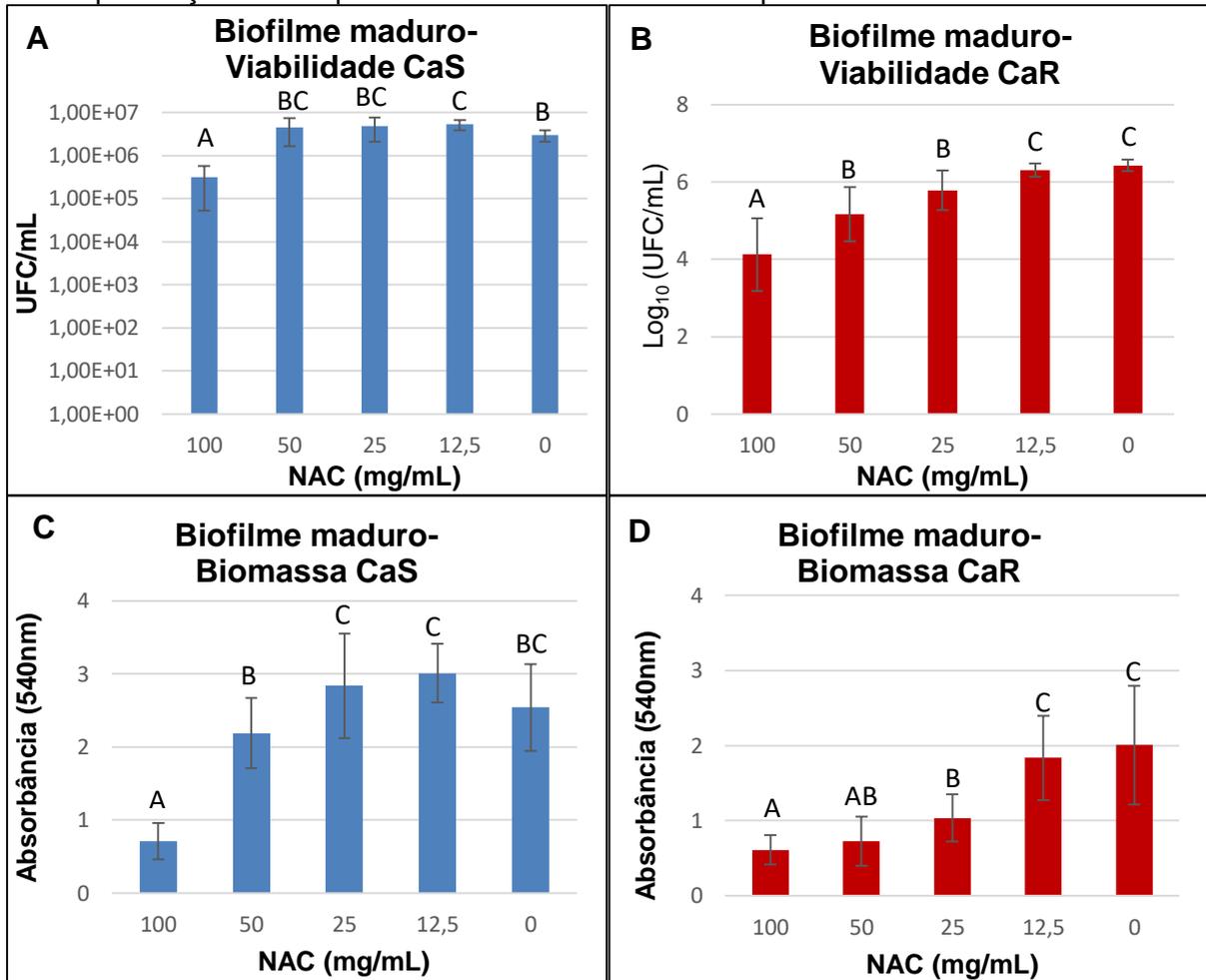
Para CaR, o teste de ANOVA com correção de Welch (Tabela A6b) também demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). Verificou-se que as concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL promoveram reduções significativas ($p \leq 0,008$) de 2,30, 1,26 e 0,64 \log_{10} , respectivamente, em relação ao controle (Figura

16B). As concentrações de 50 e 25 mg/mL não apresentaram diferença significativa entre si ($p= 0,137$).

Quanto à biomassa total do biofilme maduro (avaliada por cristal violeta), os valores de absorvância de CaS foram analisados por ANOVA (Tabela A6c), que demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p< 0,001$). Apenas a concentração 100mg/mL reduziu significativamente a biomassa total do biofilme ($p< 0,001$) em 72% em relação ao controle (Figura 16C).

Em CaR, o teste de ANOVA com correção de Welch (Tabela A6d) mostrou diferença significativa entre os grupos ($p< 0,001$) para os valores de biomassa. Após incubação da NAC com as células aderidas por 48 h, verificou-se que as concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL reduziram significativamente ($p\leq 0,015$) a biomassa total do biofilme em 69, 64 e 48%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 16D).

Figura 16 - Valores médios de UFC/mL para CaS (A, n=12) e CaR (B, n=12) e valores médios de absorvância para CaS (A, n=13) e CaR (B, n=11) obtidas em biofilmes maduros com a presença da NAC por 24 h. Barras de erro: desvio-padrão



Letras diferentes sobre as barras denotam diferença estatística significativa ($p \leq 0,015$).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

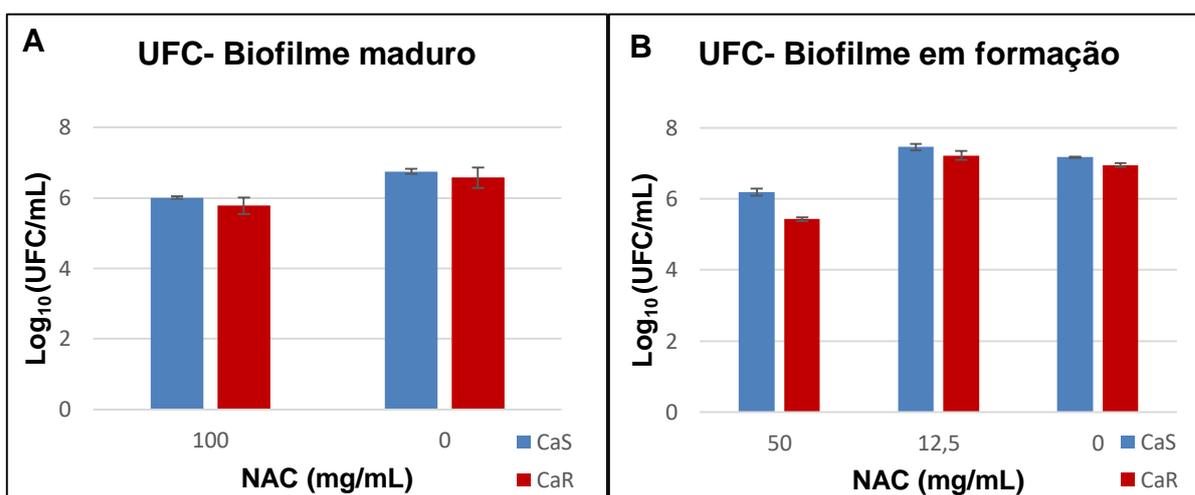
5.7 Efeito da NAC na Composição da Matriz do Biofilme

Foi avaliada a ação da NAC sobre os componentes da matriz em biofilmes maduros e biofilmes em formação. Em biofilmes maduros apenas a NAC de 100 mg/mL foi analisada, visto que apenas esta concentração apresentou redução significativa na viabilidade em relação ao grupo controle. Em biofilmes em formação, foi analisada a concentração de 50 mg/mL, menor concentração que apresentou redução significativa na viabilidade em relação ao controle, e a 12,5 mg/mL, que apresentou um aumento na viabilidade em relação ao controle.

5.7.1 Unidade formadora de colônia (UFC/mL)

Os valores de UFC/mL obtidos a partir dos 100 μ L do biofilme resuspendido em NaCl 0,89% e plaqueados em SDA para biofilmes maduros e em formação, estão representados na Figura 17. Apesar desses dados serem apenas descritivos, é possível observar que a viabilidade média do biofilme após NAC 100 mg/mL (biofilmes maduros) e 50 mg/mL (biofilmes em formação) foi inferior ao controle (0 mg/mL) em ambas as cepas. Em contrapartida, a concentração 12,5 mg/mL (biofilmes em formação) apresentou um discreto aumento nos valores médios em relação ao controle, em ambas as cepas.

Figura 17 - Valores médios de UFC/mL de biofilmes maduros (A, n=3) e biofilmes em formação (B, n=4). Barras de erro: desvio-padrão

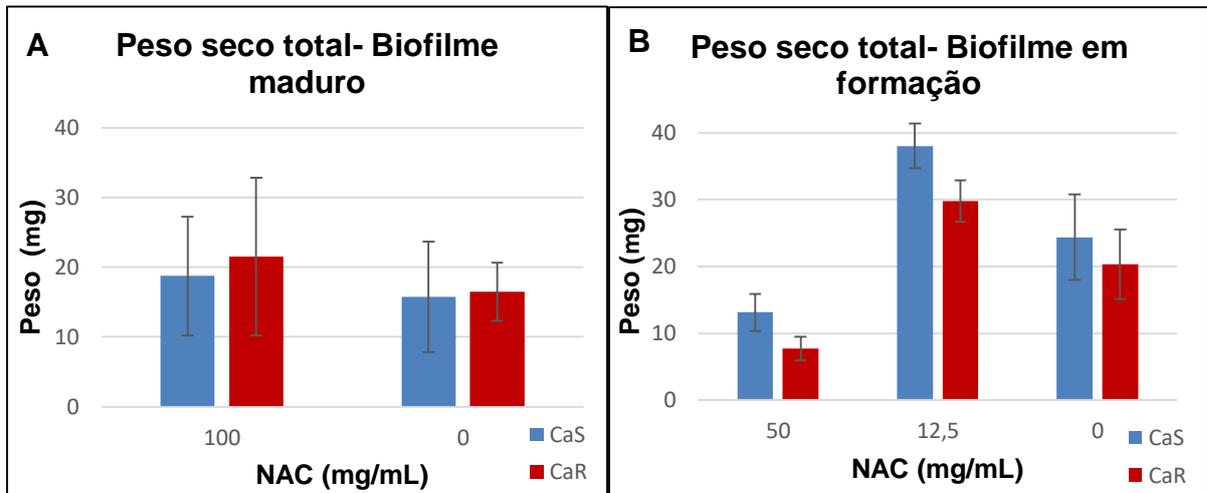


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.7.2 Análise do peso seco total

Em biofilmes em formação, a NAC 50 mg/mL apresentou um peso seco total, proveniente de ambos os biofilmes, inferior aos demais grupos (12,5 mg/mL e 0 mg/mL de NAC). Em biofilmes maduros, este comportamento parece não ser observado, visto que há pouca diferença entre a concentração 100 mg/mL e seus respectivos controles para ambas as cepas (Figura 18).

Figura 18 - Valores médios de peso seco total (mg) de biofilmes maduros (A, n=3) e biofilmes em formação (B, n=4). Barras de erro: desvio-padrão

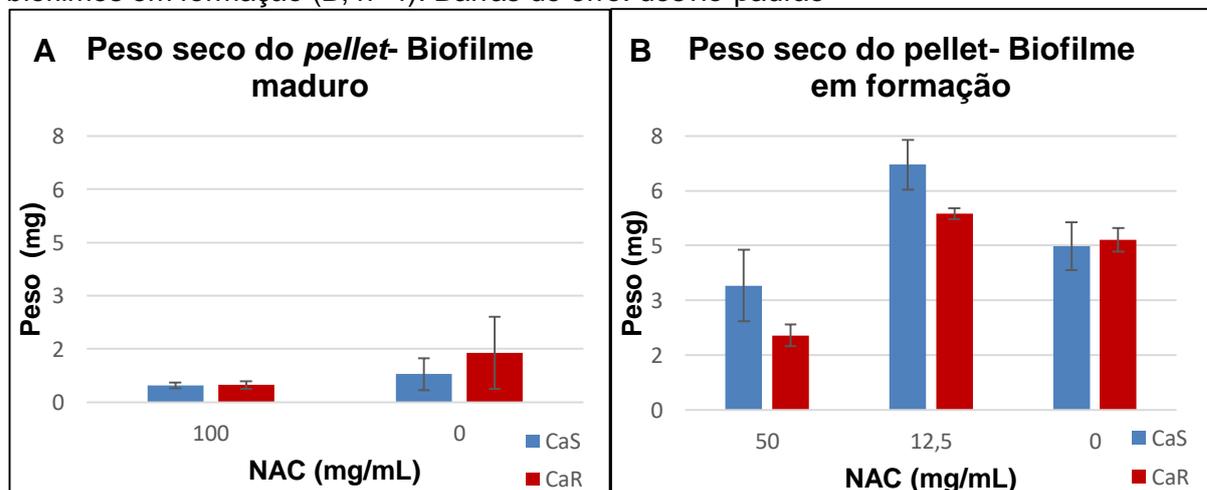


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.7.3 Análise do peso seco do *pellet*

Os dados de peso seco do *pellet*, para ambos os biofilmes, maduro e em formação, estão apresentados na Figura 19. Nesses dados descritivos é possível observar uma tendência das duas cepas a um menor peso seco nas concentrações de 100 mg/mL da NAC (biofilmes maduros) e 50 mg/mL da NAC (biofilmes em formação), baseado nos valores médios, quando comparado aos respectivos controles (0 mg/mL de NAC). Já a concentração de 12,5 mg/mL da NAC (biofilme em formação) apresentou um peso seco superior ao controle. Esses valores de peso seco do *pellet* foram utilizados para a normalização dos dados de ASP e proteínas do *pellet*.

Figura 19 - Valores médios de peso seco do *pellet* (mg) de biofilmes maduros (A, n=3) e biofilmes em formação (B, n=4). Barras de erro: desvio-padrão

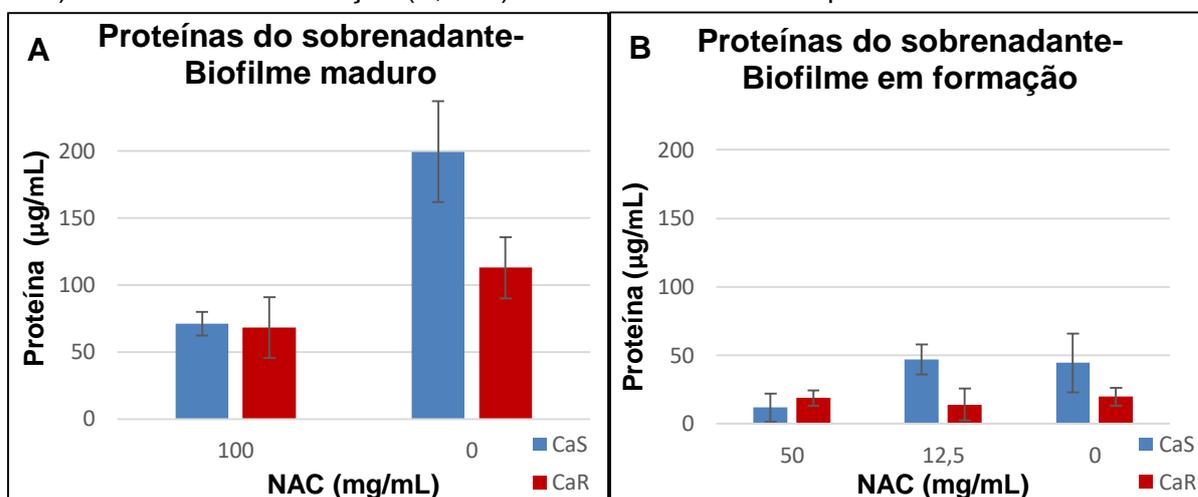


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.7.4 Análise das proteínas do sobrenadante

O conteúdo proteico da MEC presente na porção solúvel do biofilme (sobrenadante) exposta ou não à NAC em biofilmes maduros e em formação está ilustrado na Figura 20. Esta análise descritiva sugere que as concentrações 100 mg/mL da NAC (biofilmes maduros) e 50 mg/mL da NAC (biofilmes em formação) apresentaram um menor conteúdo proteico em relação ao controle (0 mg/mL) em CaS. Para CaR, os valores obtidos nas concentrações são próximos aos seus respectivos controles.

Figura 20 - Valores médios de concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) de biofilmes maduros (A, $n=3$) e biofilmes em formação (B, $n=4$). Barras de erro: desvio-padrão



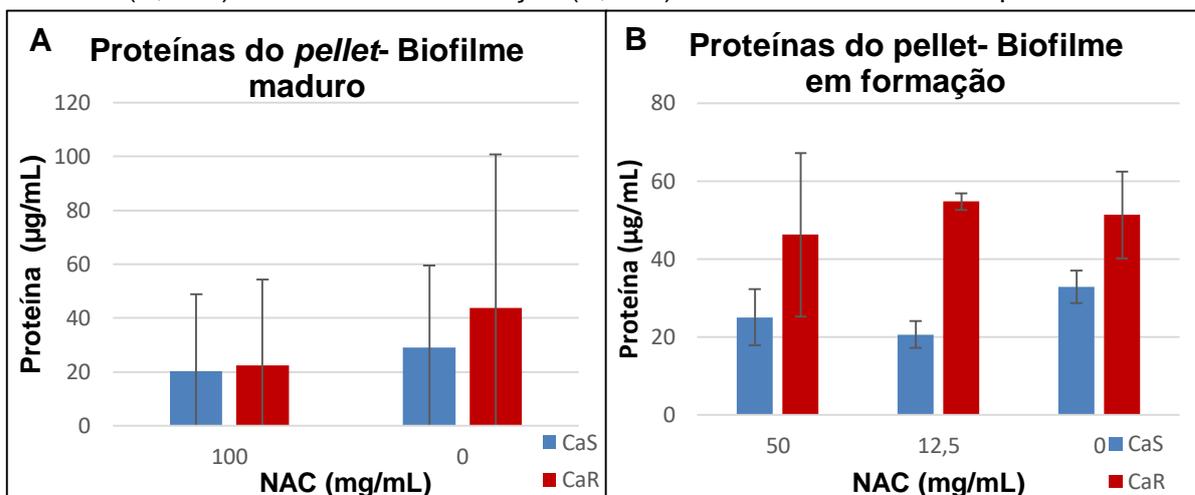
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.7.5 Análise das proteínas do *pellet*

Esta etapa apresentou uma limitação técnica, algumas amostras da concentração 100 mg/mL de NAC em biofilme maduro ficaram abaixo da curva padrão, em ambas as cepas. Este fato impossibilita correlacionar com segurança os valores de DO_{595} com a concentração de proteínas da amostra.

A Figura 21 demonstra uma tendência a menor concentração de proteínas na porção insolúvel, baseado nos valores médios, para a concentração de 50 mg/mL (biofilme em formação) em relação ao grupo controle (0 mg/mL) em ambas as cepas. No biofilme maduro, apesar da dificuldade metodológica enfrentada, é possível observar a tendência da NAC 100 mg/mL em apresentar valores inferiores em relação a NAC de 0 mg/mL.

Figura 21 - Valores médios da concentração de proteínas do *pellet* ($\mu\text{g/mL}$) em biofilmes maduros (A, $n=2$) e biofilmes em formação (B, $n=4$). Barras de erro: desvio-padrão

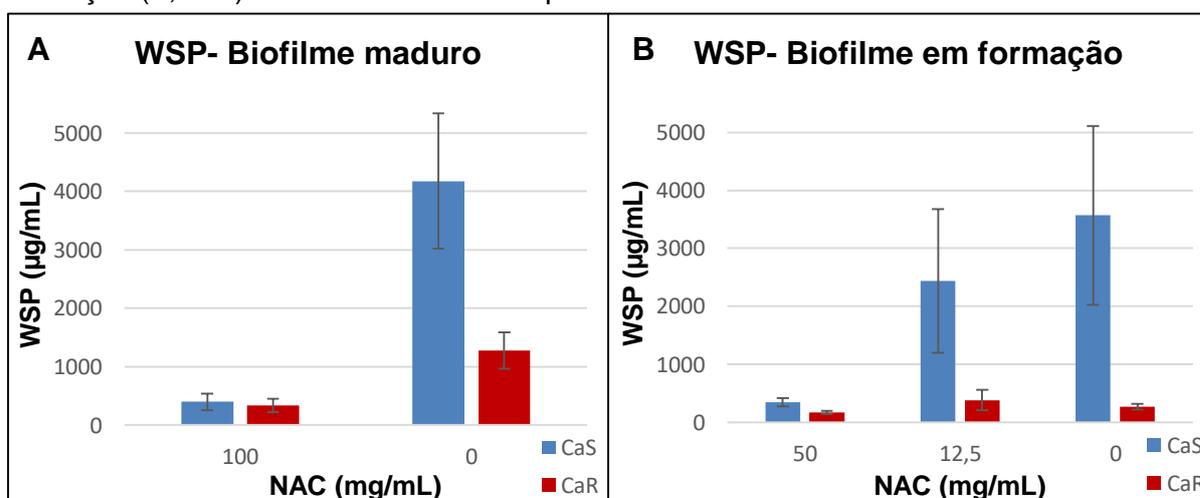


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.7.6 Análise dos polissacarídeos solúveis em água (WSP)

Para os WSP (Figura 22), as concentrações de 100 mg/mL (biofilme maduro) e 50 mg/mL (biofilme em formação) da NAC apresentaram menor conteúdo em relação à concentração 0 mg/mL em ambas as cepas. É possível observar que a cepa CaS apresentou um maior conteúdo de WSP em relação a CaR, nos dois biofilmes; este aspecto é bem mais perceptível nos grupos controle (0 mg/mL) e 12,5 mg/mL de NAC.

Figura 22 - Valores médios de WSP ($\mu\text{g/mL}$) de biofilmes maduros (A, $n=3$) e biofilmes em formação (B, $n=4$). Barra de erro: desvio padrão

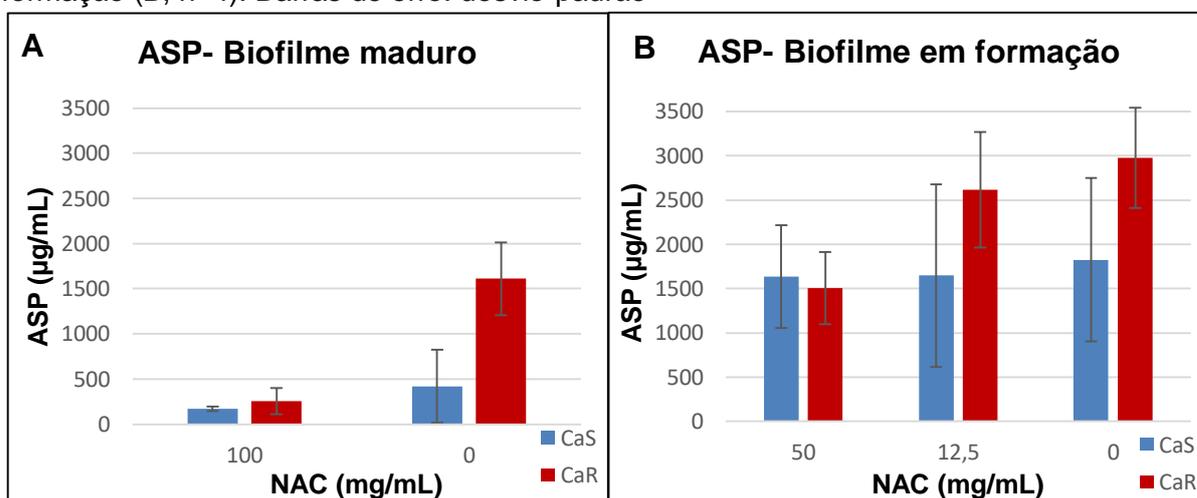


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.7.7 Análise dos polissacarídeos solúveis em álcali (ASP)

Para ASP, não é observado descritivamente uma diferença entre a concentração de 50 mg/mL (biofilme em formação) de NAC e as concentrações de 0 mg/mL e 12,5 mg/mL em CaS (Figura 23). Já em CaR, a concentração de 50 mg/mL de NAC apresentou valores médios inferiores ao 0 mg/mL e 12,5 mg/mL. Em biofilmes maduros, a concentração 100 mg/mL da NAC sugere apresentar concentrações inferiores ao controle (0 mg/mL de NAC) para ambas as cepas. De maneira geral, é possível observar que a quantidade de ASP em biofilmes em formação é superior ao biofilme maduro.

Figura 23 - Valores médios de ASP ($\mu\text{g/mL}$) de biofilmes maduros (A, $n=3$) e biofilmes em formação (B, $n=4$). Barras de erro: desvio-padrão

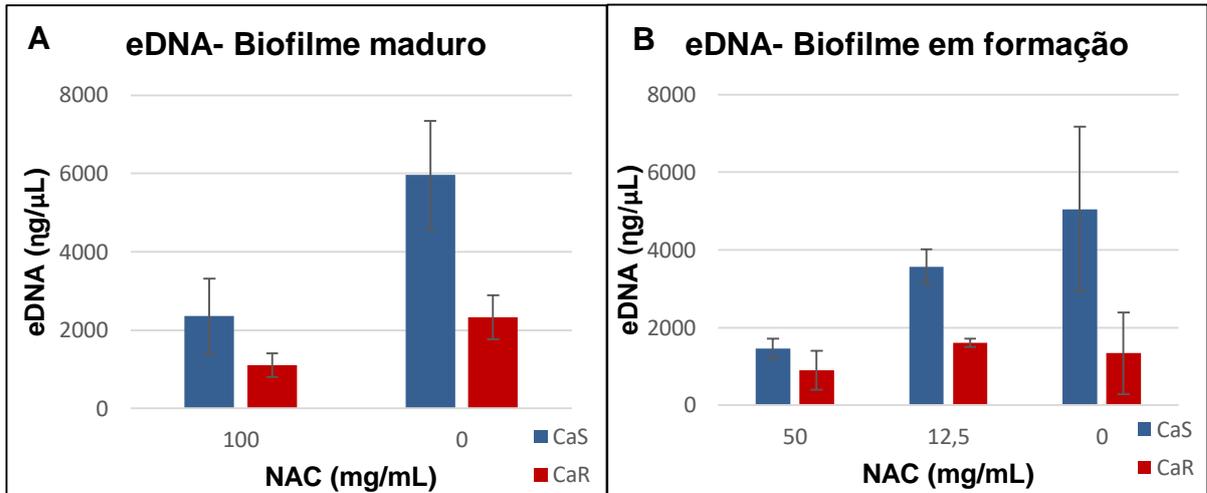


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.7.8 Análise de eDNA

Para eDNA, é possível notar que as concentrações de NAC (100 mg/mL para biofilme maduro e 50 e 12,5 mg/mL para biofilme em formação) apresentaram valores médios inferiores em relação aos seus respectivos controles (0 mg/mL) em CaS (Figura 24). Já em CaR este comportamento só é evidente em biofilmes maduros, uma vez que no biofilme em formação CaR apresenta concentrações de eDNA semelhantes em todos os grupos. De maneira geral, os valores de eDNA de CaR são inferiores ao de CaS.

Figura 24 - Valores médios de eDNA ($\eta\text{g}/\mu\text{L}$) de biofilmes maduros (A, $n=3$) e biofilmes em formação (B, $n=4$). Barras de erro: desvio-padrão



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que 25 mg/mL de NAC foi a CIM para ambas as cepas de *C. albicans*. Outros estudos verificaram valores semelhantes de CIM contra isolados clínicos de *C. albicans*^{45,47}. Nos isolados clínicos de infecções orais e vaginais, a NAC apresentou valores de CIM de 20 e 16,5 mg/mL pela técnica de difusão em águar⁴⁵. Pelo ensaio da macrodiluição, semelhante ao presente estudo, a NAC apresentou um valor de CIM de 40 mg/mL⁴⁷. Apesar de todos esses estudos terem realizado diluições seriadas “twofold” da NAC, as CIM foram diferentes e isso pode ser atribuído às diferentes concentrações estoque utilizadas (40⁴⁵ e 160 mg/mL⁴⁷, enquanto que no presente estudo, tal concentração foi de 100 mg/mL) e a origem das cepas. Apesar dos distintos valores de CIM observado, ela sempre foi de no máximo 2 diluições da NAC de estoque, o que demonstra que é necessária uma concentração alta da NAC para se ter um efeito fungistático.

Apesar dos valores de CIM verificados neste estudo, nenhum valor de CFM foi encontrado, ou seja, as concentrações avaliadas não promoveram efeito fungicida (eliminação de UFC). Somente um estudo reporta um valor de CFM da NAC de 160 mg/mL contra isolado clínico de *C. albicans*⁴⁷. Segundo esses autores, essa concentração promoveu redução maior que 99,9% do crescimento fúngico. Entretanto, não são relatados os valores de UFC para que seja possível mensurar a redução logarítmica do crescimento fúngico causado pela NAC. Na presente investigação, 50 e 25 mg/mL de NAC promoveram reduções significativas de 1,81 a 4,06 log₁₀ para as cepas avaliadas após 24 h. Já em 48 h, somente 50 mg/mL da NAC promoveu redução significativa para ambas as cepas. Portanto, esses resultados demonstram que, apesar de uma CFM não ter sido encontrada, a NAC promoveu redução da viabilidade fúngica.

Nas curvas de inativação, somente as concentrações maiores e igual à CIM demonstraram redução do crescimento fúngico durante as 24 h de incubação. Esse resultado confirma a ação fungistática da NAC nas concentrações acima ou igual à CIM, que é evidenciada a partir de 8-10 h. Em outro estudo⁴⁷, somente a NAC 80 mg/mL, acima da CIM (40 mg/mL), reduziu a viabilidade de *C. albicans* durante o período de 24 h, enquanto que concentrações de 0,8 e 8 mg/mL apresentaram valores semelhantes ao controle, com aumento da viabilidade a partir de 2 a 4 h⁴⁷.

No presente estudo, as concentrações subCIM mostraram valores próximos ou maiores que o controle a partir de 8-10 h de incubação, o que demonstra que tais concentrações estimularam o crescimento fúngico. Portanto, isso sugere cautela na utilização dessas concentrações, como por exemplo num cenário clínico de infecção.

Como citado anteriormente na revisão de literatura, apesar de serem citadas algumas hipóteses para explicar o mecanismo de ação fungistática da NAC, infelizmente ele permanece desconhecido. Após uma análise crítica desses artigos, constatou-se que as respectivas sugestões não passavam de teorias sem embasamento científico e sem explicações adequadas^{41,44}.

C. albicans possui a enzima (γ -glutamilcisteína sintetase – GCS1) que metaboliza a glutadiona⁹⁶. Como a NAC é uma precursora da glutadiona, *C. albicans* é capaz de metabolizar este componente, que é um metabólito essencial para este micro-organismo⁹⁶. Este fato pode justificar a maior viabilidade fúngica nas baixas concentrações da NAC. Enquanto que nas altas concentrações, possivelmente a enzima γ -glutamilcisteína sintetase encontrar-se saturada, ou em quantidade insuficiente para metabolizar a glutadiona, gerando assim uma redução da viabilidade.

As concentrações da NAC acima da CIM (100 e 50 mg/mL) promoveram inibição da viabilidade (de 1,41 a 2,77 \log_{10}) e da biomassa (de 39 a 88%) durante a formação do biofilme para ambas as cepas avaliadas. Esse resultado já era esperado, tendo em vista a atividade fungistática da NAC nessas concentrações observada nos experimentos prévios. Além disso, somente para CaS, concentrações da NAC inferior e igual a CIM (25 e 12,5 mg/mL) inibiram a biomassa em 77 e 34%, respectivamente. Essa redução de biomassa foi superior do que a observada em outro estudo, no qual a NAC subCIM a 4 e 8 mg/mL reduziu a biomassa de isolados clínicos de *C. albicans* em 32,8 e 43,5%, respectivamente⁴⁵. O resultado da presente investigação também demonstrou que a NAC apresentou uma ação antibiofilme somente para CaS durante a formação de biofilme por 48h, já que para CaR as concentrações subCIM apresentaram valores de biomassa semelhantes ao controle. Adicionalmente, após 48 h para CaS, houve aumento da viabilidade fúngica em 0,74 \log_{10} na presença da NAC 12,5 mg/mL, ressaltando novamente o cuidado que se deve ser tomado com baixas concentrações de NAC, pelo risco da possibilidade de apresentarem um efeito oposto do esperado.

Quando a NAC foi avaliada na formação do biofilme em tempos reduzidos, a CIM (25 mg/mL) reduziu a formação de biofilme na fase inicial (6 h), enquanto que concentrações da NAC acima da CIM diminuíram a formação de biofilme em todas as etapas (6, 12 e 24 h), tanto para CaS como para CaR. Apesar da NAC a 25 mg/mL (CIM) não ter sido avaliada nos estágios intermediários (12 e 24 h) da formação do biofilme, os resultados observados no tempo de ação corroboram com aqueles encontrados na formação de biofilme por 48 h, em que apenas a NAC a 100 e 50 mg/mL reduziram a formação do biofilme.

Já para o biofilme maduro, a NAC promoveu redução de viabilidade de 1,12 e 2,30 \log_{10} para ambas as cepas na concentração de 100 mg/mL. Para CaR, as concentrações de 50 e 25 mg/mL também promoveram redução da viabilidade em 1,26 e 0,64 \log_{10} . Assim, verificou-se que NAC foi mais efetiva para inativação de biofilme maduro de CaR. Outros estudos também verificaram redução de viabilidade de biofilme maduro de *C. albicans*^{45,46}. Em biofilmes de 24 h, a NAC 32 mg/mL reduziu a atividade metabólica do biofilme em 50% e a NAC 16 mg/mL reduziu a viabilidade fúngica após 24, 48 e 72 h em cerca de 1 \log_{10} ⁴⁶. Na presente investigação, a NAC 100 mg/mL reduziu a biomassa de ambas as cepas avaliadas em 69 a 72%. Entretanto, só em CaR as concentrações de 50 e 25 mg/mL reduziram a biomassa de biofilmes maduros, com redução de 64 e 48%, respectivamente. Num estudo prévio, 4 e 8 mg/mL da NAC reduziram a biomassa em 50 a 95,2% de biofilmes de isolados clínicos de *C. albicans*⁴⁵. Esses resultados demonstram que a NAC é capaz de desestruturar biofilmes maduros de *C. albicans*, o que num contexto clínico pode ser bastante promissor para o tratamento de infecções causadas por esses biofilmes.

Outro aspecto original da presente investigação, além da utilização de uma cepa resistente ao fluconazol, foi a avaliação da NAC sobre a composição da matriz do biofilme fúngico. Embora o tamanho da amostra estudada tenha sido pequena, os resultados iniciais mostraram que a NAC parece reduzir os compostos solúveis e insolúveis da matriz do biofilme para ambas as linhagens. Não foi encontrado na literatura o efeito da NAC sobre a matriz de *C. albicans*, o que impossibilita uma discussão direta dos resultados da atual pesquisa. Entretanto, a NAC já teve seu efeito estudado sobre os polissacarídeos extracelulares do sobrenadante de cepas bacterianas^{41,44}.

Um estudo investigou 10 cepas bacterianas monoespécie e uma multiespécie (7 espécies)⁴⁴, o outro avaliou 18 isolados clínicos de *P. aeruginosa*⁴¹. Nos dois trabalhos foi utilizado uma metodologia distinta da atual pesquisa para quantificação dos polissacarídeos solúveis, uma versão modificada do método de hidrólise ácida de Dall e Herndon⁹⁸, com precipitação dos polissacarídeos em etanol e um processo de desidratação com ácido concentrado de furfural e triptofano^{41,44}. A pesquisa envolvendo as várias cepas bacterianas detectou que a NAC 0,5 mg/mL reduziu a produção de polissacarídeos extracelulares (PECs) na maioria das bactérias testadas, mas não foi capaz de degradar os polissacarídeos quando estes já estavam presentes⁴⁴. Na outra pesquisa envolvendo *P. aeruginosa*, a NAC a 0,5 mg/mL e 1mg/mL reduziu o PEC de biofilmes maduros⁴¹. Na presente investigação, apenas NAC acima da CIM (100 e 50 mg/mL, para biofilmes pré-formados e formação de biofilme, respectivamente) pareceu reduzir os compostos da matriz, enquanto que a NAC subCIM (12,5 mg/mL para formação de biofilme) aparentou não ter efeito (valores semelhantes ao controle sem NAC). Assim, a NAC a subCIM parece ser eficaz na redução do PEC apenas em biofilmes bacterianos.

Na análise do peso seco total (biofilme resuspendido), a concentração de 50 mg/mL de NAC, em ambas as cepas (biofilme em formação), resultou em valores inferiores ao grupo controle (0 mg/mL); essa redução inclui os componentes solúveis e insolúveis do biofilme. Esses menores valores de peso seco na concentração de 50 mg/mL já eram esperados, uma vez que se trata de uma concentração superior à CIM (25 mg/mL), a qual entrou em contato com as células logo após a fase de aderência. Dessa forma, houve uma inibição das células fúngicas pela NAC, e uma redução das células viáveis para formação do biofilme. Em contrapartida, a concentração de 12,5 mg/mL resultou numa tendência a maiores valores de peso seco total. Esse comportamento foi compatível com os dados prévios do atual estudo, no qual tal concentração aumentou a viabilidade fúngica. Já no biofilme maduro, as amostras para ambas as cepas, em virtude da alta variabilidade, aparentam ter valores semelhantes ao controle.

No peso seco do *pellet*, ou seja, peso proveniente apenas dos componentes insolúveis do biofilme, as concentrações 100 mg/mL (biofilme maduro) e 50 mg/mL (biofilme em formação) da NAC apresentaram valores médios inferiores ao grupo controle. Apesar de serem dados descritivos, este fato sugere que a NAC nessas

concentrações tem uma tendência de reduzir os componentes do *pellet* (células e componentes insolúveis da matriz).

Analisando a ação da NAC sobre os componentes da matriz provenientes da porção solúvel do biofilme (WSP, eDNA e proteínas do sobrenadante), é possível observar um efeito mais evidente em CaS, comparada com CaR. Este comportamento pode ser explicado pelos ensaios anteriores, nos quais CaS, tanto no biofilme maduro quanto no em formação, apresentou maiores valores de biomassa pela técnica do cristal violeta. Dessa forma, possivelmente o biofilme de CaS pode apresentar uma maior quantidade de substratos para a ação da NAC, o que torna a diferença entre os grupos desta cepa mais evidentes. Entretanto esse mecanismo de ação da NAC para os componentes solúveis precisa ser explorado posteriormente.

A redução dos componentes de WSP e peso seco total corroboram com o trabalho que analisou o efeito do fluconazol na composição da MEC de biofilme de CaS e CaR⁸⁵. Embora esse estudo⁸⁵ não trabalhe com a NAC, ele usa a mesma cepa CaR, a mesma metodologia e também compartilham da ideia de que a redução do WSP e peso seco total podem ser um reflexo da susceptibilidade dos biofilmes aos tratamentos⁸⁵. O CMG é mantido em parte pela estabilidade da interação dos PECs da matriz (β -1,6 glucano, β -1,3 glucano e α -mananas)⁸². Dessa forma, a redução de WSP da matriz pela NAC pode alterar a estrutura do CMG e gera uma maior suscetibilidade do biofilme à terapia antifúngica.

Para a quantificação das proteínas presentes no pellet foi observado que algumas amostras apresentaram valores abaixo da curva padrão, o que impossibilitou correlacionar os valores de DO₅₉₅ das amostras com as concentrações de proteínas analisadas na curva. Devido este problema metodológico e seu alto desvio-padrão, torna-se inviável concluir algo com base nesses dados.

Analisando o ASP, apesar de descritivamente, é observado que as concentrações 100 mg/mL (biofilme maduro) e 50 mg/mL (biofilme em formação) da NAC apresentam uma tendência a valores médios inferiores aos seus respectivos controles. Se confirmado, este achado é bastante promissor, uma vez que o ASP, como o β -1,3 glucano, é um componente da MEC que dificulta a penetração de antifúngico⁸³. Logo, biofilmes com redução desses componentes podem se apresentar mais vulneráveis aos tratamentos. Em virtude do alto desvio-padrão e do reduzido número de amostras, é inviável indicar diferenças entre as cepas.

Como limitações, a presente investigação não avaliou um possível sinergismo da NAC com outros antifúngicos, não comparou os resultados da NAC com um controle positivo e utilizou um pequeno tamanho amostral para avaliar os componentes da matriz. Esta última limitação impossibilitou uma análise estatística inferencial desses dados. Um outro componente da matriz de biofilmes de *C. albicans* são os lipídeos¹⁶. Na presente investigação, tentou-se realizar também a quantificação dos lipídios dos biofilmes de CaS e CaR pelo método descrito por Frings et al.¹¹⁵ em 1972. Nesse ensaio, as amostras do pellet dos biofilmes são reagidas com uma solução de sulfo-fosfo-vanilina em banho-maria, que resulta numa reação colorimétrica que é comparada a uma curva-padrão com azeite de oliva¹¹⁵. Porém, os resultados iniciais não apontaram nenhuma tendência de comportamento e não foi possível avaliar uma quantidade de amostras suficiente mesmo para uma análise descritiva.

Os resultados observados nesse estudo possibilitam uma ideia inicial da NAC sobre o biofilme de Ca e guiam a diferentes possibilidades de investigações futuras. Entretanto, inicialmente é necessário testar mecanismos viáveis e eficazes para o uso da NAC, para só então conduzir um posterior estudo clínico para avaliar sua aplicabilidade no controle de biofilmes de Ca sobre superfícies de próteses. Há diversas maneiras do uso da NAC, desde sua incorporação em base de provas, seu uso como um tratamento superficial ou até mesmo seu uso tópico como um coadjuvante no controle de biofilmes sobre próteses dentárias e outros dispositivos médicos.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, a presente investigação concluiu que:

- 1- A NAC apresentou apenas efeito fungistático, mas não fungicida, contra CaS e CaR. Foi observado um efeito concentração-dependente, sendo que a concentração subCIM de 12,5 mg/mL apresentou um efeito oposto às concentrações acima e igual à CIM;
- 2- A NAC só apresentou efeito antibiofilme para CaS nos biofilmes em formação de 48h. Nos outros biofilmes, esse efeito foi decorrente de sua ação fungistática, uma vez que somente as concentrações que inibiram a viabilidade fúngica reduziram a biomassa tanto de biofilmes maduro como de biofilmes em formação em tempos reduzidos para ambas as cepas.
- 3- Nos componentes da matriz dos biofilmes, apesar de não ter sido possível realizar uma análise inferencial, observou-se uma tendência de redução dos componentes da matriz (WSP, ASP, proteínas e eDNA) dos biofilmes tratados com a NAC para ambas as cepas, com efeito mais evidente sobre os componentes solúveis da matriz.

REFERÊNCIAS*

1. Rautemaa R, Ramage G. Oral candidosis: clinical challenges of a biofilm disease. *Crit Rev Microbiol*. 2011; 37(4): 328-36.
2. Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol*. 2011; 49(2): 171-7.
3. Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9(2): 109-18.
4. Chandra J, Mukherjee PK. *Candida* biofilms: development, architecture, and resistance. *Microbiol Spectr*. 2015; 3(4): 1-24.
5. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013; 62(1):10-24.
6. Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9(10): 737-48.
7. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol*. 2006; 55(8): 999-1008.
8. Costa SF, Marinho I, Araújo EA, Manrique AE, Medeiros EA, Levin AS. Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. *J Hosp Infect*. 2000; 45(1): 69-72.
9. Samaranayake LP. Nutritional factors and oral candidosis. *J Oral Pathol*. 1986; 15(2): 61-5.
10. Telles DR, Karki N, Marshall MW. Oral fungal infections: diagnosis and management. *Dent Clin North Am*. 2017; 61(2): 319-49.
11. Patuwo C, Young K, Lin M, Pardi V, Murata RM. The changing role of HIV-associated oral candidiasis in the era of HAART. *J Calif Dent Assoc*. 2015; 43(2): 87-92.
12. Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: a narrative review. *Eur J Intern Med*. 2016; 34: 21-8.
13. Pfaller MA, Castanheira M. Nosocomial candidiasis: antifungal stewardship and the importance of rapid diagnosis. *Med Mycol*. 2016; 54(1): 1-22.
14. Hota B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin Infect Dis*. 2004; 39(8): 1182-9.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

15. Koo H, Yamada KM. Dynamic cell–matrix interactions modulate microbial biofilm and tissue 3D microenvironments. *Curr Opin Cell Biol.* 2016; 42: 102-12.
16. Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt J, et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio.* 2014; 5(4): 1-13.
17. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(9): 623-33.
18. Vergani CE, Sanitá PV, Mima EG, Pavarina AC, Machado AL. Oral candidiasis: conventional and alternative treatment options. In: Contreras F, Fuentes P. *Candidiasis: epidemiology, symptoms and treatment options.* Hauppauge: Nova Science Publishers; 2013. p. 85-116.
19. Appleton, SS. *Candidiasis: pathogenesis, clinical characteristics, and treatment.* Calif Dent Assoc. J. 2000; 28(12): 942-8.
20. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011; 75(2): 213-67.
21. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11(2): 382–402.
22. Rex JH, Alexander BD, Andes D, Arthington-Skaggs B, Brown SD, Chaturvedi V, et al, editors. M27-A3: reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved Standard. 3rd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
23. Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavalieri M, Coenen S, et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect.* 2015; 6: 22–9.
24. Millea PJ. N-acetylcysteine: multiple clinical applications. *Am Fam Physician.* 2009; 80(3): 265–9.
25. Stey C, Steurer J, Bachmann S, Medici TC, Tramèr MR. The effect of oral N-acetylcysteine in chronic bronchitis: a quantitative systematic review. *Eur Respir J.* 2000; 16(2): 253-62.
26. Henke MO, Ratjen F. Mucolytics in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev.* 2007; 8(1): 24–9.
27. Quah SY, Wu S, Lui JN, Sum CP, Tan KS. N-acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2012; 38(1): 81-5.
28. Rasmussen K, Nikrad J, Reilly C, Li Y, Jones RS. N-Acetyl-L-cysteine effects on multi-species oral biofilm formation and bacterial ecology. *Lett Appl Microbiol.* 2016; 62(1): 30-8.

29. Moon JH, Choi YS, Lee HW, Heo JS, Chang SW, Lee JY. Antibacterial effects of N-acetylcysteine against endodontic pathogens. *J Microbiol.* 2016; 54(4): 322-9.
30. Onger ME, Gocer H, Emir D, Kaplan S. N-acetylcysteine eradicates *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in bone cement. *Scanning.* 2016; 38(6): 766-70.
31. Eroshenko D, Polyudova T, Korobov V. N-acetylcysteine inhibits growth, adhesion and biofilm formation of Gram-positive skin pathogens. *Microb Pathog.* 2017; 105: 145-52.
32. Sevier CS, Kaiser CA. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(11): 836-47.
33. Buijtelts PC, Petit PL. Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J Microbiol Methods.* 2005; 62(1): 83-8.
34. Blasi F, Page C, Rossolini GM, Pallecchi L, Matera MG, Rogliani P, et al. The effect of N-acetylcysteine on biofilms: Implications for the treatment of respiratory tract infections. *Respir Med.* 2016; 117: 190-7.
35. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [homepage na internet]. Molécula usada como mucolítico pode combater doenças bacterianas em culturas agrícolas [acesso em 11 out 2018]. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/molecula-usada-como-mucolitico-pode-combater-doencas-bacterianas-em-culturas-agricolas/28918/>
36. Aiassa V, Zoppi A, Becerra MC, Albesa I, Longhi MR. Enhanced inhibition of bacterial biofilm formation and reduced leukocyte toxicity by chloramphenicol:β-cyclodextrin:N-acetylcysteine complex. *Carbohydr Polym.* 2016; 152: 672-8.
37. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine-a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol.* 2007; 7: 355–9.
38. Muranaka LS, Giorgiano TE, Takita MA, Forim MR, Silva LF, Coletta-Filho HD, et al. N-acetylcysteine in agriculture, a novel use for an old molecule: focus on controlling the plant-pathogen *Xylella fastidiosa*. *PLoS One.* 2013; 8(8): 1-14.
39. Corsello SM, Bittker JA, Liu Z, Gould J, McCarren P, Hirschman JE, et al. The drug repurposing hub: a next-generation drug library and information resource. *Nat Med.* 2017; 23(4): 405-8.
40. del Prado G, Ruiz V, Naves P, Rodríguez-Cerrato V, Soriano F, del Carmen Ponte M. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* strains and effects of human serum albumin, ibuprofen, N-acetyl-L-cysteine, amoxicillin, erythromycin, and levofloxacin. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010; 67(4): 311-8.
41. Zhao T, Liu Y. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 140.

42. Marchese A, Bozzolasco M, Gualco L, Debbia EA, Schito GC, Schito AM. Effect of fosfomycin alone and in combination with N-acetylcysteine on *E. coli* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2003; 22(2): 95-100.
43. Perez-Giraldo C, Rodriguez-Benito A, Moran F, Hurtado C, Blanco MT, Gomez-Garcia AC. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother*. 1997; 39(5): 643–6.
44. Olofsson AC, Hermansson M, Elwing H. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69(8): 4814-22.
45. El-Baky RMA, El Ela DMMA, Gad GFM. N-acetylcysteine inhibits and eradicates *Candida albicans*. *Biofilms Am J Infect Dis Microbiol*. 2014; 2(5): 122-30.
46. Venkatesh M, Rong L, Raad I, Versalovic J. Novel synergistic antibiofilm combinations for salvage of infected catheters. *J Med Microbiol*. 2009; 58(7): 936-44.
47. Aslam S, Darouiche RO. Role of antibiofilm-antimicrobial agents in controlling device-related infections. *Int J Artif Organs*. 2011; 34(9): 752-8.
48. Dignani M-C, Solomkin JS, Anaissie EJ. *Candida* clinical mycology. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2009. p. 197–229.
49. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20(1): 133-63.
50. Ohshima T, Ikawa S, Kitano K, Maeda N. A proposal of remedies for oral diseases caused by *Candida*: A mini review. *Front Microbiol*. 2018; 9: 1522.
51. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2012; 36(2): 288–305.
52. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. SCOPE Participant Group. Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998; 30(2): 121-9.
53. Colombo A, Guimarães T, Camargo LF. Brazilian guidelines for the management of candidiasis: a joint meeting report of three medical societies. *Braz J Infect Dis* 2013; 17(3): 283–312.
54. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 10(2): 112–22.
55. Odds FC. *Candida* and candidosis: a review and bibliography. 2nd ed. London: Bailliere Tindal; 1988. 476 p.

56. Crampin H, Finley K, Gerami-Nejad M, Court H, Gale C, Berman J, et al. *Candida albicans* hyphae have a Spitzenkorper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae. *J Cell Sci.* 2005; 118: 2935-47.
57. Leberer E, Harcus D, Dignard D, Johnson L, Ushinsky S, Thomas DY, et al. Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 2001; 42(3): 673-87.
58. Moyes DL, Richardson JP, Naglik JR. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence.* 2015; 6: 338–46.
59. Paramonova E, Krom BP, Van der Mei HC, Busscher HJ, Sharma PK. Hyphal content determines the compression strength of *Candida albicans* biofilms. *Microbiology.* 2009; 155: 1997–2003.
60. Pierce CG, Vila T, Romo JA, Montelongo-Jauregui D, Wall G, Ramasubramanian A, et al. The *Candida albicans* biofilm matrix: composition, structure and function. *J Fungi (Basel).* 2017; 3(1): 1-9.
61. Harriott MM, Noverr MC. Importance of *Candida* bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol.* 2011; 19: 557–63.
62. Han TL, Cannon RD, Villas-Bôas SG. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genet Biol.* 2011; 48(8): 747-63.
63. Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res.* 2010; 89(3): 205-18.
64. Kucharíková S, Tournu H, Lagrou K, Van Dijck P, Bujdáková H. Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. *J Med Microbiol.* 2016; 60(9): 1261-9.
65. Ramage G, VandeWalle K, Lopez-Ribot JL, Wickes BL. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; 214: 95–100.
66. Li F, Palecek SP. Distinct domains of the *Candida albicans* adhesin Eap1p mediate cell-cell and cell-substrate interactions. *Microbiology.* 2008; 154: 193–203.
67. Nobile CJ, HA Schneider, JE Nett, DC Sheppard, SG Filler, DR Andes, et al. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol.* 2008; 18: 1017–24.
68. Nobile CJ, Nett JE, Hernday AD, Homann OR, Deneault JS, Nantel A, et al. Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. *PLoS Biol.* 2009; 7(6): 1-15.

69. Uppuluri P, Pierce CG, Thomas DP, Bubeck SS, Saville SP, Lopez-Ribot JL. The transcriptional regulator Nrg1p controls *Candida albicans* biofilm formation and dispersion. *Eukaryot Cell*. 2010; 9(10): 1531-7.
70. Klotz SA, Chasin BS, Powell B, Gaur NK, Lipke PN. Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007; 59: 401–6.
71. Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol*. 2013; 28(2): 83-101.
72. Adam B, Baillie GS, Douglas LJ. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol*. 2002; 51: 344–9.
73. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun*. 2014; 82(5): 1968-81.
74. Pammi M, Liang R, Hicks JM, Barrish J, Versalovic J. Farnesol decreases biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and exhibits synergy with nafcillin and vancomycin. *Pediatr Res*. 2011; 70: 578–83.
75. Hall RA, Turner KJ, Chaloupka J, F Cottier, L De Sordi, D Sanglard, et al. The quorum-sensing molecules farnesol/homoserine lactone and dodecanol operate via distinct modes of action in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2011; 10: 1034–42.
76. Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog*. 2010; 6(4): 1-4.
77. Uppuluri P, Chaturvedi AK, Srinivasan A, Banerjee M, Ramasubramaniam AK, Köhler JR, Kadosh D, Lopez-Ribot JL. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog*. 2010; 6(3): 1-13.
78. Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. Fungal super glue: The biofilm matrix and its composition, assembly, and functions. *PLoS Pathog*. 2016; 12(9): 1-6.
79. Hynes RO, Yamada KM, Editors. *Extracellular matrix biology*. Cold Spring Harbor: Laboratory Press; 2012. 387 p.
80. Peterson BW, He Y, Ren Y, Zerdoum A, Libera MR, Sharma PK, et al. Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. *FEMS Microbiol Rev*. 2015; 39: 234-45.
81. Zarnowski R, Sanchez H, Andes DR. Large-scale production and isolation of *Candida* biofilm extracellular matrix. *Nat Protoc*. 2016; 11(12): 2320-7.
82. Mitchell KF, Zarnowski R, Sanchez H, Edward JA, Reinicke EL, Nett JE, et al. Community participation in biofilm matrix assembly and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(13): 4092-7.

83. Nett JE, Sanchez H, Cain MT, Andes DR. Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan. *J Infect Dis.* 2010; 202: 171–5.
84. Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, Cleary IA, Henriques M, Lopez-Ribot JL, et al. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia.* 2010; 169: 323–31.
85. Panariello BHD, Klein MI, Mima EGO, Pavarina AC. Fluconazole impacts the extracellular matrix of fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *J Oral Microbiol.* 2018; 10(1):1-12.
86. Scully C, El-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1994; 5(2): 125–57.
87. Anibal PC, Sardi JCO, Peixoto IT, Moraes JJC, Höfling JF. Conventional and alternative antifungal therapies to oral candidiasis. *Braz J Microbiol.* 2010; 41(4): 824-31.
88. Lee W, Lee DG. A novel mechanism of fluconazole: fungicidal activity through dose-dependent apoptotic responses in *Candida albicans*. *Microbiology.* 2018; 164(2): 194-204.
89. Ghannoum M, Roilides E, Katragkou A, Petratis V, Walsh TJ. The role of echinocandins in *Candida* biofilm-related vascular catheter infections: in vitro and in vivo model systems. *Clin Infect Dis.* 2015; 61(6): 618-21.
90. Sheppard D, Lampiris HW. *Farmacologia básica e clínica: agentes antifúngicos.* Porto Alegre: McGraw-Hill; 2008. p. 707-14.
91. Girmenia C. New generation azole antifungals in clinical investigation. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009; 18(9): 1279-95.
92. Walsh TJ, Azie N, Andes DR. Development of new strategies for echinocandins: progress in translational research. *Clin Infect Dis.* 2015; 61(6): 601-3
93. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, et al. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(2): 510-20.
94. Odds FC. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungal. *J Antimicrob. Chemother.* 1993; 31(4): 463-71.
95. Walker LA, Gow NA, Munro CA. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol.* 2010; 47(2): 117-26.
96. Baek YU, Kim YR, Yim HS, Kang SO. Disruption of gamma-glutamylcysteine synthetase results in absolute glutathione auxotrophy and apoptosis in *Candida albicans*. *FEBS Lett.* 2004; 556(3): 47-52.

97. Lappas M, Permezel M, Rice GE. N-Acetyl-cysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and nuclear factor-kappa B deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(4):1723-9.
98. Dall L, Herndon B. Quantitative assay of glycocalyx produced by viridans group streptococci that cause endocarditis. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 2039–41.
99. Quishida CC, Mima EG, Dovigo LN, Jorge JH, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using Photodithazine(®) and LED light after one and three successive applications. *Lasers Med Sci.* 2015; 30(9): 2303-12.
100. Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol.* 2014; 12(5): 405.
101. Moon JH, Jang EY, Shim KS, Lee JY. In vitro effects of N-acetyl cysteine alone and in combination with antibiotics on *Prevotella intermedia*. *J Microbiol.* 2015; 53(5): 321-9.
102. Kwok K, Chang J, Lo S, Giap A, Lim B, Wu B. A novel adjunctive cleansing method to reduce colony-forming units on duodenoscopes. *Endosc Int Open.* 2016; 4(11): 1178–82.
103. Aiassa V, Zoppi A, Becerra MC, Albesa I, Longhi MR. Enhanced inhibition of bacterial biofilm formation and reduced leukocyte toxicity by chloramphenicol: β -cyclodextrin:N-acetylcysteine complex. *Carbohydr Polym.* 2016; 152: 672-8.
104. Kashef N, Karami S, Djavid GE. Phototoxic effect of hypericin alone and in combination with acetylcysteine on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015; 12(2): 186-92.
105. Ercan UK, Smith J, Ji HF, Brooks AD, Joshi SG. Chemical changes in nonthermal plasma-treated N-acetylcysteine (NAC) solution and their contribution to bacterial inactivation. *Sci Rep.* 2016; 6: 2-13.
106. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc.* 2008; 3(12): 1909-24.
107. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2000; 40(2):175-9.
108. Panariello BHD, Klein MI, Pavarina AC, Duarte S. Inactivation of genes TEC1 and EFG1 in *Candida albicans* influences extracellular matrix composition and biofilm morphology. *J Oral Microbiol.* 2017; 9(1): 1385372.
109. Chiba A, Sugimoto S, Sato F, Hori S, Mizunoe Y. A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability. *Microb Biotechnol.* 2015; 8(3): 392-403.

110. Combrouse T, Sadovskaya I, Faille C, Kol O, Guérardel Y, Midelet-Bourdin G. Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilms of different phylogenic lineages with optimization of culture conditions. *J Appl Microbiol.* 2013; 114(4): 1120-31.
111. Andersson S, Dalhammar G, Kuttuva Rajarao G. Influence of microbial interactions and EPS/polysaccharide composition on nutrient removal activity in biofilms formed by strains found in wastewater treatment systems. *Microbiol Res.* 2011; 166(6): 449-57.
112. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248–54.
113. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 1956; 28: 350–6.
114. Rice KC, Mann EE, Endres JL, Weiss EC, Cassat JE, Smeltzer MS, et al. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(19): 8113-8.
115. Frings CS, Fendley TW, Dunn RT, Queen CA. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Clin Chem.* 1972; 18(7): 673-4.

APÊNDICE A – OUTPUT SPSS

Resultados de testes estatísticos (ANOVA/Welch e Kruskal-Wallis) para CaS e CaR demonstraram diferenças significativas entre os grupos.

Concentração fungicida mínima (CFM)

Tabela A1 - Output dos resultados de testes paramétricos ANOVA com correção de Welch para CaS (a), CaR (b) submetidas à NAC após 24h e CaR (d) submetidas à NAC após 48h. Testes não paramétricos Kruskal-Wallis para CaS (c) submetidas à NAC após 48h (continua).

a	ANOVA/Welch		Log UFC/mL		
	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	153,664	3	51,221	90,619	0
Dentro de grupos	22,213	22,273	0,505		
Total	175,877	25,273			

b	ANOVA/Welch		Log UFC/mL		
	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	96,242	3	32,081	938,554	0
Dentro de grupos	5,111	22,737	0,116		
Total	101,352	25,737			

c	Resumo do teste de hipótese		Absorbância	
	Hipótese Nula	Teste	Sig.	Decisão
	A distribuição do UFC é igual em categorias de grupos	Teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes	,000	Rejeita hipótese nula
Nível de significância de ,05				

Tabela A1 - Output dos resultados de testes paramétricos ANOVA com correção de Welch para CaS (a), CaR (b) submetidas à NAC após 24h e CaR (d) submetidas à

NAC após 48h. Testes não paramétricos Kruskal-Wallis para CaS (c) submetidas à NAC após 48h (conclusão).

d	ANOVA/Welch		Log (UFC/mL)		
	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	91,972	3	30,657	143,872	0
Dentro de grupos	5,423	22,616	0,123		
Total	97,395	25,616			

Fonte: Elaboração própria.

Efeito da NAC na formação do biofilme 48h (Viabilidade e biomassa)

Tabela A2 - Output dos resultados de testes paramétricos ANOVA/Welch para viabilidade de CaS (a) e CaR (b) e biomassa de CaS (c) e CaR (d) submetidas à NAC durante a formação do biofilme por 48h (continua).

a	ANOVA/Welch		Log (UFC/mL)		
	Soma dos quadrados	Gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	74,002	4	18,501	73,822	0
Dentro de grupos	26,161	46,633	0,275		
Total	100,163	50,633			

Tabela A2 - Output dos resultados de testes paramétricos ANOVA/Welch para viabilidade de CaS (a) e CaR (b) e biomassa de CaS (c) e CaR (d) submetidas à NAC durante a formação do biofilme por 48h (conclusão).

b	ANOVA/Welch		Log (UFC/mL)		
	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	74,029	4	18,507	58,39	0
Dentro de grupos	11,682	26,977	0,212		
Total	85,711	30,977			

c	ANOVA/Welch		Absorbância		
	Soma dos quadrados	Gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	61,427	4	15,357	297,947	0
Dentro de grupos	24,112	23,45	0,438		
Total	85,539	27,45			

d	ANOVA		Absorbância		
	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	9,753	4	2,438	5,867	0,001
Dentro de grupos	22,857	55	0,416		
Total	32,61	59			

Fonte: Elaboração própria.

Menor tempo de ação da NAC sobre biofilmes em formação

Tabela A3 - Output dos resultados de testes paramétricos ANOVA com correção de Welch para viabilidade de CaS (a) e CaR (b) e biomassa de CaR (d) submetidas à NAC durante a formação do biofilme por 24h. testes não paramétricos Kruskal-Wallis para biomassa em CaS (c) submetidas à NAC durante a formação do biofilme por 24h (continua).

a	ANOVA/Welch		Log (UFC/mL)		
	Soma dos quadrados	Gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	27,84	2	13,92	42,832	0
Dentro de grupos	7,317	19,001	0,222		
Total	35,156	21,001			

b	ANOVA/Welch		Log (UFC/mL)		
	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	16,421	2	8,211	39,364	0
Dentro de grupos	8,832	16,268	0,294		
Total	25,253	18,268			

c	Resumo do teste de hipótese	Absorbância	
Hipótese Nula	Teste	Sig.	Decisão
A distribuição do UFC é igual em categorias de grupos	Teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes	,000	Rejeita hipótese nula

Nível de significância de ,05

Tabela A3 - Output dos resultados de testes paramétricos ANOVA com correção de Welch para viabilidade de CaS (a) e CaR (b) e biomassa de CaR (d) submetidas à NAC durante a formação do biofilme por 24h. testes não paramétricos Kruskal-Wallis para biomassa em CaS (c) submetidas à NAC durante a formação do biofilme por 24h (conclusão).

d	ANOVA	Absorbância			
		gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	7,975	2	3,987	6,879	0,003
Dentro de grupos	19,127	33	0,58		
Total	27,102	35			

Fonte: Elaboração própria.

Tabela A4 - Output dos resultados de testes paramétricos ANOVA/Welch para viabilidade de CaS (a) e CaR (b) e biomassa de CaS (c) e CaR (d) submetidas à NAC durante a formação do biofilme por 12h (continua).

a	ANOVA	Log (UFC/mL)			
		Gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	4,893	2	2,446	24,068	0
Dentro de grupos	3,354	33	0,102		
Total	8,247	35			

Tabela A4 - Output dos resultados de testes paramétricos ANOVA/Welch para viabilidade de CaS (a) e CaR (b) e biomassa de CaS (c) e CaR (d) submetidas à NAC durante a formação do biofilme por 12h (conclusão).

b	ANOVA/Welch	Log (UFC/mL)			
	Soma dos quadrados	GI	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	12,532	2	6,266	39,156	0
Dentro de grupos	9,348	18,257	0,283		
Total	21,881	20,257			

c	ANOVA	Absorbância			
	Soma dos quadrados	GI	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	37,958	2	18,979	87,173	0
Dentro de grupos	7,185	33	0,218		
Total	45,143	35			

d	ANOVA/Welch	Absorbância			
	Soma dos quadrados	GI	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	14,599	2	7,3	12,061	0
Dentro de grupos	12,659	20,572	0,384		
Total	27,258	22,572			

Fonte: Elaboração própria.

Tabela A5 - Output dos resultados de viabilidade por testes não paramétricos Kruskal-Wallis para CaS (a) e ANOVA para CaR (b) submetidas à NAC durante a formação do biofilme por 6h. ANOVA/Welch para CaS (c) e CaR (d) para análise de absorvância em biofilmes submetidas à NAC por 6h (continua).

a		Resumo do teste de hipótese		Log (UFC/mL)	
Hipótese Nula		Teste		Sig.	Decisão
As médias de UFC são as iguais em todas as categorias de grupos		Teste mediano de amostras independentes		,000	Rejeita hipótese nula
A distribuição do UFC é igual em categorias de grupos		Teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes		,000	Rejeita hipótese nula

Nível de significância de ,05

b		ANOVA		Log (UFC/mL)		
		Soma dos quadrados	Gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	17,709	3	5,903	31,717	0	
Dentro de grupos	8,189	44	0,186			
Total	25,899	47				

c		ANOVA/Welch		Absorvância		
		Soma dos quadrados	Gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	55,429	3	18,476	280,096	0	
Dentro de grupos	10,537	23,731	0,239			
Total	65,967	26,731				

Tabela A5 - Output dos resultados de viabilidade por testes não paramétricos Kruskal-Wallis para CaS (a) e ANOVA para CaR (b) submetidas à NAC durante a formação do biofilme por 6h. ANOVA/Welch para CaS (c) e CaR (d) para análise de absorvância em biofilmes submetidas à NAC por 6h (conclusão).

d	ANOVA/Welch		Absorvância		
	Soma dos quadrados	Gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	23,677	3	7,892	44,208	0
Dentro de grupos	2,537	18,435	0,07		
Total	26,214	21,435			

Fonte: Elaboração própria.

Efeito da NAC sobre biofilmes maduros

Tabela A6- Output dos resultados de testes paramétricos ANOVA e ANOVA com correção de Welch viabilidade de CaS (a) e CaR (b) e biomassa de CaS (c) e CaR (d) submetidas à NAC em biofilmes maduros de 48h (continua).

a	ANOVA/Welch		Log (UFC/mL)		
	Soma dos quadrados	Gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	1,99236E+14	4	4,98089E+13	63,414	0
Dentro de grupos	2,10613E+14	23,276	3,82933E+12		
Total	4,09849E+14	27,276			

Tabela A6- Output dos resultados de testes paramétricos ANOVA e ANOVA com correção de Welch viabilidade de CaS (a) e CaR (b) e biomassa de CaS (c) e CaR (d) submetidas à NAC em biofilmes maduros de 48h (conclusão).

b	ANOVA/Welch	Log(UFC/mL)			
	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	42,902	4	10,726	27,131	0
Dentro de grupos	18,58	25,602	0,338		
Total	61,483	29,602			

c	ANOVA	Absorbância			
	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	43,969	4	10,992	41,632	0
Dentro de grupos	15,842	60	0,264		
Total	59,811	64			

d	ANOVA	Absorbância			
	Soma dos quadrados	gl	Quadrado médio	F	Sig.
Entre Grupos	18,063	4	4,516	18,308	0
Dentro de grupos	11,767	23,929	0,235		
Total	29,829	27,929			

Fonte: Elaboração própria.

APÊNDICE B – CURVAS PADRÃO DOS COMPONENTES DA MATRIZ

Curva padrão das proteínas do Sobrenadante

Gráfico B1 - Curva padrão das proteínas do sobrenadante. A partir do qual gerou a equação da reta e o coeficiente de correlação para a leitura das amostras (continua).

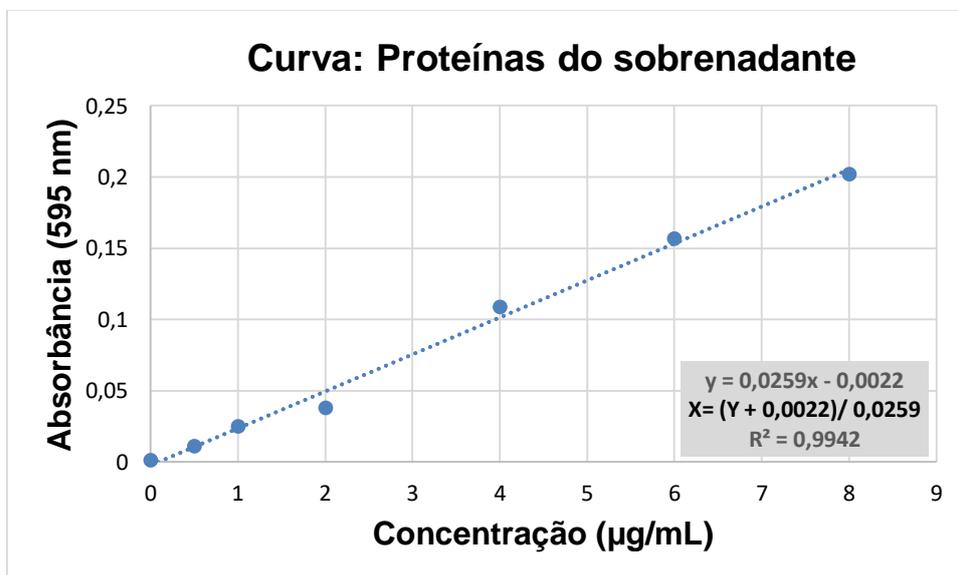
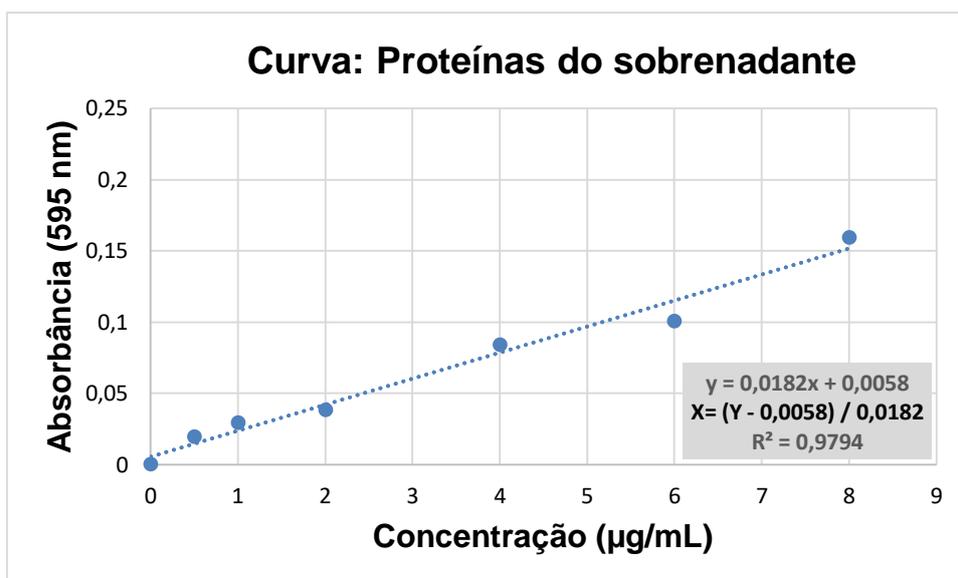
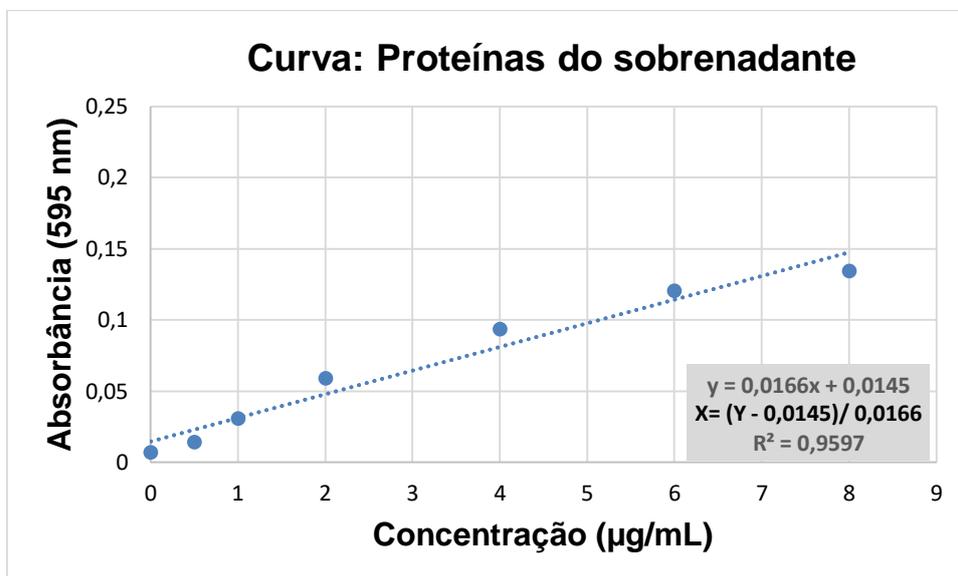


Gráfico B1 - Curva padrão das proteínas do sobrenadante. A partir do qual gerou a equação da reta e o coeficiente de correlação para a leitura das amostras (conclusão).



Fonte: Elaboração própria.

Curva padrão das proteínas do pellet

Gráfico B2 - Curva padrão das proteínas do *pellet*. A partir do qual gerou a equação da reta e o coeficiente de correlação para a leitura das amostras (continua).

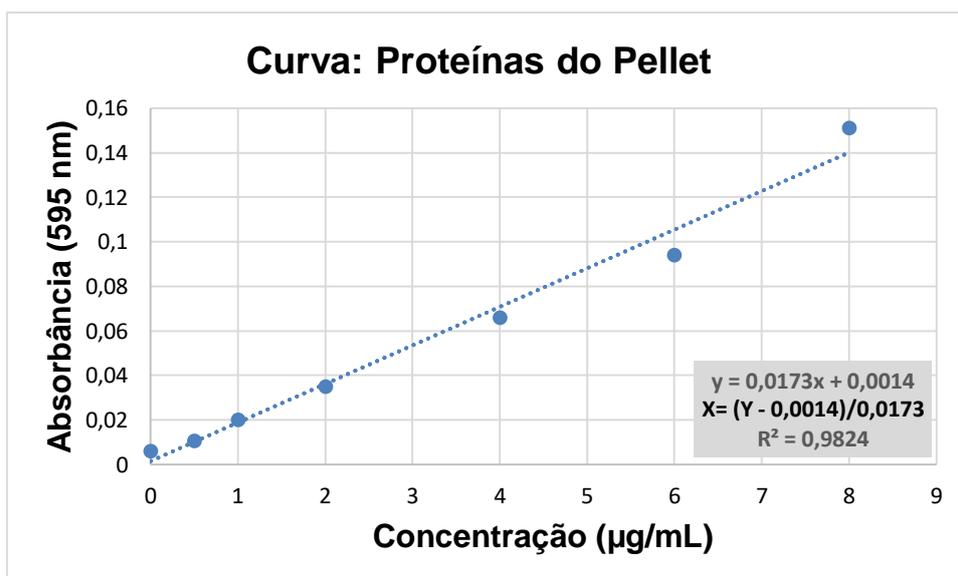
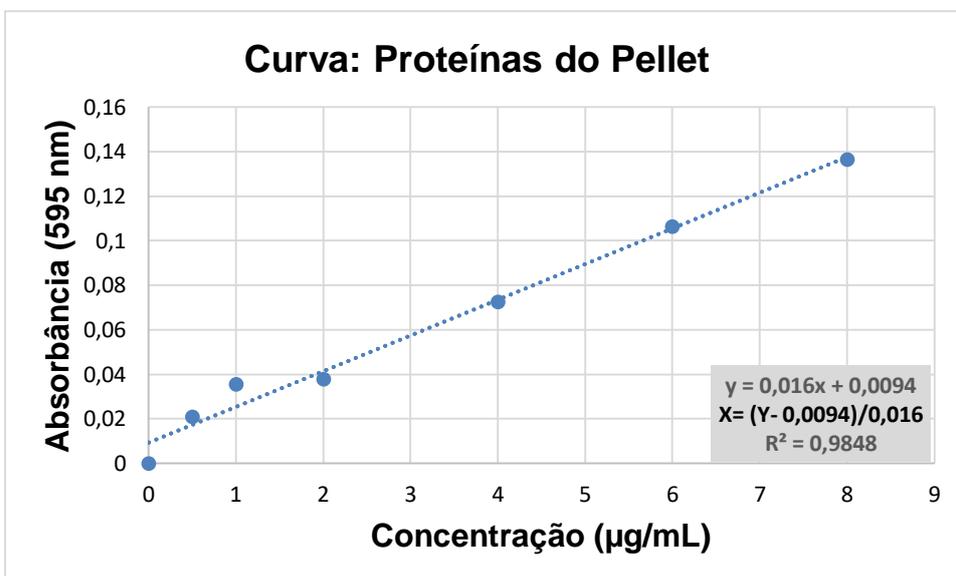


Gráfico B2 - Curva padrão das proteínas do *pellet*. A partir do qual gerou a equação da reta e o coeficiente de correlação para a leitura das amostras (conclusão).



Fonte: Elaboração própria.

Curva padrão das WSP

Gráfico B3 - Curva padrão do WSP. A partir do qual gerou a equação da reta e o coeficiente de correlação para a leitura das amostras (continua).

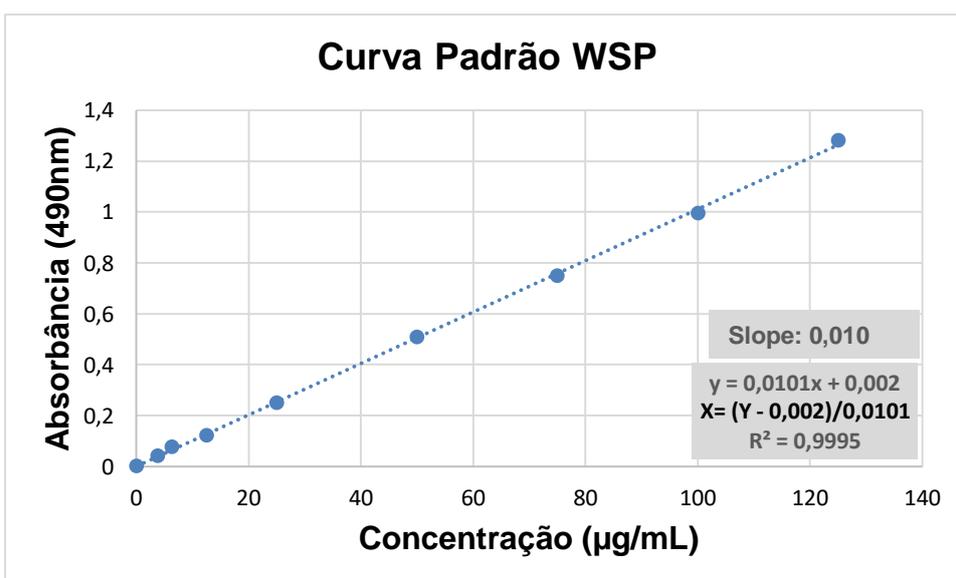
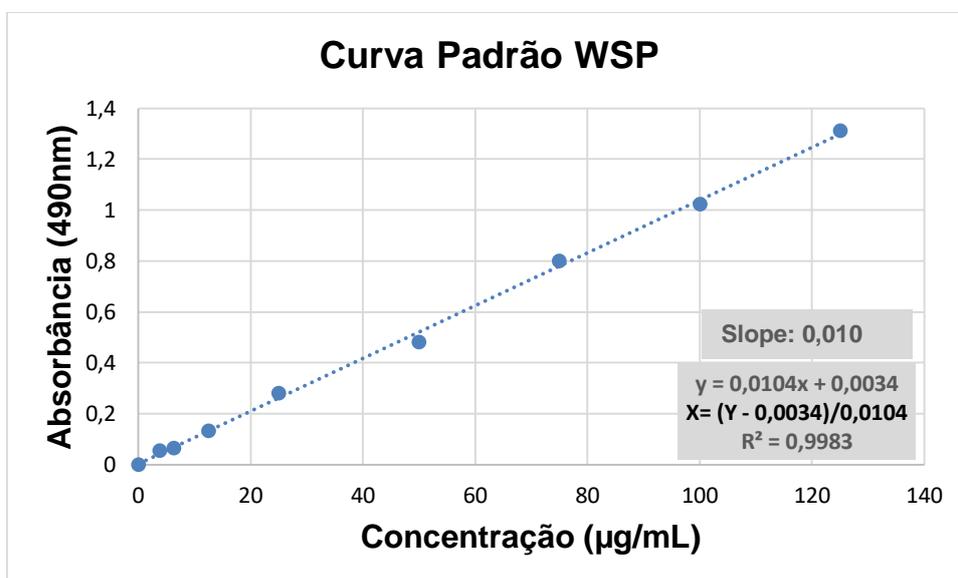
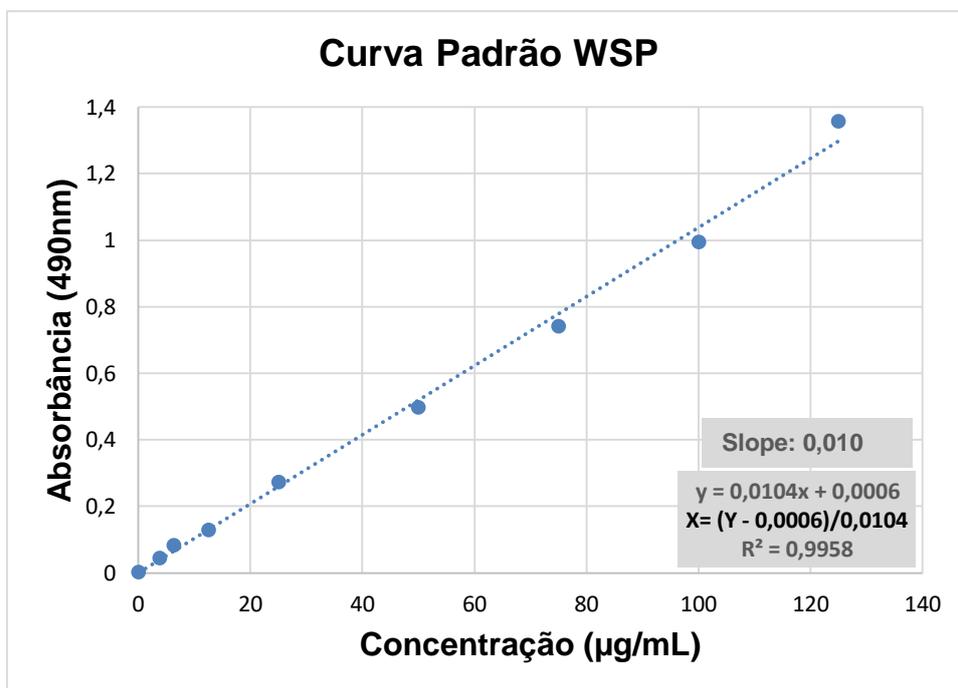


Gráfico B3 - Curva padrão do WSP. A partir do qual gerou a equação da reta e o coeficiente de correlação para a leitura das amostras (conclusão).



Fonte: Elaboração própria.

Curva padrão de ASP

Gráfico B4 - Curva padrão do ASP. A partir do qual gerou a equação da reta e o coeficiente de correlação para a leitura das amostras (continua).

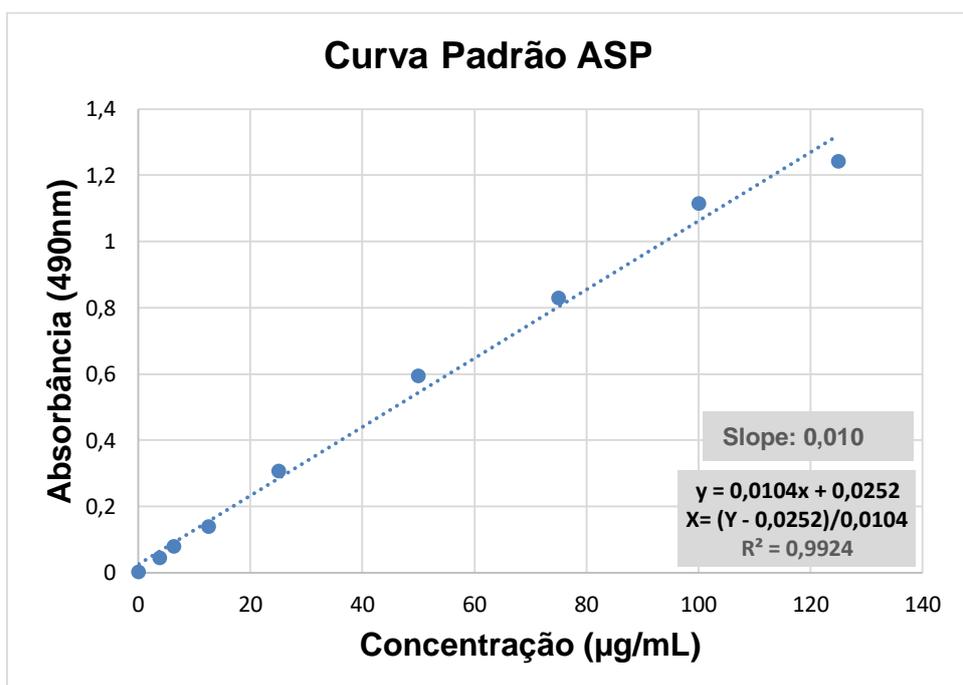
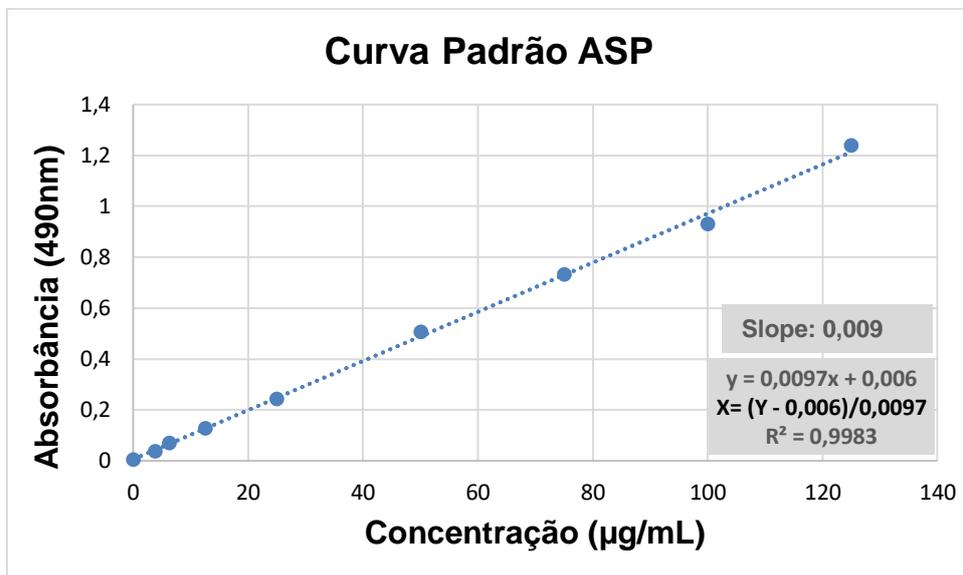
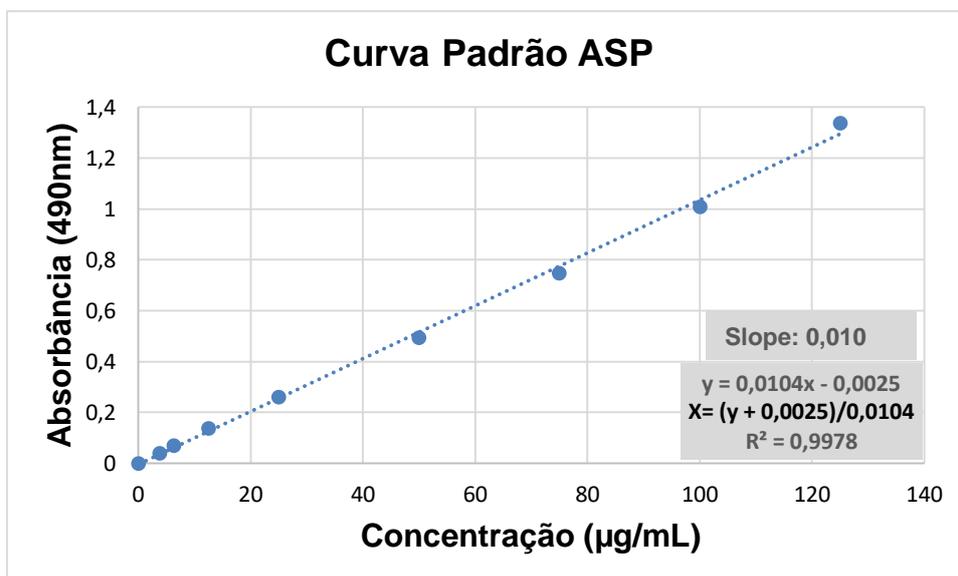


Gráfico B4 - Curva padrão do ASP. A partir do qual gerou a equação da reta e o coeficiente de correlação para a leitura das amostras (conclusão).



Fonte: Elaboração própria.

APÊNDICE C – NORMALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DA MATRIZ

Peso seco total

Figura C1 - O peso seco total corresponde ao biofilme raspado. A amostra utilizada neste passo foi de 100 µL, entretanto o volume total de biofilme raspado foi de 7,5 mL (7500 µL). Dessa forma, foi realizado o cálculo a seguir para proporcionalizar o valor obtido na amostra com o biofilme total raspado.

PESO SECO TOTAL (mg)	
Vol. total do biofilme (7500µL)	----- PESO SECO TOTAL (mg)
Vol. da amostra (100µL)	----- PESO SECO da amostra (mg)
PESO SECO TOAL (mg) = $\frac{\text{Vol. total do biofilme} \times \text{PESO SECO da amostra}}{\text{Vol da amostra (100 } \mu\text{L)}}$	

Fonte: Elaboração própria.

Peso seco do pellet

Figura C2- O peso seco do *pellet* corresponde ao pellet total do experimento biofilme (2000 µL). Como amostra utilizada foi de 500 µL, foi realizado o cálculo a seguir para proporcionalizar o peso obtido na amostra com o pellet total raspado.

PESO SECO DO PELLETT (mg)	
Vol. total do <i>pellet</i> (2000µL)	----- PESO SECO DO PELLETT (mg)
Vol. da amostra (500 µL)	----- PESO SECO da amostra (mg)
PESO SECO DO PELLETT (mg) = $\frac{\text{Vol. total do pellet} \times \text{PESO SECO da amostra}}{\text{Vol. da amostra (500 } \mu\text{L)}}$	

Fonte: Elaboração própria.

Proteínas do sobrenadante

Figura C3 - Para a quantificação das proteínas do sobrenadante foi utilizado uma amostra de 500 μL . Entretanto o volume total do sobrenadante foi de 13,3 mL. Para proporcionalizar os dados, foi realizado o cálculo abaixo.

[] PROTEÍNAS DO SOBRENADANTE ($\mu\text{g}/\text{mL}$):	
Vol. total do biofilme (13 300 μL) -----	[] PROT. DO SOBRENADANTE ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Vol. da amostra (500 μL) -----	[] Prot. amostra ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
[] PROT DO SOBRENADANTE = $\frac{\text{Vol. total do biofilme (13 300}\mu\text{l}) \times \text{[] Prot. amostra}}{\text{Vol. da amostra (500}\mu\text{L)}}$	

Fonte: Elaboração própria.

Proteínas do pellet

Figura C4 - Para a quantificação das proteínas do *pellet* foi utilizado uma amostra de 40 a 50 μL diluídas em 460 e 450 μL de água de miliQ, respectivamente. Inicialmente foi realizado um ajuste da diluição. Em seguida foi realizado a generalização dos dados para o volume total do *pellet*, que foi de 2 000 μL . Por se tratar de um componente originado do pellet, foi realizado ainda um cálculo para proporcionar a concentração encontrada para cada 1mg de peso seco de pellet. Os cálculos estão apresentados abaixo.

Ajuste da diluição:	
50 μL diluído em 500 μL ---	fator de diluição de 10
40 μL diluído em 500 μL ----	fator de diluição de 12,5
[] PROT. DO PELLETT ($\mu\text{g}/\text{mL}$):	
Vol. total do pellet (2000 μL) -----	[] PROT DO PELLETT ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Vol. da amostra (500 μL) -----	[] PROT AMOSTRA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
[] PROT DO PELLETT ($\mu\text{g}/\text{mL}$) = $\frac{\text{Vol. total do pellet (2000}\mu\text{L}) \times \text{[] PROT AMOSTRA}}{\text{Vol. da amostra (500 } \mu\text{L})}$	
[] PROT DO PELLETT/1 mg de peso seco (x)	
[] PROT DO PELLETT ($\mu\text{g}/\text{mL}$)-----	peso seco do pellet (mg)
X -----	1 mg
X = <math>\frac{\text{[] PROT DO PELLETT ($\mu\text{g}/\text{mL}$)}}{\text{peso seco do pellet em 2mL (mg)}}</math>	

Fonte: Elaboração própria.

WSP

Figura C5 - Para a quantificar o WSP foi utilizado uma amostra de 200 μL originado de um volume 1000 μL do sobrenadante ressuspendido. Então, inicialmente o valor da amostra foi proporcionado para o volume de 1000 μL . Em seguida foi realizado um cálculo para proporcionalizar a concentração de WSP presente nos 1000 μL para o volume total do sobrenadante 13300 μL . Vale lembrar que o WSP ressuspendido em 1000 μL se originou de uma alíquota de 3000 μL para precipitação do sobrenadante. Os cálculos estão apresentados abaixo.

[] WSP ($\mu\text{g}/\text{mL}$):	
Vol. ressuspendido (1000 μL) -----	[] WSP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Vol. da amostra (200 μL) -----	[] WSP AMOSTRA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
 [] WSP = $\frac{\text{Vol. ressuspend (1000}\mu\text{L})}{\text{Vol. da amostra (200 } \mu\text{L})} \times \text{[] WSP AMOSTRA}$	
 [] WSP TOTAL ($\mu\text{g}/\text{mL}$):	
Vol. total do biofilme (13 300 μL) -----	[] WSP TOTAL ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Vol p/ precipitação (3000 μL) -----	[] WSP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
 [] WSP TOTAL = $\frac{\text{Vol. total do biofilme (13 000 } \mu\text{L})}{\text{Vol p/ precipitação(3000 } \mu\text{L})} \times \text{[] WSP}$	

Fonte: Elaboração própria.

ASP

Figura C6 - Para a quantificar o ASP foi utilizado uma amostra de 100 μL , originada do volume de NaOH adicionado (μL) a cada amostra com base no seu peso seco obtido pelos 750 μL do pellet. Então, o primeiro passo foi proporcionar a concentração de ASP da amostra para o volume total de NaOH adicionado. O segundo passo foi estabelecer a concentração de ASP para cada 1 mg de peso seco. Por fim, foi estabelecida a concentração de ASP presente nos 2000 μL de pellet, de acordo com o peso seco do pellet. Os cálculos estão apresentados abaixo.

[] ASP ($\mu\text{g}/\text{mL}$):	
Vol. de NaOH adic. (μL) -----	[] ASP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
100 (μL) -----	[] ASP AMOSTRA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
[] ASP ($\mu\text{g}/\text{mL}$) = $\frac{\text{Vol. de NaOH adic. X [] ASP AMOSTRA}}{100 (\mu\text{L})}$	
[] ASP/mg de peso seco:	
[] ASP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)-----	pellet do ASP (mg)
X -----	1 mg
X = $\frac{[] \text{ ASP } (\mu\text{g}/\text{mL})}{\text{pellet do ASP (mg)}}$	
[] TOTAL ($\mu\text{g}/\text{mL}$):	
Peso seco do pellet (mg) -----	[] ASP TOTAL ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1 mg -----	[] ASP/mg de peso seco
[] ASP TOTAL = ASP/mg de peso seco X Peso seco do pellet (mg)	

Fonte: Elaboração própria.

eDNA

Figura C7 - Para a quantificar o eDNA foi utilizado uma amostra de 1,25 μL originado de um volume 20 μL (ressuspendido com tampão TE). Então, inicialmente o valor da amostra foi proporcionado para o volume de 20 μL . Em seguida foi realizado um cálculo para proporcionalizar a concentração de eDNA para o volume total do sobrenadante 13300 μL . Vale lembrar que o eDNA ressuspendido nos 20 μL se originou de uma alíquota de 400 μL da última precipitação. Os cálculos estão apresentados abaixo.

[] eDNA ($\mu\text{g}/\text{mL}$):	
Vol. ressuspendido (20 μL) -----	[] eDNA (ng/mL)
Vol. da amostra 1,25 (μL) -----	[] eDNA AMOSTRA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
 [] eDNA = $\frac{\text{Vol. ressuspend (20}\mu\text{L)} \times \text{[] eDNA AMOSTRA } (\mu\text{g}/\text{mL})}{\text{Vol. da amostra 1,25 } (\mu\text{L})}$	
 [] eDNA TOTAL ($\mu\text{g}/\text{mL}$):	
Vol. total do biofilme (13300 μL) -----	[] eDNA TOTAL ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Vol p/ precipitação (400 μL) -----	[] eDNA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
 [] eDNA TOTAL = $\frac{\text{Vol. total do biofilme (13300}\mu\text{L)} \times \text{[] eDNA } (\mu\text{g}/\text{mL})}{\text{Vol p/ precipitação (400 } \mu\text{L})}$	

Fonte: Elaboração própria.

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos.

(Direito de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 11 de março de 2019.

Thaís Soares Bezerra Santos Nunes