

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ROBERTA RIBEIRO DE CARVALHO

**BIOFILMES E SUSPENSÕES CELULARES DE *Candida* spp.
ISOLADAS DE AMBIENTE HOSPITALAR:
EFEITOS DE ANTIFÚNGICOS SINTÉTICOS E BIOATIVOS VEGETAIS**

ALFENAS/MG

2013

ROBERTA RIBEIRO DE CARVALHO

**BIOFILMES E SUSPENSÕES CELULARES DE *Candida* spp.
ISOLADAS DE AMBIENTE HOSPITALAR:
EFEITOS DE ANTIFÚNGICOS SINTÉTICOS E BIOATIVOS VEGETAIS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Obtenção e Avaliação da Atividade Biológica de Insumos Farmacêuticos.

Orientadora: Profa. Dra Amanda Latercia Tranches Dias

ALFENAS/MG

2013

Carvalho, Roberta Ribeiro de.

Biofilmes e suspensões celulares de *Candida spp.* isoladas de ambiente hospitalar: efeitos de antifúngicos sintéticos e bioativos vegetais. / Roberta Ribeiro de Carvalho. - 2013.
103 f. -

Orientadora: Amanda Latercia Tranches Dias.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

Bibliografia.

1. Candida. 2. Biofilmes. 3. Testes de Sensibilidade Microbiana. 4. Antifúngicos. 5. Ambiente de Instituições de Saúde. I. Dias, Amanda Latercia Tranches. II. Título.

CDD: 579

ROBERTA RIBEIRO DE CARVALHO

**BIOFILMES E SUSPENSÕES CELULARES DE *Candida* spp.
ISOLADAS DE AMBIENTE HOSPITALAR:
EFEITOS DE ANTIFÚNGICOS SINTÉTICOS E BIOATIVOS VEGETAIS**

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Obtenção e Avaliação da Atividade Biológica de Insumos Farmacêuticos.

Aprovada em:

Prof^a. Dr^a. Amanda Latercia Tranches Dias

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Prof^a. Dr^a. Márcia de Souza Carvalho Melhem

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

Assinatura:

Dedico este trabalho a meu pai, um exemplo para toda a vida, e a meu marido André, por todo seu apoio.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Amanda Latercia Tranches Dias, por toda orientação, dedicação, paciência e conhecimentos transmitidos.

Ao professor Dr. Murilo Gomes de Oliveira, pelos sábios conselhos e por despertar minha paixão pela microbiologia.

Aos colegas, professores e funcionários do Laboratório de Imunologia e Microbiologia Básicas do Instituto de Ciências Biomédicas, pela contribuição, ainda que indireta, para realização deste trabalho.

A todos os amigos do Núcleo de Estudos em Micologia (NEMIC), por todos os momentos de trabalho, aprendizado e diversão passados juntos.

Às queridas Clara e Marina, pela ajuda, companheirismo, aprendizado e amizade. Vocês foram além da Iniciação Científica e fazem muita falta.

Ao meu marido André, por seu incentivo, confiança e apoio sempre incondicional. Seu amor foi fundamental nesta jornada.

À minha família, por sempre acreditarem em mim e me fazerem chegar até aqui. Meu pai, por toda dedicação aos filhos, minha mãe, pelo incentivo, e irmãos, pela amizade. Caio, minha inspiração.

Ao Hospital Bom Pastor, da Fundação Hospitalar do Município de Varginha, e seus funcionários, pelo consentimento na coleta das amostras e apoio na viabilização deste trabalho.

A Deus, que parece sempre me ouvir.

“Se enxerguei mais longe foi porque me apoiei nos ombros de gigantes” – Isaac Newton.

RESUMO

Infecções fúngicas invasivas estão associadas a altos índices de morbidade e mortalidade, sendo causadas principalmente por leveduras do gênero *Candida*. A formação de biofilmes tem sido considerada um dos principais fatores associados à virulência destas leveduras, devido, principalmente, à maior resistência às terapias antimicrobianas apresentada pelas células sésseis em comparação às células planctônicas. Torna-se necessária a seleção de antifúngicos eficazes na terapêutica das infecções associadas a biofilme. O presente estudo tem por objetivo avaliar e comparar o efeito de antifúngicos sintéticos (Fluconazol e Anfotericina B) e bioativos vegetais (Guttiferona A e 7-Epiclusianona) em biofilmes e suspensões celulares de *Candida* spp. isoladas de ambiente hospitalar. Foram coletadas 180 amostras, havendo uma frequência de distribuição de 17,8% de isolados de *Candida* spp., provenientes principalmente das mãos de profissionais (28% das amostras), locais de preparo e armazenamento de medicamentos (16%) e leitos de pacientes (16%). As espécies mais isoladas foram do complexo *C. parapsilosis* (59%), *C. tropicalis* (19%), consideradas as espécies mais associadas à candidemia na América Latina, e *C. guilliermondii* (13%), associada a fenômenos de resistência cruzada e multirresistência, não sendo isolada amostra de *C. albicans*. Todas as amostras isoladas foram capazes de produzir biofilme, com biofilmes metabolicamente ativos. Biofilmes do complexo *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* apresentaram menor atividade metabólica em relação aos isolados de *C. famata*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii*. Os isolados não apresentaram resistência a Fluconazol e Anfotericina B e os bioativos demonstraram atividade. Os resultados dos testes de sensibilidade em biofilmes demonstram um grande aumento dos valores de IC quando comparados aos valores obtidos para células planctônicas, variando de 256 a >2.048 vezes no caso do Fluconazol e de 16 a 256 vezes para Anfotericina B. Os bioativos vegetais estudados apresentaram boa atividade sobre biofilmes, especialmente a Guttiferona-A. Os resultados demonstram a importância da implementação de técnicas padronizadas de ensaio de sensibilidade antifúngica em biofilmes e a importância da pesquisa de contaminação ambiental, auxiliando no estabelecimento da cadeia epidemiológica de infecções em ambientes hospitalares.

Palavras-chave: *Candida* spp. Biofilmes. Testes de Sensibilidade. Fluconazol. Anfotericina B. Bioativos naturais. Ambiente Hospitalar.

ABSTRACT

Invasive fungal infections are associated with high morbidity and mortality, mainly caused by *Candida*. The formation of biofilms has been considered one of the main factors associated with the virulence of these strains, primarily due to increased resistance to antimicrobial therapies presented by sessile cells compared to planktonic cells. It is necessary to select the effective antifungal therapy for infections associated with biofilm. The present study aims to evaluate and compare the effect of synthetic antifungals (Fluconazole and Amphotericin B) and plant bioactives (Guttiferone-A and 7-Epiclusianone) in biofilms and cell suspensions of *Candida* spp. isolated from the hospital environment. 180 samples were collected, with an incidence of 17.8% of isolates of *Candida* spp., isolated mainly from the hands of professionals (28% of samples), drug storage and preparation places (16%) and beds of patients (16%). The isolated *Candida* species were mainly *Candida parapsilosis* complex (59%) and *C. tropicalis* (19%), the species considered most associated with candidemia in Latin America, and *C. guilliermondii* (13%), associated with cross-resistance, not being isolated any sample of *C. albicans*. All isolates were able to produce biofilm, with metabolically active biofilms. The biofilms of *C. parapsilosis* complex and *C. tropicalis* showed lower metabolic activity in relation to isolates of *C. famata*, *C. glabrata* and *C. guilliermondii*. The isolates showed no resistance to Fluconazole and Amphotericin B and bioactives demonstrated activity. Results of Susceptibility Tests in biofilms showed a large increase in IC in biofilms for all tested substances. The plant bioactives studied showed good activity against biofilms, especially Guttiferone-A. The results demonstrate the importance of implementing standardized techniques for antifungal susceptibility testing in biofilms and of environmental contamination research, helping to establish the epidemiological chain of infections in hospital environments.

Keywords: *Candida* spp. Biofilms. Susceptibility Testing. Fluconazole. Amphotericin B. Natural Bioactives. Hospital Environment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estágios de formação de biofilme de <i>Candida albicans</i> em superfícies de cateteres.....	22
Figura 2 -	Microscopia eletrônica de varredura de biofilme <i>C. albicans</i> cultivado em disco de silicone.....	24
Figura 3 -	Microscopia eletrônica de varredura de biofilme <i>C. tropicalis</i> cultivado em disco de silicone.....	25
Figura 4 -	Microscopia eletrônica de varredura de biofilme <i>C. parapsilosis</i> cultivado em disco de silicone.....	25
Figura 5 -	Estrutura química de alguns fármacos com ação antifúngica.....	30
Figura 6 -	Estrutura química da Guttiferona A.....	32
Figura 7 -	Estrutura química da 7-Epiclusianona.....	33
Figura 8 -	Avaliação do crescimento e análise das espécies de leveduras, isoladas do ambiente hospitalar, em meio de cultura cromogênico.....	49
Figura 9 -	Análise da capacidade fermentadora da espécie <i>C. guilliermondii</i> (amostra 70) através do teste de fermentação de fontes de carbono – zimograma.....	50
Figura 10-	Análise das espécies de assimilação de fontes de carbono do isolado de <i>C. guilliermondii</i> (amostra 70) através de teste assimilação de fontes de carbono - auxanograma.....	51
Figura 11-	Representação fotográfica de biofilmes em placa de microtitulação após 48h, antes da lavagem com tampão PBS.....	54
Figura 12-	Representação fotográfica do ensaio de detecção de células metabolicamente ativas em biofilmes.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Distribuição dos isolados de <i>Candida</i> spp. nos setores críticos de coleta no ambiente hospitalar.....	46
Gráfico 2-	Distribuição percentual dos isolados de <i>Candida</i> spp. nos dispositivos presentes nas diferentes áreas de coleta no ambiente hospitalar.....	48
Gráfico 3-	Distribuição das amostras de <i>Candida</i> spp. oriundas de ambiente hospitalar quanto à espécie	53
Gráfico 4-	Comparação da capacidade de produção de biofilme entre os isolados de <i>Candida</i> spp. de fontes de ambiente hospitalar.....	58
Gráfico 5-	Comparação da atividade metabólica de biofilmes entre os isolados de <i>Candida</i> spp. de fontes de ambiente hospitalar.....	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Genes envolvidos no desenvolvimento de biofilmes de <i>Candida albicans</i>	26
-----------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Interpretação do perfil de sensibilidade antifúngica de amostras de <i>Candida</i> spp. de acordo com valores apresentados de IC pelo Método de Microdiluição em Caldo.....	44
Tabela 2-	Locais de coletas e distribuição de amostras de <i>Candida</i> spp. encontradas nas diferentes áreas de coleta no ambiente hospitalar.....	47
Tabela 3-	Distribuição das espécies de <i>Candida</i> spp. em relação à fonte de isolamento.....	52
Tabela 4-	Avaliação da capacidade de produção de biofilme e atividade metabólica entre as amostras isoladas de fontes de ambiente hospitalar.....	55
Tabela 5-	Avaliação percentual e classificação em grupos de quartis da capacidade de produção de biofilme e atividade metabólica entre as amostras isoladas de fontes de ambiente hospitalar.....	56
Tabela 6-	Comparação da capacidade de produção de biofilme e atividade metabólica entre as diferentes espécies de amostras isoladas de fontes de ambiente hospitalar.....	57
Tabela 7-	Testes de Sensibilidade em Células Planctônicas. Concentração Inibitória em $\mu\text{g/ml}$ e $\mu\text{M/l}$ do crescimento <i>in vitro</i> de 90% (IC_{90}) para Anfotericina B e 50% (IC_{50}) para Fluconazol, Guttiferona A e 7-Epiclusianona entre as amostras isoladas de fontes de ambiente hospitalar.....	59
Tabela 8-	Testes de Sensibilidade em Células Planctônicas. Concentração Inibitória Mínima em $\mu\text{g/ml}$ e $\mu\text{M/l}$ do crescimento <i>in vitro</i> de 90% (CIM_{90}) para Anfotericina B e 50% (CIM_{50}) para Fluconazol, Guttiferona A e 7-Epiclusianona entre as diferentes espécies isoladas de fontes de ambiente hospitalar.....	60
Tabela 9-	Testes de Sensibilidade em Biofilmes. Concentração Inibitória em $\mu\text{g/ml}$ e $\mu\text{M/l}$ do crescimento <i>in vitro</i> de 90% (IC_{90}) para Anfotericina B e 50% (IC_{50}) para Fluconazol, Guttiferona A e 7-Epiclusianona entre as amostras isoladas de fontes de ambiente hospitalar.....	61
Tabela 10-	Testes de Sensibilidade em Biofilmes. Concentração Inibitória Mínima em $\mu\text{g/ml}$ e $\mu\text{M/l}$ do crescimento <i>in vitro</i> de 90% (CIM_{90}) para Anfotericina B e 50% (CIM_{50}) para Fluconazol, Guttiferona A e 7-Epiclusianona entre as diferentes espécies isoladas de fontes de ambiente hospitalar.....	62

Tabela 11-	Concentração Inibitória em $\mu\text{g/ml}$ e $\mu\text{M/l}$ do crescimento <i>in vitro</i> de 50% (IC_{50}) para Fluconazol em células planctônicas e biofilmes de amostras de <i>Candida</i> spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.....	63
Tabela 12-	Concentração Inibitória em $\mu\text{g/ml}$ e $\mu\text{M/l}$ do crescimento <i>in vitro</i> de 90% (IC_{90}) para Anfotericina B em células planctônicas e biofilmes de amostras de <i>Candida</i> spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.....	64
Tabela 13-	Concentração Inibitória em $\mu\text{g/ml}$ e $\mu\text{M/l}$ do crescimento <i>in vitro</i> de 50% (IC_{50}) para Guttiferona A em células planctônicas e biofilmes de amostras de <i>Candida</i> spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.....	65
Tabela 14	Concentração Inibitória em $\mu\text{g/ml}$ e $\mu\text{M/l}$ do crescimento <i>in vitro</i> de 50% (IC_{50}) para 7-Epiclusianona em células planctônicas e biofilmes de amostras de <i>Candida</i> spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.....	66
Tabela 15-	Concentração Inibitória em $\mu\text{g/ml}$ e $\mu\text{M/l}$ do crescimento <i>in vitro</i> de 50% (IC_{50}) para Fluconazol em células planctônicas e biofilmes de amostras de <i>Candida</i> spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.....	67
Tabela 16-	Concentração Inibitória em $\mu\text{g/ml}$ e $\mu\text{M/l}$ do crescimento <i>in vitro</i> de 90% (IC_{90}) para Anfotericina B em células planctônicas e biofilmes de amostras de <i>Candida</i> spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.....	67
Tabela 17-	Concentração Inibitória em $\mu\text{g/ml}$ e $\mu\text{M/l}$ do crescimento <i>in vitro</i> de 50% (IC_{50}) para Guttiferona A em células planctônicas e biofilmes de amostras de <i>Candida</i> spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.....	67
Tabela 18-	Concentração Inibitória em $\mu\text{g/ml}$ e $\mu\text{M/l}$ do crescimento <i>in vitro</i> de 50% (IC_{50}) para 7-Epiclusianona em células planctônicas e biofilmes de amostras de <i>Candida</i> spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.....	68
Tabela 19-	Síntese dos resultados de amostras de ambiente hospitalar. Avaliação percentual e classificação em grupos de quartis da capacidade de produção de biofilme (após lavagem com tampão PBS) e atividade metabólica. Concentração Inibitória em $\mu\text{g/ml}$ do crescimento <i>in vitro</i> de 90% (IC_{90}) para Anfotericina B e 50% (IC_{50}) para Fluconazol, Guttiferona A e 7-Epiclusianona em células planctônicas e biofilmes de amostras de <i>Candida</i> spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANAVA	- Análise de Variância
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DO	- Densidade Óptica
DP	- Desvio Padrão
ECG	- Equipamento de Eletrocardiograma
EPI	- Equipamento de Proteção Individual
EPS	- Substâncias Poliméricas Extracelulares
ESCMID	- <i>European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>
EUCAST	- <i>European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing</i>
GQ	- Grupo de Quartil
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	- Concentração Inibitória
IH	- Infecções Hospitalares
µL	- Microlitros
mM	- MiliMol
MOPS	- [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico]
nm	- Nanômetros
µM/l	- Micromol por litro
PBS	- Phosphate Buffered Saline
Q	- Quartil
RPMI	- <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAP	- <i>Secreted Aspartyl Proteinases</i>
UFC	- Unidades Formadoras de Colônia
UNIFAL-MG	- Universidade Federal de Alfenas
UTI	- Unidade de Tratamento Intensivo
XTT	- (2-metoxi-4-nitro-5-sulfophenyl) -5 - [(fenilamino) carbonil] - 2H-tetrazólio hidróxido
YCB	- <i>Yeast Carbon Base</i>
YNB	- <i>Yeast Nitrogen Base</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Infecções fúngicas.....	17
2.2	<i>Candida spp.</i>.....	17
2.3	Fatores de risco para candidemia.....	19
2.4	Fatores associados à virulência de <i>Candida spp.</i>.....	20
2.4.1	Biofilmes.....	21
2.4.2	Formação de biofilmes.....	22
2.4.3	Capacidade de formação de biofilmes em <i>Candida spp.</i>	24
2.4.4	Métodos de estudo de biofilmes.....	27
2.5	Resistência aos antifúngicos.....	28
2.5.1	Principais antifúngicos utilizados na terapêutica.....	29
2.5.2	Antimicrobianos naturais.....	31
2.5.2.1	Gênero <i>Rheedia</i>	31
2.5.3	Biofilmes e resistência a antifúngicos.....	33
2.5.4	Testes de Sensibilidade Antifúngica.....	35
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivo Geral.....	37
3.2	Objetivos Específicos.....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1	Amostragem.....	38
4.2	Aspectos Éticos.....	38
4.3	Identificação das amostras.....	38
4.4	Formação de biofilmes de <i>Candida spp.</i>.....	40
4.5	Avaliação da capacidade de formação de biofilmes.....	40
4.6	Avaliação da atividade metabólica dos biofilmes.....	41

4.7	Determinação da sensibilidade a antifúngicos sintéticos e bioativos vegetais de células planctônicas de <i>Candida</i> spp.....	42
4.8	Determinação da sensibilidade a antifúngicos sintéticos e bioativos vegetais de biofilmes de <i>Candida</i> spp.....	44
4.9	Análise Estatística.....	45
5	RESULTADOS.....	46
5.1	Distribuição e origem das amostras de <i>Candida</i> spp. no ambiente hospitalar.....	46
5.2	Identificação das amostras.....	49
5.3	Avaliação da capacidade de produção e atividade metabólica de biofilmes.....	53
5.4	Perfil de sensibilidade das células planctônicas.....	58
5.5	Perfil de sensibilidade de biofilmes.....	60
5.6	Síntese dos resultados de amostras de ambiente hospitalar.....	68
6	DISCUSSÃO	70
6.1	Origem e distribuição das amostras.....	70
6.2	Distribuição das espécies.....	71
6.3	Avaliação da capacidade de produção e atividade metabólica de biofilmes.....	75
6.4	Perfil de sensibilidade das células planctônicas.....	79
6.5	Perfil de sensibilidade de biofilmes	80
6.6	Síntese dos resultados de amostras de ambiente hospitalar.....	83
7	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS.....	89
	APÊNDICES.....	101
	ANEXO.....	103

1 INTRODUÇÃO

Os fungos têm emergido como uma importante causa de infecção hospitalar, estando associado ao aumento de pacientes imunocomprometidos, como aqueles em quimioterapia, transplantados, diabéticos, infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), neutropênicos ou submetidos a tratamentos em setores críticos (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Infecções fúngicas estão associadas a altos índices de morbidade e mortalidade em todo o mundo, além de estarem associadas ao prolongamento do tempo de internação e aumento dos custos hospitalares, demonstrando a importância de um diagnóstico precoce e terapia antifúngica adequada (MIMICA et al., 2009).

Leveduras do gênero *Candida* colonizam o organismo humano, principalmente trato gastrointestinal, trato urogenital e pele, e estão entre os principais causadores de infecções fúngicas, inclusive hospitalares. Apesar de *Candida albicans* ser a principal espécie isolada, cada vez mais outras espécies do gênero têm sido isoladas (D'EFERT, 2009).

Espécies de *Candida* podem existir na natureza como células livres, denominadas planctônicas, e sob a forma de biofilme, em que existem as chamadas células sésseis. A maioria das infecções causadas por estas leveduras está associada à formação de biofilmes, o que traz grandes implicações clínicas e terapêuticas, uma vez que as células sésseis presentes nos biofilmes apresentam maior resistência não só às defesas do hospedeiro, mas também às terapias antifúngicas atualmente utilizadas (RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006; SILVA et al., 2010).

Cabe ressaltar que o ar, o ambiente climatizado, o acúmulo de umidade, as superfícies inanimadas dos ambientes hospitalares, as mãos colonizadas dos profissionais que prestam atendimento ao paciente e jalecos dos próprios profissionais são focos de contaminação e disseminação de patógenos no ambiente hospitalar, comprometendo a saúde do paciente (ANDRADE; ANGERAMI; PADOVANI, 2000; MARTINS-DINIZ et al., 2005), o que demonstra a importância de estudos epidemiológicos que monitorem a microbiota fúngica de ambientes hospitalares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções fúngicas

Infecções fúngicas estão associadas a altos índices de mortalidade e sua ocorrência tem aumentado nas últimas décadas, o que pode ser explicado pelo crescimento da população de pacientes imunocomprometidos e pelo uso disseminado de dispositivos médicos implantáveis (NUCCI et al., 2010; MISHRA et al., 2007; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006).

Cerca de 80% destas infecções são causadas por espécies do gênero *Candida*, um comensal humano que pode causar desde infecções locais quanto infecções invasivas (candidíase invasiva), inclusive da corrente sanguínea (candidemia) (ARENDRUP, 2010; ESPINEL-INGROFF, 2009).

As infecções hospitalares (IH) causadas por fungos se tornaram frequentes nos últimos anos (MUIR; WINBREN, 2010) acarretando altos índices de mortalidade, que atingem até 60% dos óbitos por IH (TAMURA et al., 2007). Pode-se definir como infecção hospitalar toda aquela que não está incubada nem presente à admissão do cliente na unidade hospitalar (COUTO; PEDROSA, 2004). O Ministério da Saúde através da portaria 2.616 de 12/05/1998 define que essas infecções podem ser atribuídas à instituição hospitalar e se manifestar durante a internação ou após a alta hospitalar (BRASIL, 1998).

Estima-se que a candidíase represente a terceira ou quarta causa de infecção hospitalar e a quarta causa de infecções de corrente sanguínea, o que tem grande importância clínica pela gravidade das infecções e altas taxas de mortalidade, chegando a ser superior a 50% (KU; PALANISAMY; LEE, 2010; MAVOR; THEWES; HUBE, 2005; UPPULURI et al., 2010), além de estar associada ao prolongamento de internações e a elevado custo hospitalar (MIMICA et al., 2009).

2.2 *Candida* spp.

Candida spp. são classificadas taxonomicamente no reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, família

Cryptococcaceae. O gênero *Candida* é o principal entre as leveduras patogênicas, compreendendo aproximadamente 200 espécies (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). São microrganismos comensais, que habitam diversos nichos corporais, como orofaringe, cavidade bucal, pele, uretra e intestino. Entretanto, essas mesmas leveduras podem se tornar patogênicas, caso ocorra um desequilíbrio em sua relação com o hospedeiro, sendo por isto consideradas oportunistas (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). As infecções, denominadas candidíases, variam desde lesões superficiais em pessoas saudáveis até infecções disseminadas, principalmente em pacientes imunocomprometidos.

Candida albicans é um fungo dimórfico, que se apresenta sob formas leveduriformes (blastoconídios) no estado saprofítico, estando associado à colonização assintomática; ou como formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras), observadas em processos patogênicos. Além disso, sob condições de crescimento subótimas, nesse fungo pode ocorrer a formação de clamidósporos (esporos arredondados que possuem uma espessa parede celular). Dessa forma, o fungo tem a capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos, podendo ser considerado, a rigor, um organismo “pleomórfico” (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007).

Apesar de *C. albicans* ser a espécie mais frequentemente isolada em candidíases, as espécies de *Candida* não-*albicans* têm se tornado cada vez mais importantes clinicamente, tanto pela alta distribuição quanto pela resistência aos antifúngicos. Apesar de a taxa de isolamento variar de acordo com a região estudada, as *Candida* não-*albicans* mais implicadas em processos infecciosos são *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* (ARENDRUP, 2010; HOF, 2008; MAVOR; THEWES; HUBE, 2005; MUIR; WINBREN, 2010; NUCCI et al., 2010; THEIN et al., 2009).

Em 1963, eram conhecidas apenas cinco espécies de *Candida* como causadoras de doenças em humanos, incluindo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* (*C. albicans* var *stellatoidea*) e *C. guilliermondii* (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Atualmente, são conhecidas cerca de dezessete espécies de *Candida* causadoras de micoses superficiais ou invasivas em seres humanos e alguns trabalhos relatam que espécies de *Candida* não-*albicans* chegam a ser responsáveis por 35 a 65% das candidíases (MUIR; WINBREN, 2010). Na América Latina *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são as espécies de *Candida* não-

albicans mais frequentemente isoladas, porém com perfil de sensibilidade bastante variável (MIMICA et al., 2009).

Atualmente é conhecida a existência do chamado complexo *C. parapsilosis*, composto por três grupos geneticamente distintos, incluindo *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*. O mesmo ocorre com a espécie de *C. glabrata*, que participa de um complexo formado também por três espécies, incluindo *C. glabrata sensu stricto* e as recém-descritas *C. bracarensis* e *C. nivariensis* (MIRANDA-ZAPICO et al., 2011).

As razões para esta inversão no padrão de distribuição das espécies ainda não foram completamente esclarecidas, mas podem estar relacionadas a vários fatores, especialmente ao potencial de virulência destes microrganismos e ao aumento do consumo de antifúngicos, especialmente os azóis, como um reflexo da seleção de espécies, uma vez que espécies de *Candida* não-*albicans* tem apresentado maior nível de resistência a esses fármacos (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009; KOTHAVADE et al., 2010; SILVA et al., 2011).

2.3 Fatores de risco para candidemia

Candidíases podem ser adquiridas por via endógena, onde o fungo presente na microbiota comporta-se como patógeno oportunista, principalmente sob condições de debilidade ou alteração dos mecanismos de defesa do hospedeiro, ou por via exógena, através da contaminação das mãos dos profissionais de saúde, utilização de cateteres vasculares, implantes de próteses contaminadas ou administração de soluções parenterais contaminadas (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; RÖRIG; COLACITE; ABEGG, 2009).

Os principais fatores predisponentes para candidíase envolvem terapias citotóxicas e imunossupressoras, como quimioterapia e uso de corticóides, tratamento com antimicrobianos de amplo espectro, infecção pelo HIV, neutropenia, pacientes transplantados, neonatos prematuros, idosos, uso de cateteres, politraumatismo, exposição a procedimentos médicos invasivos e internação em setores críticos (MAVOR; THEWES; HUBE, 2005; MISHRA et al., 2007).

O desenvolvimento da doença, entretanto, está relacionado não só à debilidade de resposta do hospedeiro, mas também a efetivos mecanismos de agressão expressos pelas leveduras, denominados fatores de virulência,

demonstrando a complexidade da patogenia destas infecções (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

2.4 Fatores associados à virulência de *Candida* spp.

Entre os principais fatores associados à virulência de *Candida* spp. destacam-se a capacidade de adesão a células e tecidos, a produção de enzimas extracelulares, atividade hemolítica e a formação de biofilme (BLANCO et al., 2010; FERREIRA et al., 2010; GAUWERKY; BORELLI; KORTING, 2009; LYON et al., 2011). Os fatores de virulência são determinados geneticamente, porém expressos pelos microrganismos quando submetidos a certas condições (TAMURA et al., 2007). O nível de expressão de fatores de virulência depende tanto de fatores ambientais quanto fatores do hospedeiro, além de depender do estágio da infecção (MISHRA et al., 2007).

Enzimas hidrolíticas como proteases e fosfolipases desempenham importante função nutricional, mas, sobretudo, são importantes fatores de virulência, uma vez que estão associadas ao dano celular e à disseminação fúngica no organismo hospedeiro (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009; NAILIS et al., 2010).

Fosfolipases são responsáveis pela hidrólise dos fosfolipídios constituintes da membrana celular, tendo alta atividade durante a invasão tecidual, onde estão envolvidas com a aderência e penetração no hospedeiro (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009; MISHRA et al., 2007). Já as proteinases aspárticas (Sap) codificadas pela família de genes *SAP* (*Secreted Aspartyl Proteinases*), degradam diversas proteínas do hospedeiro, inclusive as do sistema imunológico como imunoglobulinas e proteínas do complemento. As Saps parecem estar envolvidas com a capacidade das células fúngicas colonizarem e penetrarem tecidos do hospedeiro, além de estarem associadas também a outros fatores de virulência, como a formação de hifas, adesão e comutação fenotípica (MISHRA et al., 2007; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003).

Estudos demonstram que leveduras que apresentam aumento na síntese e atividade de fosfolipases e proteinases têm maior potencial patogênico, levando a quadros clínicos de candidíases mais graves (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

A atividade hemolítica de *Candida* spp. através da produção de hemolisinas também é considerada um importante fator de virulência, permitindo a aquisição de ferro da hemoglobina liberada após hemólise, favorecendo assim a capacidade de a levedura se multiplicar no soro do hospedeiro durante o processo de infecção (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009; MISHRA et al., 2007).

A alteração fenotípica na morfologia das colônias, incluindo mudança no formato, estruturas de superfície celular e germinação a 37°C, também pode tornar as leveduras mais virulentas (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007).

Outro mecanismo importante no processo de patogenicidade é a adesão da célula leveduriforme, principalmente através de proteínas adesinas, à célula do hospedeiro ou a superfícies inertes de materiais médico-hospitalares (implantes, próteses e cateteres), favorecendo o desencadeamento do processo infeccioso e a formação de biofilmes, caracterizados como uma comunidade de microrganismos associados (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; MISHRA et al., 2007).

2.4.1 Biofilmes

Biofilmes são comunidades microbianas organizadas que se formam aderidas a uma superfície e são envolvidas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, sendo constituídos por uma mistura de células do hospedeiro, leveduras, hifas, pseudohifas e proteínas e polissacarídeos da matriz extracelular (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006; NETT; ANDES, 2006; SENEVIRATNE et al., 2008).

De fato, a maioria das infecções causadas por *Candida* spp. está associada à formação de biofilmes em superfícies ao invés de se apresentarem como células livres (planctônicas) (FERREIRA et al., 2009; MISHRA et al., 2007; NETT; ANDES, 2006; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006), o que traz consequências clínicas e terapêuticas relevantes, uma vez que as células sésseis em biofilmes apresentam características fenotípicas próprias, diferentes das células planctônicas de origem, levando não só a uma resistência às defesas do hospedeiro como também a uma maior resistência às terapias antimicrobianas (MISHRA et al., 2007; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006; SILVA et al., 2010; VANDENBOSCH et al., 2010).

Dessa maneira, biofilmes representam uma importante forma de persistência dos microrganismos no hospedeiro, estando associados a um aumento da mortalidade, morbidade e de custos médico-hospitalares (D'EFERT, 2009; MIMICA et al., 2009; SILVA et al., 2010).

2.4.2 Formação de biofilmes

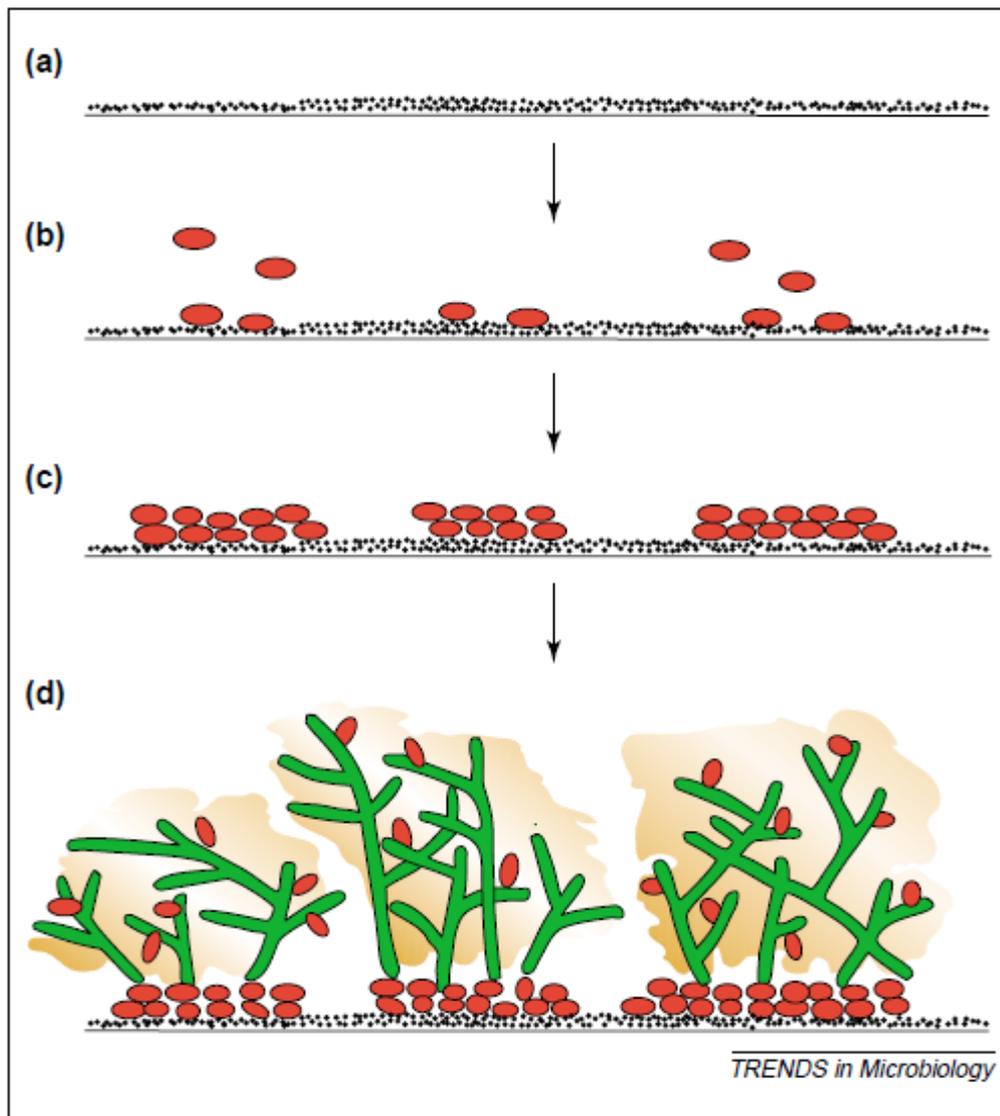


Figura 1 - Estágios de formação de biofilme de *Candida albicans* em superfícies de cateteres. (a) Superfície do cateter com uma camada adsorvida de substâncias condicionantes da adesão. (b) Adesão primária das leveduras à superfície. (c) Formação de camadas basais de microcolônias de leveduras, estando cada microcolônia aderida à superfície. (d) Término da formação das microcolônias, com formação de hifas, pseudo-hifas e da matriz polimérica extracelular que envolve as células.

Fonte: DOUGLAS, 2003.

A formação do biofilme se inicia a partir da aderência da célula leveduriforme a uma superfície (etapa de adesão), seguida de uma multiplicação inicial, com transformação das células em formas filamentosas, formando hifas e pseudohifas, e uma discreta organização das células (etapa de iniciação). A seguir ocorre a etapa de maturação do biofilme, com a produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e expansão da biomassa arranjada em uma estrutura tridimensional, e, por fim, há a dispersão das células do biofilme, que são liberadas para colonizar o ambiente circundante (FINKEL; MITCHELL, 2011; NOBILE et al., 2012; SENEVIRATNE et al., 2008; VANDENBOSCH et al., 2010).

O processo inicial de adesão é mediado por interações hidrofóbicas e forças eletrostáticas entre as células e o substrato, mas em seguida ocorre a expressão de moléculas específicas, as adesinas, que facilitam a adesão e a torna mais estável. O processo de adesão celular em uma superfície a partir de uma suspensão de *Candida* spp. geralmente dura de 1-2h (SENEVIRATNE et al., 2008).

Uma vez aderidas, as células se dividem formando um agregado celular organizado, mas cuja morfogênese varia em função de vários fatores, como a espécie de *Candida*, o substrato sobre o qual o biofilme está sendo formado, fontes de carbono, etc. Em cerca de 18-24h a comunidade formadora do biofilme de *Candida* spp. pode ser visualizada como uma estrutura de bicamada onde coexistem formas de leveduras, hifas e pseudohifas. Durante o processo de maturação o biofilme se torna uma espessa camada de matriz extracelular em que estão incorporados os vários tipos celulares. Esta complexidade estrutural representa um arranjo espacial ótimo onde estão presentes canais de água entre células a fim de facilitar a difusão de nutrientes através da biomassa para as camadas inferiores e permitir a eliminação de resíduos metabólicos (RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006; SENEVIRATNE et al., 2008).

Por fim, durante a etapa da dispersão, acontece a liberação de células do biofilme, que podem ser responsáveis pela disseminação fúngica no hospedeiro, com a formação de novos biofilmes e persistência da infecção (RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006). Estudos identificaram novos reguladores da transcrição de dispersão do biofilme, Ume6, Pes1 e NRG1, cujas mudanças na expressão ou atividade durante a maturação do biofilme podem controlar a dispersão das células. Outro fato importante consiste na verificação de que células dispersas têm fenótipos distintos das planctônicas, apresentando maior capacidade

de aderência e de filamentação, além do aumento da patogenicidade quando comparadas às células planctônicas (FINKEL; MITCHELL, 2011).

2.4.3 Capacidade de formação de biofilmes em *Candida* spp.

A capacidade de formar biofilmes varia de acordo com a espécie de *Candida*, assim como a morfologia geral do biofilme, a composição da EPS e a resistência antifúngica. Alguns estudos relatam que a capacidade de formação de biofilmes é maior entre as espécies de *Candida* não-*albicans*, reafirmando o potencial patogênico destas espécies emergentes (SENEVIRATNE et al., 2008).

Em imagens feitas a partir de microscopia eletrônica de varredura pode-se observar a variação na morfologia do biofilme de acordo com a espécie de *Candida*. Biofilmes de *C. albicans* (Figura 2) apresentaram predomínio das formas filamentosas, enquanto que em biofilmes de *C. tropicalis* (Figura 3) e *C. parapsilosis* (Figura 4) houve o predomínio de blastoconídeos (FERREIRA et al., 2009).

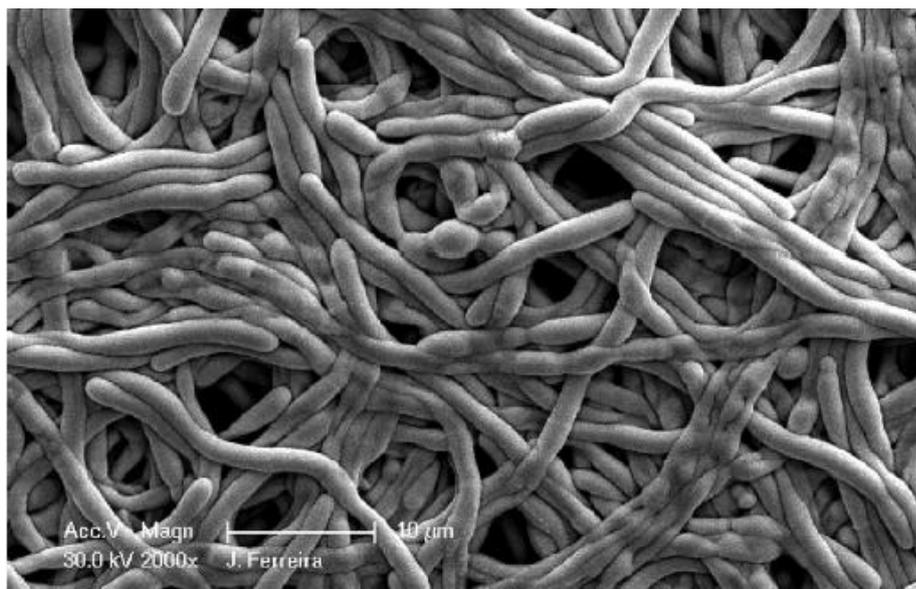


Figura 2 - Microscopia eletrônica de varredura de biofilme *C. albicans* cultivado em disco de silicone.

Fonte: FERREIRA et al., 2009.

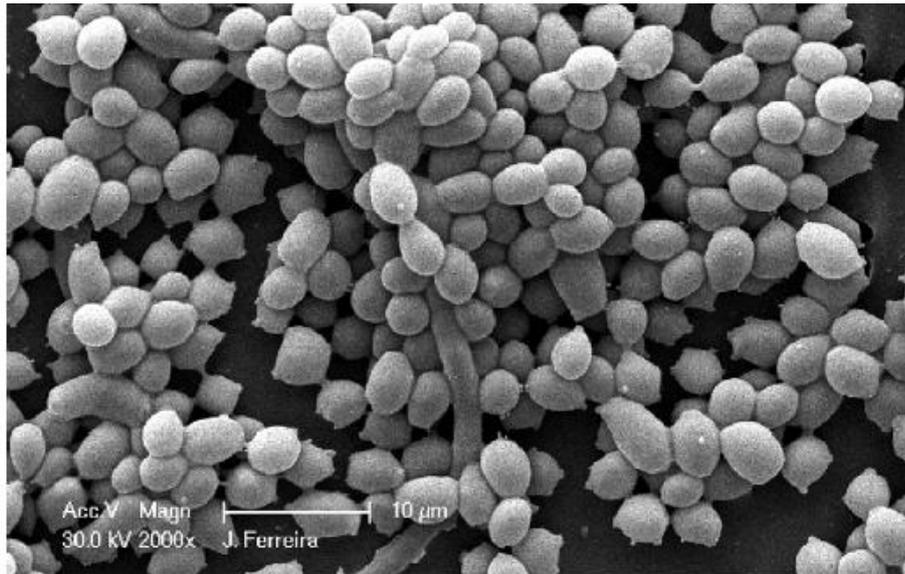


Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura de biofilme *C. tropicalis* cultivado em disco de silicone.
Fonte: FERREIRA et al., 2009.

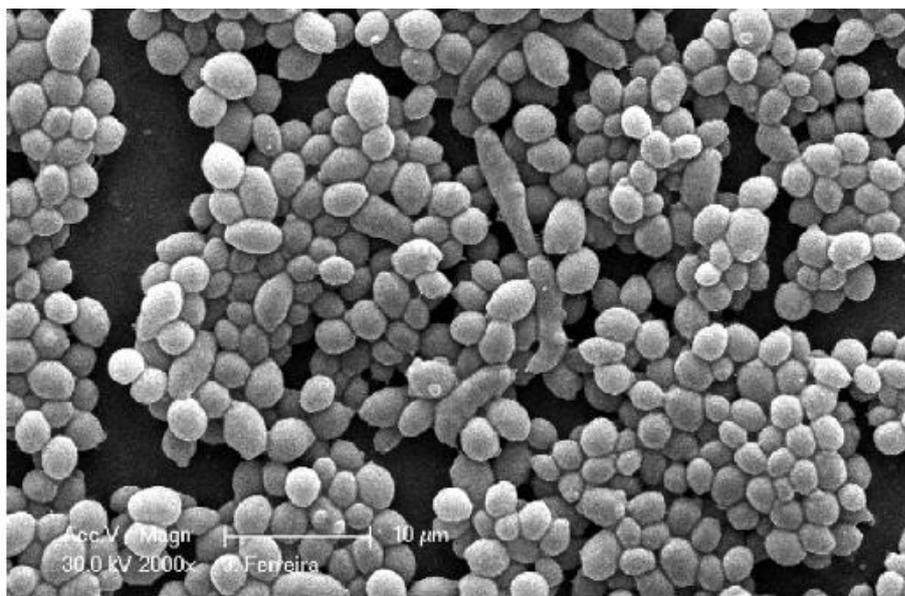


Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura de biofilme *C. parapsilosis* cultivado em disco de silicone.
Fonte: FERREIRA et al., 2009.

Além das espécies de *Candida* spp. envolvidas, vários outros fatores podem afetar a formação do biofilme, como o substrato sobre o qual está sendo formado, a presença de nutrientes e a disponibilidade de oxigênio (SENEVIRATNE et al., 2008).

A exposição de células de *Candida* spp. a concentrações subinibitórias de antifúngicos, o que frequentemente ocorre na terapêutica, especialmente em quimioprofilaxias, parece interferir e modificar a formação de biofilmes (KUHN et al., 2002). Medicamentos antivirais também parecem alterar a formação de biofilmes de *Candida* spp., o que pode ser especialmente preocupante em pacientes infectados pelo HIV com candidíase (BRAGA-SILVA et al., 2010).

O desenvolvimento de biofilmes de *Candida* spp. é um processo complexo, que envolve além dos fatores já citados, a coordenação de várias respostas de sinalização e a contribuição de diversos fatores moleculares e genéticos, que estão sendo compreendidos, mas ainda não completamente (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006; FINKEL; MITCHELL, 2011).

Já foram identificados vários genes que participam do processo de desenvolvimento do biofilme, além de como ocorre a regulação desses genes, sua expressão e atividade. Alguns estão representados no Quadro 1 (adaptado de FINKEL; MITCHELL, 2011).

Função molecular do produto do gene	Papel do produto do gene	Genes
Fatores de transcrição	Positivo	ACE2, BCR1, CPH1, CZF1, EFG1, FLO8, GCN4, TEC1, UME6 e NRG1
	Negativo	ZAP1
Proteínas relacionadas à parede celular	Positivo	ALS1, ALS2, ALS3, ALS4, ALS7, ALS9, CSA1, EAP1, FKS1, HWP1, HWP2, OCH1, PGA1, PGA10, PMT1, PMT2, PMT4, PMT6, RBT1, RBT5 e SUN41
	Negativo	YWP1
Proteínas quinases	Positivo	CBK1, GIN4, IRE1, MKC1 e YAK1
	Negativo	CHK1 e TOR1
Bombas de drogas de efluxo	Positivo	CDR1, CDR2 e MDR1

Quadro 1 - Genes envolvidos no desenvolvimento de biofilmes de *Candida albicans*.
Fonte: adaptado de FINKEL; MITCHELL, 2011.

Tem sido bastante discutido também o processo de sinalização celular que controla a organização e coordenação dos biofilmes, determinado quorum sensing, que envolve a secreção de moléculas sinalizadoras e a capacidade de as células responderem a esses sinais e está relacionado à densidade celular do biofilme (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006; FINKEL; MITCHELL, 2011).

O fato é que a maioria das manifestações de candidíase está associada à formação de biofilmes, onde os microrganismos apresentam maior proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro e maior resistência aos agentes antifúngicos, o que favorece o estabelecimento do processo infeccioso e dificulta sua erradicação (ANDES et al., 2004; MISHRA et al., 2007; SENEVIRATNE et al., 2008).

Devemos considerar que a ocorrência do processo de adesão celular que permite a propagação dos microrganismos e a formação do biofilme pode ocorrer tanto nos tecidos do hospedeiro quanto nos dispositivos médico-hospitalares, como implantes, próteses, tubos endotraqueais, marcapassos e cateteres. Desta forma, o aumento da utilização destes dispositivos tem facilitado a colonização e a formação de biofilmes de *Candida* spp., contribuindo assim para a disseminação, progressão e persistência de infecções hospitalares (MARTINEZ et al., 2010; MISHRA et al., 2007; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006; SENEVIRATNE et al., 2008).

Estudos mostram que, em infecções sistêmicas relacionadas a cateteres causadas por *Candida* spp., manter o cateter vascular colonizado está associado com maior tempo de infecção, altas taxas de falha terapêutica, aumento do risco de disseminação e morte (ANDES et al., 2004). Na maioria das vezes os dispositivos médicos implantados que são infectados precisam ser removidos, o que nem sempre é possível, além de gerar riscos aos pacientes (COCUAUD et al., 2005; KO et al., 2010; NETT et al., 2008).

2.4.4 Métodos de estudo de biofilmes

Diversos modelos têm sido propostos para a avaliação do desenvolvimento de biofilmes, tanto *in vitro* como *in vivo*. Os principais sistemas *in vitro* incluem a modelos dinâmicos e estáticos, como a microtitulação. Os *in vivo* são baseados em modelos animais (COENYE et al., 2011).

Nos modelos *in vitro* utilizados para elucidar os estágios de desenvolvimento e os processos envolvidos na formação do biofilme, geralmente são utilizados discos

de silicone ou placas de poliestireno (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006). A maioria das pesquisas que envolvem biofilmes avalia o desenvolvimento do biofilme por determinação da biomassa ou através da quantificação do número de células no biofilme. A atividade do biofilme ou sua composição celular nem sempre têm sido investigadas, apesar de parecer que estes são parâmetros com significado importante em termos de patogenicidade, já que a atividade metabólica do biofilme pode estar relacionada ao grau de expressão de fatores de virulência e ao nível de resistência aos antifúngicos (SILVA et al., 2010).

A atividade metabólica do biofilme pode ser determinada através de metodologias que utilizam a redução do XTT (2-metoxi-4-nitro-5-sulfophenyl) -5-[(fenilamino) carbonil] - 2H-tetrazólio hidróxido), e o grau desta atividade parece estar relacionado, entre outros fatores, à espécie de *Candida* formadora do biofilme (KONOPKA et al., 2010; KU; PALANISAMY; LEE, 2010; MARTINEZ et al., 2010; SILVA et al., 2010).

2.5 Resistência aos antifúngicos

A resistência aos antifúngicos tem representado um grande desafio para a clínica, frente às dificuldades observadas no tratamento da candidíase (ALVES; CAMARGO; GOULART, 2010). Tem havido um aumento significativo na distribuição de falhas no tratamento de candidíases, especialmente em pacientes recebendo por longo prazo terapia antifúngica. Espécies de *Candida* podem adquirir resistência a drogas durante o curso do tratamento, demonstrando a importância do monitoramento de terapias profiláticas e das doses utilizadas na terapêutica (MISHRA et al., 2007).

Sob o ponto de vista terapêutico, as espécies de leveduras de *Candida* não-*albicans* caracterizam-se por apresentar particularidades em relação à sua sensibilidade a diversos antifúngicos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003) e a identificação de fatores de virulência do fungo e reconhecimento dos mecanismos de patogênese pode levar ao desenvolvimento de novas terapias antifúngicas eficazes (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009).

Os principais mecanismos de resistência aos antifúngicos são mudanças na parede celular ou membrana plasmática da levedura, levando a uma diminuição da absorção da droga, alterações na afinidade da droga por seu alvo celular, devido a

mecanismos genéticos e aumento do efluxo de drogas a partir das células (MISHRA et al., 2007).

É importante salientar que a sensibilidade a antifúngicos pode variar entre as diferentes espécies de *Candida*, demonstrando que a sobrevivência de pacientes com candidemia e em estado crítico associa-se diretamente à precoce identificação da espécie envolvida no processo infeccioso e seu perfil de sensibilidade. Assim, a utilização de metodologia rápida que resulte na precisa identificação da espécie e do seu perfil de sensibilidade é fundamental para o tratamento clínico (MIMICA et al., 2009).

Dentre os fatores que podem ter contribuído para o aumento desta resistência está o uso profilático de terapias antifúngicas (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009). O uso excessivo de Fluconazol pode também ter sido responsável pela alteração do perfil das leveduras, com diminuição de infecções causadas por *C. albicans* (geralmente mais sensíveis) e o aumento de infecções por espécies de *Candida* não-*albicans*, com perfil aumentado de resistência a esse antifúngico (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; NOBILE; MITCHELL, 2006).

2.5.1 Principais antifúngicos utilizados na terapêutica

O arsenal de antifúngicos disponíveis no comércio é restrito, por isso a indicação deve ser criteriosa, no sentido de evitar o surgimento de microrganismos resistentes, o que muitas vezes acaba por dificultar a recuperação do paciente, aumentando os custos de hospitalização (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Os fármacos antifúngicos mais utilizados atualmente na clínica são classificados em azólicos, polienos, inibidores da síntese de ácidos nucleicos e equinocandinas. Os azólicos inibem uma etapa no final da biossíntese de ergosterol, presente na membrana da célula fúngica, causando a perda da estrutura e função da membrana. São representativos dessa classe os imidazóis, como cetoconazol e clotrimazol, e os triazóis, que incluem fluconazol, voriconazol e itraconazol. Os polienos, como a anfotericina B, intercalam com o ergosterol presente na membrana formando poros que levam à morte celular. Dentre os inibidores da síntese de ácidos nucleicos está a 5-flucitosina. Já as equinocandinas, como caspofungina e micafungina, inibem a síntese de β -1,3-glucano, principal componente da parede

celular (FERREIRA et al., 2009; KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009).

A estrutura química dos principais fármacos antifúngicos está representada na Figura 5. Terbinafina (pertencente a classe das alilaminas, que atua na inibição da síntese do ergosterol) e Griseofulvina (que atua no aparelho mitótico fúngico) são fármacos utilizados no tratamento de infecções causadas por dermatófitos (SIDRIM; ROCHA, 2004).

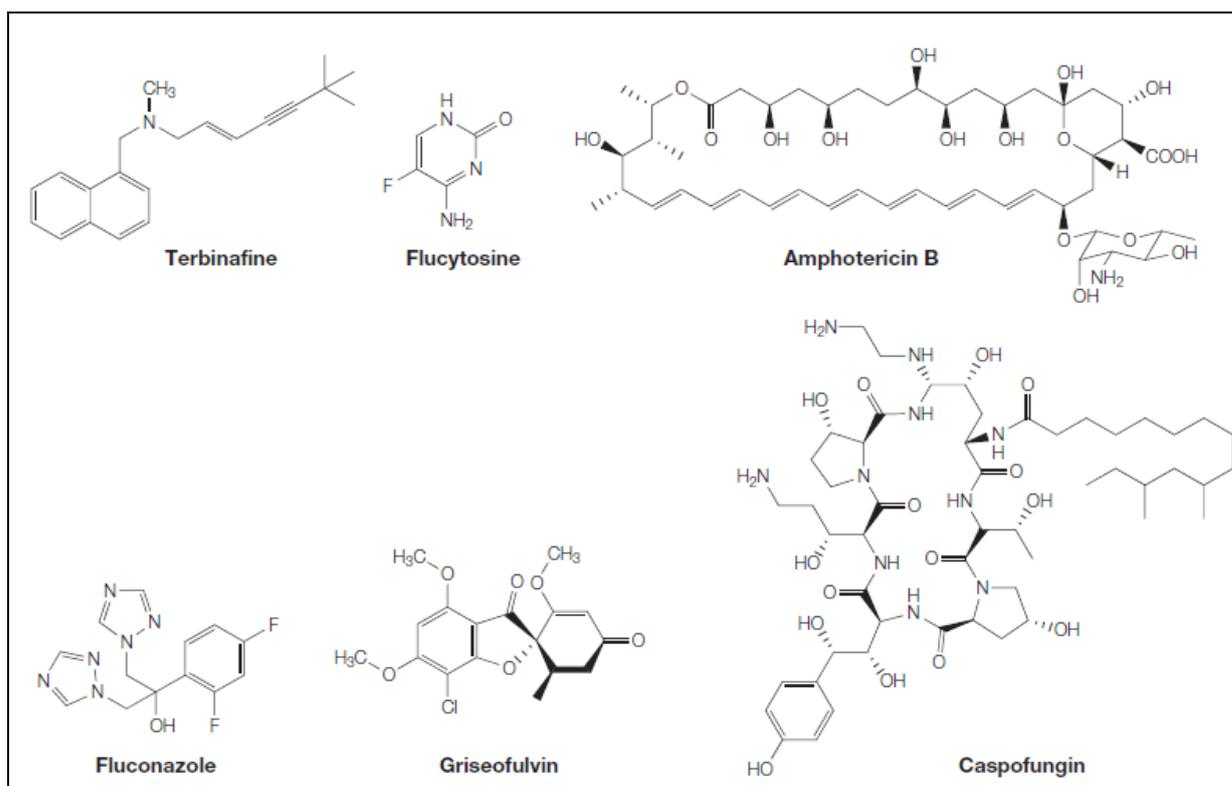


Figura 5 - Estrutura química de alguns fármacos com ação antifúngica.
Fonte: ANDERSON, 2005.

Candida albicans, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* apresentam boa sensibilidade aos antifúngicos polienos, flucitosinas, azólicos e equinocandinas. *Candida glabrata* é menos suscetível à ação de Fluconazol e Anfotericina B, porém possui alta sensibilidade a antifúngicos como equinocandinas, voriconazol e posaconazol. *Candida krusei*, por sua vez, é intrinsecamente resistente ao Fluconazol e geralmente menos sensível à ação da Anfotericina B; contudo, possui boa sensibilidade a antifúngicos como equinocandinas e azólicos de espectro estendido (MIMICA et al., 2009).

A aplicação terapêutica destes antifúngicos por vezes é limitada, dada sua toxicidade e o aumento significativo da resistência de espécies de *Candida* nos últimos anos, representando um grande desafio na terapêutica (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009; MISHRA et al., 2007; WEI; XU; WU, 2011).

2.5.2 Antimicrobianos naturais

O aparecimento de isolados de *Candida* spp. resistentes às drogas antifúngicas tradicionais tem mostrado a necessidade de opções terapêuticas alternativas. Investigações sobre novas classes de drogas ou novas combinações de drogas já existem, tanto para combater a resistência aos medicamentos quanto para aumentar a eficácia das drogas em geral (WEI; XU; WU, 2011).

A natureza é uma importante fonte de substâncias farmacologicamente ativas, sendo que a maioria dos fármacos em uso clínico são de origem natural ou são desenvolvidos por síntese a partir de produtos naturais, e foram os antibióticos que mais contribuíram para o interesse em produtos naturais (BARREIRO, 2009).

A produção de substâncias de origem vegetal com aplicações terapêuticas tem sido de grande interesse atualmente. Compostos com propriedades antimicrobianas podem ser produzidos como consequência do metabolismo secundário das plantas e estar presentes em extratos e óleos essenciais (DUARTE, 2006).

Atualmente, os métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais mais utilizados incluem método de difusão em agar, método de macrodiluição e microdiluição, sendo este último utilizado principalmente para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de extratos ativos de plantas (OSTROSKY, 2008).

2.5.2.1 Gênero *Rheedia*

O gênero *Rheedia*, também denominado *Garcinia*, é considerado o de maior número de espécies da família *Guttiferae*. Análises químicas de partes de plantas desse gênero apresentaram uma composição química variada, com predomínio de derivados fenólicos prenilados e oxigenados, biflavonóides, xantonas, benzofenonas, triterpenos e isocumarinas (ALMEIDA et al., 2008).

Substâncias isoladas da família *Guttiferae* têm demonstrado potencial antimicrobiano sobre cocos Gram positivos, Gram negativos e fungos, além de outras propriedades farmacológicas, tais como ações antitumoral e anti-HIV, no entanto, existem poucos estudos relacionados à atividade antimicrobiana de extratos ou compostos extraídos desse grupo de plantas (ALMEIDA et al., 2008).

Estudos têm avaliado a atividade antimicrobiana dos extratos da *Rheedia brasiliensis* (sinônimo: *Garcinia brasiliensis*), planta nativa da região amazônica brasileira e também chamada de “bacupari” (ALMEIDA et al., 2008; GUSTAFSON et al., 1992).

As guttiferonas são benzofenonas polipreniladas hidroxiladas, com várias citações na literatura por seu amplo espectro de atividades biológicas e sua ocorrência comum na família *Guttiferae* (GUSTAFSON et al., 1992). Há relatos de 15 tipos de guttiferonas, sendo que alguns desses compostos são relatados como antimicrobianos, como a Guttiferona-A (Figura 6), isolada de *Rheedia brasiliensis* (DIAS et al., 2012).

Outra substância também caracterizada e isolada de *Rheedia brasiliensis*, e com atividade antimicrobiana, é a 7-Epiclusianona (Figura 7).

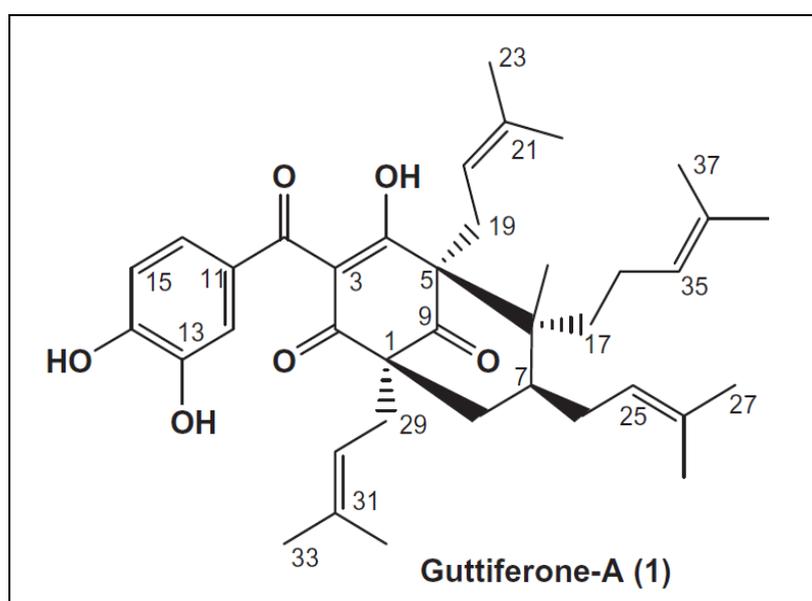


Figura 6 - Estrutura química da Guttiferona-A.
Fonte: DIAS et al. (2012).

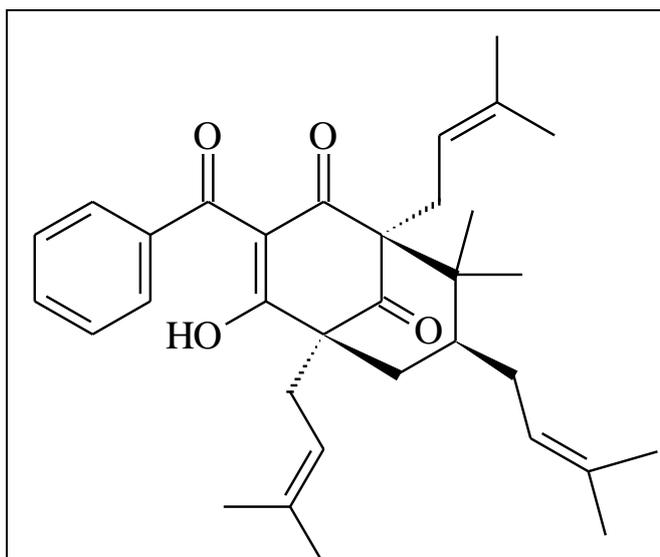


Figura 7 - Estrutura química da 7-Epiclusianona.
Fonte: SANTOS et al., 1999.

Dessa maneira, muitos estudos têm sido realizados tanto com extratos vegetais quanto com substâncias purificadas e isoladas a partir destes extratos com a finalidade de se encontrar novos agentes com atividade antimicrobiana.

2.5.3 Biofilmes e resistência a antifúngicos

Células sésseis presentes no biofilme exibem propriedades específicas, entre elas uma maior tolerância aos antifúngicos, quando comparadas às células planctônicas livres correspondentes, sendo possível inclusive isolar células persistentes do biofilme após tratamento com antifúngico. Dessa maneira, é importante compreender as mudanças que ocorrem durante o processo de formação e desenvolvimento de biofilmes, para que se avalie sua real contribuição para a tolerância aos antifúngicos (D'EFERT, 2009).

Em 1995 Douglas et al. já haviam demonstrado o aumento da resistência antifúngica em biofilmes de *Candida* spp., que foram de 20 a 2000 vezes mais resistentes que células planctônicas a vários antifúngicos, incluindo a anfotericina B, fluconazol, itraconazol e cetoconazol (QUINDÓS; VILLAR-VIDAL; ERASO, 2009; SENEVIRATNE et al., 2008). Vários estudos subsequentes demonstraram a

diminuição da sensibilidade de biofilmes de *Candida* spp. aos antifúngicos quando comparados às células planctônicas correspondentes, chegando a resistência do biofilme a ser 4000 vezes maior ao Fluconazol do que as células livres (FERREIRA et al., 2009; JAIN et al., 2007; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006; WEI; XU; WU, 2011). Biofilmes podem ser menos sensíveis até mesmo às substâncias utilizadas para desinfetar dispositivos e equipamentos médicos contaminados (NETT et al., 2008; THERAUD et al., 2004).

Cabe ressaltar que essa resistência dos biofilmes aos antifúngicos pode variar de acordo com a espécie de *Candida* envolvida no processo infeccioso, mas já demonstra a necessidade de desenvolvimento de novas drogas ou novas associações entre drogas (FERREIRA et al., 2009; SCHILLACI et al., 2008; SENEVIRATNE et al., 2010; UPPULURI et al., 2008; WEI; XU; WU, 2011). De qualquer forma, as equinocandinas e Anfotericina B lipossomal têm apresentado maior atividade contra biofilmes de *Candida* spp. (KUHN et al., 2002; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006; QUINDÓS; VILLAR-VIDAL; ERASO, 2009; SENEVIRATNE et al., 2008; UPPULURI; CHATURVEDI; LOPEZ-RIBOT I, 2009).

Vários estudos têm sido realizados na tentativa de esclarecer os mecanismos pelos quais os biofilmes de *Candida* spp. apresentam resistência maior aos antifúngicos quando comparados com as células planctônicas, mas ainda não estão completamente esclarecidos (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006). Alguns dos possíveis mecanismos incluem a penetração restrita da droga através da matriz do biofilme, a taxa de crescimento diminuída das células e a limitação de nutrientes, mudanças na interação da droga, a expressão de genes de resistência, principalmente aqueles de codificam bombas de efluxo, a densidade celular aumentada, o processo de filamentação e a presença de células “persistir” no biofilme (CHANDRA; ZHOU; GHANNOUM, 2005; FINKEL; MITCHELL, 2011; MISHRA et al., 2007; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006; SENEVIRATNE et al., 2010).

Desta maneira, o que se pode concluir é que a resistência aos antifúngicos em biofilmes é multifatorial, sendo um processo complexo e de grande importância clínica, principalmente porque a aquisição de resistência a drogas pode acontecer durante o tratamento da candidíase, e muitas dessas manifestações estão associadas com a formação de biofilmes de *Candida* spp. (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009; MISHRA et al., 2007).

2.5.4 Testes de Sensibilidade Antifúngica

O aumento da prevalência da resistência aos antifúngicos demonstra ser essencial conhecer a espécie de *Candida* envolvida no processo infeccioso, sua origem e sua sensibilidade aos antifúngicos, para que um tratamento adequado seja estabelecido.

A partir da publicação do documento M27-A do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI, com a padronização de testes de sensibilidade antifúngica de leveduras, através de técnicas de macro e microdiluição em caldo, houve um avanço no conhecimento do perfil de sensibilidade destes microrganismos (FAVALESSA; MARTINS; HAHN, 2010).

No intuito de minimizar as limitações do método descrito no documento M27-A, bem como otimizar os ensaios para a determinação de resistência, formou-se um subcomitê dentro do grupo europeu (denominado *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* – EUCAST) da *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID) voltado a estudar parâmetros para testes com antifúngicos específicos para tipos diversos de leveduras (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2000).

Apesar de se embasar no manual CLSI, o EUCAST incorpora modificações importantes na técnica de microdiluição em placas, como a redução do período de incubação de 48 para 24 h, a suplementação do meio *Roswell Park Memorial Institute* utilizado (RPMI-1640) com 2% de glicose, um inóculo de $1 - 5 \times 10^5$ UFC/mL (ao contrário do inóculo de $1 - 5 \times 10^3$ proposto pelo CLSI), microplacas de 96 poços com fundo plano (ao contrário das placas de fundo arredondado usadas na metodologia proposta pelo CLSI) e leitura espectrofotométrica (ao contrário da leitura visual proposta pelo CLSI) (CLSI, 2008; EUCAST, 2012).

Atualmente também têm sido utilizados métodos alternativos, como difusão em ágar utilizando fitas impregnadas com gradientes de concentração de antifúngicos, como E-test[®] (FAVALESSA; MARTINS; HAHN, 2010), apesar de não existir comercialmente fitas com todos os tipos de drogas, especialmente para testes com bioativos vegetais.

Apesar destes avanços, as metodologias de testes de sensibilidade antifúngica como a técnica de diluição em caldo preconizada pelo CLSI ou pelo EUCAST, e a técnica do E-test[®], são voltadas para testes em populações de células

planctônicas, não permitindo que seja estimada a eficácia da droga contra biofilmes (RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006). Esta pode ser uma das principais razões para a falta de correlação entre os resultados de sensibilidade aos antifúngicos obtidos *in vitro* e os resultados clínicos em pacientes, principalmente em infecções disseminadas (RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006; RAMAGE et al., 2001), já que a maioria das infecções por *Candida* spp., especialmente as invasivas, estão relacionadas à formação de biofilmes, os quais se associam a um fenótipo de resistência aumentada (ANDES et al., 2004; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006; SENEVIRATNE et al., 2008; SHUFORD et al., 2007).

Dessa maneira, é importante que sejam implementadas técnicas padronizadas de ensaio de sensibilidade antifúngica em biofilmes e que tenham boa correlação *in vitro* e *in vivo*, como as técnicas de microtitulação em placas de 96 poços acopladas a métodos colorimétricos. O uso desses ensaios deve ser útil para a seleção de antifúngicos eficazes na terapêutica das infecções associadas biofilme (RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar a distribuição de linhagens de *Candida* spp. isoladas de ambiente hospitalar e avaliar e comparar o efeito de antifúngicos sintéticos e bioativos vegetais em biofilmes e suspensões celulares destas linhagens.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a distribuição de amostras de *Candida* spp. isoladas a partir de ambiente em Hospital Público do Sul de Minas Gerais.
- Avaliar a produção de biofilmes das diferentes linhagens de *Candida* spp. isoladas em relação à sua densidade óptica e atividade metabólica.
- Avaliar o perfil de sensibilidade das células planctônicas de *Candida* spp. e de células em biofilmes a antifúngicos de aplicação convencional.
- Avaliar o perfil de sensibilidade das células planctônicas de *Candida* spp. e de células em biofilmes a substâncias bioativas de origem vegetal.
- Confrontar a sensibilidade de células planctônicas e de biofilmes dos isolados de *Candida* spp.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Amostras de ambiente hospitalar foram coletadas em setores considerados críticos de um Hospital Público da região Sul de Minas Gerais. Foram coletadas 60 amostras de cada um dos setores: Unidade de Tratamento Intensivo (UTI), Posto de Internação de Pacientes Oncológicos e Centro de Quimioterapia, no período de novembro de 2011 a março de 2012.

A coleta foi realizada com *swab* estéril umidificado em solução salina estéril de locais como mãos de profissionais, bolsos de jaleco, superfícies de postos de enfermagem e de quartos de pacientes. Os materiais foram semeados em meio Agar BHI (Brain Heart Infusion) com cloranfenicol e incubados a 35°C por até 15 dias. Colônias de leveduras, sugestivas de *Candida* spp., foram isoladas, identificadas e mantidas em meio Agar Sabouraud a 8°C, na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG.

4.2 Aspectos Éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da UNIFAL-MG e aprovado (Protocolo nº 133/2011 – Anexo A). Foi encaminhado o pedido de Autorização ao Hospital para realização da coleta de dados (Apêndice A) e a coleta das amostras de profissionais foi realizada após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aos sujeitos da pesquisa (Apêndice B).

4.3 Identificação das amostras

Foi utilizado o meio de cultura cromogênico Chromagar® *Candida* para observação da pureza da colônia e avaliação presuntiva das espécies pertencentes ao gênero *Candida*. Aliado a este teste, para identificação das espécies, foram realizados o teste de fermentação de fontes de carbono (zimograma) e o teste de assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio (auxanograma) (SIDRIM; ROCHA, 2004).

As leveduras foram semeadas no meio cromogênico e incubadas a 37°C por 48h para identificação presuntiva.

Para o preparo do meio basal do zimograma em água destilada, foram utilizados 0,45% de extrato de levedura e 0,75% de peptona, e 0,005% de azul de bromotimol como indicador. O meio foi esterilizado a 121°C durante 15 min e distribuído em tubos de ensaio em alíquotas de 3 mL contendo tubos de Durhan invertidos. As fontes de carbono empregadas nesse teste foram glicose, sacarose, maltose, lactose, rafinose e trealose. Foi distribuído 1,5 mL de solução a 9% de cada açúcar nos tubos de ensaio que continham o meio básico, permitindo uma concentração final de 3% de cada açúcar testado. Em seguida, foram inoculados com 0,2 mL da suspensão da levedura com turvação correspondente a escala 5 de McFarland. As culturas foram mantidas em temperatura de 25 a 30°C por 14 dias e as leituras realizadas diariamente com o intuito de se observar o desprendimento de gás dentro dos tubos de Durhan, o que indica a positividade do teste (SIDRIM; ROCHA, 2004).

No preparo do meio para prova de assimilação de carbono, em água destilada, foram utilizados 0,67% de meio base *Yeast Nitrogen Base* (YNB) e 2,0% de Agar Bacteriológico. Quanto ao meio para prova de assimilação de nitrogênio, em água destilada, foi empregado 1,17% de meio base *Yeast Carbon Base* (YCB) e 2,0% de Agar Bacteriológico. Os meios foram esterilizados a 121°C por 15 min. Os açúcares empregados no teste de assimilação de fontes de carbono foram sacarose, maltose, lactose, celubiose, trealose, rafinose, xilose, glicose e inositol, enquanto as fontes de nitrogênio utilizadas no teste de assimilação dessas fontes foram sulfato de amônio e nitrato de potássio. Para realização dos testes de assimilação de carbono e de nitrogênio, foram empregados 2 mL de suspensão de levedura com turvação correspondente a escala 3 de McFarland, vertidos em placas de Petri, e em seguida foram adicionados 40 mL de meio básico YNB (em placas de 15 cm de diâmetro) ou 13 mL de meio básico YCB (em placas de 9cm de diâmetro), resfriados a 50°C. Após solidificação do meio básico foram colocadas em pontos equidistantes do meio YNB, as fontes de carbono e do meio YCB, as fontes de nitrogênio; incubando-se entre 25 e 30°C por 96 h. A assimilação foi verificada pela formação de halos opacos ao redor da fonte (SIDRIM; ROCHA, 2004).

4.4 Formação de biofilmes de *Candida* spp.

Os biofilmes foram desenvolvidos em microplacas de poliestireno de fundo chato com 96 poços, pré-esterilizadas, disponíveis comercialmente, segundo a técnica descrita por Seneviratne et al. (2008) com algumas modificações.

Para o preparo das suspensões utilizadas, amostras de *Candida* spp. foram inoculadas em meio Agar Sabouraud e incubadas a 35°C por 24h, e depois em caldo YNB suplementado com 100 mM de glicose por mais 24h a 35°C. As suspensões celulares foram ajustadas a uma densidade óptica equivalente a 1×10^6 células/mL em caldo YNB suplementado, e utilizadas logo após o preparo.

As microplacas foram sensibilizadas com 200 µL de soro fetal bovino estéril e incubadas por 24h a 37°C. Após remoção do soro por aspiração foram adicionados em cada poço 100 µL de suspensão padronizada de *Candida* spp.. As placas foram então incubadas a 37°C, 75rpm por 1,5h em estufa de agitação orbital para permitir a aderência celular à superfície da placa. Posteriormente as suspensões foram removidas e cada poço lavado com 200 µL de tampão fosfato-salino – *Phosphate Buffered Saline* (PBS) por duas vezes, para a remoção de células não aderidas. Após a lavagem, foram, então, pipetados em cada poço 200 µL de caldo YNB suplementado com glicose e as placas incubadas a 37°C, 75 rpm por 48h em estufa de agitação orbital. Após a formação do biofilme cada poço teve o meio aspirado e novamente lavado com 200 µL de tampão PBS por duas vezes, para a remoção de células não aderidas. Para controle, um poço de cada placa de microtitulação foi manuseado de maneira idêntica, exceto pela não adição de suspensão de *Candida* spp.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.5 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes

Para avaliação da capacidade de formação dos biofilmes foi realizada a leitura da densidade óptica em um leitor de placas a 405 nm (JIN et al., 2003).

Foram realizadas duas medidas espectrofotométricas em leitor de placas, a primeira logo após as 48h de formação dos biofilmes e a segunda após aspiração do meio e lavagem com tampão PBS, com o objetivo de avaliar a quantidade de

material removido durante a lavagem com tampão (composto por células dispersas, matriz extracelular e produtos liberados).

Os valores de absorvância obtidos para os poços controle foram então subtraídos dos valores dos poços teste, para eliminar resultados incorretos devido à interferência de fundo. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Os valores de absorvância para produção de biofilme foram comparados ao maior valor de leitura obtido, sendo a este atribuído o índice de 100% de capacidade de formação de biofilme. As amostras foram então ordenadas em ordem crescente de absorvância obtida, e foram calculados os quartis (Q), que dividem a distribuição de resultados em quatro partes iguais. O primeiro quartil (Q1), foi estabelecido como o limite entre as 25% menores observações e as 75% maiores, o segundo quartil (Q2), é igual à mediana e o terceiro quartil (Q3), separando as 75% menores observações das 25% maiores.

A seguir, para melhor interpretação dos resultados, as amostras foram classificadas em quatro grupos de quartil, considerados de 1 a 4, cada um com 25% das amostras, sendo grupo 1 (GQ1) para os 25% dos isolados de maior absorvância (cujas absorvâncias se encontram maiores que Q3), grupo 2 (GQ2) para os 25% dos isolados subsequentes (cujas absorvâncias se encontram entre Q2 e Q3), grupo 3 (GQ3) para os 25% dos isolados subsequentes (cujas absorvâncias se encontram entre Q1 e Q2) e grupo 4 (GQ4) para os 25% das amostras com menores resultados de absorvância (cujas absorvâncias se encontram menores que Q1).

4.6 Avaliação da atividade metabólica dos biofilmes

Para avaliação da atividade metabólica do biofilme foi realizado o ensaio de redução do XTT, conforme métodos descritos anteriormente por Kuhn et al. (2002) e por Ramage et al. (2001), com algumas modificações. Previamente, uma solução de XTT a 1 mg/mL em PBS foi preparada, esterilizada por filtração e armazenada a -80°C. Uma solução de menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) foi preparada (0,4 mM) em acetona e também esterilizada por filtração. Antes de cada ensaio, a solução de XTT foi descongelada e misturada à solução de menadiona a uma proporção de 5 para 1 em volume.

Foram adicionados 12µL da solução XTT-Menadiona e 200 µL da solução PBS em cada poço pré-lavado e com biofilmes formados e nos poços controle. A

placa de microtitulação foi então incubada protegida da luz por 2h a 37°C. Seguindo a incubação, 100 µL de solução foram transferidos para novos poços e a mudança de cor da solução foi medida espectrofotometricamente em leitor de placas, a 490 nm. Esta mudança na coloração é proporcional ao número de células vivas e pode ser quantificada, portanto, quanto maior a absorbância, maior o número de células metabolicamente ativas, uma vez que o ensaio de redução de XTT quantifica a capacidade da enzima desidrogenase presente na mitocôndria de converter o sal tetrazólio hidrossolúvel XTT (cor amarela) em compostos de formazana (cor laranja).

Os valores de absorbância obtidos para os poços controle foram então subtraídos dos valores dos poços teste, para eliminar resultados incorretos devido à interferência de fundo (JIN et al., 2003). Os ensaios foram realizados em duplicata.

Da mesma forma que foi avaliada a capacidade de produção de biofilmes, os valores de absorbância para atividade metabólica dos biofilmes foram comparados ao maior valor de leitura obtido, e as amostras classificadas em grupos de quartil, cada um contendo 25% das amostras.

4.7 Determinação da sensibilidade a antifúngicos sintéticos e bioativos vegetais de células planctônicas de *Candida* spp.

Foi realizado o Teste de Microdiluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras segundo publicação do CLSI (documento M27A3, 2008) com algumas modificações sugeridas no documento EDef 7.2 do EUCAST (2012).

Os antifúngicos sintéticos testados foram o Fluconazol e a Anfotericina B, diluídos em meio sintético RPMI-1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol) tamponado a pH $7,0 \pm 0,1$ com a solução tampão MOPS e suplementado com 2% de glicose.

Guttiferona-A e 7-Epiclusianona, substâncias purificadas de *Rheedia brasiliensis*, foram testadas. Estas moléculas foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM), da UNIFAL-MG.

A faixa de concentração dos fármacos utilizados foi de 64 a 0,125 µg/mL para Fluconazol, de 16 a 0,0313 µg/mL para Anfotericina B e de 100 a 0,060 µg/mL para Guttiferona-A e 7-Epiclusianona.

Para o preparo das suspensões utilizadas, amostras de *Candida* spp. foram inoculadas em meio Agar Sabouraud e incubadas a 35°C. Foi preparado um inóculo em solução salina estéril a 0,85% e as suspensões celulares ajustadas à densidade óptica equivalente a $1-5 \times 10^6$ células/mL em comprimento de onda de 530nm (equivalente a uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5). As suspensões foram então diluídas com meio RPMI-1640 a uma concentração de $1-5 \times 10^5$ células por mL e utilizadas logo após o preparo.

O teste foi realizado em placas de microdiluição estéreis, descartáveis, de 96 poços de fundo chato. Foram adicionados volumes de 100 µL das diluições dos fármacos antifúngicos 2 vezes concentrados e 100 µL das suspensões dos inóculos.

Para cada microrganismo testado, foi realizado controle negativo (branco) com 200 µL do meio de cultura sem adição de microrganismo na coluna 1 da microplaca. Nas colunas de 2 a 11 foram realizados os testes com antifúngico e microrganismos, sendo que na coluna 2 estava a maior concentração da droga e a coluna 11 a menor concentração da droga. Na coluna 12 foi realizado o controle de crescimento (controle positivo), com 100 µL de meio de cultura e 100 µL da suspensão de leveduras, sem antifúngico.

As microplacas foram incubadas a 35°C por 24h e a leitura feita em leitor automatizado de placas a 530 nm. A concentração inibitória (IC_n), ou *endpoint*, foi determinada como a concentração mais baixa do agente antimicrobiano que impede n% do crescimento microbiano. Para Fluconazol e substâncias puras foram determinadas as IC_{50} e para Anfotericina B IC_{90} . Todas as densidades ópticas tiveram a leitura descontada da leitura do branco, e a absorbância do controle positivo foi considerada 100% (CLSI, 2008; EUCAST, 2012).

Além da determinação da IC, como estudo individual da sensibilidade dos isolados, foi determinada a CIM, como estudo populacional. A CIM_n representa a concentração mais baixa do agente antimicrobiano que impede n% das amostras testadas. Para Fluconazol e substâncias puras foram determinadas as CIM_{50} e para Anfotericina B CIM_{90} . Todas as densidades ópticas tiveram a leitura descontada da leitura do branco, e a absorbância do controle positivo foi considerada 100% (CLSI, 2008; EUCAST, 2012). Os testes foram realizados em duplicata.

As amostras padrões *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. tropicalis* ATCC 750 foram utilizadas como Controle de Qualidade, conforme recomendado pelo documento M27 A3 do CLSI (2008).

Os perfis de sensibilidade e resistência aos antifúngicos Fluconazol e Anfotericina B foram interpretados conforme proposto no documento M27 A3 do CLSI, 2008 e Pfaller et al., 2012 (Tabela 1).

Tabela 1 - Interpretação do perfil de sensibilidade antifúngica de amostras de *Candida* spp. de acordo com valores apresentados de IC pelo Método de Microdiluição em Caldo.

Antifúngico ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade	Sensibilidade Dose Dependente	Resistência
Fluconazol ¹	≤ 8	16 – 32	≥ 64
Anfotericina B ²	≤ 1	–	≥ 2

Fonte: ¹Documento M27 A3, CLSI, 2008.

²Pfaller et al., 2012.

4.8 Determinação da sensibilidade a antifúngicos sintéticos e bioativos vegetais de biofilmes de *Candida* spp.

Para realização do teste de sensibilidade em biofilmes foi realizada a técnica descrita por Ramage et al. (2001), com algumas modificações. Após a formação dos biofilmes conforme já descrito, foram adicionados 200 μL de diferentes concentrações de Fluconazol, Anfotericina B, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona em cada poço, e a microplaca incubada por 48h a 37°C.

Os antifúngicos foram diluídos em meio RPMI-1640 com L-glutamina e sem bicarbonato, tamponado com MOPS e suplementado com 2% de glicose. Para cada isolado foram testadas 10 diluições seriais logarítmicas dos antifúngicos. As faixas de concentrações dos fármacos utilizados foram de 1024 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para Fluconazol, de 64 a 0,125 $\mu\text{g/mL}$ para Anfotericina B e de 800 a 0,23 $\mu\text{g/mL}$ para a Guttiferona-A e 7-Epiclusianona.

Após incubação do biofilme já formado e adicionado das substâncias testadas, cada poço teve o meio aspirado e lavado com 200 μL de tampão PBS por duas vezes, para a remoção de células não aderidas. Para controle, poços contendo somente soluções de antifúngicos e poços com biofilmes sem antifúngicos foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente.

Em seguida foi feita a avaliação da atividade metabólica do biofilme, realizada através do ensaio de redução do XTT, já descrito anteriormente no item 5.4.

Todas as densidades ópticas tiveram a leitura descontada da leitura do branco, e a absorbância do controle positivo (biofilme formado sem adição de antifúngico) foi considerada 100%. A CIM das células sésseis (SCIM) foi determinada de acordo com uma inibição de no mínimo 50% da atividade metabólica do biofilmes tratados com Fluconazol, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona e de 90% para Anfotericina B, de acordo com o ensaio de redução do XTT.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.9 Análise Estatística

O trabalho foi realizado utilizando Delineamento Inteiramente Casualizado.

Para análises de estatística descritiva e realização de Teste Qui-Quadrado para dados qualitativos, foi utilizado o software BioEstat®.

Foram realizados os testes Análise de Variância e Scott-Knott para o teste de médias, com intervalo de confiança de 95%, utilizando o software Sisvar®. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p\text{-valor} < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Distribuição e origem das amostras de *Candida* spp. no ambiente hospitalar

De um total de 180 amostras ambientais coletadas nos setores críticos do hospital em estudo, 34 foram positivas para leveduras, sendo 2 isolados de *Rhodotorula* spp. e 32 isolados de *Candida* spp.

Foram isoladas 9 amostras de *Candida* spp. do ambiente da UTI, 12 do Posto de Internação de Pacientes Oncológicos e 11 do Centro de Quimioterapia, o que corresponde a uma distribuição de 15%, 20% e 18,3% nestes ambientes, respectivamente (Gráfico 1). Realizando o teste de Qui-Quadrado foi possível observar que o setor de coleta não influenciou na positividade de amostras de *Candida* spp. (p -valor = 0.7664).

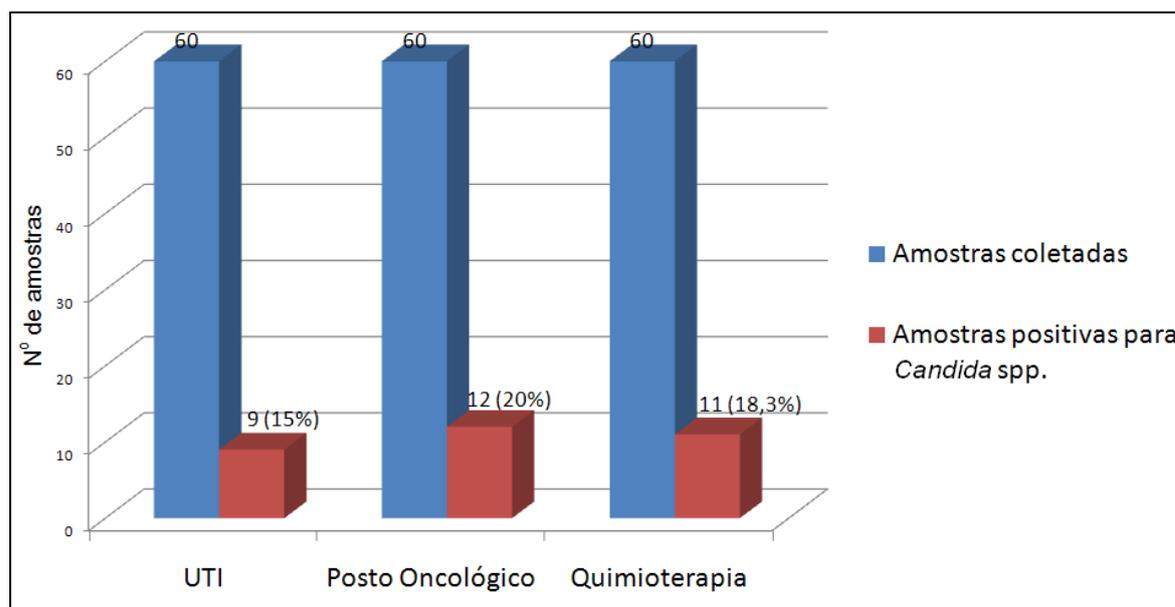


Gráfico 1 - Distribuição dos isolados de *Candida* spp. nos pontos críticos de coleta no ambiente hospitalar. Número de amostras coletadas (% de distribuição).

Fonte: O autor, 2012.

As áreas em que foram realizadas as coletas de amostras, assim como o número de isolados de *Candida* spp. e sua distribuição em cada local podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Locais de coletas e distribuição de amostras de *Candida* spp. encontradas nas diferentes áreas de coleta no ambiente hospitalar.

Local de Coleta	Nº de amostras coletadas	Nº de isolados de <i>Candida</i> spp.	Distribuição de <i>Candida</i> spp.
Mãos de Profissionais	31	9	29,0%
Equipamentos de Proteção Individual (jalecos e luvas)	28	3	10,7%
Leitos de pacientes (lençóis, colchões, poltronas de quimioterapia)	28	5	17,9%
Equipamentos Hospitalares (bomba de infusão, ECG, monitor cardíaco, Raio-X, gasômetro)	10	4	40,0%
Locais de armazenamento e preparo de medicamentos (bandejas, carrinhos de emergência, geladeiras de medicamentos)	9	5	55,5%
Locais de higienização das mãos (pias, torneiras, almotolias com antissépticos, dispensador álcool-gel)	16	3	18,8%
Veículos de Distribuição de alimentos	2	2	100%
Superfícies (balcões, interruptores, maçanetas, telefones)	53	1	1,9%
Estetoscópios	3	0	0%
Total	180	32	17,8%

Fonte: O autor, 2012.

A distribuição percentual do total das 32 amostras de *Candida* spp. isoladas no ambiente hospitalar em relação à fonte de isolamento se encontra no Gráfico 2.

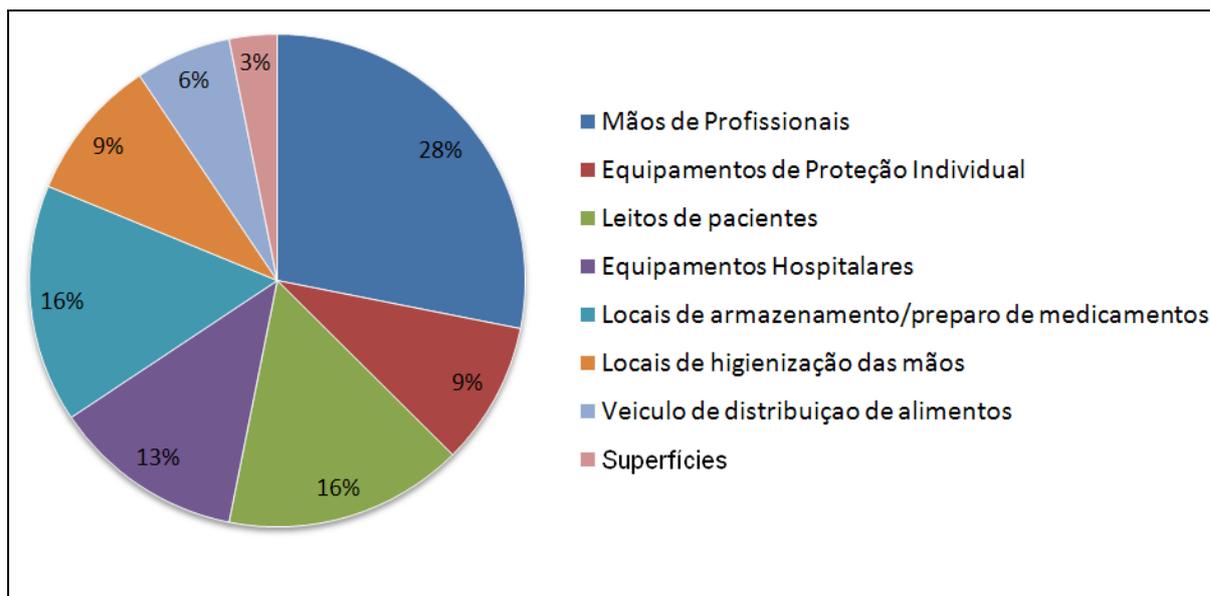


Gráfico 2 - Distribuição percentual dos isolados de *Candida* spp. nos dispositivos presentes nas diferentes áreas de coleta no ambiente hospitalar.

Fonte: O autor, 2012.

É possível observar que a maior parte das amostras foi isolada a partir das mãos de profissionais hospitalares (9 isolados). Foram classificadas como oriundas de Equipamentos de Proteção Individual as amostras isoladas de jalecos de profissionais (2 isolados) e caixa de luvas descartáveis (1 isolado). Amostras de leitos de pacientes foram obtidas de lençóis de macas (1 isolado) e poltronas em que pacientes recebem quimioterapia (4 isolados). De Equipamentos Hospitalares foram isoladas amostras de bombas de infusão de medicamentos (3 isolados) e equipamento de eletrocardiograma (1 isolado). Em relação aos locais de preparo e armazenamento de medicamentos, foram isoladas amostras de bandeja de preparo de medicamentos (2 isolados), carrinho de emergência (2 isolados) e geladeira de armazenamento de medicamentos termolábeis (1 isolado). Dos locais de higienização das mãos foram isoladas amostras de pia de lavabo (1 isolado), torneira de lavado (1 isolado) e almotolia de sabonete líquido (1 isolado). Além disso, foram isoladas amostras de veículos de distribuição de alimentos (2 isolados) e superfícies (1 isolado de caixa de armazenamento de algodão).

5.2 Identificação das amostras

As amostras foram identificadas conforme anteriormente descrito através do meio de cultura cromogênico Chromagar® *Candida* (Figura 8), teste de fermentação de fontes de carbono (Figura 9) e teste de assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio (Figura 10).

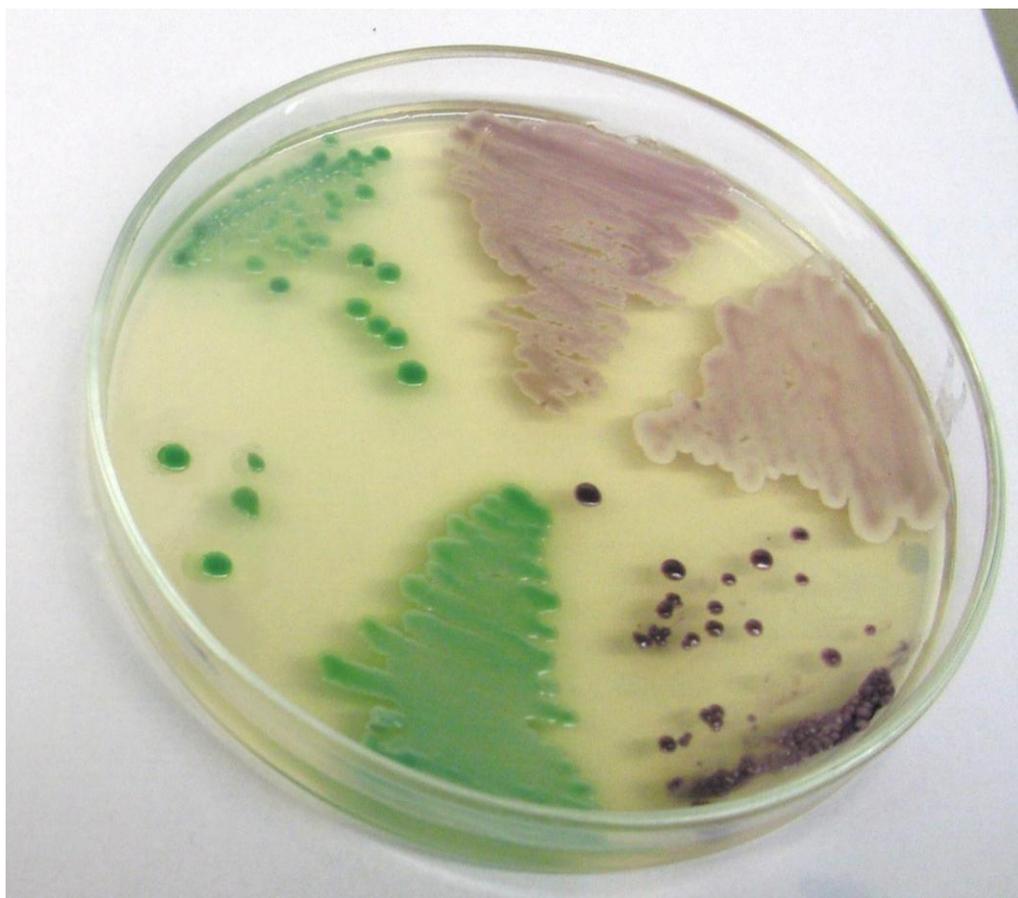


Figura 8 - Avaliação do crescimento e análise das espécies de leveduras, isoladas do ambiente hospitalar, em meio de cultura cromogênico. Colônias em verde são sugestivas de *C. albicans*, colônias em rosa claro são sugestivas de *C. parapsilosis* e colônias em rosa a roxo são sugestivas de *C. glabrata*.

Fonte: O autor, 2012.



Figura 9 - Análise da capacidade fermentadora da espécie *C. guilliermondii* (amostra 70) através do teste de fermentação de fontes de carbono – zimograma. A presença de bolhas de CO₂ no interior dos tudos de Duhram indicam a positividade do teste (destaque em vermelho). Teste positivo para os glicose, galactose, rafnose, sacarose e trealose; e negativo para lactose.

Fonte: O autor, 2012.

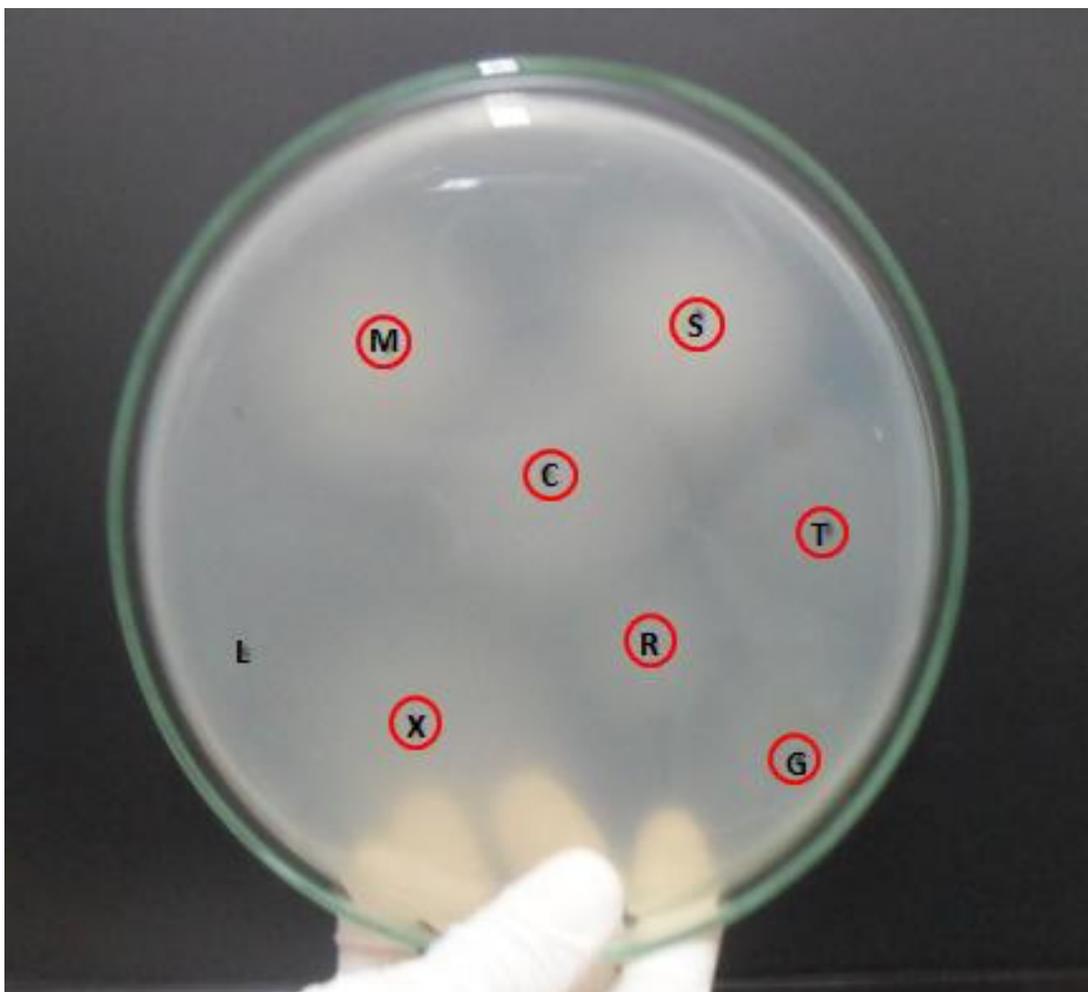


Figura 10 - Análise das espécies de assimilação de fontes de carbono do isolado de *C. guilliermondii* (amostra 70) através de teste assimilação de fontes de carbono – auxanograma. A presença de halos opacos ao redor da aplicação do açúcar indicam a positividade do teste (destaque em vermelho). Teste positivo para os açúcares maltose (M), sacarose (S), celobiose (C), trealose (T), xilose (X), rafinose (R) e glicose (G); e negativo para lactose (L).

Fonte: O autor, 2012.

A distribuição das espécies identificadas de acordo com a fonte de isolamento encontra-se detalhada na Tabela 3. Amostras de mesmo número seguidas de letras diferentes indicam que foram encontradas mais de uma espécie de *Candida* spp. na mesma amostra coletada.

Tabela 3 - Distribuição das espécies de *Candida* spp. em relação à fonte de isolamento.

Amostra	Fonte	Identificação
	Mãos de Profissionais	
13	Mão de Profissional	<i>C. tropicalis</i>
19	Mão de Profissional	<i>C. parapsilosis</i>
33A	Mão de Profissional	<i>C. parapsilosis</i>
33B	Mão de Profissional	<i>C. guilliermondii</i>
67	Mão de Profissional	<i>C. parapsilosis</i>
70	Mão de Profissional	<i>C. guilliermondii</i>
104A	Mão de Profissional	<i>C. parapsilosis</i>
104B	Mão de Profissional	<i>C. glabrata</i>
105	Mão de Profissional	<i>C. parapsilosis</i>
	Equipamentos de Proteção Individual	
57	Jaleco	<i>C. guilliermondii</i>
120	Caixa de Luvas	<i>C. parapsilosis</i>
142	Jaleco	<i>C. parapsilosis</i>
	Leitos de pacientes	
55	Lençol	<i>C. tropicalis</i>
107	Poltrona Quimioterapia	<i>C. tropicalis</i>
124	Poltrona Quimioterapia	<i>C. tropicalis</i>
125	Poltrona Quimioterapia	<i>C. parapsilosis</i>
130	Poltrona Quimioterapia	<i>C. parapsilosis</i>
	Equipamentos Hospitalares	
37A	Bomba de Infusão	<i>C. parapsilosis</i>
37B	Bomba de Infusão	<i>C. glabrata</i>
78	Bomba de Infusão	<i>C. parapsilosis</i>
90	Equipamento ECG	<i>C. parapsilosis</i>
	Locais de armazenamento/preparo de medicamentos	
75	Bandeja Medicamentos	<i>C. parapsilosis</i>
79A	Carrinho de Emergência	<i>C. parapsilosis</i>
79B	Carrinho de Emergência	<i>C. parapsilosis</i>
83	Geladeira Medicamentos	<i>C. guilliermondii</i>
86	Mesa de Preparo Medicamentos	<i>C. parapsilosis</i>
	Locais de higienização das mãos	
28	Almotolia Sabonete	<i>C. parapsilosis</i>
27	Torneira de lavabo	<i>C. parapsilosis</i>
138	Pia de lavabo	<i>C. famata</i>
	Veículos de Distribuição de alimentos	
39	Veículo de distribuição de alimentos	<i>C. tropicalis</i>
40	Veículo de distribuição de alimentos	<i>C. parapsilosis</i>
	Superfícies	
133	Caixa de Algodão	<i>C. tropicalis</i>

C. parapsilosis: complexo *C. parapsilosis*.

Fonte: O autor, 2012.

O gráfico 3 representa a distribuição de cada espécie de *Candida*. Foram isoladas 1 amostra de *Candida famata*, 2 amostras de *C. glabrata*, 4 amostras de *C. guilliermondii*, 6 amostras de *C. tropicalis* e 19 amostras do complexo *C. parapsilosis*.

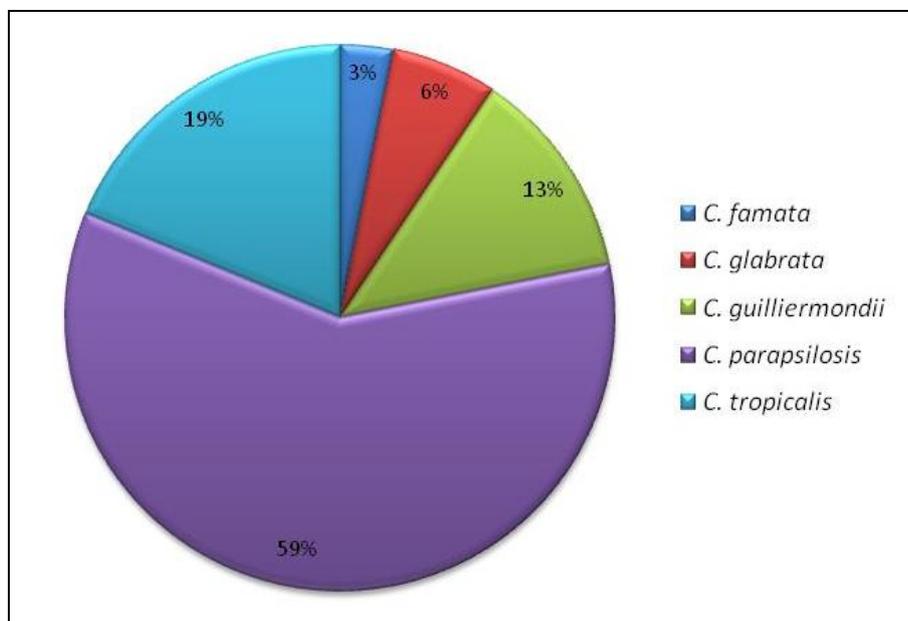


Gráfico 3 - Distribuição das amostras de *Candida* spp. oriundas de ambiente hospitalar quanto à espécie. *Candida parapsilosis*: complexo *C. parapsilosis*.

Fonte: O autor, 2012.

5.3 Avaliação da capacidade de produção e atividade metabólica de biofilmes

Todas as amostras isoladas foram capazes de produzir biofilme. Para avaliar a capacidade de formação de biofilme foi avaliada a densidade óptica do biofilme a 405nm depois de formado (antes da lavagem com tampão PBS) e após lavagem com tampão PBS (Figura 11). A determinação da atividade metabólica dos biofilmes foi obtida através da técnica colorimétrica de redução do XTT (Figura 12). Os valores obtidos se encontram descritos na Tabela 4 e foram organizados de acordo com a espécie de *Candida*.

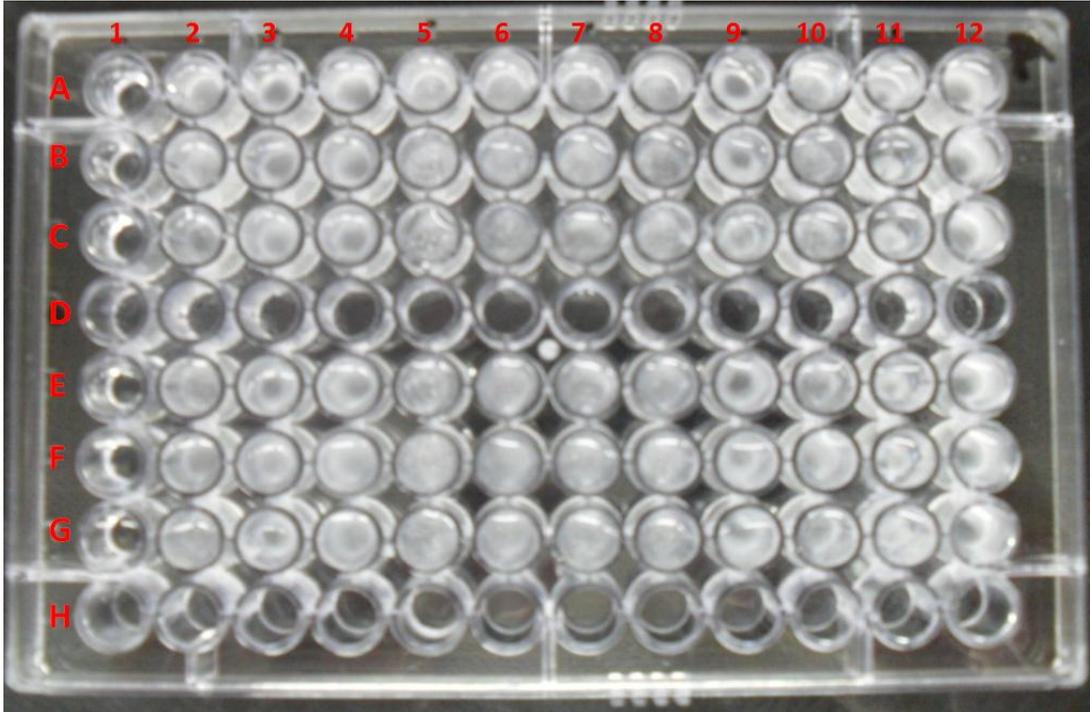


Figura 11 - Representação fotográfica de biofilmes em placa de microtitulação após 48h, antes da lavagem com tampão PBS (na coluna 1: branco, nas linhas D e H: não constam amostras de biofilmes).

Fonte: O autor, 2012.

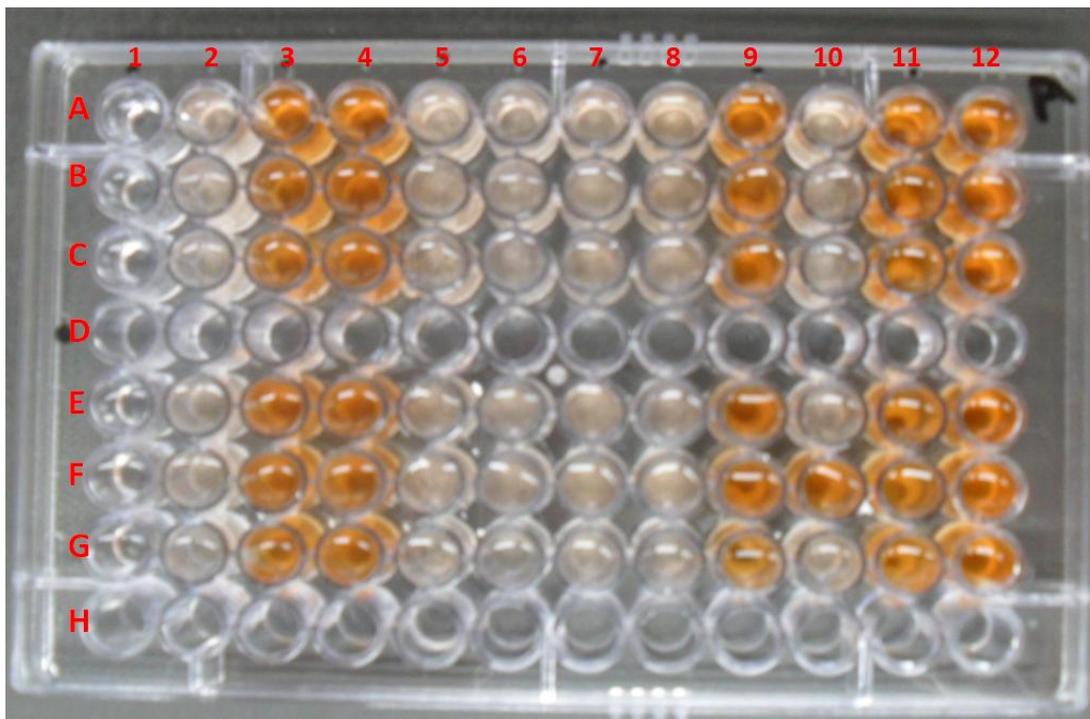


Figura 12 - Representação fotográfica do ensaio de detecção de células metabolicamente ativas em biofilmes (na coluna 1: branco, nas linhas D e H: não constam amostras de biofilmes).

Fonte: O autor, 2012.

Tabela 4 - Avaliação da capacidade de produção de biofilme e atividade metabólica entre as amostras de *Candida* spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar (Valores expressos em média da Densidade Óptica \pm Desvio Padrão)

Amostra	Espécie	Produção de Biofilme (antes lavagem PBS)	Produção de Biofilme (após lavagem PBS)	Atividade Metabólica
		DO ₄₀₅ \pm DP	DO ₄₀₅ \pm DP	DO ₄₉₀ \pm DP
138	<i>C. famata</i>	0,720 \pm 0,058	0,310 \pm 0,262	0,195 \pm 0,005
37B	<i>C. glabrata</i>	0,872 \pm 0,104	0,192 \pm 0,099	0,208 \pm 0,012
104B	<i>C. glabrata</i>	0,892 \pm 0,010	0,365 \pm 0,179	0,183 \pm 0,011
33B	<i>C. guilliermondii</i>	0,566 \pm 0,105	0,101 \pm 0,111	0,167 \pm 0,041
57	<i>C. guilliermondii</i>	1,279 \pm 0,147	0,668 \pm 0,133	0,170 \pm 0,023
70	<i>C. guilliermondii</i>	0,836 \pm 0,110	0,293 \pm 0,247	0,187 \pm 0,017
83	<i>C. guilliermondii</i>	0,558 \pm 0,106	0,068 \pm 0,015	0,180 \pm 0,011
19	<i>C. parapsilosis</i>	0,737 \pm 0,056	0,081 \pm 0,019	0,062 \pm 0,014
27	<i>C. parapsilosis</i>	0,883 \pm 0,091	0,278 \pm 0,105	0,063 \pm 0,013
28	<i>C. parapsilosis</i>	0,976 \pm 0,088	0,178 \pm 0,159	0,062 \pm 0,027
33A	<i>C. parapsilosis</i>	0,823 \pm 0,041	0,086 \pm 0,029	0,086 \pm 0,025
37A	<i>C. parapsilosis</i>	0,621 \pm 0,077	0,128 \pm 0,050	0,041 \pm 0,011
40	<i>C. parapsilosis</i>	1,025 \pm 0,079	0,550 \pm 0,149	0,023 \pm 0,011
67	<i>C. parapsilosis</i>	1,050 \pm 0,253	0,812 \pm 0,129	0,027 \pm 0,007
75	<i>C. parapsilosis</i>	0,898 \pm 0,047	0,474 \pm 0,131	0,168 \pm 0,026
78	<i>C. parapsilosis</i>	0,812 \pm 0,074	0,254 \pm 0,093	0,068 \pm 0,009
79A	<i>C. parapsilosis</i>	0,722 \pm 0,113	0,311 \pm 0,052	0,065 \pm 0,010
79B	<i>C. parapsilosis</i>	1,182 \pm 0,192	0,754 \pm 0,234	0,024 \pm 0,003
86	<i>C. parapsilosis</i>	0,848 \pm 0,315	0,781 \pm 0,280	0,036 \pm 0,013
90	<i>C. parapsilosis</i>	0,770 \pm 0,050	0,141 \pm 0,056	0,080 \pm 0,016
104A	<i>C. parapsilosis</i>	0,951 \pm 0,167	0,675 \pm 0,228	0,018 \pm 0,009
105	<i>C. parapsilosis</i>	0,736 \pm 0,172	0,426 \pm 0,166	0,093 \pm 0,013
120	<i>C. parapsilosis</i>	0,859 \pm 0,050	0,224 \pm 0,117	0,053 \pm 0,028
125	<i>C. parapsilosis</i>	0,858 \pm 0,028	0,231 \pm 0,050	0,043 \pm 0,018
130	<i>C. parapsilosis</i>	0,860 \pm 0,044	0,229 \pm 0,097	0,058 \pm 0,018
142	<i>C. parapsilosis</i>	0,885 \pm 0,059	0,175 \pm 0,085	0,072 \pm 0,025
13	<i>C. tropicalis</i>	0,880 \pm 0,162	0,327 \pm 0,078	0,044 \pm 0,014
39	<i>C. tropicalis</i>	0,940 \pm 0,119	0,450 \pm 0,157	0,166 \pm 0,036
55	<i>C. tropicalis</i>	1,342 \pm 0,105	0,681 \pm 0,070	0,181 \pm 0,014
107	<i>C. tropicalis</i>	0,811 \pm 0,069	0,181 \pm 0,067	0,073 \pm 0,012
124	<i>C. tropicalis</i>	0,831 \pm 0,027	0,163 \pm 0,031	0,065 \pm 0,016
133	<i>C. tropicalis</i>	0,775 \pm 0,125	0,194 \pm 0,082	0,073 \pm 0,014
	Média Geral	0,869 \pm 0,101	0,337 \pm 0,117	0,095 \pm 0,016

DO: Densidade óptica

DP: Desvio Padrão

C. parapsilosis: complexo *C. parapsilosis*.

Fonte: O autor, 2012.

Tabela 5 - Avaliação percentual e classificação em grupos de quartis da capacidade de produção de biofilme e atividade metabólica entre as amostras de *Candida* spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.

Amostra	Espécies	Produção de Biofilme (antes lavagem PBS)			Produção de Biofilme (após lavagem PBS)			Atividade Metabólica		
		DO ₄₀₅	%	GQ	DO ₄₀₅	%	GQ	DO ₄₉₀	%	GQ
138	<i>C. famata</i>	0,720	53,64	4	0,310	38,14	2	0,195	93,91	1
37B	<i>C. glabrata</i>	0,872	64,97	2	0,192	23,60	3	0,208	100,00	1
104B	<i>C. glabrata</i>	0,892	66,47	2	0,365	44,97	2	0,183	88,06	1
33B	<i>C. guilliermondii</i>	0,566	42,14	4	0,101	12,40	4	0,167	80,13	2
57	<i>C. guilliermondii</i>	1,279	95,28	1	0,668	82,29	1	0,170	81,49	1
70	<i>C. guilliermondii</i>	0,836	62,26	3	0,293	36,02	2	0,187	90,06	1
83	<i>C. guilliermondii</i>	0,558	41,60	4	0,068	8,31	4	0,180	86,54	1
19	<i>C. parapsilosis</i>	0,737	54,88	4	0,081	9,91	4	0,062	29,85	3
27	<i>C. parapsilosis</i>	0,883	65,80	2	0,278	34,24	2	0,063	30,13	3
28	<i>C. parapsilosis</i>	0,976	72,71	1	0,178	21,90	3	0,062	29,57	3
33A	<i>C. parapsilosis</i>	0,823	61,31	3	0,086	10,57	4	0,086	41,19	3
37A	<i>C. parapsilosis</i>	0,621	46,30	4	0,128	15,80	4	0,041	19,71	4
40	<i>C. parapsilosis</i>	1,025	76,34	1	0,550	67,73	1	0,023	11,06	4
67	<i>C. parapsilosis</i>	1,050	78,24	1	0,812	100,00	1	0,027	12,90	4
75	<i>C. parapsilosis</i>	0,898	66,89	2	0,474	58,39	1	0,168	80,85	1
78	<i>C. parapsilosis</i>	0,812	60,49	3	0,254	31,26	3	0,068	32,53	2
79A	<i>C. parapsilosis</i>	0,722	53,76	4	0,311	38,28	2	0,065	31,09	3
79B	<i>C. parapsilosis</i>	1,182	88,09	1	0,754	92,86	1	0,024	11,38	4
86	<i>C. parapsilosis</i>	0,848	63,21	3	0,781	96,22	1	0,036	17,23	4
90	<i>C. parapsilosis</i>	0,770	57,36	4	0,141	17,36	4	0,080	38,46	2
104A	<i>C. parapsilosis</i>	0,951	70,86	1	0,675	83,13	1	0,018	8,73	4
105	<i>C. parapsilosis</i>	0,736	54,83	4	0,426	52,46	2	0,093	44,63	2
120	<i>C. parapsilosis</i>	0,859	63,98	3	0,224	27,61	3	0,053	25,48	3
125	<i>C. parapsilosis</i>	0,858	63,90	3	0,231	28,41	3	0,043	20,43	4
130	<i>C. parapsilosis</i>	0,860	64,07	2	0,229	28,16	3	0,058	27,72	3
142	<i>C. parapsilosis</i>	0,885	65,92	2	0,175	21,59	4	0,072	34,46	2
13	<i>C. tropicalis</i>	0,880	65,60	2	0,327	40,29	2	0,044	21,23	4
39	<i>C. tropicalis</i>	0,940	70,06	1	0,450	55,38	2	0,166	79,65	2
55	<i>C. tropicalis</i>	1,342	100,00	1	0,681	83,87	1	0,181	87,18	1
107	<i>C. tropicalis</i>	0,811	60,44	3	0,181	22,27	3	0,073	34,86	2
124	<i>C. tropicalis</i>	0,831	61,91	3	0,163	20,05	4	0,065	31,17	3
133	<i>C. tropicalis</i>	0,775	57,72	3	0,194	23,91	3	0,073	34,86	2

DO: Densidade óptica média para cada amostra.

%: Índice percentual da absorbância da amostra quando comparada à maior absorbância.

GQ: Classificação das amostras em grupos de acordo com os quartis (1 para os 25% dos isolados de maior absorbância, 2 para os 25% dos isolados com absorbâncias subsequentes, grupo 3 para mais 25% dos isolados com absorbâncias subsequentes e 4 para os 25% das amostras com menores resultados de absorbância).

C. parapsilosis: complexo *C. parapsilosis*.

Fonte: O autor, 2012.

Na Tabela 5 encontram-se as avaliações percentuais da capacidade de produção de biofilme e atividade metabólica entre as amostras em relação aos maiores valores de absorvância obtidos em cada teste, além da classificação das amostras em grupos de quartis.

Para comparar a capacidade de produção de biofilme e atividade metabólica entre as diferentes espécies das amostras isoladas, foram calculadas as médias entre as amostras das diferentes espécies e realizada análise de variância (ANAVA). Os resultados são apresentados na Tabela 6 e Gráficos 4 e 5. É possível observar que não houve diferença estatística significativa em relação à capacidade de produção de biofilme entre as diferentes espécies, independente da lavagem com tampão PBS (p -valor $>0,05$). Já em relação à atividade metabólica, biofilmes de *C. tropicalis* e do complexo *C. parapsilosis* apresentaram os menores valores de atividade metabólica, não diferindo entre si, enquanto amostras de *C. famata*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii* apresentaram os maiores valores de atividade metabólica, não diferindo entre si (p -valor $<0,05$).

Tabela 6 - Comparação da capacidade de produção de biofilme e atividade metabólica entre as diferentes espécies de *Candida* spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar (Valores expressos em média da Densidade Óptica \pm Desvio Padrão).

Espécies	Produção de Biofilme (antes lavagem PBS)	Produção de Biofilme (após lavagem PBS)	Atividade Metabólica	
	DO ₄₀₅ \pm DP	DO ₄₀₅ \pm DP	DO ₄₉₅ \pm	DP
<i>C. famata</i>	0,720	0,310	0,195	a
<i>C. glabrata</i>	0,882 \pm 0,014	0,279 \pm 0,122	0,196 \pm 0,018	a
<i>C. guilliermondii</i>	0,810 \pm 0,339	0,283 \pm 0,276	0,176 \pm 0,009	a
<i>C. parapsilosis</i>	0,868 \pm 0,131	0,357 \pm 0,245	0,060 \pm 0,034	b
<i>C. tropicalis</i>	0,930 \pm 0,210	0,333 \pm 0,203	0,100 \pm 0,058	b
p-valor	0,7681	0,9740	0,0001	

DO: Densidade óptica.

DP: Desvio Padrão.

Atividade metabólica: médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de variância.

C. parapsilosis: complexo *C. parapsilosis*.

Fonte: O autor, 2012.

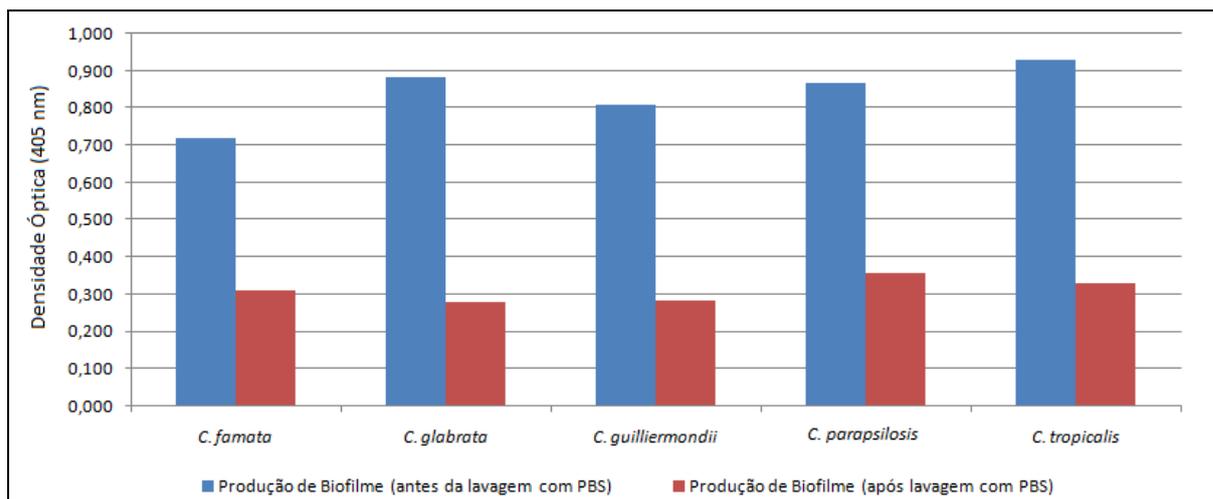


Gráfico 4 - Comparação da capacidade de produção de biofilme entre os isolados de *Candida* spp. de fontes de ambiente hospitalar. Valores médios de densidade óptica a 405 nm para cada espécie (antes e após lavagem com tampão PBS). Não houve diferença estatística entre as diferentes espécies (p-valor>0,05). *Candida parapsilosis*: complexo *C. parapsilosis*.

Fonte: O autor, 2012.

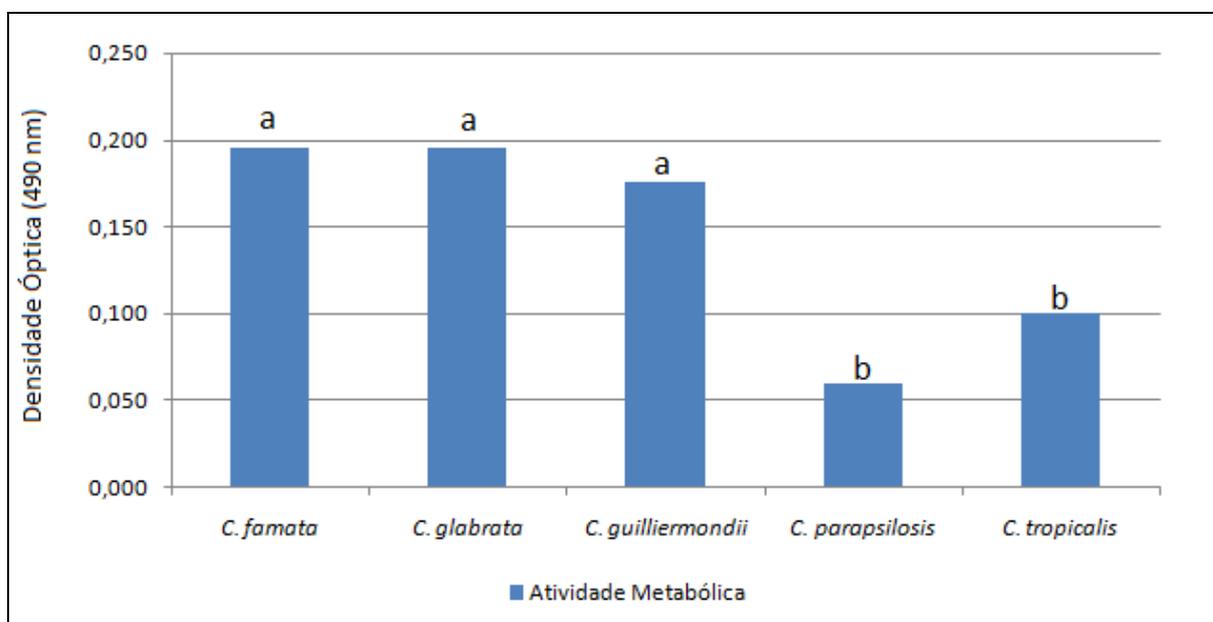


Gráfico 5 - Comparação da atividade metabólica de biofilmes entre os isolados de *Candida* spp. de fontes de ambiente hospitalar. Valores médios de densidade óptica a 490 nm para cada espécie (médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de variância). *Candida parapsilosis*: complexo *C. parapsilosis*.

Fonte: O autor, 2012.

5.4 Perfil de sensibilidade das células planctônicas

Os resultados do Teste de Microdiluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras são apresentados na Tabela 7 e foram organizados de

acordo com a espécie de *Candida*. A IC_n foi determinada como a concentração mais baixa do agente antimicrobiano que impede o n% do crescimento do microrganismo. Para o fármaco Fluconazol e para os bioativos vegetais Guttiferona-A e 7-Epiclusianona foram determinadas as IC₅₀ e para a droga poliênica Anfotericina B IC₉₀. Os resultados estão expressos em µg/mL e µM/L.

Tabela 7 – Testes de Sensibilidade em Células Planctônicas. Concentração Inibitória em µg/mL e µM/L do crescimento *in vitro* de 90% (IC₉₀) para Anfotericina B e 50% (IC₅₀) para Fluconazol, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona entre as amostras de *Candida* spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.

Amostra	Espécie	IC em µg/mL (µM/L) – Células Planctônicas			
		Fluconazol	Anfotericina B	Guttiferona-A	7-Epiclusianona
138	<i>C. famata</i>	4 (13,06)	0,5 (0,54)	0,23 (0,38)	60 (119,45)
37B	<i>C. glabrata</i>	1 (3,27)	1 (1,08)	1,875 (3,11)	100 (199,08)
104B	<i>C. glabrata</i>	1 (3,27)	0,25 (0,27)	15 (24,88)	>100 (>199,08)
33B	<i>C. guilliermondii</i>	4 (13,06)	1 (1,08)	0,23 (0,38)	30 (59,73)
57	<i>C. guilliermondii</i>	4 (13,06)	0,5 (0,54)	1,875 (3,11)	100 (199,08)
70	<i>C. guilliermondii</i>	16 (52,24)	1 (1,08)	0,468 (0,78)	30 (59,73)
83	<i>C. guilliermondii</i>	8 (26,12)	0,5 (0,54)	0,468 (0,78)	30 (59,73)
19	<i>C. parapsilosis</i>	1 (3,27)	0,5 (0,54)	1,875 (3,11)	100 (199,08)
27	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	1 (1,08)	1,875 (3,11)	100 (199,08)
28	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	1 (1,08)	0,23 (0,38)	30 (59,73)
33A	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	1 (1,08)	1,875 (3,11)	>100 (>199,08)
37A	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	0,5 (0,54)	1,875 (3,11)	100 (199,08)
40	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	1 (1,08)	7,5 (12,44)	60 (119,45)
67	<i>C. parapsilosis</i>	1 (3,27)	1 (1,08)	3,75 (6,22)	>100 (>199,08)
75	<i>C. parapsilosis</i>	2 (6,53)	0,5 (0,54)	0,468 (0,78)	>100 (>199,08)
78	<i>C. parapsilosis</i>	4 (13,06)	1 (1,08)	1,875 (3,11)	100 (199,08)
79.1	<i>C. parapsilosis</i>	1 (3,27)	0,5 (0,54)	0,23 (0,38)	30 (59,73)
79.2	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	1 (1,08)	3,75 (6,22)	100 (199,08)
86	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	0,5 (0,54)	15 (24,88)	100 (199,08)
90	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	0,5 (0,54)	1,875 (3,11)	100 (199,08)
104A	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	1 (1,08)	7,5 (12,44)	100 (199,08)
105	<i>C. parapsilosis</i>	1 (3,27)	0,25 (0,27)	0,23 (0,38)	30 (59,73)
120	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	0,5 (0,54)	0,468 (0,78)	100 (199,08)
125	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	0,5 (0,54)	0,468 (0,78)	100 (199,08)
130	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	0,5 (0,54)	0,468 (0,78)	100 (199,08)
142	<i>C. parapsilosis</i>	4 (13,06)	0,5 (0,54)	0,468 (0,78)	60 (119,45)
13	<i>C. tropicalis</i>	1 (3,27)	0,5 (0,54)	0,468 (0,78)	100 (199,08)
39	<i>C. tropicalis</i>	0,25 (0,82)	1 (1,08)	100 (165,89)	>100 (>199,08)
55	<i>C. tropicalis</i>	4 (13,06)	0,5 (0,54)	0,468 (0,78)	100 (199,08)
107	<i>C. tropicalis</i>	0,5 (1,63)	0,25 (0,27)	3,75 (6,22)	100 (199,08)
124	<i>C. tropicalis</i>	0,5 (1,63)	0,25 (0,27)	0,23 (0,38)	100 (199,08)
133	<i>C. tropicalis</i>	1 (3,27)	0,125 (0,14)	3,75 (6,22)	>100 (>199,08)

C. parapsilosis: complexo *C. parapsilosis*.

Fonte: O autor, 2012.

As análises da Concentração Inibitória Mínima populacional, ou seja, a concentração de antifúngico Fluconazol e bioativos vegetais Guttiferona-A e 7-Epiclusianona que inibe 50% das amostras testadas (CIM₅₀), e a concentração de Anfotericina A que inibe 90% das amostras (CIM₉₀), estão representadas na Tabela 8, de acordo com a espécie de *Candida*.

Tabela 8 - Testes de Sensibilidade em Células Planctônicas. Concentração Inibitória Mínima em µg/mL e µM/L do crescimento *in vitro* de 90% (CIM₉₀) para Anfotericina B e 50% (CIM₅₀) para Fluconazol, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona entre as diferentes espécies de *Candida* isoladas de fontes de ambiente hospitalar.

Espécie	CIM em µg/mL (µM/L) – Células Planctônicas			
	Fluconazol	Anfotericina B	Guttiferona-A	7-Epiclusianona
<i>C. famata</i>	4,0 (13,06) a1	0,5 (0,54)	0,230 (0,38)	60 (119,45)
<i>C. glabrata</i>	1,0 (3,27) a1	0,25 (0,27)	1,875 (3,11)	>100 (>199,08)
<i>C. guilliermondii</i>	4,0 (13,06) a2	0,5 (0,54)	0,468 (0,78)	30 (59,73)
<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63) a1	0,5 (0,54)	1,875 (3,11)	100 (199,08)
<i>C. tropicalis</i>	0,5 (1,63) a1	0,25 (0,27)	0,468 (0,78)	100 (199,08)
p-valor	0,0001	0,3845	0,4284	0,081

p-valor: Análise Estatística baseada nas médias individuais de concentrações inibitórias mínimas.

Fluconazol: médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de variância.

C. parapsilosis: complexo *C. parapsilosis*.

Fonte: O autor, 2012.

É possível observar que não houve diferença estatística significativa em relação às Concentrações Inibitórias Mínimas para Anfotericina B e os bioativos vegetais (p-valor>0,05). Já em relação ao Fluconazol amostras de *C. guilliermondii* apresentaram os maiores valores CIM (p-valor<0,05), enquanto as demais amostras não diferiram entre si.

5.5 Perfil de sensibilidade de biofilmes

Os resultados do Teste de Sensibilidade em Biofilmes são apresentados na Tabela 9. Para o fármaco Fluconazol e para os bioativos vegetais Guttiferona-A e 7-Epiclusianona foram determinadas as IC₅₀ (concentração que inibe 50% da atividade metabólica do biofilme) e para Anfotericina B, IC₉₀ (concentração que inibe 90% da atividade metabólica do biofilme).

Tabela 9 – Testes de Sensibilidade em Biofilmes. Concentração Inibitória em µg/mL e µM/L do crescimento *in vitro* de 90% (IC₉₀) para Anfotericina B e 50% (IC₅₀) para Fluconazol, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona entre amostras de *Candida* spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.

Amostra	Espécie	IC em µg/mL (µM/L) – Biofilmes			
		Fluconazol	Anfotericina B	Guttiferona-A	Epiclusianona
138	<i>C. famata</i>	>1024 (>3343,46)	8 (8,66)	100 (165,89)	200 (398,16)
37 B	<i>C. glabrata</i>	>1024 (>3343,46)	16 (17,31)	100 (165,89)	>800 (>1592,7)
104 B	<i>C. glabrata</i>	>1024 (>3343,46)	16 (17,31)	600 (995,36)	>800 (>1592,7)
33 B	<i>C. guilliermondii</i>	512 (1671,63)	4 (4,33)	200 (331,78)	600 (1194,51)
57	<i>C. guilliermondii</i>	>1024 (>3343,46)	64 (69,26)	30 (49,76)	400 (796,34)
70	<i>C. guilliermondii</i>	1024 (3343,46)	16 (17,31)	30 (49,76)	800 (1592,7)
83	<i>C. guilliermondii</i>	>1024 (>3343,46)	64 (69,26)	60 (99,52)	200 (398,16)
19	<i>C. parapsilosis</i>	>1024 (>3343,46)	64 (69,26)	100 (165,89)	200 (398,16)
27	<i>C. parapsilosis</i>	>1024 (>3343,46)	8 (8,66)	60 (99,52)	200 (398,16)
28	<i>C. parapsilosis</i>	>1024 (>3343,46)	4 (4,33)	30 (49,76)	200 (398,16)
33 A	<i>C. parapsilosis</i>	>1024 (>3343,46)	4 (4,33)	15 (24,88)	200 (398,16)
37 A	<i>C. parapsilosis</i>	>1024 (>3343,46)	4 (4,33)	30 (49,76)	600 (1194,51)
40	<i>C. parapsilosis</i>	>1024 (>3343,46)	8 (8,66)	30 (49,76)	200 (398,16)
67	<i>C. parapsilosis</i>	256 (835,82)	32 (34,63)	30 (49,76)	60 (119,45)
75	<i>C. parapsilosis</i>	>1024 (>3343,46)	4 (4,33)	100 (165,89)	>800 (>1592,7)
78	<i>C. parapsilosis</i>	>1024 (>3343,46)	32 (34,63)	60 (99,52)	600 (1194,51)
79A	<i>C. parapsilosis</i>	>1024 (>3343,46)	32 (34,63)	60 (99,52)	800 (1592,7)
79B	<i>C. parapsilosis</i>	256 (835,82)	8 (8,66)	200 (331,78)	>800 (>1592,7)
86	<i>C. parapsilosis</i>	512 (1671,63)	32 (34,63)	100 (165,89)	600 (1194,51)
90	<i>C. parapsilosis</i>	>1024 (>3343,46)	8 (8,66)	30 (49,76)	400 (796,34)
104 A	<i>C. parapsilosis</i>	>1024 (>3343,46)	32 (34,63)	400 (663,56)	>800 (>1592,7)
105	<i>C. parapsilosis</i>	>1024 (>3343,46)	64 (69,26)	600 (995,36)	600 (1194,51)
120	<i>C. parapsilosis</i>	>1024 (>3343,46)	32 (34,63)	100 (165,89)	>800 (>1592,7)
125	<i>C. parapsilosis</i>	>1024 (>3343,46)	16 (17,31)	400 (663,56)	600 (1194,51)
130	<i>C. parapsilosis</i>	>1024 (>3343,46)	64 (69,26)	800 (1327,14)	600 (1194,51)
142	<i>C. parapsilosis</i>	>1024 (>3343,46)	32 (34,63)	600 (995,36)	400 (796,34)
13	<i>C. tropicalis</i>	>1024 (>3343,46)	16 (17,31)	15 (24,88)	600 (1194,51)
39	<i>C. tropicalis</i>	>1024 (>3343,46)	32 (34,63)	200 (331,78)	>800 (>1592,7)
55	<i>C. tropicalis</i>	>1024 (>3343,46)	64 (69,26)	200 (331,78)	200 (398,16)
107	<i>C. tropicalis</i>	>1024 (>3343,46)	32 (34,63)	200 (331,78)	800 (1592,7)
124	<i>C. tropicalis</i>	>1024 (>3343,46)	16 (17,31)	100 (165,89)	800 (1592,7)
133	<i>C. tropicalis</i>	>1024 (>3343,46)	8 (8,66)	800 (1327,14)	>800 (>1592,7)

C. parapsilosis: complexo *C. parapsilosis*.

Fonte: O autor, 2012.

As análises das CIMs de Fluconazol e bioativos vegetais que inibem 50% da atividade metabólica de biofilmes e de Anfotericina B que inibem 90% da atividade metabólica de biofilmes, de acordo com a espécie de *Candida*, estão representadas na Tabela 10. É possível observar que não houve diferença estatisticamente

significante em relação às Concentrações Inibitórias Mínimas entre as diferentes espécies, para nenhuma substância testada (p-valor>0,05).

Tabela 10 - Testes de Sensibilidade em Biofilmes. Concentração Inibitória Mínima em $\mu\text{g}/\text{mL}$ e $\mu\text{M}/\text{L}$ do crescimento *in vitro* de 90% (CIM₉₀) para anfotericina B e 50% (CIM₅₀) para Fluconazol, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona entre as diferentes espécies de *Candida* isoladas de fontes de ambiente hospitalar.

Espécie	CIM em $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\mu\text{M}/\text{L}$) – Biofilmes			
	Fluconazol	Anfotericina B	Guttiferona-A	7-Epiclusianona
<i>C. famata</i>	>1024 (>3343,46)	8 (8,66)	100 (165,89)	200 (398,16)
<i>C. glabrata</i>	>1024 (>3343,46)	16 (17,31)	100 (165,89)	>800 (>1592,67)
<i>C. guilliermondii</i>	1024 (3343,46)	64 (69,26)	30 (49,76)	400 (796,34)
<i>C. parapsilosis</i>	>1024 (>3343,46)	64 (69,26)	100 (165,89)	600 (796,34)
<i>C. tropicalis</i>	>1024 (>3343,46)	64 (69,26)	200 (331,78)	800 (1592,67)
p-valor	0,8153	0,7043	0,1232	0,4125

p-valor: Análise Estatística baseada nas médias individuais de Concentrações Inibitórias Mínimas.

C. parapsilosis: complexo *C. parapsilosis*.

Fonte: O autor, 2012.

Os resultados comparativos entre Testes de Sensibilidade de células planctônicas e biofilmes a Fluconazol, Anfotericina B, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona podem ser observados nas Tabelas 11, 12, 13 e 14 respectivamente, onde também está indicado o aumento da IC para as substâncias em biofilmes em relação às células planctônicas.

Tabela 11 - Concentração Inibitória em $\mu\text{g/mL}$ e $\mu\text{M/L}$ do crescimento *in vitro* de 50% (IC_{50}) para Fluconazol em células planctônicas e biofilmes de amostras de *Candida* spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.

Amostra	Espécie	Fluconazol - IC_{50} em $\mu\text{g/mL}$ ($\mu\text{M/L}$)		
		Células Planctônicas	Células em Biofilme	Aumento da IC_{50}
138	<i>C. famata</i>	4 (13,06)	>1024 (>3343,46)	>256
37B	<i>C. glabrata</i>	1 (3,27)	>1024 (>3343,46)	>1024
104B	<i>C. glabrata</i>	1 (3,27)	>1024 (>3343,46)	>1024
33B	<i>C. guilliermondii</i>	4 (13,06)	512 (1671,63)	128
57	<i>C. guilliermondii</i>	4 (13,06)	>1024 (>3343,46)	>256
70	<i>C. guilliermondii</i>	16 (52,24)	1024 (3343,46)	64
83	<i>C. guilliermondii</i>	8 (26,12)	>1024 (>3343,46)	>128
19	<i>C. parapsilosis</i>	1 (3,27)	>1024 (>3343,46)	>1024
27	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	>1024 (>3343,46)	>2048
28	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	>1024 (>3343,46)	>2048
33A	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	>1024 (>3343,46)	>2048
37A	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	>1024 (>3343,46)	>2048
40	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	>1024 (>3343,46)	>2048
67	<i>C. parapsilosis</i>	1 (3,27)	256 (835,82)	256
75	<i>C. parapsilosis</i>	2 (6,53)	>1024 (>3343,46)	>512
78	<i>C. parapsilosis</i>	4 (13,06)	>1024 (>3343,46)	>256
79.1	<i>C. parapsilosis</i>	1 (3,27)	>1024 (>3343,46)	>1024
79.2	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	256 (835,82)	512
86	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	512 (1671,63)	1024
90	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	>1024 (>3343,46)	>2048
104A	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	>1024 (>3343,46)	>2048
105	<i>C. parapsilosis</i>	1 (3,27)	>1024 (>3343,46)	>1024
120	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	>1024 (>3343,46)	>2048
125	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	>1024 (>3343,46)	>2048
130	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	>1024 (>3343,46)	>2048
142	<i>C. parapsilosis</i>	4 (13,06)	>1024 (>3343,46)	>256
13	<i>C. tropicalis</i>	1 (3,27)	>1024 (>3343,46)	>1024
39	<i>C. tropicalis</i>	0,25 (0,82)	>1024 (>3343,46)	>4096
55	<i>C. tropicalis</i>	4 (13,06)	>1024 (>3343,46)	>256
107	<i>C. tropicalis</i>	0,5 (1,63)	>1024 (>3343,46)	>2048
124	<i>C. tropicalis</i>	0,5 (1,63)	>1024 (>3343,46)	>2048
133	<i>C. tropicalis</i>	1 (3,27)	>1024 (>3343,46)	>1024

C. parapsilosis: complexo *C. parapsilosis*.

Fonte: O autor, 2012.

Tabela 12 - Concentração Inibitória em $\mu\text{g/mL}$ e $\mu\text{M/L}$ do crescimento *in vitro* de 90% (IC_{90}) para Anfotericina B em células planctônicas e biofilmes de amostras de *Candida* spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.

Amostra	Espécie	Anfotericina B - IC_{90} em $\mu\text{g/mL}$ ($\mu\text{M/L}$)		
		Células Planctônicas	Células em Biofilme	Aumento da IC_{50}
138	<i>C. famata</i>	0,5 (0,54)	8 (8,66)	16
37B	<i>C. glabrata</i>	1 (1,08)	16 (17,31)	16
104B	<i>C. glabrata</i>	0,25 (0,27)	16 (17,31)	64
33B	<i>C. guilliermondii</i>	1 (1,08)	4 (4,33)	4
57	<i>C. guilliermondii</i>	0,5 (0,54)	64 (69,26)	128
70	<i>C. guilliermondii</i>	1 (1,08)	16 (17,31)	16
83	<i>C. guilliermondii</i>	0,5 (0,54)	64 (69,26)	128
19	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (0,54)	64 (69,26)	128
27	<i>C. parapsilosis</i>	1 (1,08)	8 (8,66)	8
28	<i>C. parapsilosis</i>	1 (1,08)	4 (4,33)	4
33A	<i>C. parapsilosis</i>	1 (1,08)	4 (4,33)	4
37A	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (0,54)	4 (4,33)	8
40	<i>C. parapsilosis</i>	1 (1,08)	8 (8,66)	8
67	<i>C. parapsilosis</i>	1 (1,08)	32 (34,63)	32
75	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (0,54)	4 (4,33)	8
78	<i>C. parapsilosis</i>	1 (1,08)	32 (34,63)	32
79.1	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (0,54)	32 (34,63)	64
79.2	<i>C. parapsilosis</i>	1 (1,08)	8 (8,66)	8
86	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (0,54)	32 (34,63)	64
90	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (0,54)	8 (8,66)	16
104A	<i>C. parapsilosis</i>	1 (1,08)	32 (34,63)	32
105	<i>C. parapsilosis</i>	0,25 (0,27)	64 (69,26)	256
120	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (0,54)	32 (34,63)	64
125	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (0,54)	16 (17,31)	32
130	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (0,54)	64 (69,26)	128
142	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (0,54)	32 (34,63)	64
13	<i>C. tropicalis</i>	0,5 (0,54)	16 (17,31)	32
39	<i>C. tropicalis</i>	1 (1,08)	32 (34,63)	32
55	<i>C. tropicalis</i>	0,5 (0,54)	64 (69,26)	128
107	<i>C. tropicalis</i>	0,25 (0,27)	32 (34,63)	128
124	<i>C. tropicalis</i>	0,25 (0,27)	16 (17,31)	64
133	<i>C. tropicalis</i>	0,125 (0,14)	8 (8,66)	64

C. parapsilosis: complexo *C. parapsilosis*.

Fonte: O autor, 2012.

Tabela 13 - Concentração Inibitória em $\mu\text{g/mL}$ e $\mu\text{M/L}$ do crescimento *in vitro* de 50% (IC_{50}) para Guttiferona-A em células planctônicas e biofilmes de amostras de *Candida* spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.

Amostra	Espécie	Guttiferona-A - IC_{50} em $\mu\text{g/mL}$ $\mu\text{M/L}$)		
		Células Planctônicas	Células em Biofilme	Aumento da IC_{50}
138	<i>C. famata</i>	0,23 (0,38)	100 (165,89)	435
37B	<i>C. glabrata</i>	1,875 (3,11)	100 (165,89)	53
104B	<i>C. glabrata</i>	15 (24,88)	600 (995,36)	40
33B	<i>C. guilliermondii</i>	0,23 (0,38)	200 (331,78)	870
57	<i>C. guilliermondii</i>	1,875 (3,11)	30 (49,76)	16
70	<i>C. guilliermondii</i>	0,468 (0,78)	30 (49,76)	64
83	<i>C. guilliermondii</i>	0,468 (0,78)	60 (99,52)	128
19	<i>C. parapsilosis</i>	1,875 (3,11)	100 (165,89)	53
27	<i>C. parapsilosis</i>	1,875 (3,11)	60 (99,52)	32
28	<i>C. parapsilosis</i>	0,23 (0,38)	30 (49,76)	130
33A	<i>C. parapsilosis</i>	1,875 (3,11)	15 (24,88)	8
37A	<i>C. parapsilosis</i>	1,875 (3,11)	30 (49,76)	16
40	<i>C. parapsilosis</i>	7,5 (12,44)	30 (49,76)	4
67	<i>C. parapsilosis</i>	3,75 (6,22)	30 (49,76)	8
75	<i>C. parapsilosis</i>	0,468 (0,78)	100 (165,89)	214
78	<i>C. parapsilosis</i>	1,875 (3,11)	60 (99,52)	32
79.1	<i>C. parapsilosis</i>	0,23 (0,38)	60 (99,52)	261
79.2	<i>C. parapsilosis</i>	3,75 (6,22)	200 (331,78)	53
86	<i>C. parapsilosis</i>	15 (24,88)	100 (165,89)	7
90	<i>C. parapsilosis</i>	1,875 (3,11)	30 (49,76)	16
104A	<i>C. parapsilosis</i>	7,5 (12,44)	400 (663,56)	53
105	<i>C. parapsilosis</i>	0,23 (0,38)	600 (995,36)	2609
120	<i>C. parapsilosis</i>	0,468 (0,78)	100 (165,89)	214
125	<i>C. parapsilosis</i>	0,468 (0,78)	400 (663,56)	855
130	<i>C. parapsilosis</i>	0,468 (0,78)	800 (1327,14)	1282
142	<i>C. parapsilosis</i>	0,468 (0,78)	600 (995,36)	1282
13	<i>C. tropicalis</i>	0,468 (0,78)	15 (24,88)	33
39	<i>C. tropicalis</i>	100 (165,89)	200 (331,78)	2
55	<i>C. tropicalis</i>	0,468 (0,78)	200 (331,78)	427
107	<i>C. tropicalis</i>	3,75 (6,22)	200 (331,78)	53
124	<i>C. tropicalis</i>	0,23 (0,38)	100 (165,89)	435
133	<i>C. tropicalis</i>	3,75 (6,22)	800 (1327,14)	213

C. parapsilosis: complexo *C. parapsilosis*.

Fonte: O autor, 2012.

Tabela 14 - Concentração Inibitória em $\mu\text{g/mL}$ e $\mu\text{M/L}$ do crescimento *in vitro* de 50% (IC_{50}) para 7-Epiclusianona em células planctônicas e biofilmes de amostras de *Candida* spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.

Amostra	Espécie	7-Epiclusianona - IC_{50} em $\mu\text{g/mL}$ ($\mu\text{M/L}$)		
		Células Planctônicas	Células em Biofilme	Aumento da IC_{50}
138	<i>C. famata</i>	60 (119,45)	200 (398,16)	3
37B	<i>C. glabrata</i>	100 (199,08)	>800 (>1592,7)	>8
104B	<i>C. glabrata</i>	>100 (>199,08)	>800 (>1592,7)	>8
33B	<i>C. guilliermondii</i>	30 (59,73)	600 (1194,51)	20
57	<i>C. guilliermondii</i>	100 (199,08)	400 (796,34)	4
70	<i>C. guilliermondii</i>	30 (59,73)	800 (1592,7)	27
83	<i>C. guilliermondii</i>	30 (59,73)	200 (398,16)	7
19	<i>C. parapsilosis</i>	100 (199,08)	200 (398,16)	2
27	<i>C. parapsilosis</i>	100 (199,08)	200 (398,16)	2
28	<i>C. parapsilosis</i>	30 (59,73)	200 (398,16)	7
33A	<i>C. parapsilosis</i>	>100 (>199,08)	200 (398,16)	<2
37A	<i>C. parapsilosis</i>	100 (199,08)	600 (1194,51)	6
40	<i>C. parapsilosis</i>	60 (119,45)	200 (398,16)	3
67	<i>C. parapsilosis</i>	>100 (>199,08)	600 (1194,51)	<6
75	<i>C. parapsilosis</i>	>100 (>199,08)	>800 (>1592,7)	>8
78	<i>C. parapsilosis</i>	100 (199,08)	600 (1194,51)	6
79.1	<i>C. parapsilosis</i>	30 (59,73)	800 (1592,7)	27
79.2	<i>C. parapsilosis</i>	100 (199,08)	>800 (>1592,7)	>8
86	<i>C. parapsilosis</i>	100 (199,08)	600 (1194,51)	6
90	<i>C. parapsilosis</i>	100 (199,08)	400 (796,34)	4
104A	<i>C. parapsilosis</i>	100 (199,08)	>800 (>1592,7)	>8
105	<i>C. parapsilosis</i>	30 (59,73)	600 (1194,51)	20
120	<i>C. parapsilosis</i>	100 (199,08)	>800 (>1592,7)	>8
125	<i>C. parapsilosis</i>	100 (199,08)	600 (1194,51)	6
130	<i>C. parapsilosis</i>	100 (199,08)	600 (1194,51)	6
142	<i>C. parapsilosis</i>	60 (119,45)	400 (796,34)	7
13	<i>C. tropicalis</i>	100 (199,08)	600 (1194,51)	6
39	<i>C. tropicalis</i>	>100 (>199,08)	>800 (>1592,7)	>8
55	<i>C. tropicalis</i>	100 (199,08)	200 (398,16)	2
107	<i>C. tropicalis</i>	100 (199,08)	800 (1592,7)	8
124	<i>C. tropicalis</i>	100 (199,08)	800 (1592,7)	8
133	<i>C. tropicalis</i>	>100 (>199,08)	>800 (>1592,7)	>8

C. parapsilosis: complexo *C. parapsilosis*.

Fonte: O autor, 2012.

Os resultados comparativos das CIMs obtidas nos testes de sensibilidade a Fluconazol, Anfotericina B, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona em células planctônicas e biofilmes, de acordo com as espécies isoladas, podem ser observados nas tabelas 15, 16, 17 e 18, respectivamente. Também está indicado o aumento da CIM para as substâncias em biofilmes em relação às células planctônicas.

Tabela 15 - Concentração Inibitória em $\mu\text{g/mL}$ e $\mu\text{M/L}$ do crescimento *in vitro* de 50% (IC_{50}) para Fluconazol em células planctônicas e biofilmes de amostras de *Candida* spp. isoladas do ambiente hospitalar.

Espécie	Fluconazol - CIM_{50} em $\mu\text{g/mL}$ ($\mu\text{M/L}$)		
	Células Planctônicas	Células em Biofilme	Aumento da CIM_{50}
<i>C. famata</i>	4,0 (13,06)	>1024 (>3343,46)	>256
<i>C. glabrata</i>	1,0 (3,27)	>1024 (>3343,46)	>1024
<i>C. guilliermondii</i>	4,0 (13,06)	1024 (3343,46)	256
<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (1,63)	>1024 (>3343,46)	>2048
<i>C. tropicalis</i>	0,5 (1,63)	>1024 (>3343,46)	>2048

C. parapsilosis: complexo *C. parapsilosis*.

Fonte: O autor, 2012.

Tabela 16 - Concentração Inibitória em $\mu\text{g/mL}$ e $\mu\text{M/L}$ do crescimento *in vitro* de 90% (IC_{90}) para Anfotericina B em células planctônicas e biofilmes de amostras de *Candida* spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.

Espécie	Anfotericina B - CIM_{90} em $\mu\text{g/mL}$ ($\mu\text{M/L}$)		
	Células Planctônicas	Células em Biofilme	Aumento da CIM_{50}
<i>C. famata</i>	0,5 (0,54)	8 (8,66)	16
<i>C. glabrata</i>	0,25 (0,27)	16 (17,31)	64
<i>C. guilliermondii</i>	0,5 (0,54)	64 (69,26)	128
<i>C. parapsilosis</i>	0,5 (0,54)	64 (69,26)	128
<i>C. tropicalis</i>	0,25 (0,27)	64 (69,26)	256

C. parapsilosis: complexo *C. parapsilosis*.

Fonte: O autor, 2012.

Tabela 17 - Concentração Inibitória em $\mu\text{g/mL}$ e $\mu\text{M/L}$ do crescimento *in vitro* de 50% (IC_{50}) para Guttiferona-A em células planctônicas e biofilmes de amostras de *Candida* spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.

Espécie	Guttiferona-A - CIM_{50} em $\mu\text{g/mL}$ ($\mu\text{M/L}$)		
	Células Planctônicas	Células em Biofilme	Aumento da CIM_{50}
<i>C. famata</i>	0,230 (0,38)	100 (165,89)	435
<i>C. glabrata</i>	1,875 (3,11)	100 (165,89)	53
<i>C. guilliermondii</i>	0,468 (0,78)	30 (49,76)	64
<i>C. parapsilosis</i>	1,875 (3,11)	100 (165,89)	53
<i>C. tropicalis</i>	0,468 (0,78)	200 (331,78)	427

C. parapsilosis: complexo *C. parapsilosis*.

Fonte: O autor, 2012.

Tabela 18 - Concentração Inibitória em $\mu\text{g/mL}$ e $\mu\text{M/L}$ do crescimento *in vitro* de 50% (IC_{50}) para 7-Epiclusianona em células planctônicas e biofilmes de amostras de *Candida* spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.

Espécie	7-Epiclusianona - CIM_{50} em $\mu\text{g/mL}$ ($\mu\text{M/L}$)		
	Células Planctônicas	Células em Biofilme	Aumento da CIM_{50}
<i>C. famata</i>	60 (119,45)	200 (398,16)	3
<i>C. glabrata</i>	>100 (>199,08)	>800 (>1592,67)	Indefinido
<i>C. guilliermondii</i>	30 (59,73)	400 (796,34)	13
<i>C. parapsilosis</i>	100 (199,08)	600 (796,34)	6
<i>C. tropicalis</i>	100 (199,08)	800 (1592,67)	8

C. parapsilosis: complexo *C. parapsilosis*.

Fonte: O autor, 2012.

5.6 Síntese dos resultados de amostras de ambiente hospitalar

Na tabela 19 encontra-se uma síntese dos resultados obtidos entre amostras isoladas de ambiente hospitalar, com os dados da avaliação percentual e classificação em grupos de quartis da capacidade de produção de biofilme (após lavagem com tampão PBS) e atividade metabólica dos biofilmes, além das IC para Anfotericina B (IC_{90}) e para Fluconazol, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona (IC_{50}) em Testes de Sensibilidade em células planctônicas e biofilmes.

Tabela 19 – Síntese dos resultados de avaliações realizadas com *Candida* spp. de ambiente hospitalar. Avaliação percentual em grupos de quartis da capacidade de produção de biofilme (após lavagem com tampão PBS) e atividade metabólica. Concentração Inibitória, em $\mu\text{g/mL}$, do crescimento *in vitro* de 90% (IC_{90}) para Anfotericina B e 50% (IC_{50}) para Fluconazol, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona em células planctônicas e biofilmes de amostras de *Candida* spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar. (Continua)

Amostra	Espécies	Produção de Biofilme ¹		Atividade Metabólica		Fluconazol (IC_{50} - $\mu\text{g/mL}$)		Anfotericina B (IC_{90} - $\mu\text{g/mL}$)		Guttiferona-A (IC_{50} - $\mu\text{g/mL}$)		7Epiclusianona (IC_{50} - $\mu\text{g/mL}$)	
		%	GQ	%	GQ	Cél. Planc.	Bio-filme	Cél. Planc.	Bio-filme	Cél. Planc.	Bio-filme	Cél. Planc.	Bio-filme
138	<i>C. famata</i>	38,14	2	93,91	1	4	>1024	0,5	8	0,23	100	60	200
37B	<i>C. glabrata</i>	23,60	3	100	1	1	>1024	1	16	1,875	100	100	>800
104B	<i>C. glabrata</i>	44,97	2	88,06	1	1	>1024	0,25	16	15	600	>100	>800
33B	<i>C. guilliermondii</i>	12,40	4	80,13	2	4	512	1	4	0,23	200	30	600
57	<i>C. guilliermondii</i>	82,29	1	81,49	1	4	>1024	0,5	64	1,875	30	100	400
70	<i>C. guilliermondii</i>	36,02	2	90,06	1	16	1024	1	16	0,468	30	30	800
83	<i>C. guilliermondii</i>	8,31	4	86,54	1	8	>1024	0,5	64	0,468	60	30	200
19	<i>C. parapsilosis</i>	9,91	4	29,85	3	1	>1024	0,5	64	1,875	100	100	200
27	<i>C. parapsilosis</i>	34,24	2	30,13	3	0,5	>1024	1	8	1,875	60	100	200
28	<i>C. parapsilosis</i>	21,90	3	29,57	3	0,5	>1024	1	4	0,23	30	30	200
33A	<i>C. parapsilosis</i>	10,57	4	41,19	3	0,5	>1024	1	4	1,875	15	>100	200

Tabela 19 – Síntese dos resultados de avaliações realizadas com *Candida* spp. de ambiente hospitalar. Avaliação percentual em grupos de quartis da capacidade de produção de biofilme (após lavagem com tampão PBS) e atividade metabólica. Concentração Inibitória, em µg/mL, do crescimento *in vitro* de 90% (IC₉₀) para Anfotericina B e 50% (IC₅₀) para Fluconazol, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona em células planctônicas e biofilmes de amostras de *Candida* spp. isoladas de fontes de ambiente hospitalar.

(Continuação)

Amostra	Espécies	Produção de Biofilme ¹		Atividade Metabólica		Fluconazol (IC ₅₀ - µg/mL)		Anfotericina B (IC ₉₀ - µg/mL)		Guttiferona-A (IC ₅₀ - µg/mL)		7Epiclusianona (IC ₅₀ - µg/mL)	
		%	GQ	%	GQ	Cél. Planc.	Bio-filme	Cél. Planc.	Bio-filme	Cél. Planc.	Bio-filme	Cél. Planc.	Bio-filme
37A	<i>C. parapsilosis</i>	15,80	4	19,71	4	0,5	>1024	0,5	4	1,875	30	100	600
40	<i>C. parapsilosis</i>	67,73	1	11,06	4	0,5	>1024	1	8	7,5	30	60	200
67	<i>C. parapsilosis</i>	100	1	12,90	4	1	256	1	32	3,75	30	>100	600
75	<i>C. parapsilosis</i>	58,39	1	80,85	1	2	>1024	0,5	4	0,468	100	>100	>800
78	<i>C. parapsilosis</i>	31,26	3	32,53	2	4	>1024	1	32	1,875	60	100	600
79A	<i>C. parapsilosis</i>	38,28	2	31,09	3	1	>1024	0,5	32	0,23	60	30	800
79B	<i>C. parapsilosis</i>	92,86	1	11,38	4	0,5	256	1	8	3,75	200	100	>800
86	<i>C. parapsilosis</i>	96,22	1	17,23	4	0,5	512	0,5	32	15	100	100	600
90	<i>C. parapsilosis</i>	17,36	4	38,46	2	0,5	>1024	0,5	8	1,875	30	100	400
104A	<i>C. parapsilosis</i>	83,13	1	8,73	4	0,5	>1024	1	32	7,5	400	100	>800
105	<i>C. parapsilosis</i>	52,46	2	44,63	2	1	>1024	0,25	64	0,23	600	30	600
120	<i>C. parapsilosis</i>	27,61	3	25,48	3	0,5	>1024	0,5	32	0,468	100	100	>800
125	<i>C. parapsilosis</i>	28,41	3	20,43	4	0,5	>1024	0,5	16	0,468	400	100	600
130	<i>C. parapsilosis</i>	28,16	3	27,72	3	0,5	>1024	0,5	64	0,468	800	100	600
142	<i>C. parapsilosis</i>	21,59	4	34,46	2	4	>1024	0,5	32	0,468	600	60	400
13	<i>C. tropicalis</i>	40,29	2	21,23	4	1	>1024	0,5	16	0,468	15	100	600
39	<i>C. tropicalis</i>	55,38	2	79,65	2	0,25	>1024	1	32	100	200	>100	>800
55	<i>C. tropicalis</i>	83,87	1	87,18	1	4	>1024	0,5	64	0,468	200	100	200
107	<i>C. tropicalis</i>	22,27	3	34,86	2	0,5	>1024	0,25	32	3,75	200	100	800
124	<i>C. tropicalis</i>	20,05	4	31,17	3	0,5	>1024	0,25	16	0,23	100	100	800
133	<i>C. tropicalis</i>	23,91	3	34,86	2	1	>1024	0,125	8	3,75	800	>100	>800

1: Produção de Biofilme após lavagem com tampão PBS.

%; Índice percentual da absorbância da amostra quando comparada à maior absorbância.

GQ: Classificação das amostras em grupos de quartis (1 para os 25% dos isolados de maior absorbância, 2 para os 25% dos isolados com absorbâncias subsequentes, grupo 3 para mais 25% dos isolados com absorbâncias subsequentes e 4 para os 25% das amostras com menores resultados de absorbância).

C. parapsilosis: complexo *C. parapsilosis*

Fonte: O autor, 2012.

6 DISCUSSÃO

6.1 Origem e distribuição das amostras

Neste estudo foram analisadas 32 amostras de *Candida* spp. coletadas em Hospital de médio porte da região Sul de Minas Gerais, o que representa uma distribuição de 17,8% de leveduras pertencentes a este gênero no ambiente analisado. Cabe ressaltar que as amostras foram coletadas de UTI, Posto de Internação Oncológico e Centro de Quimioterapia, setores estes considerados críticos do ponto de vista de predisposição dos pacientes a infecções fúngicas.

Entre os principais fatores predisponentes para infecções fúngicas invasivas, estão a utilização de dispositivos médicos, a internação em setores críticos, tratamento com antimicrobianos de amplo espectro, pacientes com câncer e tratamento com quimioterapia (MISHRA et al., 2007; WARNOCK, 2007). Kojic e Darouiche (2004) já alertavam que a combinação de um aumento da taxa de envelhecimento da população, um elevado número de pacientes imunossuprimidos e um aumento no número de dispositivos médicos estavam relacionados com o aumento na ocorrência de complicações infecciosas ligadas a esses dispositivos.

Neste trabalho, quando analisadas as fontes das quais as amostras foram isoladas, destaca-se o fato de que a maior parte dos isolados de *Candida* spp. tenha sido proveniente das mãos de profissionais da saúde (28% do total dos 32 isolados), sendo que 29% das amostras coletadas apresentaram positividade para esta levedura. Cabe ressaltar que em duas amostras coletadas de mãos de profissionais da saúde foram identificadas duas espécies de *Candida* diferentes.

Além disso, foram isoladas amostras de locais de armazenamento e preparo de medicamentos (16% dos isolados; positividade em 55,5% das amostras coletadas), leitos de pacientes (16% dos isolados; positividade em 17,9% das amostras coletadas), equipamentos hospitalares (13% dos isolados; positividade em 40% das amostras coletadas), equipamentos de proteção individual (9% dos isolados; positividade em 10,7% das amostras coletadas), locais de higienização das mãos (9% dos isolados; positividade em 18,8% das amostras coletadas), veículos de distribuição de alimentos (6% dos isolados; positividade em 100% das amostras coletadas) e superfícies do ambiente hospitalar (3% dos isolados; positividade em 1,9% das amostras coletadas).

A alta distribuição de leveduras do gênero *Candida* em amostras coletadas em ambiente hospitalar é um motivo de preocupação, uma vez que podem servir como uma fonte de colonização e infecção ao paciente hospitalizado. A maioria dos estudos avalia espécies de *Candida* spp. isoladas de casos de infecção, não havendo uma preocupação quanto à vigilância de amostras ambientais, que podem servir de reservatório e fonte de transmissão de infecções.

Em manual próprio, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária afirma que as mãos dos profissionais da equipe de saúde são a principal fonte de infecção hospitalar, e destaca ainda que os equipamento médico-hospitalares, fômites, alimentos e até medicamentos também podem ser fonte de disseminação dessas infecções (BRASIL, 2009). Em nosso estudo foram identificadas várias fontes associadas à Cadeia Epidemiológica das Infecções Hospitalares. Assim, as leveduras são direta ou indiretamente veiculadas pelas mãos de profissionais, as quais passam a ser consideradas importantes fontes de infecção para os pacientes.

6.2 Distribuição das espécies

A espécie mais comum entre os isolados provenientes de ambiente hospitalar foi pertencente ao complexo *C. parapsilosis* (59%), seguida por *C. tropicalis* (19%), *C. guilliermondii* (13%), *C. glabrata* (6%) e *C. famata* (3%), sendo que nenhuma amostra de *C. albicans* foi isolada.

Embora *C. albicans* ainda seja a espécie mais estudada, o aumento de infecções fúngicas invasivas causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* é um fato que tem sido relatado em vários estudos (MICELI; DIAZ; LEE, 2011; OSORIO et al., 2008), e devemos destacar que nenhuma amostra de *C. albicans* foi isolada do ambiente hospitalar em nosso trabalho. Apesar de a maioria das infecções causadas por *Candida* spp. ser devido a fontes endógenas, é sabido que o ambiente hospitalar pode desempenhar um importante papel na disseminação desses microrganismos, e a alta distribuição de espécies de *Candida* não-*albicans* no ambiente hospitalar pode ser um motivo que leve a um aumento de infecções hospitalares causadas por estes patógenos.

Em estudo realizado em ambiente hospitalar no Brasil por Cordeiro et al. (2010) foram encontrada uma distribuição de 20,4% de leveduras do gênero *Candida* em amostrar de ar ambiente, sendo que as espécies mais frequentes

também foram complexo *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, mas diferente de nosso estudo, *C. albicans* foi a terceira espécie mais isolada.

Estudo de tipagem molecular realizado Hota (2004) mostrou que espécies de *Candida* spp. recuperadas de pacientes, mãos de profissionais da saúde e do meio ambiente, faziam parte de uma mesma cadeia epidemiológica. Em estudo realizado por Vazquez et al. (1998) foram encontrados isolados de *Candida* em pacientes internados em UTI e unidade de transplante de medula óssea que eram idênticos aos isolados encontrados na superfície dos quartos onde os pacientes foram internados, antes de adquirirem a infecção.

Outro dado que merece destaque é o fato de que em nosso trabalho as espécies mais isoladas de ambiente hospitalar são do complexo *C. parapsilosis* (59%) e *C. tropicalis* (19%), justamente as espécies de *Candida* não-*albicans* mais associadas à candidemia na América Latina (MOTTA et al., 2010; NUCCI et al., 2010).

Bonfietti et al. (2012) descreveram a distribuição de isolados de candidemia no Brasil em um período de 10 anos e, apesar de haver um predomínio de isolados de *C. albicans* (44%), as espécies de *Candida* não-*albicans* mais isoladas foram *C. parapsilosis* (34%), *C. tropicalis* (13%) e *C. glabrata* (5%).

Candida parapsilosis apresenta-se, desde os anos 80, como um importante patógeno hospitalar de fungemias (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003), representando um problema significativo para neonatos, transplantados e para pacientes que recebem nutrição parenteral (TROFA; GÁCSER; NOSANCHUK, 2008).

É relatado que *C. parapsilosis* apresenta uma composição genética variável, e por isso duas novas espécies denominadas *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, além de *C. parapsilosis sensu stricto*, tem sido recentemente propostas. Estas três espécies formam o chamado complexo *C. parapsilosis*. (GOMEZ-LOPEZ et al., 2008). Neste trabalho denomina-se genericamente as amostras do complexo *C. parapsilosis*, mas alguns estudos reportam diferença na sensibilidade entre as três espécies, o que pode influenciar as escolhas terapêuticas (SILVA et al., 2009).

Candida tropicalis possui considerável potencial biológico como agente oportunista em indivíduos com neutropenia e câncer (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; SILVA et al., 2011). Nucci e Colombo (2007) encontraram, em 12 centros médicos brasileiros localizados em 10 cidades, 924 episódios de candidemia, sendo 188 (20%) causados por *C. tropicalis*, sendo esta a 2ª espécie mais frequente em

candidemias em adultos e idosos, e a 3ª causa de candidemia em recém-nascidos e crianças, sendo o câncer a doença de base mais frequente relacionada.

Candida tropicalis apresenta grande propensão a disseminar e está associada a altos índices de mortalidade. Estas características estão provavelmente relacionadas aos fatores de virulência da espécie em questão, como formação de biofilme, secreção de proteinases e dimorfismo (NEGRI et al., 2010).

Colombo et al. (2006) realizaram um estudo de vigilância envolvendo 11 centros médicos em 9 cidades brasileiras e, em 712 casos de candidemia, as espécies de *Candida não-albicans* de maior distribuição foram *C. tropicalis* (20,9% dos casos), e *C. parapsilosis* (20,5% dos casos). Também encontraram uma distribuição de 4,9% de candidemias causadas por *C. glabrata* e 2,4% causadas por *C. guilliermondii*.

Candida guilliermondii vem sendo reconhecida por diferentes autores como agente emergente, especialmente na América Latina (MICELI; DIAZ; LEE, 2011). Em relação a seu tratamento, há relatos de resistência *in vitro* de amostras clínicas à Anfotericina B, porém há dúvidas sobre a real eficácia deste medicamento na terapêutica de infecções sistêmicas por *C. guilliermondii* (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Medeiros et al. (2007) relaram um pseudo surto ocorrido em um hospital universitário brasileiro, em que das 149 amostras de sangue coletadas no período de aproximadamente um ano, 43% foram positivas para *C. guilliermondii*. Nenhum dos pacientes apresentavam sintomas relacionados à fungemia, e o caso foi considerado um pseudo surto porque houveram erros relacionados à coleta das amostras. Mas o fato é que durante a investigação foram isoladas amostras de *C. guilliermondii* de superfícies do ambiente e da pele e unha dos membros da equipe de enfermagem, que foram subtipadas e estavam altamente relacionadas às amostras coletadas dos pacientes.

Candida glabrata, também encontrada em nosso estudo (6% de distribuição no ambiente hospitalar), é considerada um importante patógeno hospitalar, sendo a levedura em maior ascensão nas candidemias relatadas nos EUA e Europa (TAMURA et al., 2007). Infecções por *C. glabrata* estão associadas à falha terapêutica em tratamentos com azólicos, e alguns estudos relatam menor sensibilidade de isolados desta espécie em relação à Anfotericina B (MICELI; DIAZ; LEE, 2011).

Em estudo epidemiológico sobre candidemias em hospitais brasileiros, Motta et al. (2010), as espécies de *Candida* não-*albicans* mais encontradas foram *C. parapsilosis* (22,1%), *C. tropicalis* (14,8%) e *C. glabrata* (6,6%).

Moretti et al. (2012) analisando a incidência de candidemias por 5 anos em hospital brasileiro sugeriram que houve um aumento significativo em candidemias causadas por *C. glabrata*, apesar de este aumento dessa incidência não estar associado ao uso de Fluconazol.

É relatado que, em infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans*, *C. glabrata* tem maior taxa de mortalidade, chegando a 50% em pacientes com câncer e até 100% em pacientes transplantados de medula óssea (SENEVIRATNE et al., 2010).

Em todo o mundo, aumentou a prevalência de espécies consideradas raras, como *Candida famata* (WARNOCK, 2007; MICELI; DIAZ; LEE, 2011). Recentemente no Brasil foi reportado por Almeida Jr. et al. (2012) o primeiro caso de um isolado clínico de *C. haemulonii*, isolada de amostra sanguínea.

A partir dessa inversão no padrão de incidência de espécies causadoras de infecções fúngicas, e dada a impossibilidade de diferenciar clinicamente infecções causadas por *C. albicans* e *Candida* não-*albicans*, especialmente porque infecções por estas espécies tem vários fatores de risco em comum (APISARNTHANARAK et al., 2009), torna-se cada vez mais necessária a identificação da espécie de *Candida* causadora de uma infecção.

Há também uma necessidade emergente de programas de vigilância de saúde para monitorar possíveis mudanças na distribuição das espécies de leveduras, determinar o seu perfil de sensibilidade e estabelecer a cadeia epidemiológica da infecção para que, assim, interferências no ciclo de contaminação infecção ambiente possam ser bem sucedidos. Um maior número de estudos em hospitais e investimentos em formação profissional devem ser realizados para prevenir e controlar a contaminação fúngica, a colonização e infecção hospitalar.

Além do aumento da incidência de espécies de *Candida* não-*albicans*, as elevadas morbidades e mortalidades das infecções causadas por estas espécies, levam à necessidade de conhecermos ainda mais os fatores associados à virulência e a resistência destas espécies (SILVA et al., 2011).

6.3 Avaliação da capacidade de produção e atividade metabólica de biofilmes

A formação de biofilme é um dos principais fatores de virulência de *Candida* spp. e, atualmente, tem recebido considerável destaque (COENYE et al., 2011). A formação de biofilme de *Candida* tem uma importante repercussão clínica devido às diferenças observadas entre células planctônicas e células contidas no biofilme microbiano. As células do biofilme são, geralmente, mais tolerantes aos tratamentos antifúngicos que as células planctônicas e podem persistir no hospedeiro mesmo com um grande influxo de células inflamatórias e células do sistema imune adaptativo (HALL-STOODLEY et al., 2012; SILVA et al., 2011).

Além disso, a formação de biofilme em dispositivos médicos pode afetar negativamente o hospedeiro, pois pode causar falha no funcionamento de cateteres, implantes e acessos venosos e servir como reservatório ou fonte de futuras infecções (MARTINEZ et al., 2010). Estudos relatam que isolados produtores de biofilmes estão associados a maiores índices de mortalidade quando comparado com amostras não produtoras de biofilmes (SILVA et al., 2011).

Em relação à produção de biofilmes, todas as amostras isoladas foram capazes de produzir biofilme. A produção média de biofilme analisada através da densidade óptica a 405 nm após 48h antes da lavagem com tampão PBS foi de $0,868 \pm 0,101$ e após a lavagem com tampão PBS foi de $0,337 \pm 0,117$, representando uma diminuição de 61,2% na absorbância.

Para fins de análise do biofilme, devemos considerar apenas a absorbância após a lavagem com tampão PBS, que representam as células fortemente aderidas e, portanto, pertencentes ao biofilme. Porém, devemos considerar que, durante a formação inicial do biofilme, células das leveduras analisadas que foram adicionadas às microplacas foram incubadas por 1,5h para permitir a aderência celular à superfície da placa, e posteriormente as suspensões foram removidas e cada poço lavado com 200 μ L de tampão PBS por duas vezes, para a remoção de células não aderidas. Ou seja, a produção inicial de biofilme (após 48h de incubação e antes da lavagem com PBS) representa uma parcela do biofilme, com células já dispersas, matriz extracelular e produtos extracelulares produzidos somente pelas células aderidas no processo inicial. Este é um ponto pouco discutido em artigos e que pode trazer informações importantes sobre o processo de patogenicidade associado à produção de biofilmes.

Mohandas e Ballal (2011) encontraram resultados que sugerem que a produção de biofilme é mais importante para isolados de *Candida* não-*albicans*, o que não podemos concluir, uma vez que não isolamos amostras de *C. albicans* de fonte ambiental. Apesar de ser identificado que espécies de *Candida* não-*albicans* são frequentes patógenos humanos, ainda faltam informações sobre sua patogenicidade, mas a produção de biofilmes, bem como sua constituição, é fortemente dependente da espécie de *Candida*, e desempenha um papel importante na persistência da infecção (SILVA et al., 2011).

Em relação à atividade metabólica dos biofilmes, avaliada através do Ensaio de Redução de XTT, todas os biofilmes analisados se mostraram metabolicamente ativos após 48h de formação, sendo a absorbância média de $0,095 \pm 0,016$ entre as amostras isoladas de ambiente hospitalar.

Hawser e Douglas (1994) mostraram que a medida colorimétrica da atividade metabólica pelo XTT está diretamente relacionada com o número de células viáveis. Em estudo comparando sete técnicas de avaliação de biofilmes, Taff, Nett e Andes (2012) consideraram o Ensaio de Redução de XTT o mais reprodutível, preciso e eficiente para avaliação quantitativa de biofilmes.

Observou-se que o método espectrofotométrico em placas de microtitulação permite avaliar e quantificar a formação do biofilme a partir da medida de alguns atributos apresentados pelas células aderidas. Embora se trate de um método indireto, é bastante versátil, permitindo que várias amostras possam ser avaliadas simultaneamente, e apresenta um bom nível de reprodutibilidade e especificidade (DJORDJEVIC; WIEDMANN; LANDSBOROUGH, 2002; ERRIU et al., 2012).

Quando avaliados os percentuais da capacidade de produção de biofilme e atividade metabólica entre as amostras em relação aos maiores valores de absorbância obtidos em cada teste, além da classificação das amostras em grupos de quartis (Tabela 5), é possível observar que nem sempre amostras com grande capacidade de produção de biofilme são as que possuem biofilmes com maior atividade metabólica, o que pode ter uma relação com a virulência associada a cada amostra.

A amostra do complexo *C. parapsilosis* número 67, por exemplo, é a que apresenta maior produção de biofilme (após lavagem com PBS), portanto, com índice de 100%, enquanto em relação à atividade metabólica deste mesmo biofilme a amostra o índice de 12,9%, sendo classificada no último quartil (GQ4), estando

entre os 25% das amostras cujos biofilmes têm menor atividade metabólica. O mesmo acontece com as amostras do complexo *C. parapsilosis* números 40, 79B e 104A, que se encontram entre as amostras com maior produção de biofilme (GQ1), mas com menor atividade metabólica (GQ4).

Resultado diferente foi apresentado pela amostra de *C. guilliermondii* número 83, que apresenta a menor produção de biofilme entre todas as amostras, com índice de 8,31% (GQ4), mas está entre as amostras com maior atividade metabólica de biofilme, sendo classificada no primeiro quartil. Resultado semelhante é apresentado pela amostra de *C. glabrata* número 37B, que em relação à produção de biofilme é classificada em GQ3 e em relação à atividade metabólica deste mesmo biofilme é classificada em GQ1.

Mas algumas amostras, como *C. guilliermondii* número 57 e *C. tropicalis* número 55 não só apresentam alta capacidade de produção de biofilme (GQ1) como também biofilmes com alta atividade metabólica (GQ1).

Pressupõe-se que, quanto maior a capacidade de formação de biofilme e maior o número de células metabolicamente ativas, produzindo mais proteínas extracelulares e matriz extracelular, maior a propensão de falha terapêutica, uma vez que microrganismos envolvidos em biofilmes são menos sensíveis aos antifúngicos do que células planctônicas, bem como aos mecanismos de defesa do hospedeiro (CHASSOT et al., 2008). Mas a capacidade de formação de biofilmes com baixa atividade metabólica também parece ser um importante fator associado à resistência aos antifúngicos (SILVA et al., 2010), demonstrando a importância de se correlacionar a capacidade de formação de biofilmes, sua atividade metabólica, e a sensibilidade das células sésseis frente aos fármacos antifúngicos.

Quando a capacidade de produção de biofilme e sua atividade metabólica são avaliadas entre as diferentes espécies (Tabela 6) é possível observar que não há diferença na produção de biofilme entre as diferentes espécies analisadas, mas em relação à atividade metabólica, biofilmes de *C. tropicalis* e do complexo *C. parapsilosis* apresentaram os menores valores de atividade metabólica não diferindo entre si, enquanto amostras de *C. famata*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii* apresentaram os maiores valores de atividade metabólica (p -valor $<0,05$), não diferindo entre si.

Resultados diferentes foram obtidos por Silva et al. (2010), que em estudo de biofilmes formados por *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, encontraram que

biofilmes formados por de *C. glabrata* apresentaram menor atividade metabólica. Apesar de o número de amostras testadas não ter sido alta, foram analisadas 1 amostra padrão e 6 amostras de origem clínica, enquanto em nosso estudo as amostras analisadas foram de origem ambiental. Desta maneira, estudos comparativos de diferentes fontes de isolamento se fazem necessários.

É importante destacar que neste trabalho classificamos amostras de complexo *C. parapsilosis*, mas existem dados divergentes quanto à capacidade das espécies pertencentes a este grupo em formar biofilmes. Tavanti et al. (2005) relataram não existir diferença estatisticamente significativa na formação de biofilmes por estas três espécies. Entretanto, em um estudo posterior, Tavanti et al. (2007) relataram que os isolados de *C. orthopsilosis* não foram capazes de formar biofilmes *in vitro*. Em outro estudo, Song et al. (2005) relataram que isolados de *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* não foram capazes de formar biofilmes, enquanto Lattif et al. (2010) identificaram as três espécies do complexos como capazes de formar biofilmes, com arquitetura tridimensional do biofilme similar, porém com diferenças na biomassa entre os biofilmes formados.

Considerando diferenças existentes na formação e atividade metabólica de biofilmes entre diferentes espécies de *Candida*, ressaltamos a importância deste trabalho, haja vista a escassez de trabalhos que abordam esses fatores associados à virulência de algumas espécies de *Candida não-albicans*, como *C. guilliermondii* e *C. famata*.

Candida famata, considerada causa rara de candidíase, tem sido relacionada a infecções sistêmicas associadas ao uso de cateter e a relatos de CIMs elevadas frente ao Fluconazol e equinocandinas (BEYDA et al., 2013). *C. guilliermondii*, antes considerada uma espécie incomum, tem sido reconhecida como uma espécie emergente nos últimos anos e associada a infecções graves. Além disso, podem apresentar diminuição da sensibilidade a Fluconazol, que constitui o tratamento empírico de escolha para estas infecções, além de resistência cruzada entre os azóis, taxas de sensibilidade a equinocandinas que variam de 33 a 100% e relatos de resistência *in vitro* a Anfotericina B (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; SAVINI et al., 2011). Entre os fatores de risco para infecções associadas a esta espécie estão internação hospitalar, pacientes com câncer, neutropênicos, e em tratamentos quimioterápicos (SAVINI et al., 2011) e ressaltamos que em nosso estudo as

amostras foram coletadas de ambientes cujos pacientes apresentam os fatores de risco citados.

6.4 Perfil de sensibilidade das células planctônicas

A resistência aos antifúngicos disponíveis, especialmente entre as espécies de *Candida* não-*albicans*, é um grande desafio para a terapia empírica e profilática de infecções causadas por estes agentes (MICELI; DIAZ; LEE, 2011).

A quantidade de antifúngicos disponíveis para tratamento de infecções fúngicas, especialmente as invasivas, ainda é baixa se comparada com a diversidade de drogas antibacterianas. Dentro dessa limitação, os antifúngicos Anfotericina B e Fluconazol estão entre as drogas mais tradicionais usados em regimes de tratamento e profilaxia em ambientes hospitalares. A identificação da espécie de levedura e os conhecimentos sobre seus fatores associados a virulência são essenciais para correlacionar com a resposta clínica aos antifúngicos e para a tentativa de compreender o surgimento de levedura com maior tolerância e desenvolvimento de mecanismos de resistência antifúngicos.

Neste estudo, as amostras de *Candida* spp. isoladas de ambiente hospitalar, não apresentaram resistência *in vitro* ao antifúngicos convencionais testados, sendo que 100% das amostras apresentaram-se sensíveis à Anfotericina B e apenas uma amostra (3,13%) apresentou sensibilidade dose-dependente ao Fluconazol, com IC de 16 µg/mL, sendo as demais sensíveis frente a este antifúngico. O intervalo de IC para Fluconazol foi de 0,25 a 16 µg/mL (1,63 a 52,24 µM/L) e para Anfotericina B foi de 0,125 a 1 µg/mL (0,14 a 1,08 µM/L) (Tabela 7).

Quando avaliada a CIM entre as espécies analisadas (Tabela 8) verifica-se que a espécie não influenciou na sensibilidade à Anfotericina B, porém em relação ao Fluconazol amostras de *C. guilliermondii* apresentaram valores de CIM maiores em relação às demais espécies (p valor < 0,05). Apesar de a amostra de *C. famata* também apresentar CIM de 4 µg/mL (13,06 µM/L) para o Fluconazol, seu resultado não foi considerado estatisticamente igual ao de *C. guilliermondii* e destaca-se também o fato de ter sido isolada e analisada somente uma amostra. Estudos mostram que *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* apresentam reduzida sensibilidade aos azólicos (MICELI; DIAZ; LEE, 2011).

Quando analisada a sensibilidade das amostras isoladas frente aos bioativos de origem vegetal testados, observa-se que 6 isolados (18,75%) não foram sensíveis às concentrações avaliadas de 7-Epiclusianona. Entretanto, o bioativo foi especialmente eficaz entre os isolados de *C. guilliermondii*, cuja CIM para a 7-Epiclusianona foi de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (59,73 $\mu\text{M}/\text{L}$). Isto se torna especialmente interessante se considerarmos que esta foi a espécie que apresentou os maiores valores de CIM para Fluconazol.

Já a Guttiferona-A apresentou excelente ação antifúngica sobre as amostras isoladas, com valores de IC muito baixos, variando entre 0,23 a 1,875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0,38 a 3,11 $\mu\text{M}/\text{L}$), menores que as IC frente ao Fluconazol. Esses resultados ratificam a possibilidade de se explorar esta substância como um candidato a protótipo de nova droga, especialmente por já apresentar estudos que mostram sua baixa toxicidade (DIAS et al., 2012).

6.5 Perfil de sensibilidade de biofilmes

Células presentes em biofilmes exibem características fenotípicas diferentes das células planctônicas, e a principal é que as células sésseis são notoriamente mais resistentes aos agentes antimicrobianos e às defesas imunológicas do hospedeiro. Esta é a principal razão pela qual infecções associadas a biofilme são frequentemente associadas à falha terapêutica (KHAN; AHMAD, 2012).

De fato, os resultados dos Testes de Sensibilidade em biofilmes (Tabela 9) mostram um aumento de IC para todos os antifúngicos testados. Enquanto os testes em células planctônicas evidenciaram que apenas uma amostra apresentou sensibilidade dose-dependente ao Fluconazol, sendo as demais sensíveis frente a este antifúngico, nos testes em células sésseis todas as amostras se mostraram resistentes. Para 84,4% dos biofilmes (27 amostras) não foi possível determinar a IC para o Fluconazol, sendo maior que 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3343,46 $\mu\text{M}/\text{L}$), a maior concentração testada.

Punithavathy, Nalina e Menon (2012) realizaram estudo com 50 isolados clínicos de *C. tropicalis*, sendo apenas 62% sensíveis ao Fluconazol em Testes de Sensibilidade em células planctônicas. Nos testes em biofilmes todas os isolados foram identificados como resistentes com IC superiores a 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sendo que 6%

apresentaram IC superiores a 1024 $\mu\text{g/mL}$, todos isolados de pacientes imunocomprometidos. Em nosso estudo todas as amostras ambientais de *C. tropicalis* eram sensíveis ao Fluconazol nos testes em células planctônicas e todas apresentaram IC superiores a 1024 $\mu\text{g/mL}$.

Jain et al. (2007) em estudo com isolados clínicos encontraram que 28% das amostras apresentaram biofilmes sensíveis à Anfotericina B, com IC < 1 $\mu\text{g/mL}$, o que não ocorreu em nosso trabalho, onde apesar de nos Testes de Sensibilidade em células planctônicas 100% das amostras apresentarem sensibilidade a este poliênico, todos os biofilmes mostraram-se resistentes, com IC variando de 4 a 64 $\mu\text{g/mL}$ (4,33 a 69,26 $\mu\text{M/L}$).

Esse aumento da resistência dos biofilmes aos antifúngicos associado à toxicidade, efeitos colaterais e alto custo das drogas atualmente utilizadas demonstra a necessidade de estudos adicionais que permitam a elucidação dos fatores envolvidos nesta diminuição da sensibilidade e também necessidade de desenvolvimento de novas drogas ou novas associações entre drogas, sendo muito interessante a busca de bioativos naturais.

Quando analisada a atividade dos bioativos vegetais frente aos biofilmes das amostras de ambiente hospitalar, pode-se perceber que a IC para Guttiferona-A variou de 15 a 800 $\mu\text{g/mL}$ (24,88 a 1327,14 $\mu\text{M/L}$), e para 7-Epiclusianona variou de 200 a maior que 800 $\mu\text{g/mL}$ (398,16 a maior que 1592,67 $\mu\text{M/L}$), o que representa uma maior atividade dos bioativos vegetais em biofilmes do que o Fluconazol, cujas ICs variaram de 256 a >1024 $\mu\text{g/mL}$ (835,82 a >3343,46 $\mu\text{M/L}$).

Os resultados comparativos entre os perfis de sensibilidade das células planctônicas e das células sésseis demonstram um grande aumento das IC em biofilmes quando comparadas com as ICs em células planctônicas, para todas as substâncias testadas (Tabelas 11, 12, 13 e 14).

Para o Fluconazol, as ICs encontradas foram de 64 a mais de 4096 vezes maior em biofilmes. Para a Anfotericina B, as IC foram de 4 a 256 vezes maior em biofilmes, sendo que este antifúngico apresenta alta toxicidade, especialmente nefrotoxicidade (TRIPATHI; WATT; BENJAMIN, 2012) além de poder causar toxicidade cardiovascular, distúrbios neurológicos e alterações do equilíbrio hidroeletrolítico (KOROLKOVAS; FRANÇA, 2006).

Em estudo realizado por Pires et al. (2011) com amostras de *C. parapsilosis* isoladas de água de unidades de hemodiálise também não foram identificadas amostras resistentes a Fluconazol e Anfotericina B em Testes de Sensibilidade em células planctônicas, e nos testes em biofilmes houve um grande aumento das ICs, sendo superiores a 512 µg/mL para o Fluconazol e maiores que 16 µg/mL para Anfotericina B. Porém 7% dos isolados apresentaram um aumento da IC em biofilmes superior a 16 vezes em relação a células planctônicas frente a Anfotericina B, enquanto em nosso estudo 65,6% dos isolados apresentaram um aumento da IC superior a 16 vezes.

O bioativo 7-Epiclusianona não apresentou atividade nas concentrações testadas em 25% dos biofilmes, e, além disso, o aumento da IC em células sésseis em relação a células planctônicas foi superior a 10 vezes em 40,6% das amostras. Murata et al. (2008) relataram o efeito inibitório deste bioativo vegetal no crescimento de biofilmes de *Streptococcus mutans*. Apesar de não ter sido encontrado em nosso trabalho uma boa atividade inibitória de 7-Epiclusianona em biofilmes de *Candida* spp., estes parecem ser os primeiros dados da atividade antifúngica deste bioativo vegetal em células planctônicas e biofilmes de *Candida não-albicans*.

Reafirmando a maior tolerância de células sésseis a agentes antifúngicos quando comparadas às células planctônicas correspondentes (D'EFERT, 2009), também houve um aumento das ICs para o bioativo vegetal Guttiferona-A em biofilmes dos isolados de ambiente hospitalar, chegando este aumento a ser superior a 2500 vezes em uma das amostras. Apesar disso, a Guttiferona-A apresentou excelente atividade antifúngica em biofilmes, sendo que a IC frente a Guttiferona-A foi ≤ 60 µg/mL para 40,6% dos biofilmes.

Monzote et al. (2011) não encontraram atividade antifúngica da Guttiferona-A em amostra de *C. albicans*, não sendo testadas amostras de *Candida não-albicans*. A IC₅₀ em *C. albicans* foi superior a 64 µM, enquanto em nosso trabalho a CIM₅₀ em células planctônicas foi de apenas 3,11 µM em *C. glabrata* e complexo *C. parapsilosis*, 0,78 µM em *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* e 0,38 µM em *C. famata*. Além disso, em biofilmes de *C. guilliermondii* a CIM₅₀ foi de 49,76 µM, concentração inferior a encontrada por Monzote et al. (2011) frente a células planctônicas de *C. albicans*. Resultado semelhante ao de Monzote et al. (2011) foi encontrado por Dias

et al. (2012), que testaram este bioativo vegetal em amostras padrão de *Candida* spp., e encontraram CIM₅₀ em *C. albicans* de 66,35 µM, enquanto em amostras de *Candida* não-*albicans* encontraram concentrações inibitórias de 33,17 µM em *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* e de 8,29 µM em *C. glabrata*.

Dessa maneira, em nosso trabalho reforçamos não só a atividade antifúngica deste bioativo vegetal em células planctônicas de *Candida* não-*albicans*, mas também em biofilmes destas espécies. Apesar de a ação antimicrobiana da Guttiferona-A já ter sido descrita por outros autores (DIAS et al., 2012; MONZOTE et al., 2011), não foram encontrados trabalhos que mostrem sua atividade em biofilmes.

Os resultados de Testes de Sensibilidade em biofilmes de amostras isoladas de ambiente hospitalar são importantes, já que todos os isolados apresentaram a capacidade de formação de biofilmes, o que é um problema, mesmo se tratando de amostras ambientais, uma vez que biofilmes em superfícies podem ser menos sensíveis até mesmo às substâncias utilizadas para desinfetar dispositivos e equipamentos médicos contaminados (NETT et al., 2008). Além disso, amostras ambientais podem fazer parte do ciclo epidemiológico das Infecções Hospitalares (BRASIL, 2009), e a presença de infecções associadas a biofilmes possui várias implicações clínicas e terapêuticas, estando associadas a um aumento da mortalidade, morbidades e de custos médico-hospitalares.

Estes resultados demonstram a importância da implementação de técnicas padronizadas de ensaio de sensibilidade antifúngica em biofilmes, e sua inclusão nos métodos de referência preconizados pelos comitês internacionais de testes de sensibilidade, como CLSI e EUCAST, possibilitando assim uma seleção de antifúngicos eficazes na terapêutica das infecções associadas a biofilmes.

6.6 Síntese dos resultados de amostras de ambiente hospitalar

A análise da Tabela 19 permite uma comparação entre os resultados obtidos entre os isolados de ambiente hospitalar. A comparação entre capacidade de produção de biofilmes e sua atividade metabólica já foi anteriormente discutida.

Quando analisadas as IC frente aos fármacos testados e a produção e atividade metabólica de biofilmes, é possível observar que a amostra que

apresentou maior IC frente ao Fluconazol (*C. guilliermondii* n° 70), com IC de 16 µg/mL) encontra-se no segundo grupo de maior capacidade produtora de biofilme (GQ2) e no grupo cujo biofilme apresentou maior atividade metabólica (GQ1). Todas as amostras cuja IC₅₀ frente ao Fluconazol foi ≥ 4 µg/mL apresentaram biofilmes com atividade metabólica classificada em GQ1 ou GQ2, ou seja, estavam entre os 50% de isolados com maior atividade metabólica de biofilmes, apesar de as capacidades de produção de biofilme variarem dos grupos 1 ao 4. Dessa maneira, maiores IC frente ao Fluconazol parecem estar mais relacionadas à atividade metabólica dos biofilmes.

Silva et al. (2010) já relacionavam a avaliação da atividade metabólica como um parâmetro com significado importante em termos de patogenicidade, uma vez que uma maior atividade metabólica do biofilme pode estar relacionada com maior expressão de fatores de virulência, embora uma baixa atividade metabólica do biofilme pode sugerir um mecanismo de resistência das células sésseis aos antimicrobianos. Nossos dados sugerem que amostras cujos biofilmes apresentam alta atividade metabólica apresentam menor sensibilidade ao Fluconazol, e esta menor sensibilidade está mais relacionada à atividade metabólica dos biofilmes do que à capacidade dos isolados em produzir biofilmes.

O mesmo não acontece com as IC frente à Anfotericina B, Guttiferona-A e 7-Epiclusianona, em que não pode ser notada uma relação entre IC e capacidade de produção de biofilmes ou sua atividade metabólica, talvez pelo fato de que todos os isolados apresentaram, frente a estes antifúngicos, ICs muito próximas entre si, com pequena variação.

Nos Testes de Sensibilidade em biofilmes não houve relação direta no que diz respeito à resposta do biofilme aos diferentes antifúngicos. Biofilmes que apresentaram as maiores IC frente ao Fluconazol e à Anfotericina B não foram necessariamente os que apresentam as maiores IC frente aos bioativos vegetais, o que pode demonstrar uma diferença no mecanismo de ação de diferentes substâncias sobre biofilmes. O biofilme formado pela amostra 57 de *C. guilliermondii*, por exemplo, apresentou as maiores ICs de antifúngicos sintéticos (para Fluconazol >1024 µg/mL e para Anfotericina B de 64 µg/mL), no entanto, Guttiferona-A apresentou excelente atividade sobre seu biofilme, com IC de 15 µg/mL.

Os resultados de Testes de Sensibilidade Antifúngica em biofilmes de amostras isoladas a partir do ambiente hospitalar são importantes, uma vez que todos os isolados mostraram a capacidade de formação de biofilme, o que é um problema, uma vez que os biofilmes em superfícies pode ser ainda menos sensíveis a substâncias utilizadas na desinfecção de dispositivos médicos contaminados e equipamentos (NETT et al., 2008), e encontramos a presença de leveduras nestes locais. Além disso, as amostras ambientais podem ser parte do ciclo epidemiológico de infecções hospitalares,

Cabe ressaltar que todos os biofilmes apresentarem resistência frente a Fluconazol e Anfotericina B, que estão entre os antifúngicos mais utilizados no ambiente hospitalar, tanto em quimioprevenções quanto em tratamento de infecções (TRIPATHI; WATT; BENJAMIM, 2012). Esta pode ser uma das razões pelas quais infecções associadas a biofilmes são frequentemente relacionadas à falha terapêutica e a maiores taxas de mortalidade (TUMBARELLO et al., 2007).

Apesar da resistência das células sésseis analisadas frente aos antifúngicos sintéticos analisados, 28,1% dos biofilmes apresentaram IC frente à Guttiferona-A de apenas 15 a 30 $\mu\text{g/mL}$, e as CIMs para todas as espécies isoladas variaram de 30 a 200 $\mu\text{g/mL}$, reforçando a possibilidade deste promissor bioativo como um candidato a protótipo de droga.

Não foi encontrada uma relação direta entre a formação de biofilme, sua atividade metabólica e seu perfil de sensibilidade. As menores IC em biofilmes frente à Anfotericina B (4 $\mu\text{g/mL}$) foram eficazes tanto em amostras que apresentaram maior capacidade de formação de biofilme e alta atividade metabólica (amostra 75 do complexo *C. parapsilosis*) quanto em amostras com menor capacidade de formação de biofilme e baixa atividade metabólica (amostra 37A do complexo *C. parapsilosis*). O mesmo ocorreu em relação à Guttiferona-A, que apresentou atividade em biofilmes independente da capacidade de formação de biofilme e de sua atividade metabólica. As amostras 57 de *C. guilliermondii* (alta capacidade de formação de biofilme e atividade metabólica, em GQ 1), 37A do complexo *C. parapsilosis* (baixa capacidade de formação de biofilme e atividade metabólica, em GQ 4) e 13 de *C. tropicalis* (alta capacidade de formação de biofilme, em GQ2 e baixa atividade metabólica, em GQ 4) apresentaram IC frente a Guttiferona-A de apenas 30 $\mu\text{g/mL}$. Em relação aos biofilmes que apresentaram maior resistência

frente aos antifúngicos sintéticos e bioativos vegetais, também se encontram amostras com alta e baixa capacidade de formação de biofilme e atividade metabólica.

Esses dados demonstram que o perfil de sensibilidade em células planctônicas não prediz o perfil de sensibilidade em células sésseis. Além disso, o estudo de capacidade de formação de biofilme e atividade metabólica, relevantes para o estudo de patogenicidade, não descartam a realização de testes de sensibilidade em biofilmes para um eficaz tratamento de infecções fúngicas associadas à formação de biofilmes.

O fato é que a maior parte das prescrições de antifúngicos é feita com base em estudos realizados com células em suspensão, sendo as quantidades de antifúngico prescritas, possivelmente inferiores às necessárias para eliminar biofilmes. Essa pode ser uma das principais razões para a falta de correlação entre resultados de sensibilidade aos antifúngicos obtidos *in vitro* e os resultados clínicos em pacientes, principalmente em infecções disseminadas.

Compreender os processos envolvidos no desenvolvimento de biofilmes e no aumento de sua resistência às terapias antifúngicas é de extrema importância para que sejam estabelecidas estratégias para prevenir ou erradicar as infecções relacionadas a este modo de crescimento.

Através da análise do perfil de sensibilidade dessas amostras quando em comunidade, esperamos contribuir para o esclarecimento do papel dos biofilmes na patogenicidade destas leveduras.

7 CONCLUSÕES

Foi considerada alta distribuição de leveduras do gênero *Candida* em amostras coletadas em ambiente hospitalar (17,8%), que podem servir de reservatório e fonte de transmissão de infecções.

Somente espécies de *Candida não-albicans* foram isoladas de ambiente hospitalar.

As espécies mais isoladas de ambiente hospitalar foram do complexo *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, que são consideradas as espécies de *Candida não-albicans* mais prevalentes em candidemias na América Latina

Todas as amostras isoladas foram capazes de produzir biofilme, mas não foi observada uma relação direta entre a capacidade de produção de biofilme e sua atividade metabólica.

Não houve diferença na produção de biofilme entre as diferentes espécies analisadas, mas biofilmes de complexo *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* apresentaram os menores valores de atividade metabólica (p-valor<0,05).

Amostras produtoras de biofilmes com maior atividade metabólica apresentaram maiores ICs frente ao Fluconazol em testes de sensibilidade de células planctônicas.

Em relação ao perfil de sensibilidade amostras de *C. guilliermondii* apresentaram valores de IC para Fluconazol superiores aos valores apresentados frente às demais espécies (p-valor<0,05).

O bioativo vegetal Guttiferona-A apresentou excelente ação antifúngica sobre as amostras isoladas, com valores de IC variando entre 0,23 a 1,875 µg/mL.

Os resultados dos Testes de Sensibilidade em biofilmes realizados demonstram um grande aumento das IC em biofilmes quando comparadas com as IC em células planctônicas, para todas as substâncias testadas, variando de 256 a >2.048 vezes no caso do Fluconazol e de 16 a 256 vezes para Anfotericina B.

Os bioativos vegetais estudados apresentaram boa atividade sobre biofilmes, especialmente a Guttiferona-A, com IC ≤ 60 µg/mL para 40,6% dos biofilmes.

As metodologias empregadas no estudo produção e sensibilidade de biofilmes formados por *Candida* spp. se mostraram reprodutíveis, o que é fundamental para a avaliação deste importante fator associado à virulência.

O perfil de sensibilidade em células planctônicas não prediz o perfil de sensibilidade em células sésseis. Além disso, o estudo de capacidade de formação de biofilme e atividade metabólica, não descarta a realização de testes de sensibilidade em biofilmes.

Os resultados demonstram a importância da implementação de técnicas padronizadas de ensaio de sensibilidade antifúngica em biofilmes, para uma adequada seleção de antifúngicos com eficácia terapêutica em infecções associadas a biofilmes.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. S. B. et al. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, v. 15, p. 886-891, 2008.

ALMEIDA JR, J. N. et al. First report of a clinical isolate of *Candida haemulonii* in Brazil. **Clinics**, v. 67, n. 10, p. 1229-1231, 2012.

ÁLVARES, C.A.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n.5, p.319-327, 2007.

ALVES, I. A.; CAMARGO, F. P.; GOULART, L. S. Identificação por PCR e sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos vaginais de *Candida* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 575-579, 2010.

ANDERSON, J. B. Evolution of antifungal drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 547-557, 2005.

ANDES, D. et al. Development and Characterization of an In Vivo Central Venous Catheter *Candida albicans* Biofilm Model. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 6023- 6031, 2004.

ANDRADE, D.; ANGERAMI, E. L. S.; PADOVANI, C. R. Condição microbiológica dosleitos hospitalares antes e depois de sua limpeza. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 2, p. 163-169, 2000.

APISARNTHAVNARAK, A. et al. Risk factors and outcomes of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species at a Thai tertiary care center. **American Journal of Infection Control**, v. 04, p. 781-782, 2009.

ARENDRUP, M. C. Epidemiology of invasive candidiasis. **Current Opinion in Critical Care**, v. 16, p. 445-452, 2010.

BARREIRO, E. J. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BEYDA, N. D. ET AL. Treatment of *Candida famata* bloodstream infections: case series and review of the literature. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 438-443, 2013.

BLANCO, M. T. et al. La hidrofobicidad de la superficie celular como indicador de otros factores de virulência en *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 27, n. 4, p. 195-199, 2010.

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

BONFIETTI L. X., et al. Ten-year study of species distribution and antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates at a Brazilian tertiary hospital. **Mycopathologia**, v. 174, p. 389-396, 2012.

BRAGA-SILVA, L. A., et al. Multiple effects of amprenavir against *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**, v. 10, p. 221-224, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria 2616, de 1998. Publicação D. O. U. de 13 de maio de 1998. **Programa de Controle de Infecção Hospitalar**. Anexo II: Conceitos e critérios diagnósticos das IHs. São Paulo, p. 5, maio de 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Curso Básico de Controle de Infecção Hospitalar**. Caderno A: Epidemiologia para o Controle de Infecção Hospitalar. Brasília, DF, 2009.

CHANDRA, J.; ZHOU, G.; GHANNOUM, M. A. Fungal Biofilms and Antimycotics. **Current Drug Targets**, v. 6, p. 887-894, 2005.

CHASSOT, F. et al. Can intrauterine contraceptive devices be a *Candida albicans* reservoir? **Contraception**, v. 77, p. 355-359, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Strandard-Third Edition. M27-A3**. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

COCUAUD, C. et al. Anti-metabolic activity of caspofungin against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 507-512, 2005.

COENYE, T. et al. Prevention of *Candida albicans* Biofilm Formation. **The Open Mycology Journal**, v. 5, p. 9-20, 2011.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2816-2823, 2006.

CORDEIRO, R. A. et al. Isolation of pathogenic yeasts in the air from hospital environments in the city of Fortaleza, northeast Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n.1, p. 30-34, 2010.

COUTO, R. C.; PEDROSA, T. M. G. **Guia prático de Controle de Infecção Hospitalar**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

D'EFERT, C. Hidden killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in the human host. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, p. 358-364, 2009.

DIAS, K. S. T. et al. Semisynthesis and antimicrobial activity of novel guttiferone – A derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 2713-2720, 2012.

DJORDJEVIC, D; WIEDMANN, M.; LANDSBOROUGH, L.A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2950-2958, 2002.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends Microbiol**, v. 11, p. 30-36, 2003.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência**, v. 7, 2006.

ERRIU, M. et al. Microtiter spectrophotometric biofilm production assay analyzed with metrological methods and uncertainty evaluation. **Measurement**, v. 45, p. 1083-1088, 2012.

ESPINEL-INGROFF. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 1, p. 15-22, 2009.

EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST). **Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts**. Document EDef 7.2. Munich, Germany, 2012.

FAVALESSA, O. C.; MARTINS, M. A.; HAHN, R. C. Aspectos micológicos e suscetibilidade in vitro de leveduras do gênero *Candida* em pacientes HIV-positivos provenientes do Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 673-677, 2010.

FERREIRA, C. et al. *Candida albicans* virulence and drug-resistance requires the O-acyltransferase Gup1p. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 238, 2010.

FERREIRA, J. A. G. et al. Biofilm Formation and Effect of Caspofungin on Biofilm Structure of *Candida* Species Bloodstream Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 10, p. 4377-4384, 2009.

FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews**, v. 9, p. 109-118, 2011.

GAUWERKY, K.; BORELLI, C.; KORTING, H. C. Targeting virulence: A new paradigm for antifungals. **Drug Discovery Today**, v. 3, n. 4, p. 214-222, 2009.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Physiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GOMEZ-LOPEZ, A. A. et al. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1506-1509, 2008.

GUSTAFSON, K. R. et al. The guttiferones, HIV inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**, v. 48, p. 10093-10102, 1992.

HALL-STOODLEY, L. et al. Towards Diagnostic Guidelines for Biofilm-Associated Infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 127-145, 2012.

HAWSER, S.P.; DOUGLAS, L.J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 3, p. 915-921, 1994.

HOF, H. Developments in the epidemiology of invasive fungal infections – implications for the empiric and targeted antifungal therapy. **Mycoses**, v. 51, n. 1, p. 1-6, 2008.

HOTA, B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are the hospital surface reservoirs for nosocomial infection? **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p.1182-1189, 2004.

JAIN, N. et al. Biofilm Formation by and Antifungal Susceptibility of *Candida* Isolates from Urine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1697-1703, 2007.

JIN, Y. et al. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of Human Immunodeficiency Virus infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 2961-2967, 2003.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigates*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 2, p. 211-224, 2009.

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I. Antibiofilm activity of certain phytocompounds and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 618-621, 2012.

KO, K. S. et al. In vitro Evaluation of Antibiotic Lock Technique for the Treatment of *Candida albicans*, *C. glabrata*, and *C. tropicalis* Biofilms. **Journal of Korean Medical Science**, v. 25, p.1722-1726, 2010.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. *Candida* infections of medical devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 255-267, 2004.

KONOPKA, K. et al. Susceptibility of *Candida* biofilms to histatin 5 and fluconazole. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, p. 413-417, 2010.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 8ª Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KOTHAVADE, R. J. et al. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 873-880, 2010.

KU, T. S. N.; PALANISAMY, S. K. A.; LEE, S. A. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to azithromycin, tigecycline and vancomycin and the interaction between tigecycline and antifungals. **Internacional Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p. 441-446, 2010.

KUHN, D. M. et al. Antifungal Susceptibility of *Candida* Biofilms: Unique Efficacy of Amphotericin B Lipid Formulations and Echinocandins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1773-1780, 2002.

LATTIF, A. A. et al. Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 265-270, 2010.

LYON, J. P. et al. Inhibition of Virulence Factors of *Candida* spp. by Different Surfactants. **Mycopathologia**, v. 171, p. 93-101, 2011.

MARTINEZ, L. R. et al. Demonstration of Antibiofilm and Antifungal Efficacy of Chitosan against *Candida* Biofilms, Using an In Vivo Central Venous Catheter Model. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 9, p. 1436-1440, 2010.

MARTINS-DINIZ, J. N. et al. Monitoramento de fungos anemófilos e de leveduras em unidade hospitalar. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 3, p. 398-405, 2005.

MAVOR, A. L.; THEWES, S.; HUBE, B. Systemic Fungal Infections Caused by *Candida* Species: Epidemiology, Infection Process and Virulence Attributes. **Current Drug Targets**, v. 6, p. 863-874, 2005.

MEDEIROS, E. A. S. et al. Evidence for a pseudo-outbreak of *Candida guilliermondii* fungemia in a University Hospital in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 942-947, 2007.

MICELI, M. H.; DIAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, p. 142-151, 2011.

MÍMICA, L. M. J. et al. *Candida* infection diagnosis: evaluation of *Candida* species identification and characterization of susceptibility profile. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 1, p. 17-23, 2009.

MIRANDA-ZAPICO, I. et al. Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. **The Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 2315-2322, 2011.

MISHRA, N. N. et al. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 54, n. 3, p. 201-235, 2007.

MOHANDAS, V.; BALLAL, M. Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 3, p. 4-8, 2011.

MONZOTE, L. et al. Antimicrobial evaluation of the polyisoprenylated benzophenones nemorosone and guttiferone a. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 3, p. 458-462, 2011.

MORETTI, M. L. et al. Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. **Medical Mycology**, doi: 10.3109/13693786.2012.708107, 2012.

MOTTA, A. L. et al. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 441-448, 2010.

MUIR, A.; WEINBREN, M. J. Potential virulence factors of *Candida* spp. Isolated from clinical and food sources. **Journal of Hospital Infection**, v. 75, p. 236-246, 2010.

MURATA, R. M. et al. Inhibitory effects of 7-epiclusianone on glucan synthesis, acidogenicity and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 282, n. 2, p. 174-181, 2008.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 3, p. 400-428, 2003.

NAILIS, H. et al. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. **BMC Microbiology**, v. 10, p.114, 2010.

NEGRI, M. et al. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. **Mycopathologia**, v. 169, n. 3, p. 175-182, 2010.

NETT, J. E. et al. Reduced Biocide Susceptibility in *Candida albicans* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3411-3413, 2008.

NETT, J.; ANDES, D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 340-345, 2006.

NOBILE, C. J.; MITCHELL, A. P. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 9, p.1382-1391, 2006.

NOBILE, C.J. et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. **Cell**, v. 148, p.126-138, 2012.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, n. 1, p. 77-82, 2007.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 561-570, 2010.

OSORIO, J. J. C. et al. Epidemiology of invasive fungal infection. **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 103-109, 2008.

OSTROSKY, E. A., et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PFALLER, M.A., et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin b, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1040-2046, 2012.

PIRES, R. H. et al. *Candida parapsilosis* complex water isolates from a haemodialysis unit: biofilm production and in vitro evaluation of the use of clinical antifungals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 646-654, 2011.

PUNITHAVATHY, P. M.; NALINA, K.; MENON, T. Antifungal susceptibility testing of *Candida tropicalis* biofilms against fluconazole using calorimetric indicator resazurin. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 72-74, 2012.

QUINDÓS, G.; VILLAR-VIDAL, M.; ERASO, E. Actividad de la micafungina contra las biopelículas de *Candida*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 1, p. 49- 55, 2009.

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

RAMAGE, G. et al. Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n. 9, p. 2475-2479, 2001.

RODRIGUES-TUDELA, J. L. et al. Influence of shaking on antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: a comparison of the NCCLS Standard M27A médium, buffered yeast nitrogen base, and RPMI-2% glucose. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 400-404, 2000.

RÖRIG, K.C.O.; COLACITE, J.; ABEGG, M.A. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 225-227, 2009.

SANTOS, M. H. et al. 7-Epiclusianone, the new tetraprenylated benzophenone and others chemical constituents from the fruits of *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, v. 22, n. 5, 1999.

SAVINI, V. et al. What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. **Mycoses**, v. 54, n. 5, 2011.

SCHILLACI, D., et al. In vitro anti-biofilm activity of *Boswellia* spp. Oleogum resin essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 433-438, 2008.

SENEVIRATNE, C. J. et al. Cell Density and Cell Aging as Factors Modulating Antifungal Resistance of *Candida albicans* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3259-3266, 2008.

SENEVIRATNE, C. J.; JIN L.; SMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Diseases**, v. 14, p. 582-590, 2008.

SENEVIRATNE, C. J. et al. Proteomics of drug resistance in *Candida glabrata* biofilms. **Proteomics**, v. 10, p. 1444-1454, 2010.

SHUFORD, J. A., et al. In vitro biofilm characterization and activity of antifungal agents alone and in combination against sessile and planktonic clinical *Candida albicans* isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, p. 277-281, 2007.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, A. P. et al. Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2392-2397, 2009.

SILVA, S., et al. In Vitro Biofilm Activity of Non-*Candida albicans* *Candida* Species. **Current Microbiology**, v. 61, p. 534-540, 2010.

SILVA, S. et al. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 241-247, 2011.

TAFF, H. T.; NETT, J. E.; ANDES, D. R. Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation. **Medical Mycology**, v. 50, n. 2, p. 214 – 218, 2012.

TAMURA, N.K. et al. Fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 91-93, 2007.

TAVANTI, A. et al. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida para-psilosis* groups II and III. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 284-292, 2005.

TAVANTI, A. et al. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 1455-1462, 2007.

THEIN, Z. M. et al. P. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. **Mycoses**, v. 52, p. 467-475, 2009.

THÉRAUD, M. et al. Efficacy of antiseptics and disinfectants on clinical and environmental yeast isolates in planktonic and biofilm conditions. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 1013-1018, 2004.

TRIPATHI, N.; WATT, K.; BENJAMIN, D. K. Treatment and prophylaxis of invasive candidiasis. **Semin. Perinatol**, v. 36, p. 416-423, 2012.

TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, p. 606-625, 2008.

TUMBARELLO, M. et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 1843-1850, 2007.

UPPULURI, P.; CHATURVEDI A, K.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Design of a Simple Model of *Candida albicans* Biofilms Formed under Conditions of Flow: Development, Architecture, and Drug Resistance. **Mycopathologia**, v. 168, p. 101-109, 2009.

UPPULURI, P. et al. Dispersion as an Important Step in the *Candida albicans* Biofilm Developmental Cycle. **Plos Pathogens**, v. 6, n. 3, 2010.

UPPULURI, P. et al. Synergistic Effect of Calcineurin Inhibitors and Fluconazole against *Candida albicans* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 1127-1132, 2008.

VANDENBOSCH, D. et al. Fungicidal activity of miconazole against *Candida* spp. Biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 694-700, 2010.

VAZQUEZ, J. A. et al. Nosocomial *Candida glabrata* Colonization: an Epidemiologic Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 421-426, 1998.

WARNOCK, D. W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 48, p. 1-12, 2007.

WEI, G. X.; XU, X.; WU, C. D. In vitro synergism between berberine and miconazole against planktonic and biofilm *Candida* cultures. **Archives of Oral Biology**, v. 14, n. 5, p. 441-448, 2010.

**APÊNDICE A – AUTORIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO
DA PESQUISA (COLOQUE A VERSÃO ASSINADA)**

Alfenas, 01 de junho, 2011.

Exmo Diretor Técnico.

Vimos, através desta, solicitar sua autorização para o desenvolvimento da pesquisa de mestrado em Ciências Farmacêuticas intitulada: **“BIOFILMES E SUSPENSÕES CELULARES DE *Candida* spp. DE INFECCÕES NOSOCOMIAIS E DE AMBIENTE HOSPITALAR: EFEITOS DE ANTIFÚNGICOS SINTÉTICOS E BIOATIVOS VEGETAIS”**, cujos objetivos são:

Coletas semanais para investigação de colonização hospitalar fúngica: ambiente hospitalar, leitos, maçanetas de porta, interruptores, bandejas de preparo de medicamentos, estetoscópios, mãos e jalecos de funcionários do Centro de Tratamento Intensivo e Centro cirúrgico.

Coletas semanais para investigação de infecção hospitalar fúngica: amostras de hemoculturas negativas para presença de bactérias ou com indicação direta de Candidemia e amostras de ponta de cateter.

O projeto será analisado pelo Comitê de Ética em pesquisa com Seres Humanos da UNIFAL conforme declaração em anexo, sendo garantido o anonimato de todos os indivíduos pesquisados. A coleta de dados será realizada durante o período de julho de 2011 a outubro de 2012, com visitas semanais da mestrandia Roberta Ribeiro de Carvalho, acompanhado de outro discente que auxiliar-lhe-á nas coletas.

Atenciosamente,

Profa.Dra. Amanda Latercia Tranches Dias
Orientadora

Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG

Roberta Ribeiro de Carvalho
Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG

De acordo e ciente: _____

Diretor Técnico do Hospital Bom Pastor (FHOMUV)

APENDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,.....abaixo assinado(a), tendo sido informado do assunto e do fim da pesquisa **BIOFILMES E SUSPENSÕES CELULARES DE *Candida* spp. DE INFECÇÕES NOSOCOMIAIS E DE AMBIENTE HOSPITALAR: EFEITOS DE ANTIFÚNGICOS SINTÉTICOS E BIOATIVOS VEGETAIS** a ser realizado em parceria com a UNIFAL-MG, e devidamente informado, previamente, do modo como essa pesquisa será realizada, concordo que as amostras de microrganismos que forem isoladas pelos médicos responsáveis ou amostras isoladas de vestuários e mãos, através de procedimentos não invasivos, poderão ser utilizadas nesta pesquisa. **Declaro que estou livre e inteiramente de acordo em participar dela**, sabedor (a) de que será guardada, em sigilo, qualquer informação que eu fornecer sobre minha pessoa e podendo deixar de participar dela quando bem quiser.

Portanto, concordo em participar desta pesquisa, renunciando, neste ato, a qualquer indenização por danos morais e concordo que as amostras obtidas sejam utilizadas com a finalidade de pesquisa e que os dados resultantes sejam divulgados desde que seja preservada minha identidade.

Varginha,dede

.....
(assinatura do participante ou de seu responsável)

Profa Dra Amanda L. T. Dias
Orientadora-PPGCF

Roberta Ribeiro de Carvalho
Mestranda-PPGCF

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa