

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO E ANTIBIOFILME  
DO SAL IMIDAZÓLICO CLORETO DE 1-METIL-3-HEXADECILIMIDAZOL  
(C<sub>16</sub>MImCl) E DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DE mate (*Ilex paraguariensis*  
A. St. Hil.) FRENTE A CÉLULAS DE BIOFILME DE *Candida tropicalis*.**

VANESSA ZAFANELI BERGAMO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Orientador:** Prof Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

**Co-orientador:** Prof Dr. George González Ortega

**PORTO ALEGRE**

**2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO E ANTIBIOFILME  
DO SAL IMIDAZÓLICO CLORETO DE 1-METIL-3-HEXADECILIMIDAZOL  
(C<sub>16</sub>MImCl) E DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DE mate (*Ilex paraguariensis*  
A. St. Hil.) FRENTE A CÉLULAS DE BIOFILME DE *Candida tropicalis*.**

VANESSA ZAFANELI BERGAMO

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola e do  
Ambiente da Universidade  
Federal do Rio Grande do  
Sul, como requisito parcial  
para a obtenção do título de  
Mestre.

Porto Alegre, RS, Brasil

Fevereiro, 2014

*"A persistência é o menor caminho do êxito."*

*(Charles Chaplin)*

## *Agradecimentos*

*Agradecer a todos que me ajudaram a construir esta dissertação não é tarefa fácil.*

*Iniciando... De forma carinhosa agradeço aos meus pais e as minhas irmãs Alessandra e Fernanda que sempre me incentivaram a não desistir desta grande batalha, principalmente ao meu pai que sempre acreditou no meu potencial, mesmo sem entender o meu trabalho, sempre me apoiou da forma mais linda! Obrigada pelo amor e carinho!*

*Faculdade... Tudo começou graças a grande receptividade do Prof. Dr. George González Ortega para eu fazer parte do seu grupo de pesquisa. Logo, conheci o Prof. Dr. Alexandre M. Fuentefria e então tive a oportunidade de trabalhar com estes dois grandes professores. Agradeço o carinho e a compreensão perante todo o nervosismo e o medo de não conseguir vencer este trabalho! De forma especial, agradeço ao meu orientador Alexandre Fuentefria pelo seu otimismo, simpatia, dedicação e principalmente a sua amizade! Sou muito grata por tudo! Quero agradecer ao Prof. Henri, ao Ricardo Donato, Katarzyna Donato e Giovane Zorzi que contribuíram muito para a execução e andamento deste trabalho!*

*Aos colegas e amigos... acredito que além do mestrado nos proporcionar um grande trabalho, esforço, aprendizagem e crescimento, felizmente levamos nesta bagagem os verdadeiros amigos, né MICOGIRLS?! De modo especial, meu forte agradecimento vai para todas as meninas do lab: Bruna, Daiane, Aline, Renata, Fernanda, Camilinha Hatwig, Aícha, Thayse, Camila Donato, Gabriela Meirelles, Simone (sempre fez o melhor alfajor para alegrar as nossas tardes!!) e ao Edu!! Enfim, a meus amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão. Não poderia deixar de comentar o meu reconhecimento principalmente para a Bruna que nunca se cansou em me explicar desde o MIC até as diluições do biofilme! E as jantinhas nos finais de semana? E as festas? Sempre encontrando uma maneira de sermos alegres do início ao fim desta jornada. Sem contar os choros (quase todos os dias) nos últimos dias da dissertação. Nesses momentos percebemos que os amigos existem! Outra pessoa que me ajudou muito é a Daiane, que com seu jeito engraçado, com piadas e o seu sorriso contagiante sempre fez meus dias mais alegres no lab! Sem contar a ajuda no meu primeiro "paper", de coração obrigada por tudo!!!*

*Agradeço a participação dos membros da banca examinadora.*

*Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa concedida durante os anos do curso.*

*Não poderia deixar de agradecer a Deus por me fazer uma pessoa feliz e realizada com as escolhas tomadas em minha vida.*

*Para finalizar esta seção, gostaria de dedicar esta dissertação para o meu pai que sempre me apoiou citando uma frase de Charles Chaplin: "Lembra-vos que as grandes proezas da história foram conquistadas do que parecia impossível"!! Pai te amo!!!*

CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO E ANTIBIOFILME DO SAL IMIDAZÓLICO CLORETO DE 1-METIL-3-HEXADECILIMIDAZOL ( $C_{16}MImCl$ ) E DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DE mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) FRENTE A CÉLULAS DE BIOFILME DE *Candida tropicalis*.<sup>1</sup>

Autora: Vanessa Zafaneli Bergamo

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria

Co-orientador: Prof Dr. George González Ortega

## RESUMO

Em contraste com a vasta descrição na literatura científica dos biofilmes bacterianos, poucos trabalhos focam o estudo da formação e as estratégias de inibição da constituição do biofilme fúngico. Este trabalho objetiva a caracterização do potencial antifúngico e antibiofilme do sal imidazólico 1-metil-3-octilimidazol cloreto ( $C_{16}MImCl$ ), e das frações (F70 e F90) purificadas de saponinas mate (*Ilex paraguariensis* A. st. Hil.), frente a células de biofilme de seis isolados clínicos de *Candida tropicalis*. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do  $C_{16}MImCl$  foi de 0,014 $\mu$ g/mL frente às células planctônicas, ao passo que as Frações de Saponinas da Erva Mate (FSEM) não apresentaram atividade antifúngica. Utilizando o cateter traqueal (CT) como corpo de prova, foi utilizado para avaliar a capacidade de inibição e remoção do biofilme. Avaliou-se também a Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme (CMEB) para remoção do biofilme pré-formado pelo método da microplaca. Para a atividade antibiofilme foi observado que o  $C_{16}MImCl$ , apresentou melhor resultado quando comparado ao fluconazol. As FSEM também apresentaram atividade antibiofilme quando comparados ao fluconazol, entretanto menores do que o tensoativo sintético. Pela análise dos resultados de CMEB, o  $C_{16}MImCl$  foi o composto com maior capacidade de erradicar o biofilme pré-formado, na concentração de 0,9  $\mu$ g/mL (92% a 100% de remoção do biofilme). Os demais compostos testados (fluconazol, FEM e a água) não apresentaram atividade removedora, observando-se valores menores que 80% de remoção. Tanto as concentrações nas quais  $C_{16}MImCl$  inibiu as células planctônicas (0,014  $\mu$ g/mL) como as de biofilme (0,028 -0,225  $\mu$ g/mL) foram mais baixas que as obtidas pelo fluconazol. Os resultados obtidos demonstram a potencialidade destes tensoativos, principalmente o  $C_{16}MImCl$ , que demonstrou baixa toxicidade e provável mecanismo de ação sobre a síntese do ergosterol. Assim, é possível afirmarmos que estes tensoativos representam uma potencial alternativa para o controle químico de fungos leveduriformes, especialmente as ocasionadas por células de biofilme por *C. tropicalis*.

Palavras-chaves: Biofilme, *Candida tropicalis*, Cateter Traqueal, Antibiofilme, Substâncias Tensoativas, Sais imidazólicos

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (112 p.). Fevereiro, 2014.

## ABSTRACT

### DESCRIPTION OF POTENTIAL AND ANTIFUNGAL ANTIBIOFILM IMIDAZOLIUM SALT 1 - METHYL- 3 - OCTILIMIDAZOLIUM CHLORIDE (C<sub>16</sub>MImCl) AND PURIFIED FRACTION OF MATE (*Ilex paraguariensis* to. St. Hil.) FRONT OF CELLS BIOFILM *Candida tropicalis*.<sup>1</sup>

Author: Vanessa Zafaneli Bergamo

Advisor: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria

Co - advisor: Prof. Dr. George Gonzalez Ortega

In contrast to the extensive description in the literature of bacterial biofilms, few works focus on the study of the formation and strategies for inhibiting the formation of fungal biofilms. This work aims to characterize the antifungal potential and antibiofilm the imidazole salt 1 - methyl - 3 - octylimidazol chloride (C<sub>16</sub>MImCl), and fractions (F70 and F90) purified saponins mate (*Ilex paraguariensis* A. st. Hil.), against to biofilm cells of six clinical isolates of *Candida tropicalis*. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of C<sub>16</sub>MImCl was 0.014 mg / mL to planktonic cells, whereas the Saponin Fractions of Yerba Mate (SFYM) showed no antifungal activity. Using the tracheal catheter (CT) as a specimen was used to evaluate the ability of the biofilm inhibition and removal. We also assessed the Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC) to remove the preformed biofilms by the microplate method. For antibiofilm activity was observed that C<sub>16</sub>MImCl, showed better results when compared to fluconazole. The SFYM also had antibiofilm activity when compared to fluconazole, however smaller than the synthetic surfactant. By analyzing the results MBEC, the compound C<sub>16</sub>MImCl was capacity to eradicate pre- formed biofilm in a concentration of 0.9 mg / mL (92% to 100% biofilm removal). The other tested compounds (fluconazole, SFYM and water) showed no activity remover, observing less than 80 % removal values. Both concentrations at which they inhibit planktonic cells C<sub>16</sub>MImCl (0.014 µg/mL) and the biofilm (0.028 -0.225 µg/ml) were lower than those obtained by fluconazole. The results obtained demonstrate the potential of these surfactants, especially C<sub>16</sub>MImCl, which demonstrated low toxicity and probable mechanism of action on the synthesis of ergosterol. Thus, it is possible to assert that these surfactants are a potential alternative to chemical control of yeasts, especially those caused by biofilm cells of *C. tropicalis*.

Keywords: Biofilm, *Candida tropicalis*, Tracheal Catheter, antibiofilm, surface-active substances, imidazolium salts

<sup>1</sup>Master of Science Dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (112 p.). February, 2014.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
2.1 Objetivo Geral .....	5
2.2 Objetivos Específicos.....	5
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>7</b>
3.1 Biofilme.....	7
3.2 Biofilme de <i>Candida</i> sp .....	11
3.3 Biofilme e Resistência.....	14
3.4 Biofilme em Cateter Traqueal .....	18
3.5 Antibiofilme .....	20
3.5.1 Substâncias com capacidade de remoção e inibição da formação de biofilme por <i>Candida</i> .....	20
3.5.2 Metodologias da atividade Antibiofilme e Remoção .....	23
3.6 Tensoativos .....	27
3.6.1 Saponinas de Erva Mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.) .....	29
3.6.2 Sais imidazólicos e líquidos iônicos.....	33
<b>4 MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
4.1 Isolados .....	37
4.2 Teste de triagem para a formação do biofilme.....	37
4.2.1 Método do Cristal Violeta em microplaca.....	37
4.3 Teste de Susceptibilidade aos compostos testados .....	38
4.3.1 <i>Screening</i> dos sais imidazólicos e saponinas de erva mate .....	39
4.3.1.1 Preparação do inóculo.....	42
4.3.1.2 Teste de Susceptibilidade – <i>Screening</i> .....	42
4.3.1.3 Teste de Susceptibilidade – Determinação da Concentração Inibitória Mínima das Células Planctônicas (CIMP).....	43
4.3.1.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) ...	45
4.4 Ensaio de formação de biofilme em Cateter Traqueal.....	45



4.5	Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB).....	46
4.6	Formação e diluição do inóculo para a atividade antibiofilme e removedora .....	46
4.6.1	Avaliação da atividade antibiofilme do Cateter Traqueal contaminado artificialmente .....	47
4.6.2	Avaliação da atividade de remoção do biofilme do Cateter Traqueal contaminado artificialmente .....	47
4.7	Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme (CMEB).....	48
4.8	Avaliação do Potencial Zeta .....	49
4.9	Análise dos resultados CIMs, CFMs, CMEB .....	49
4.10	Análise dos resultados do biofilme.....	50
5	RESULTADOS .....	51
5.1	Avaliação da capacidade de formação do biofilme pelo método Cristal Violeta em microplaca.....	51
5.2	Teste de Susceptibilidade.....	52
5.2.1	<i>Screening</i> da atividade antifúngica dos sais imidazólicos e das saponinas (F70 e F90) dos frutos de erva mate frente aos isolados de <i>C. tropicalis</i> .....	52
5.2.3	Teste de Suscetibilidade aos sais imidazólicos .....	52
5.3	Avaliação do ensaio da formação de biofilme em Cateter Traqueal .....	55
5.4	Determinação da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) pelo sal imidazólico C <sub>16</sub> MImCl .....	55
5.5	Atividade antibiofilme do sal imidazólico C <sub>16</sub> MImCl e Frações de saponinas da erva mate .....	58
5.6	Resultado da atividade removedora em Cateter Traqueal do C <sub>16</sub> MImCl e das Frações de saponinas da erva mate .....	60
5.7	Avaliação do potencial zeta .....	63
5.8	Avaliação da Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme (CMEB) do C <sub>16</sub> MImCl e erva mate em microplacas de 96 poços .....	63
6	DISCUSSÃO .....	68
6.1	Avaliação da capacidade de formação do biofilme .....	68
6.2	Teste de Susceptibilidade aos tensoativos .....	70
6.3	Metodologias aplicadas para a atividade de remoção e antibiofilme.....	71

6.4 Mecanismo de ação e Toxicidade do C <sub>16</sub> MImCl .....	76
7 CONCLUSÕES .....	80
8 PERSPECTIVAS .....	81
9 REFERÊNCIAS .....	82

## TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Critérios de avaliação da formação de biofilme pelo método do cristal violeta, segundo a faixa de absorbância lida -----	38
<b>Tabela 2.</b> Método de detecção do biofilme de <i>C. tropicalis</i> em microplaca com o corante Cristal Violeta-----	51
<b>Tabela 3.</b> Comparativos da Susceptibilidade <i>in vitro</i> de <i>C. tropicalis</i> aos sais imidazólicos-----	53
<b>Tabela 4.</b> Susceptibilidade das células planctônicas frente ao sal imidazólico C <sub>16</sub> MImCl-----	54
<b>Tabela 5.</b> Formação do biofilme nos isolados de <i>C. tropicalis</i> no Cateter traqueal após 96h de incubação em meio líquido-----	55
<b>Tabela 6.</b> Susceptibilidade das células de biofilme e das células planctônicas frente ao C <sub>16</sub> MImCl-----	57
<b>Tabela 7.</b> Avaliação da atividade antibiofilme do C <sub>16</sub> MImCl e das Frações de saponinas da erva mate em relação aos isolados clínicos de <i>C. tropicalis</i> após 96 h de incubação-----	59
<b>Tabela 8.</b> Atividade removedora do C <sub>16</sub> MImCl, das Frações de saponinas da erva mate em relação aos isolados clínicos de <i>C. tropicalis</i> após 96 h de incubação-----	62

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Etapas da formação do biofilme de leveduras numa superfície de um cateter traqueal-----	8
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de resistência aos compostos azólicos em espécies de <i>Candida</i> -----	17
<b>Figura 3.</b> MEV do biofilme formado em superfície de poliestireno com incubação de 48h. Biofilme de <i>C. tropicalis</i> . -----	27
<b>Figura 4.</b> Molécula de surfactante-----	28
<b>Figura 5.</b> Estrutura Básica das Saponinas folhas de mate-----	31
<b>Figura 6.</b> Estrutura Básica das Saponinas de frutos de mate-----	31
<b>Figura 7.</b> Estrutura química de um sal imidazólico (cloreto de 1-metil-3-hexadecilimidazol)-----	34
<b>Figura 8.</b> Combinações de cátions e ânions dos líquidos iônicos estudados na triagem antifúngica-----	40
<b>Figura 9.</b> Obtenção do extrato bruto dos frutos-----	41
<b>Figura 10.</b> Obtenção das Frações de saponinas da erva mate-----	41
<b>Figura 11.</b> Erradicação do biofilme (%) com a Água em comparação com os isolados de <i>C. tropicalis</i> -----	64
<b>Figura 12.</b> Erradicação do biofilme (%) com C <sub>16</sub> MImCl (0,9 µg/mL, 0,45 µg/mL, 0,225 µg/mL e 0,112 µg/mL) em comparação com os isolados de <i>C. tropicalis</i> -----	65
<b>Figura 13.</b> Erradicação do biofilme (%) com Frações de saponinas da erva mate em 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL em comparação com os isolados de <i>C. tropicalis</i> -----	66
<b>Figura 14.</b> Erradicação do biofilme (%) com fluconazol em 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL em comparação com os isolados de <i>C. tropicalis</i> .-	67
<b>Figura 15.</b> Representação esquemática do mecanismo de ação do C <sub>16</sub> MImCl-----	78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**C<sub>16</sub>MImCl** - 1-metil-3-octilimidazol cloreto

**CIM** - Concentração Inibitória Mínima

**CT** - Cateter Traqueal

**CMEB** - Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme

**log** - logaritmo

**HCPA** - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**AmB** - anfotericina B

**MFS** - Major Facilitor Superfamily

**ABC** - ATP binding cassette

**EUA** - Estados Unidos da América

**TE** - Tubos Endotraqueais

**UFC/mL** - Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

**AS** - Agar Sabouraud

**EDTA** - ácido etilenodiamino tetracético

**XTT** - 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida)

**MTT** - (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

**CV** - Cristal Violeta

**MEV** - Microscopia Eletrônica de Varredura

**MC** - Microscopia Confocal

**CMC** - Concentração Micelar Crítica

**IRAS** - Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

**LIs** - Líquidos Iônicos

**UFRGS** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**TSB** - Caldo de Triptose de Soja

**CS** - Caldo Saboraud

**CFM** - Concentração Fungicida Mínima

**CIMP** - Concentração Inibitória Mínima das Células Planctônicas

**AP** - Água Peptonada

**BC** - Banho de Coleta

**UFC/cm<sup>2</sup>** - Unidades Formadoras de Colônia por Centímetro Quadrado

**CIMB** - Concentração Inibitória Mínima do Biofilme

**BI** - Banho de Imersão

**CMEB** - Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme

**CLSI** - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

**FSEM** - Frações de Saponinas da Erva Mate

**SFYM** - Saponin Fractions of Yerba Mate

**TGI** - Trato Gastrointestinal

## 1 INTRODUÇÃO

Em contraste com os dados da literatura que descrevem extensivamente a formação do biofilme bacteriano, pouca importância tem sido dada aos biofilmes fúngicos de importância clínica (Fischbach & Walsh, 2009). Biofilmes são comunidades microbianas altamente estruturadas e hidratadas, constituídos por células sésseis incorporadas em uma matriz polimérica extracelular (contendo DNA, polissacarídeos). Em comparação com as células planctônicas (forma livre de desenvolvimento do micro-organismo no hospedeiro ou material inerte), as células sésseis geralmente apresentam-se mais resistentes aos agentes antimicrobianos e este aumento da resistência tem um impacto considerável no tratamento de biofilme relacionado com infecções fúngicas, principalmente as ocasionadas por espécies de *Candida*. É relatado que as células de biofilme de *Candida* são 30 a 2000 vezes mais resistentes que as células planctônicas frente a diversos agentes antifúngicos, incluindo os poliênicos, como anfotericina B e os azólicos como fluconazol, itraconazol e cetoconazol (Jabra-Rizk et al., 2004).

A resistência antifúngica é uma característica chave dos biofilmes de *Candida*, a qual está associada com o aumento da densidade de células e inatividade metabólica das mesmas. O crescente aumento dos casos de resistência tem sido explicado por uma penetração lenta do agente antimicrobiano pela matriz do biofilme. Agentes antimicrobianos difundem-se através da matriz extracelular por canais de água, a fim de alcançar as células.

A matriz pode atuar como uma barreira para estes compostos quando as células alvo estão localizadas na biomassa do biofilme (Gordon et al., 1988). Além disso, os componentes da matriz podem ligar-se diretamente aos agentes antimicrobianos, inativando a ação dos mesmos (Nett et al., 2007). Outra hipótese é a de que as células sésseis metabolicamente inativas desenvolvem-se de modo mais lento do que os seus homólogos planctônicos, que se tornam refratários ao tratamento antifúngico nos casos de candidíases (Kumamoto, 2002).

Espécies de *Candida* são importantes patógenos causadores de infecções, principalmente em pacientes imunodeprimidos, tornando-se um elemento de grande valor clínico. Embora *Candida albicans* seja o principal agente etiológico de candidíases, outras espécies de *Candida não-albicans*, como *C. tropicalis*, surgiram como causadores de infecções fúngicas em indivíduos imunocomprometidos. Uma ampla variedade de biomateriais, como cateteres, implantes e próteses são utilizada na prática clínica, os quais, frequentemente, representam um fator de risco para o desenvolvimento de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) por *Candida* spp. (Crump & Collignon, 2000). *Candida tropicalis* desenvolve uma biomassa complexa de biofilme contendo micro-colônias agregadas de blastoconídios com uma espessa camada polimérica extracelular (Silva et al., 2009). É uma das principais espécies causadoras de candidíases, destacando-se principalmente nos casos de infecções urinárias e da corrente sanguínea (Bizerra et al., 2008).



*Candida tropicalis* é uma causa frequente de candidemias em hospitais da América Latina e é uma das espécies mais isoladas em hospitais do Brasil. No sul do país, observa-se este panorama, o qual *C. tropicalis* foi o agente mais frequente, representando 13,3 a 15% dos casos de infecções fúngicas (Antunes et al., 2004; Aquino et al., 2005; Franca et al., 2008). A limitação do arsenal terapêutico disponível atualmente para o tratamento desta fungemia é preocupante. Os fármacos antifúngicos presentemente disponíveis pertencem a diferentes classes, mas apresentam diversas restrições quanto a sua via de administração, interações medicamentosas e perfil toxicológico.

Desta forma há uma grande necessidade para a prospecção de novas substâncias antifúngicas que apresentem atividade e baixa toxicidade. Diante dessa necessidade, os sais imidazólicos já vêm sendo fortes candidatos. Relata-se na literatura a ação efetiva dos sais imidazólicos contra bactérias e fungos como *C. albicans* e *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, entre outras espécies fúngicas (Cornellas et al., 2011). A relação estrutura-atividade, conjuntamente com as propriedades físico-químicas vantajosas e relativa baixa toxicidade possibilitam que os sais imidazólicos, como o cloreto de 1-metil-3-hexadecilimidazol ( $C_{16}MImCl$ ), torne-se uma potencial alternativa para o tratamento de candidemias, especialmente as ocasionadas por *C. tropicalis*.

Um produto natural que vem a contribuir também para a atividade antimicrobiana é o mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). Diversas propriedades benéficas à saúde têm sido atribuídas ao chá de mate, como atividade antimicrobiana, antioxidante, estimulante e digestiva. O mate caracteriza-se pelo elevado teor de saponinas em suas folhas e, principalmente, nos frutos

verdes. Sobre as saponinas de mate há relatos preliminares de atividade sinérgica com antifúngicos (Klein et al., 2014, dados não publicados), porém pouco explorado em termos de atividade antibiofilme de fungos.

Observando que os cateteres são capazes de acumular biofilme fúngico leveduriforme, em especial por espécie de *C. tropicalis*, a utilização de um agente antifúngico tem grande potencial preventivo. Portanto, a utilização dos sais imidazólicos, bem como as frações das saponinas de mate para evitar a formação de biofilme fúngico em cateteres torna-se esta proposta inovadora para a resolução de um problema de saúde pública.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antifúngico e antibiofilme do sal imidazólico C<sub>16</sub>MImCl (cloreto de 1-metil-3-hexadecilimidazol) e de duas frações purificadas de saponinas da erva mate (*Ilex paraguariensis* A. St.Hil.) frente a células de biofilme de *Candida tropicalis*.

### 2.2 Objetivos Específicos

1) Avaliar a capacidade de formação do biofilme fúngico por isolados clínicos de *C. tropicalis* através da metodologia do Cristal Violeta, bem como através da utilização do cateter traqueal como corpo de prova.

2) Determinar a Concentração Inibitória Mínima do sal imidazólico C<sub>16</sub>MImCl e de frações saponosídicas dos frutos da erva mate nas células plantônicas e de biofilme.

3) Determinar a capacidade de remoção e inibição da formação de biofilme (atividade antibiofilme), utilizando o cateter traqueal como corpo de prova, pelo sal imidazólico e pelas frações da erva mate, comparadas com o antifúngico fluconazol e a água destilada estéril.

4) Determinar a Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme (CMEB), tanto pelo sal imidazólico como pelas frações da erva mate, comparadas com o antifúngico fluconazol e a água destilada estéril.

5) Avaliar o efeito do tratamento com C<sub>16</sub>MImCl sobre o potencial zeta em células planctônicas e células de biofilme.

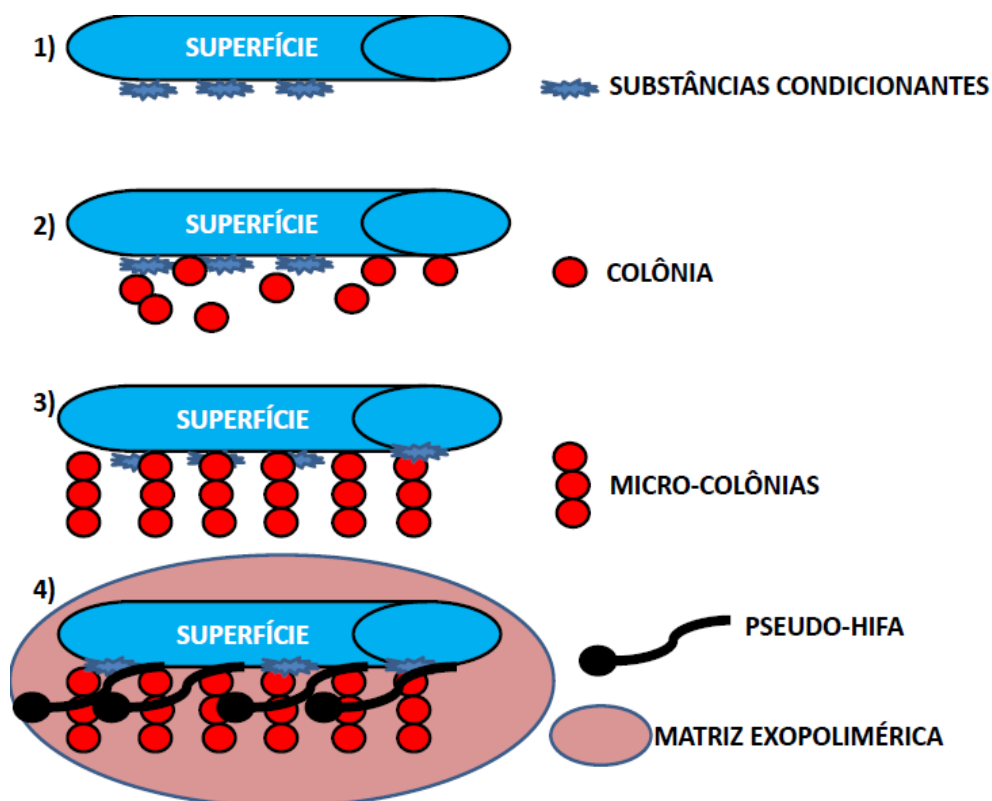
## **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 Biofilme**

O biofilme é definido como sendo uma comunidade séssil que forma micro-colônias aderidas a um substrato de forma irreversível, concentradas em uma matriz exopolimérica de substâncias extracelulares exibindo um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento e à transcrição genética (Kiedrowski & Horswill, 2011). As células sésseis desempenham o tipo de crescimento microbiano que tem predomínio na natureza e são cruciais no desenvolvimento de infecções, uma vez que servem de nicho aos agentes patogênicos e estão associados a altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos (Percival et al., 2012).

Os micro-organismos relacionados ao biofilme formado exibem um comportamento diferente daqueles que se apresentam na forma planctônica (célula de vida livre), em relação ao crescimento e à capacidade para resistir aos agentes biocidas. O desenvolvimento do biofilme depende do tipo e do número de células que se aderem ao dispositivo, do tipo de superfície que constitui o dispositivo e do meio ou fluidos a que os micro-organismos estão expostos (Baillie & Douglas, 1998; Donlan, 2001; Steinberg, 2011). A natureza da estrutura do biofilme e as características das células que o constituem conferem uma resistência aos agentes antimicrobianos e às defesas naturais do organismo.

Os mecanismos responsáveis pela resistência aos antifúngicos podem estar relacionados com limitações difusionais à passagem do agente pela matriz extracelular, com alterações fenotípicas das células no biofilme e ainda com o desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células (Dunne, 2002). A formação do biofilme inicia-se com a adesão microbiana seguida pelo processo de desenvolvimento e maturação do biofilme, como pode ser observado na Figura 1.



**FIGURA 1.** Etapas da formação do biofilme de leveduras sobre a superfície de um cateter traqueal. 1) Superfície do cateter com uma camada de substâncias condicionantes da adesão adsorvida. 2) Adesão primária das leveduras à superfície. 3) Formação das camadas basais das micro-colônias de leveduras. 4) Conclusão da formação das micro-colônias com presença de hifas, pseudo-hifas e da matriz polimérica extracelular que envolve as células.

A estrutura do biofilme é fortemente regulada e dependente da sinergia da expressão de uma variedade de genes e das condições ambientais durante o curso da infecção (Ramage et al., 2009; Ramage et al., 2012). Essa regulação é realizada por um sistema de comunicação microbiana chamado de “*quorum sensing*”, o qual serve para controlar algumas características dos micro-organismos, desde a associação à sobrevivência até as determinantes de patogenicidade (Douglas, 2003; Harding et al., 2009; Ramage et al., 2009). No processo de formação do biofilme, a primeira etapa de aderência caracteriza-se pela aproximação do micro-organismo à superfície de adesão. Uma vez atingida a distância crítica (<1nm), a relação entre o micro-organismo e a superfície depende do somatório das forças repulsivas e atrativas geradas entre estas duas entidades (forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals (Carpentier & Cerf, 1993; Dunne, 2002; Ramage et al., 2009).

As forças eletrostáticas tendem a repelir as duas superfícies, já que a maioria dos micro-organismos e superfícies inertes estão carregadas negativamente e as interações de Van der Waals têm influência positiva. Este estágio inicial de adesão em que há envolvimento de interações físico-químicas entre as superfícies designa-se de adesão primária (Carpentier & Cerf, 1993, Dunne, 2002). Após o processo de adesão, estabelece-se um conjunto de fenômenos que caracterizam a adesão propriamente dita. A microbiota fracamente aderida finaliza o processo de adesão, produzindo exopolissacarídeos que formam complexos com os materiais da superfície.

Logo após a adesão à superfície, dá-se início ao processo de maturação do biofilme.

O biofilme maduro de leveduras contém muitas micro-colônias, formadas por espécies de levedura, que são interceptadas por canais de água que permitem a passagem dos nutrientes. Os biofilmes maduros, com um crescimento de 48 horas, formam uma rede densa de células sob a forma de leveduras, hifas e pseudo-hifas (Hawser & Douglas, 1995). A maturação do filme formado é também controlado por outros fatores, como o pH interno, a difusão do oxigênio dissolvido e a osmolaridade (Carpentier & Cerf, 1993; O'toole & Kolter, 1998). No final da maturação, o biofilme acaba por atingir uma massa crítica e estabelece-se um equilíbrio dinâmico no qual o crescimento de células é compensado pela liberação de células planctônicas disponíveis para a colonização de outras superfícies. No biofilme maduro, as células mais aderidas a superfície tornam-se inativas, e numa fase posterior morrem devido à falta de nutrientes, diminuição do pH e da concentração de oxigênio, além da acumulação de produtos tóxicos resultantes no metabolismo celular (La Tourette Prosser et al., 2003). Estudos sugerem que o desenvolvimento primário, a maturação e o envelhecimento de um biofilme são regulados pela expressão de genes da qual é dependente a densidade populacional que é controlada através da transmissão de sinais entre as células. Uma vez atingida a maturação, gera-se no biofilme uma série de alterações na forma de crescimento e cooperação fisiológica entre as células (Costerton et al., 1995; Costerton & Lappin-Scott, 1999; La Tourette Prosser et al., 2003; Cardoso, 2004).



### 3.2 Biofilme de *Candida* sp

Devido ao crescimento significativo da população senil a nível mundial, a necessidade de dispositivos médicos como cateteres e próteses vem despertando o interesse de diversos autores, e por isso, grandes avanços têm sido feitos nesta área. Uma grande parte dos dispositivos médicos são ainda colonizados por microrganismos, como as espécies de *Candida*, tornando-se o foco de infecções associadas aos dispositivos médicos. A colonização destes materiais médicos de longa permanência, através da adesão microbiana e formação de biofilme subsequente, podem preceder infecções sistêmicas em pacientes criticamente enfermos. Métodos preventivos têm sido sugeridos para reduzir a incidência de infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateteres, tais como o revestimento destes com antibióticos ou com antissépticos (Raad, et al., 2007). No entanto, alternativas mais eficazes e menos tóxicas são altamente desejáveis.

O significativo aumento do uso de antifúngicos para a terapêutica, de um modo geral, tem influenciado de forma acentuada na emergência de cepas envolvidas com baixa resposta clínica (Rogers, 2006). Segundo Pannanusorn et al. (2013), o uso do fluconazol vem sendo amplamente utilizado na prevenção e tratamento da corrente sanguínea causada por leveduras, o que resultou em uma diminuição da incidência das infecções ocasionadas por *C. albicans*, ao contrário daquelas ocasionadas por espécies de *C. não-albicans*. Neste contexto, têm-se observado uma alteração nos padrões epidemiológicos das *Candidas* resistentes ao fluconazol.

As espécies de *Candida* podem fazer parte da microbiota da pele e mucosas do ser humano a partir de seu nascimento, através do contato materno e com o ambiente hospitalar (Heljic et al., 2005). Na segunda e terceira semana de vida, tais leveduras podem colonizar todo o Trato Gastrointestinal (TGI) da criança. Nos adultos, podem estar presentes no TGI em cerca de 20 a 80% da população sadia e na mucosa vaginal de 20 a 30% das mulheres (Huang & Wang, 2003; Manzoni et al., 2007). É interessante destacar que apesar de serem conhecidas mais de 160 espécies de *Candida*, cerca de 20 são reconhecidas como patógenos humanos. As principais espécies de interesse médico são: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida lusitaniae* (Miceli et al., 2011).

Estudos demonstram a importância das leveduras do gênero *Candida* como agentes de septicemia. Nos Estados Unidos, Edmond et al. (1999), analisou-se a prevalência de infecções da corrente sanguínea durante três anos, em 49 hospitais, e foi observado que *Candida* spp. foi a quarta causa mais comum destas infecções, sendo responsáveis por 7,6% dos casos, superada apenas por estafilococos coagulase-negativa (ECN) (31,9%), *Staphylococcus aureus* (15,7%) e *Enterococcus*spp. (11,1%). No Brasil foram encontrados resultados semelhantes. Entre outros, destaca-se um estudo epidemiológico conduzido por Colombo & Guimarães (2003), realizado em 11 hospitais e foram confirmados 712 casos de candidíase sistêmica, no qual *Candida* spp. foi o quarto patógeno mais frequentemente isolado, precedida por ECN, *S. aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. O mesmo grupo de pesquisadores

(Colombo et al., 2007), em estudo envolvendo resultados de 45.468 hemoculturas de quatro hospitais terciários de São Paulo, observaram que em 4% dos casos, o agente isolado foi *Candida* spp. Os fatores de risco para a candidemia em hospitais no Brasil são ocasionados devido às infecções que são adquiridas por pacientes críticos, o qual são submetidos a quimioterapia e também aos procedimentos invasivos, ventilação mecânica, nutrição parenteral total e presença de cateter venoso central. A utilização de dispositivos intravasculares como cateteres, cânulas, sondas e drenos ocasionam a quebra das barreiras anatômicas e podem contribuir para a passagem das leveduras para a corrente sanguínea.

Em relação a distribuição por espécies, segundo Colombo & Guimarães (2003), *C. albicans* foi a mais isolada das fungemias até a década de 1990. Após esse período foi observado um incremento na proporção de espécies não *albicans*. Em princípio, esse fato relaciona-se a pressão seletiva exercida pelo uso profilático de fluconazol em pacientes com risco elevado de desenvolver infecções fúngicas invasivas (Talarmin et al., 2009). Estudo realizado em hospitais terciários de Recife-PE comprovou que *C. não-albicans* são as principais leveduras isoladas de fungemia, sendo a *C. tropicalis* um importante agente de IRAS (Talarmin et al., 2009).

*Candida tropicalis* possui considerável potencial biológico como agente oportunista quando o hospedeiro encontra-se neutropênico, quando há supressão da flora bacteriana pelo uso de antimicrobianos e danos na mucosa gastrointestinal. Esta espécie tem sido relatada como o segundo ou terceiro agente etiológico mais comum de candidemia em pacientes com neoplasias,

sendo sua freqüência maior em leucemias e menor em tumores sólidos. Os isolados clínicos desta espécie são sensíveis a anfotericina B e, na grande maioria das vezes, aos triazólicos. Em países de América Latina, particularmente o Brasil, esta espécie é extremamente freqüente, mesmo entre pacientes não portadores de câncer, constituindo-se na segunda ou terceira principal causa de candidemia nas principais séries publicadas (Bedini et al., 2006; Vigouroux et al., 2006; Nucci & Colombo, 2007)

### **3.3 Biofilme e Resistência**

O significado clínico do biofilme refere-se ao aumento da resistência da levedura à uma variedade de agentes antimicrobianos (Ramage et al., 2001a; Ramage et al., 2001b) e a sua capacidade de suportar as defesas do hospedeiro. Esta resistência dos biofilmes de *Candida* aos antifúngicos foi demonstrada pela primeira vez em 1995 (Hawser & Douglas, 1995). Os agentes antifúngicos anfotericina B (AmB), fluconazol, flucitosina, itraconazol e cetoconazol foram testados usando um ensaio de disco de cateter. Todos estes medicamentos estudados apresentaram atividade reduzida contra as células sésseis quando comparadas as células planctônicas. Outros pesquisadores demonstraram também a resistência aos antifúngicos quando os biofilmes de *Candida* são cultivados em outros tipos de superfície, incluindo celulose, poliestireno, e prótese acrílica (Baillie & Douglas., 1998; Baillie & Douglas., 1999; Ramage et al., 2001b).

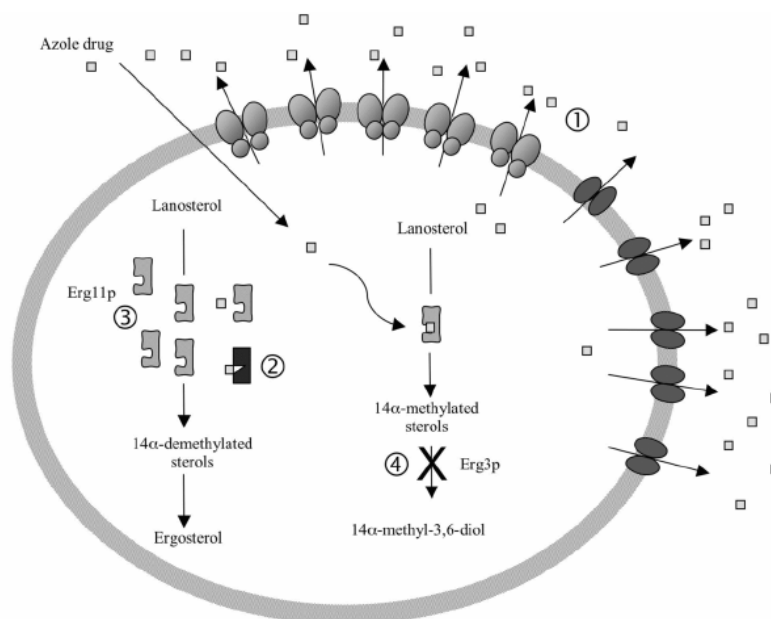
O biofilme microbiano oferece vantagens quando comparadas sobre o modo de crescimento das células planctônicas. As células sésseis são significativamente mais tolerantes aos antibióticos e biocidas (Behlau & Gilmore, 2008). O biofilme representa uma proteção para as células contra uma agressão externa, como por exemplo, a ação dos agentes antimicrobianos e dos mecanismos de defesa imunológico em casos de biofilmes formado no corpo humano (Davey & O'toole, 2000). As diferenças de susceptibilidade aos antimicrobianos entre células planctônicas e de biofilme já foram amplamente relatados, onde vários mecanismos para o aumento da resistência em células de biofilme têm sido propostos (Ramage et al., 2009). Uma das explicações para o aumento desta resistência é devido a lenta penetração do antimicrobiano através da matriz do biofilme. Agentes antimicrobianos se difundem na matriz extracelular através de canais de água, até alcançar as células (Lafleur et al., 2006; Ramage et al., 2009). A matriz exopolissacarídica pode agir como uma barreira para os compostos antimicrobianos já que as células alvo estão localizadas na biomassa do biofilme (Gordon et al., 1988). Os componentes da matriz podem se ligar diretamente aos agentes antimicrobianos. Outra alternativa é que as células de biofilmes são metabolicamente inativas e portanto crescem de forma mais lenta do que as células planctônicas, tornando-as refratárias ao tratamento antimicrobiano (Lafleur et al., 2006; Ramage et al., 2009).

A resistência aos antimicrobianos, quando definida em termos microbiológicos, se refere à baixa susceptibilidade do micro-organismo ao agente antimicrobiano, pelo teste de sensibilidade *in vitro*, no qual a CIM do

fármaco supera o limite do ponto de corte definido para este micro-organismo (Espinel-Ingroff, 2008; Kanafani & Perfect, 2008; Pfaller, 2012; Tobudic et al., 2012). A resistência primária ou intrínseca é conhecida por estar presente num organismo sem prévia exposição ao fármaco. A resistência secundária ou adquirida se desenvolve em resposta a exposição a estes fármacos e normalmente é dependente de uma alteração na expressão de genes (Pfaller, 2012). Por exemplo, a resistência aos azólicos em cepas de *C. tropicalis* é devido ao aumento da expressão do gene ERG11, associada a mutação missense nesse gene (Vandeputte et al., 2005).

A resistência clínica é definida como uma persistência da infecção, mesmo após a administração de um agente antifúngico, que demonstre nos teste de susceptibilidade *in vitro* uma concentração inibitória mínima baixa contra o patógeno causador da doença (Tobudic et al., 2012). Nessas circunstâncias, a resistência dos azólicos é uma das questões que desperta o interesse de estudos na atualidade. Vários estudos têm demonstrado recentemente que as leveduras do gênero *Candida* tem se tornado mais resistentes aos azólicos, o que está amplamente associado com o exacerbado uso do fluconazol na clínica médica (Pfaller, 2012; Tobudic et al., 2012).

Até o momento os mecanismos de resistência aos azóis descritos são: i) alterações na via metabólica do ergosterol; ii) mutações pontuais no gene ERG11; iii) sobre-expressão de transportadores membranares de efluxo, como demonstrado na figura 2 (Morschhäuser, 2002; Morschhäuser, 2010).



**FIGURA 2.** Mecanismos de resistência aos compostos azólicos em espécies de *Candida*. Fonte: Moreira, 2010.

A resistência adquirida aos azólicos pode estar envolvida com o aumento da expressão de transportadores farmacológicos, ocasionando o efluxo dos fármacos das células fúngicas (Rogers, 2006). A diminuição da concentração intracelular em leveduras pode estar também associada com a redução da captação do fármaco. Os principais tipos de transportadores citados na literatura são: i) *Major Facilitor Superfamily* (MFS) que fazem parte da família de proteínas transportadoras e estão envolvidas apenas com a resistência do fluconazol; ii) e os transportadores *ATP binding cassette* (Tipo ABC) que estão associados com todos os azóis (Cuenca-Estrella et al., 2006).

Na observação destes mecanismos de resistência, denota-se que os fungos estão sendo capazes de se adaptarem de forma rápida em resposta a pressão ambiental imposta pelos antifúngicos. Portanto, a busca por novas

alternativas no tratamento de infecções ocasionadas por *C. não-albicans*, em especial *C. tropicalis*, ainda permanece como um desafio para a pesquisa.

### **3.4 Biofilme em Cateter Traqueal**

Em uma Unidade de Terapia Intensiva, a infecção é uma condição muito frequente nos pacientes. A infecção pode ter origem IRAS, o qual é definida pelo aparecimento após 48 horas de internação. Esta infecção também pode ser considerada precoce quando surgem nas primeiras 96 horas de internação ou ainda considerada uma infecção tardia, quando envolve um processo de colonização microbiana por patógenos hospitalares. Outro tipo de infecção é a de origem comunitária, ou seja, já está presente ou incubada na época da admissão hospitalar.

Em torno de 5% dos pacientes hospitalizados nos Estados Unidos da América (EUA), adquirem IRAS, e isso é dependente das características do hospital e do tipo de serviço. Hospitais Universitários apresentam um maior número de infecções em relação a hospitais pequenos, principalmente em serviços cirúrgicos (Segreti, 1989). As infecções mais frequentes são urinárias (35 a 45%), feridas cirúrgicas e pneumonias (10 a 25%). Os métodos invasivos, como a cateterização urinária, a intubação traqueal, a ventilação mecânica e cateteres intravasculares são responsáveis por grande número das infecções.

Enquanto a média mundial de infecção é 5%, no Brasil na década de 90 estimou-se uma incidência de 15,5% (Prade et al., 1998). Vale ressaltar que o Brasil, um país marcado pela diversidade geopolítico-cultural e por desigualdades socioeconômicas, as instituições de saúde também se revelam



heterogêneas quanto aos padrões de atendimento, estrutura física e ocorrência de infecções. Mesmo diante das novas propostas de atendimento a saúde, os hospitais enfrentam o grave problema da demanda social, a recessão econômica, a carência quanti e qualitativa de recursos humanos e a inapropriada obtenção de tecnologia, tornando assim condições férteis para a elevação dos índices de infecção.

A pneumonia associada a ventilação mecânica é um tipo de IRAS que ocorre em pacientes submetidos a ventilação mecânica invasiva por períodos superior a 48 horas. Está associada ao aumento significativo da morbimortalidade, tempo de hospitalização, uso de medicamentos e custos. A incidência é bastante variável entre os estudos, ficando por volta de 7,6 casos por 1000 pacientes ventilados dia, em termos de percentuais, em torno de 28 a 32%, embora possa apresentar valores mais elevados a depender dos recursos, materiais, protocolos utilizados, perfil epidemiológico, ambiente da unidade e população. Conforme Zolfaghari & Wyncoll (2011), a formação de biofilme na parede interna do Cateter Traqueal (CT) é um fator imodificável que ocorre em todos os pacientes submetidos a ventilação mecânica invasiva e consolida-se em horas após a intubação, tornando-se abundante em 96 horas. Os micro-organismos que sobrevivem nesse sistema de comunidades estruturadas em matrizes poliméricas, coordenadas e funcionais, são numerosos e diversos, o qual destaca-se os fungos de *Candida*. Num estudo realizado por Menezes et al. (2013), as espécies de *Candida* avaliadas foram capazes de realizar adesão a lamínulas de vidro. Entretanto, foi observado que isolados de *Candida não-albicans* apresentaram maior capacidade de

aderência (81,4%) que os de *C. albicans* (76,3%), pois 91% dos isolados de *C. tropicalis* apresentaram capacidade de aderir às lamínulas de vidro e destes. Dentre os isolados de *C. tropicalis* aderentes positivos, aqueles provenientes de secreção traqueal se revelaram 100% aderentes.

Em 2012, Gil-Perotin et al. relataram que o biofilme esteve presente na superfície interna de 95% dos CT de pacientes submetidos a ventilação mecânica por período superior a 24 horas.

Liu et al. (2013) pesquisaram a eficácia da limpeza mecânica da superfície interna do CT como medida profilática a formação dos biofilmes em 46 pacientes randomizados em três grupos de mesmo numero. Os autores revelaram que mais de 60% dos pacientes tiveram isolados da mesma espécie tanto no biofilme do CT quanto na secreção traqueobrônquica e que a ponta do CT foi a região com maior densidade de patógenos relacionados a pneumonia associada a ventilação mecânica.

### **3.5 Antibiofilme**

#### **3.5.1 Substâncias com capacidade de remoção e inibição da formação de biofilme por *Candida***

Uma substância com capacidade de atuar contra o biofilme fúngico pode ser avaliada através da inibição da formação do biofilme sobre uma superfície biótica ou abiótica e também através de seu efeito inibitório (capacidade de

remoção) sobre a biomassa fúngica pré-formada. Tratando-se da atividade antibiofilme, este consiste em incubar o inóculo fúngico padronizado em presença de concentrações definidas da substância analisada, verificando se esta é capaz de reduzir, ou até mesmo impedir a formação do biofilme na superfície inerte. Já na avaliação da atividade removedora, forma-se previamente o biofilme na superfície inerte e o mesmo é submetido a concentrações definidas da substância, verificando se ela é capaz de remover o biofilme pré-formado (Brun-Buisson et al., 2004).

O tratamento após a adaptação e a conseqüente formação do biofilme vem sendo realizado através da utilização de fármacos, antibacterianos, antissépticos e antifúngicos. Um pequeno número de drogas antifúngicas podem ser utilizadas para tratar a candidíase associada com dispositivos médicos implantados e infectados, porém geralmente há a necessidade destes serem removidos (Mermel et al., 2001). Biofilmes de *Candida* são altamente resistentes aos agentes antimicrobianos em comparação com a sua forma planctônica (Lamfon et al., 2004). Cocuaud et al. (2005) avaliaram a atividade das Equinocandinas (caspofungina) e demonstraram, que a caspofungina na concentração de 2 mg/L inibiu espécies de *Candida* em qualquer que seja o estado de maturação dos biofilmes.

Em estudo realizado por Cross et al. (1998), foi observada uma eficácia comparável para o tratamento de candidíase oral utilizando itraconazol (100 mg diárias por 15 dias) e fluconazol (50 mg diárias por 15 dias). Boucherit-Atmani et al. (2011) avaliaram que as células de biofilme de *C. albicans* foram mais resistentes que as células planctônicas.

Azóis, como o fluconazol, possuem boa atividade contra *C. albicans* e uma excelente biodisponibilidade oral e baixa toxicidade (Brammer, 1990). No entanto, esta família de antifúngicos possui ação fungistática. Além disso, o aumento do uso dos azóis resultou numa mudança epidemiológica para as espécies de *Candida*, reduzindo a sensibilidade a este composto (Nguyen et al., 1996). Portanto, é necessário mais estratégias eficazes para controlar estas candidíases.

Atualmente, a busca pela utilização de plantas para inibir o biofilme fungico têm crescido devido elas apresentarem, com frequência, uma atividade antimicrobiana (Cowan, 1999; Bakkali et al., 2008; Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009).

*Cymbopogon citratus* (capim limão) e *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia) e seus óleos essenciais tem sido utilizados como inibidores da formação do biofilme fúngico. Estes óleos apresentaram CIM das células do biofilme de *C. albicans* variando entre 200-400 µg/mL para *S. aromaticum* e 180-360 µg/mL para *C. citratus*. Portanto, estes valores validam a utilização tradicional desses óleos na Índia como terapia efetiva contra biofilmes (Carlini et al., 1986).

Não existe técnica eficaz e não invasiva para tratar infecções associadas a biofilmes em implantes médicos. Os esforços para desenvolver um tratamento não-invasivo e eficaz para este tipo de infecções incluem reforço elétrico e ultrassônico de antibióticos e uso de antimicrobianos aplicados em biomateriais (Carmen., 2005). Estratégias para controlar a formação do biofilme em dispositivos médicos já foram sugeridas. Entre elas, destacam-se: i)

redução no tempo de cateterização; ii) uso tópico de pomadas antimicrobianas; iii) revestimento do lúmen do cateter com agentes antimicrobianos; iv) enzimas que dissolvam os polímeros da matriz do biofilme; v) reações químicas que bloqueiam a síntese da matriz do biofilme do biofilme; (Burton et al., 2006).

A resistência das células do biofilme com antifúngicos ou antibióticos convencionais levaram os pesquisadores a focar na natureza do dispositivo médico. Vários compostos têm sido adicionados em polímeros. Exemplos disso são os antimicrobianos, compostos de amônio quaternário, polietileno aminas, íons ou nanopartículas de prata, óxido nítrico, anticorpos e os antifúngicos (Stigter et al., 2004; Hetrick et al., 2007; De Pijck et al., 2010; Nava-Ortiz et al., 2010). Um procedimento para a preparação de drogas em cateteres foi realizado adicionando um composto antimicrobiano em um polímero através da moldagem de injeção ou mistura por fusão (Wu & Grainger, 2006; De Pijck et al., 2010). Com isso, os polímeros podem ser aderidos ou mergulhados em soluções para carregar o antimicrobiano na rede polimérica. Este material modificado libera altas concentrações do antimicrobiano em fases precoces, a fim de combater a colonização do micro-organismo.

### **3.5.2 Metodologias da atividade Antibiofilme e Remoção**

Vários métodos para análise de inibição dos biofilmes e remoção dos mesmos são usados nos estudos de biofilmes formados por leveduras. Em relação ao crescimento do biofilme, estão descritos métodos com: discos de cateteres (Hawser & Douglas.,1995; Baillie & Douglas., 1998), reator de crescimento (Baillie & Douglas., 1998; Cotter & Kavanagh, 2000), filtros de

celulose (Baillie & Douglas., 1998; Baillie & Douglas., 1999), microplacas de cultura celular de 96 poços (Ramage et al., 2001c) e bandas de acrílico (Nikawa et al., 2003; Ramage et al., 2001c). A maioria destas metodologias para fungos foram adaptadas dos métodos desenvolvidos para o estudo dos biofilmes de bactérias.

A contagem de células viáveis, em termos de número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) é a técnica mais comum para analisar o desenvolvimento do biofilme de *Candida* e a eficácia de um novo antifúngico. As células de um biofilme são liberadas por raspagem, sonicação ou vórtex, semeadas em Agar Sabouraud (AS) e incubadas, seguido por contagem de UFC/mL (Seneviratne et al., 2009; Costa et al., 2011; Estivill et al., 2011). Por exemplo, Seneviratne et al. (2009), avaliaram a cinética de crescimento dos biofilmes por contagem de UFC/mL de *Candida* depois de 1,5 horas; 24 horas; 48 horas e 72 horas de desenvolvimento. Num tempo de adesão de 1,5 horas, cerca de  $10^5$  células/mL aderiram ao poço da placa. Em 48 horas, as células sésseis atingiram um patamar de  $10^8$  células/mL. Entretanto, em 72 horas já houve um declínio desta comunidade microbiana.

Outra técnica que vem despertando o interesse de diversos pesquisadores na formação do biofilme é a utilização de um corpo de prova, como demonstrado por Percival et al. (2005). Neste estudo, os biofilmes de *C. albicans* foram cultivados a níveis de  $10^5$  UFC/mL em segmentos de cateter venoso central, e em seguida, submetidos à tratamento com ácido etilendiaminotetracético (EDTA). O resultado obtido mostrou que o tratamento utilizando 40 mg/mL de EDTA tetrassódico por pelo menos 21 horas poderia

significativamente reduzir ou potencialmente erradicar biofilmes associados ao cateter.

O ensaio de redução de tetrazólio com sal XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida) e o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) são técnicas comuns para estimar o crescimento das células viáveis do biofilme e examinar o impacto da terapia do biofilme (Jin et al., 2003; Seneviratne et al., 2009; Nett et al., 2011; Taff et al., 2012). Estes métodos colorimétricos quantitativos baseiam-se na redução do produto de formazano pelas desidrogenases mitocondriais do metabolismo ativo de células leveduriformes e hifas, medido espectrofotometricamente (492 nm). Estes ensaios foram comparados com outros ensaios quantitativos de biofilme, incluindo: i) coloração com Cristal Violeta (CV); ii) quantificação do DNA; iii) quantificação de proteínas; iv) medição de peso seco v) contagem de células viáveis e estes provaram ser reprodutíveis, precisos baratos e eficientes para a medição biofilmes (Nett et al., 2011).

O peso seco é uma metodologia útil que permite a diferenciação entre os biofilmes formados pelos mesmos isolados de diferentes substratos. Além disso, esta análise permite a estimativa da quantidade de células e matriz extracelular em comparação, por exemplo, com resultados de UFC/mL (Junqueira et al., 2011).

A coloração com CV é outro método para quantificar a biomassa total de biofilme através de uma análise espectrofotométrica (Silva et al., 2009). Usando esta coloração, Silva et al. (2009) observaram que o biofilme de *C.*

*glabrata* obteve menos biomassa total em comparação com *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

A composição da matriz extracelular pode ser determinada e quantificada utilizando-se métodos químicos, demonstrando diferenças significativas entre as espécies. A matriz extracelular de *C. albicans* é composta de hidratos de carbono (39,6%, incluindo 32,2% de glicose), proteínas (5,0%), hexosamina (3,3%), fósforo (0,5%) (Silva *et al.*, 2009). Em contraste, a matriz do biofilme de *C. tropicalis* consistem principalmente de hexosamina (27,4%), com pequenas quantidades de hidratos de carbono (3,3%, incluindo 0,5% de glucose), proteínas (3,3%), e 0,2% de fósforo (Al-Fattani & Douglas, 2006).

Em relação à análise da ultraestrutura do biofilme, uma das metodologias utilizadas para a observação da morfologia do biofilme é a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Baillie & Douglas., 1998) (Fig. 3). Entretanto, a mesma tem a desvantagem da amostra sofrer um processo de desidratação. Alternativamente, a Microscopia Confocal (MC) permite a observação de biofilmes sem necessidade de desidratação, porém esta observação só pode ser efetuada se as células forem marcadas com fluorocromos.



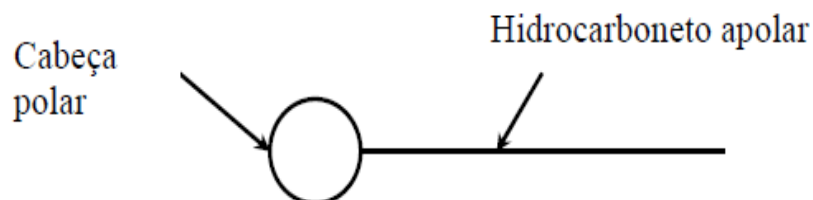


**FIGURA 3.** MEV do biofilme formado em superfície de poliestireno com incubação de 48 horas. Biofilme de *C. tropicalis*. Micro-colônias agregadas com blastoconídeos. Fonte: Costa et al., 2013.

Em relação aos métodos genotípicos, diversas técnicas de análise dos genes envolvidos no processo de formação do biofilme também vêm sendo utilizados. Sendo assim, já foram descritos alguns genes específicos e moléculas sinalizadoras de “*quorum sensing*” que são regulados nos biofilmes de *C. albicans*, por exemplo: i) o gene *caace2* que afeta a morfogênese, aderência e virulência; ii) *hwp1* relacionado com a adesão e penetração na célula hospedeira e iii) farnesol, uma molécula de “*quorum sensing*” envolvida na formação do biofilme de *C. albicans* (Ramage et al., 2009).

### 3.6 Tensoativos

Os tensoativos são moléculas anfipáticas, capazes de atuar na interface reduzindo a tensão superficial e interfacial. Devido a esta propriedade, estes compostos possuem inúmeras aplicações nas mais diversas áreas, atuando como detergentes, emulsificantes, lubrificantes, espumantes, dispersantes, molhantes, solubilizantes, além de atuarem como antimicrobianos (Nitschke & Costa, 2007). A natureza anfipática é determinada pelo equilíbrio entre as regiões hidrofílica e hidrofóbica presentes na molécula (Fig.4).



**FIGURA 4.** Molécula de surfactante. Fonte: Evans et al., 1997

A partir de uma determinada concentração, os tensoativos formam agregados em solução aquosa, que é denominada Concentração Micelar Crítica (CMC) (Nitschke & Costa, 2007). Abaixo da CMC, o tensoativo está predominantemente na forma de monômeros; em concentrações iguais ou superiores, as moléculas desse tendem à auto associação, formando agregados de dimensões coloidais. Sendo assim, a CMC é uma propriedade intrínseca de cada tensoativo e isto depende de características da estrutura, como tamanho da cadeia do hidrocarboneto, grau de dissociação ou de polarização, equilíbrio hidrófilo-lipófilo, e das condições experimentais, como força iônica, contra-íons, temperatura, entre outras. A efetividade dos tensoativos é dada pela capacidade de diminuir a tensão superficial (Nitschke & Costa, 2007).

Existem vários tipos de tensoativos: os biotensoativos (tensoativos de origem microbiana); tensoativos naturais; sintetizados por plantas (saponinas) ou mesmo humanos, como os sais biliares (Nitschke & Pastore, 2002).

Os tensoativos podem ser classificados de acordo com a carga do grupo hidrofílico, como: aniônicos, catiônicos e não-iônicos. Os tensoativos aniônicos e os não-iônicos são os mais 12 consumidos atualmente, na forma de detergentes, emulsificantes, dispersantes e umectantes. Os catiônicos possuem atividade germicida, são empregados em composições anti-sépticas, além de seu uso como amaciantes de roupas e de condicionadores de cabelos. Os não iônicos são tensoativos em cuja molécula não existe a parte iônica mais polar que a outra propiciando a afinidade com água (não são dissociados em solução aquosa). Os aniônicos são tensoativos cuja parte hidrofílica da molécula é carregada negativamente (ânion). Os catiônicos são tensoativos cuja parte hidrofílica da molécula é carregada positivamente (cátion) (Rosen & Kunjappu, 2012).

### **3.6.1 Saponinas de Erva Mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**

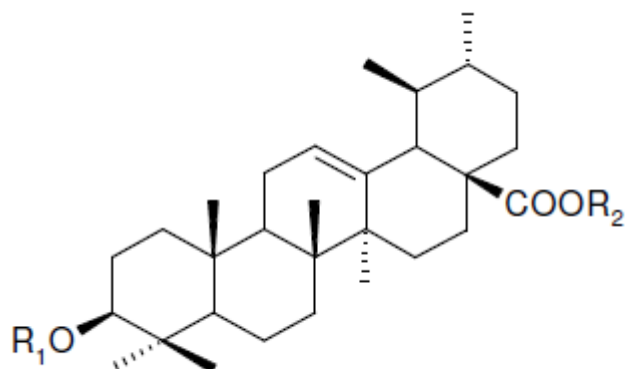
*Ilex paraguariensis*, popularmente conhecido como mate, é uma espécie endêmica em alguns países sul-americanos (Cardoso & George-Kraemer, 2008). O mate já era consumido por povos nativos da América do Sul, em função da sua propriedade estimulante do sistema nervoso central, antes do novo mundo ser descoberto pelos povos europeus.

Já o termo erva-mate é reservado ao produto tecnologicamente processado. A Argentina é o principal produtor mundial, seguido pelo Brasil e o Paraguai. No Brasil, a erva mate é reconhecidamente um dos principais produtos dentre a produção vegetal e silvicultura, com produção estimada em cerca de 230 mil toneladas em 2002 (Bastos et al, 2006).

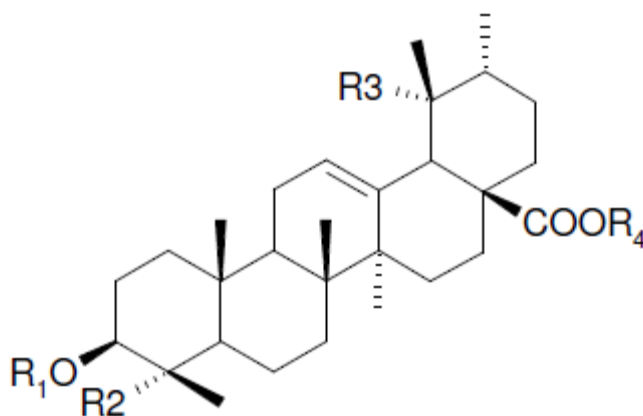
Além do seu elevado teor em metilxantinas (principalmente cafeína) e polifenóis, derivados do ácido caféico e da catequina, o mate é reconhecido como uma rica fonte de saponinas (Mazzafera, 1997; Filip et al., 2000; Bastos et al, 2006).

As saponinas constituem uma classe química bastante heterogênea, cujo nome deriva de sua propriedade de formação de espuma em solução aquosa. Estão amplamente distribuídos em diversas espécies vegetais abrangendo aproximadamente 100 famílias (Oleszek, 2002). Quimicamente são constituídas por uma porção hidrofóbica triterpênica ou esteróide ligada a uma ou mais cadeias de açúcares, em geral, glicose, galactose, ácido glicurônico, xilose ou metilpentose, cuja massa molecular varia entre 600 e 2000 Da, aproximadamente (Oleszek, 2002). As saponinas mais encontradas na natureza são as triterpênicas com agliconas de 30 átomos de carbono. Já as saponinas triterpênicas, mais de 50% apresentam o núcleo hidrofóbico do tipo oleano (Bader & Hiller, 1987).

Os estudos com as saponinas de *Ilex paraguariensis* no país se iniciaram no PPGCF-UFRGS no final da década de 80, sendo os frutos apenas mais recentemente avaliados como uma matéria-prima de interesse (Athayde et al., 2000) Os principais núcleos que caracterizam a fração de saponinas do mate são derivados do ácido oleanólico e ursólico (Figuras 5 e 6).



**FIGURA 5.** Estrutura Básica das Saponinas folhas de mate. (Adaptado de Pavei, 2004).



**FIGURA 6.** Estrutura Básica das Saponinas de frutos de mate. (Adaptado de Pavei, 2004).

Nesta Universidade, no Laboratório de Desenvolvimento Galênico, foram realizados alguns trabalhos pioneiros para a obtenção de uma fração enriquecida em saponinas a partir de frutos verdes. O ensaio de fracionamento foi desenvolvido por Pavei (2004) através da aplicação de extração em fase sólida, (INPI 0501510-3 de 12/02/2006). No mesmo segmento foram

desenvolvidos ensaios para quantificação das saponinas por CLAE-UV, tendo como foco as saponinas mais polares do mate.

Canto et al. (2010) avaliou a potencialidade desta fração como adjuvante espumógeno, o qual seus resultados foram significativos quando comparados com os tensoativos sintéticos. Não foram encontrados indícios de irritação cutânea significativa em coelhos.

Mais recentemente, estudos preliminares realizados pelo grupo, utilizando saponinas de folhas e frutos de mate, revelaram uma atividade antifúngica relevante contra algumas espécies de leveduras e fungos filamentosos. Este tipo de atividade é inédito para as saponinas do mate e abre novas perspectivas de pesquisa, face aos dados recentemente publicados sobre o comportamento físico-químico (sobretudo micelização e tensão superficial) e sua relação com as saponinas de mate (Canto et al., 2010; Peixoto et al., 2011; Peixoto et al., 2012).

Moléculas anfifílicas, as saponinas interagem com as membranas biológicas, determinando várias atividades biológicas que lhe são atribuídas, como hemólise e citotoxicidade.

Nos estudos sobre a citotoxicidade das saponinas, utiliza-se linhagens tumorais para o tratamento de vários tipos de câncer (Niu et al., 2008). Poucos trabalhos enfocam a citotoxicidade como efeito indesejável sobre as células estudadas quando se utiliza saponinas frente aos micro-organismos ou até mesmo como adjuvantes em formulações (Tiwari et al., 2008).

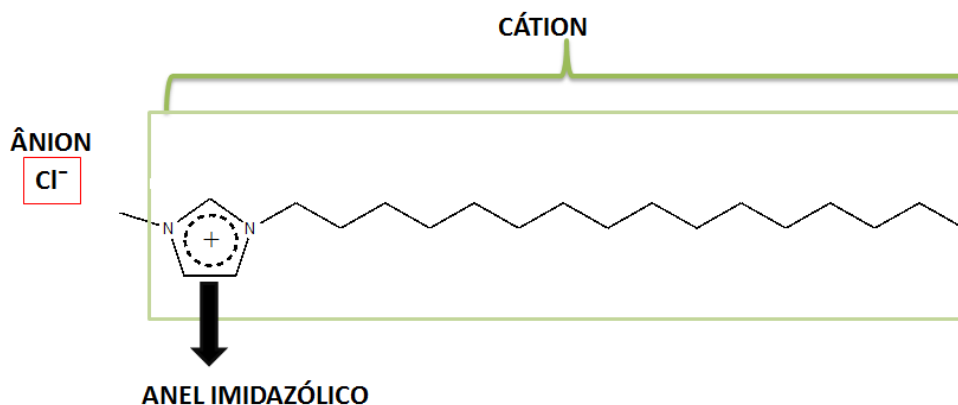
Tratando-se do mecanismo responsável por estas atividades, associa-se uma grande união entre as saponinas com o esteroide da membrana celular, o colesterol (Ikbal et al., 2007). Outro relato em relação às saponinas quanto ao seu mecanismo é que há também uma interferência destas sobre as proteínas transmembrânicas e do citoesqueleto celular. Denota-se, portanto, uma grande complexidade em relação a estas interações.

Sobre a atividade citotóxica do mate já foi avaliado o teste de AMES nas células bacterianas (Leitão & Braga, 1994). Um estudo sobre os efeitos mutagênicos, genotóxicos e clastogênicos sobre as bactérias, linfócitos e células de mamíferos, para a infusão de folhas de mate, não foram constatados os efeitos genotóxicos sobre as bactérias, modificações nos cromossomos dos linfócitos, nem clastogenicidade *in vivo* (Fonseca et al., 2000).

### **3.6.2 Sais imidazólicos e líquidos iônicos**

Os líquidos iônicos (LIs) são compostos líquidos em temperaturas inferiores a 100 °C, que possuem estruturas cristalinas iônico-covalentes e são amplamente conhecidos por apresentar várias propriedades avançadas. Eles possuem volatilidade insignificante, não são inflamáveis, apresentam alta estabilidade térmica e química, boa condutividade elétrica, além de possuírem capacidade de dissolver muitos materiais orgânicos e inorgânicos (Dupont et al., 2000; Migowski & Dupont, 2007).

Os líquidos iônicos fazem parte da grande classe dos sais imidazólicos, que são todos os compostos constituídos por cátions ou ânions contendo uma unidade imidazólica, conforme figura 7.



**FIGURA 7.** Estrutura química de um sal imidazólico (cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazol)

Presentemente, os LIs dispõem de grande crescimento e inicialmente foram utilizados, principalmente na substituição de solventes voláteis convencionais. Inicialmente, foram utilizados para substituir solventes voláteis convencionais e transformação de processos ambientalmente perigosos em processos seguros (Wasserschied & Welton, 2008). Rapidamente, a expansão da aplicação destes compostos foi significativa, sendo utilizados também como eletrólitos em baterias e na preparação de nanomateriais, entre muitos outros (Lu, et al., 2009). Estes derivados iônicos têm encontrado aplicações em uma ampla variedade de processos e materiais, devido principalmente às suas propriedades facilmente ajustáveis por mudanças estruturais nos cátions e ânions (Wasserschied & Welton, 2008; Lu et al., 2009).

A unidade imidazólica é frequentemente encontrada em substâncias biológicas ativas, incluindo agentes antifúngicos como econazol, fenticonazol, isoconazol, cetoconazol, miconazol, omoconazol, oxiconazol, sertaconazol, bifonazol, butoconazol, clotrimazolsulconazol e tioconazol. Outros medicamentos antifúngicos relacionados são os triazóis (albaconazol,



fluconazol, isavuconazol, itraconazol, posaconazol, ravuconazol, terconazol, voriconazol) e os tiazóis (abafungin). Essas classes de antifúngicos imidazólicos, triazólicos e tiazólicos inibem a enzima lanosterol 14-  $\alpha$  demetilase, a enzima necessária para converter lanosterol a ergosterol (Kanafani & Perfect, 2008).

Apesar do anel imidazólico ser encontrado em agentes antifúngicos, estudos sobre as atividades biológicas dos LIs são relativamente escassos onde mais comumente se encontra na literatura trabalhos focados as propriedades antimicrobianas. Muitos destes estudos avaliam que as propriedades físico-químicas dos LIs são atrativos para várias aplicações farmacêuticas, especialmente como agentes antibacterianos (Ferraz et al., 2011). Agentes antissépticos catiônicos, geralmente apresentam valores de CIM entre 8 a 500  $\mu\text{g/mL}$  (Demberelnyamba et al., 2004; Kanafani & Perfect, 2008). Entretanto, os LIs apresentaram valores de CIM contra bactérias de interesse clínico no valor de 4 a 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Tratando-se da atividade antifúngica e a toxicidade dos LIs em humanos, há poucos dados disponíveis na literatura. Alguns relatos descrevem a ação dos sais imidazólicos contra bactérias e fungos como *Aspergillus flavus* (Gupta, 2011), entre outras espécies fúngicas (Cornellas et al., 2011; Petrović et al., 2012), o que se salienta a potencial atividade antimicrobiana destes compostos e isso pode estar correlacionado com a estrutura química do mesmo (Foksowicz-Flaczyk & Walentowska, 2012).

Atualmente, o nosso grupo de pesquisa vem desempenhando estudos *in vitro* com leucócitos humanos para o teste genotóxico, com aplicação do sal

imidazólico em concentrações inibitórias mínimas. Por seguinte, neste mesmo estudo foi avaliado a atividade antifúngica para os sais imidazólicos testados. (Schrekker et al., 2013). Os sais imidazólicos poderiam vir a contribuir para uma promissora atividade antifúngica, já que as drogas atuais disponíveis no mercado apresentam efeitos secundários indesejáveis e são, muitas vezes, ineficazes principalmente contra as leveduras patógenas emergentes.

## **4 MATERIAS E MÉTODOS**

### **4.1 Isolados**

Foram selecionados para o estudo seis isolados clínicos de *Candida tropicalis* (72A, 72P, 94P, 102A, 17A, 57A), uma espécie fúngica leveduriforme, tipicamente oportunista e formadora de biofilme em cateteres. Todos os isolados estão depositados na Coleção de fungos do Laboratório de Micologia Aplicada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### **4.2 Teste de triagem para a formação do biofilme**

#### **4.2.1 Método do Cristal Violeta em microplaca**

Os isolados estudados neste trabalho foram escolhidos através do método do cristal violeta em microplaca, de acordo com a técnica descrita por Shin et al. (2002) e Stepanović et al. (2007), em triplicata, com modificações para adaptação ao modelo fúngico. Inicialmente, as estirpes foram cultivadas em AS durante 24 horas a 30°C e após o período de incubação, foi preparado o inóculo de acordo com a escala 0,5 de McFarland ( $10^6$  células leveduriformes/mL). Alíquotas de 20 µL foram transferidas para microplacas e suplementadas com 180µL de Caldo de Triptose de Soja (TSB, Oxoid®). Após

incubação de 24 horas a 37 °C, a cultura foi cuidadosamente removida com uma pipeta multicanal, sem tocar as paredes. A cada poço, foi adicionada a água destilada estéril para lavar e remover as células fracamente aderentes. Uma alíquota de Metanol 99,9% (150 µL) foi adicionado e após 20 minutos, as placas foram invertidas e secou-se durante 30 minutos. Estas placas foram coradas durante 15 minutos com 150 µL do violeta de geneciana 0,5% (Newprov), a temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se a aspiração do corante e a lavagem das placas com água corrente. Por fim, o corante foi novamente suspenso em 150 µL de etanol 100% e depois de 30 minutos, a leitura foi feita através da medição da absorção (450nm), conforme a tabela 1:

**TABELA 1.** Critérios de avaliação da formação de biofilme pelo método do cristal violeta, segundo a faixa de absorbância.

<b>FORMAÇÃO DO BIOFILME</b>	<b>FAIXA DE ABSORBÂNCIA</b>
<b>FORTE</b>	> 0,280
<b>MÉDIO</b>	0,170 – 0,279
<b>FRACO</b>	0,070 – 0,170
<b>NÃO FORMADOR</b>	< 0,070

Fonte: Shin et al. (2002), com modificações.

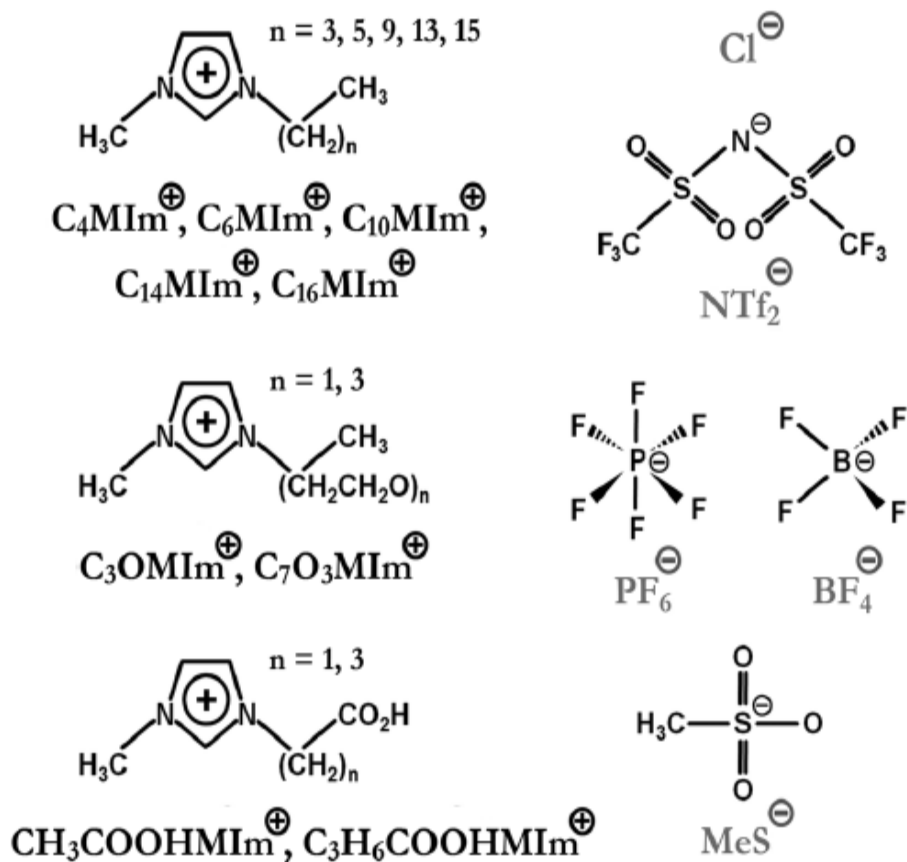
### **4.3 Teste de Susceptibilidade aos compostos testados**

Na avaliação da Susceptibilidade, foram utilizados os sais imidazólicos, provenientes do Laboratório TECNOCAT (Instituto de Química da Universidade

Federal do Rio Grande do Sul, Brasil) e a Erva Mate foi utilizado os seus frutos imaturos de mate, colhidos em janeiro de 2008 e gentilmente fornecidos pela Ervateira Barão. A elaboração das frações ocorreram no Laboratório de Desenvolvimento Galênico da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

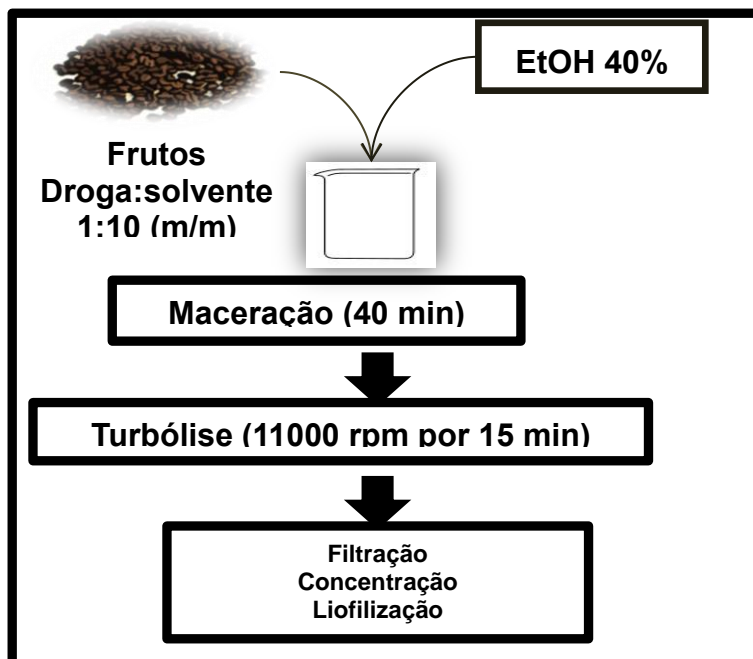
#### 4.3.1 *Screening* dos sais imidazólicos e saponinas de erva mate

Foi feita uma seleção de um conjunto de quatorze sais imidazólicos para a atividade antifúngica *in vitro* para serem avaliadas frente aos isolados de *C. tropicalis*. Os sais de metilimidazol substituídos, incluindo na cadeia lateral substituintes -  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$  ( $n = 3, 5, 9, 13, 15$ ); -  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_3$  ( $n = 1, 3$ ), -  $(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$  ( $n = 1, 3$ ) e os ânions:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $(\text{F}_3\text{CSO}_2)_2\text{N}^-$ ,  $\text{H}_3\text{CSO}_3^-$ ,  $\text{PF}_6^-$  (Figura 8), foram sintetizados conforme a literatura (Wasserschied & Welton, 2008; Lu et al., 2009).

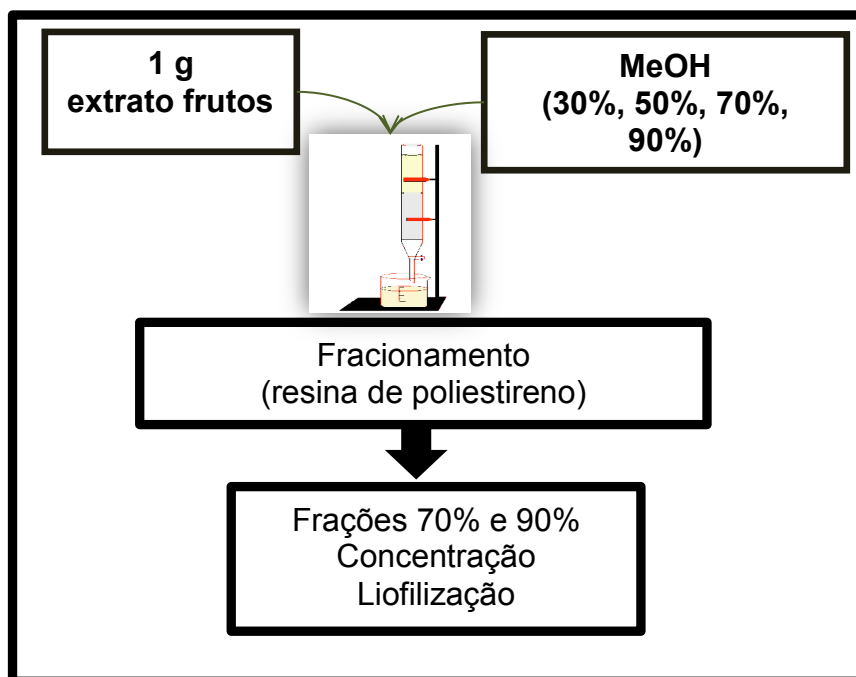


**FIGURA 8.** Combinações de cátions e ânions dos líquidos iônicos estudados na triagem antifúngica. Fonte: Schrekker et al., 2013.

As frações de saponinas foram obtidas de frutos verdes de erva mate, conforme preconizado por Resende et al. (2012). A metodologia está detalhadamente descrita nas figuras 9 e 10 abaixo.



**FIGURA 9.** Obtenção do extrato bruto dos frutos. Fonte: Resende et al., 2012.



**FIGURA 10.** Obtenção das Frações de Saponinas da Erva Mate (FSEM). Fonte: Resende et al., 2012.

Para o *screening*, os sais imidazólicos e as FSEM (F70 e F90) foram testadas na concentração de 500µg/mL.

#### **4.3.1.1 Preparação do inóculo**

Estes isolados foram cultivados em AS acrescido de cloranfenicol (HiMedia, Mumbai, Índia), a 32°C por 24 horas. Em seguida, retirou-se uma quantidade suficiente com uma alça microbiológica na superfície da colônia e este foi suspenso em solução estéril de salina 0,9%. A suspensão fúngica foi obtida comparando com a escala 0,5 de Mcfarland ( $1 \times 10^6$  células/mL a  $5 \times 10^6$  células/mL). A partir desta solução fúngica, diluição 1:50 em salina estéril foi aplicada (4,9 mL de Salina 0,9% + 0,1 mL da solução fúngica). A partir da solução 1:50, obteve-se uma diluição 1:20 em Caldo Saboraud (CS), resultando num inóculo de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  células por mililitro. Portanto, este foi o inóculo usado nos experimentos para cada isolado.

#### **4.3.1.2 Teste de Susceptibilidade – *Screening***

O teste de susceptibilidade foi realizado em placas de microdiluição estéreis, descartáveis, com 96 poços. Primeiramente, pipetou-se 100 µl de CS na microplaca, sendo: controle positivo (100 µl) e no controle negativo (200 µl). Posteriormente, ocorreu a adição dos sais imidazólicos ou das FSEM (100 µl). Por fim, adicionou-se o inóculo fúngico (100 µl) na microplaca. Logo, as placas foram incubadas a 32°C por 48 horas. A avaliação foi realizada mediante leitura visual, observando o crescimento ou não de aglomerados de células no fundo da cavidade da placa. Os sais imidazólicos escolhidos foram aqueles que tiveram a capacidade de inibir o crescimento fúngico.



#### 4.3.1.3 Teste de Susceptibilidade – Determinação da Concentração Inibitória Mínima das Células Planctônicas (CIMP)

A susceptibilidade dos isolados frente aos sais imidazólicos e as FSEM foi estabelecida pelo método de microdiluição em caldo de acordo com a norma M27-A3 (CLSI,2008). Fluconazol (Pharma Nostra, Brasil) foi utilizado como antifúngico de referência, cujos valores de CIM foram determinados previamente para estes isolados de *C. tropicalis*. Como organismo-controle da qualidade antifúngica dos compostos testados, em cada ensaio foi incluída a cepa *C. albicans* ATTC 24433. A interpretação dos testes foi realizada com a norma M27-S4 CLSI (2012), estabelecendo-se para *C. tropicalis* critérios de sensibilidade (CIM  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$ ) e de resistência (CIM  $> 4$   $\mu\text{g/mL}$ ) frente ao fluconazol. Soluções-estoque, na concentração de 1024  $\mu\text{g/mL}$  de sais imidazólicos, FSEM e fluconazol, foram preparados separadamente por dissolução em água destilada estéril.

Para todas as amostras testadas, as soluções estoque foram diluídas em RPMI 1640 (HiMedia, Índia) tamponado a pH 7,0 com tampão MOPS 0,165 M. As concentrações finais para cada composto variaram de 500 $\mu\text{g/mL}$  a 0,9  $\mu\text{g/mL}$  para os sais imidazólicos. As CIM pré-determinada para estes sais em relação às leveduras testadas foi previamente determinada como 0,9  $\mu\text{g/mL}$ . Foi estabelecido para começar na microplaca diluições seriadas das amostras de forma que nos primeiros poços houvesse três maiores concentrações em relação a concentração de 0,9  $\mu\text{g/mL}$ . Portanto, a faixa de concentração dos sais imidazólicos utilizada nos ensaios foi de 0,014  $\mu\text{g/mL}$  a 7,2  $\mu\text{g/mL}$ . Para as

FSEM, as concentrações variaram entre 500 µg/mL a 0,9 µg/mL. O fluconazol já apresentava as CIM frente a estes isolados, o qual foi realizado pelo Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada, sendo os valores: 128 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, 0,125 µg/mL, 0,125 µg/mL, 0,125 µg/mL para os isolados 72A, 72P, 94P, 102A, 17A, 57A, respectivamente.

A suspensão fúngica foi preparada conforme mencionado anteriormente para o teste de susceptibilidade (*Screening*), porém a solução final do inóculo na diluição 1:20 foi adicionada ao caldo RPMI, obtendo-se uma concentração final de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  UFC/mL.

O ensaio foi administrado em microplacas estéreis de 96 poços e estas foram incubadas a 35°C de 24 a 48 horas para todos os isolados testados. Por fim, a CIM foi determinada como a menor concentração do composto testado capaz de inibir 50% do crescimento fúngico. Para estes ensaios, foram incluídos um controle livre de micro-organismo (controle de esterilidade) e um controle livre de antifúngico (controle de crescimento).

#### **4.3.1.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)**

Logo após a leitura do CIM, foi retirada uma alíquota equivalente a 20µL dos poços utilizados na determinação da CIM, bem como dos controles dos micro-organismos. Todas estas alíquotas foram cultivadas em placa de Petri contendo Agar Saboraud dextrose acrescido de cloranfenicol, sem conter qualquer antifúngico e foram incubadas a 32°C por 24 horas. Portanto, CFM foi considerada como a concentração fungicida mínima em que não ocorreu crescimento visível, ou seja, houve 100% de inibição dos isolados testados quando comparados ao crescimento dos controles (Denning et al., 1992). Os ensaios foram realizados em duplicata.

#### **4.4 Ensaio de formação de biofilme em Cateter Traqueal**

O método foi realizado conforme preconizado (Da Silva Malheiros et al., 2010; Tondo et al., 2010), com modificações, servindo como um controle positivo do teste. Para se obter colônias jovens puras, as leveduras foram cultivadas em AS durante 24 horas, 37 °C. Em seguida, sete colônias foram adicionadas a 2 ml de TSB, formando um inóculo e incubou-se durante 24 horas, a 37 °C. Os cateteres, 1x1 cm (Siliconizado/látex- Mark Med, número 12) foram adicionados a 9 mL de Água Peptonada (AP)(HiMedia) juntamente com 1 mL do inóculo no TSB e incubou-se durante 96 horas a 37 °C. As leveduras fortes produtoras de biofilmes, a partir do ensaio de formação de biofilmes em microplaca de poliestireno, foram usadas para determinar a sua capacidade de formação de biofilmes em cateter. Subsequente ao período de

incubação, os cateteres foram lavados três vezes com AP para remover as células fracamente aderentes. Em seguida, estes cateteres foram adicionados a outro frasco, designado como Banho de Coleta (BC), com 50 mL de AP e as células aderentes foram libertadas do cateter por ultrassom a uma frequência de 40 KHz, durante 10 minutos. A água contida em cada cateter foi submetida a diluições decimais ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) e 20  $\mu$ l de cada diluição foram semeadas em AS. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C e os números de Unidades Formadoras de Colônia por Centímetro Quadrado (UFC/cm<sup>2</sup>) foram determinados. Todas as contagens foram feitas em duplicata e cada experimento foi repetido duas vezes.

#### **4.5 Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB)**

O perfil de susceptibilidade dos isolados, após a formação do biofilme sobre o cateter, também foi avaliada, tal como descrito para as células planctônicas.

#### **4.6 Formação e diluição do inóculo para a atividade antibiofilme e removedora**

Os isolados de *C. tropicalis* foram semeados em meio TSB e incubados durante 24 horas. Após a incubação, a solução de estoque para o ensaio de formação de biofilme foi obtida mediante adição de 9 mL de AP para cada 1 mL de cultura. Uma suspensão de  $10^6$  UFC/mL, o equivalente a 5-7 culturas a partir de células jovens, em seguida, foi formado.

#### **4.6.1 Avaliação da atividade antibiofilme do Cateter Traqueal contaminado artificialmente**

Tiras do CT (Mark Med, São Paulo, Brasil), de 1 x 1 cm (comprimento x perímetro) foram imersos por 1 minuto em uma solução de C<sub>16</sub>MImCl (0,9 µg/mL), fluconazol (8,0 µg/mL), FSEM (1,0 mg/mL) ou água destilada estéril. Depois, foram deixados a secar ao ar livre, durante 2 minutos e imediatamente imersos durante 96 horas na suspensão fúngica anteriormente descrita. Os cateteres foram lavados três vezes com AP para remover as células fracamente aderentes. Os cateteres foram então sonicados durante 10 minutos e adicionados no BC para recolher o biofilme a ser quantificado. Diluições decimais (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup>) foram feitas (4,5 mL + 0,5 mL), e uma alíquota de 20 µl de cada uma foi plaqueada em AS pelo método da gota. As placas foram incubadas a 32 °C durante 24 horas para a contagem das colônias. As contagens foram realizadas em duplicata e cada experiência foi repetida pelo menos duas vezes.

#### **4.6.2 Avaliação da atividade de remoção do biofilme do Cateter Traqueal contaminado artificialmente**

Tiras do CT de 1 cm x 1 cm, foram imersos durante 96 horas em uma suspensão de fungos, tal como descrito anteriormente. Os cateteres foram lavados três vezes com AP para remover as células fracamente aderentes, em seguida, foram colocados num Banho de Imersão (BI) contendo C<sub>16</sub>MImCl (0,9 µg/mL), fluconazol (8,0 µg / mL), FSEM (1,0 mg/mL), durante 1 minuto e deixados a secar ao ar livre. Para prova real do teste de remoção foi utilizada a

água destilada estéril. Logo, diluições decimais ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) foram feitas, e uma alíquota de 20  $\mu$ l de cada uma foi plaqueada em AS, pelo método da gota. Em paralelo, os cateteres foram imersos no BC por cerca de 10 minutos, para recolher as células isoladas do cateter contaminado. A partir desta suspensão, diluições decimais ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) foram feitas, e uma alíquota de 20  $\mu$ l de cada uma foi plaqueada em AS, pelo método da gota. As placas foram incubadas a 32 °C durante 24 horas para a contagem das colônias. As contagens foram realizadas em duplicata e cada experiência foi repetida pelo menos duas vezes. O resultado para este ensaio foi realizado através da soma do BI e BC, ou seja, quanto maior for este valor, em UFC/cm<sup>2</sup>, maior foi a atividade removedora da substância testada.

#### **4.7 Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme (CMEB)**

Para testar a susceptibilidade das células sésseis para os compostos em estudo, foi usado o método de Ramage et al. (2011), com modificações. Resumidamente, as células de *C. tropicalis* foram cultivadas em AS a 32 °C durante 24 horas. Uma alíquota de 20  $\mu$ L de uma suspensão contendo  $10^6$  células/mL em solução salina estéril (0,9 %) e 180  $\mu$ L de RPMI foi adicionada em microplacas de 96 poços, incubadas durante 48 horas a 32 °C. Após 48 horas, os poços foram lavados três vezes com água destilada estéril para remover as células não aderentes. Em seguida, foi realizada uma macrodiluição dos compostos, tais como: C<sub>16</sub>MImCl (0,9  $\mu$ g/mL a 0,028  $\mu$ g/mL), fluconazol (32 $\mu$ g/mL a 0,031  $\mu$ g/mL), FSEM (1,0 mg/mL a 0,9  $\mu$ g/mL) e água destilada estéril. Assim, cada poço corresponde a uma concentração da

amostra. Após 48 horas, obteve-se a realização de lavagens com água destilada estéril. Foi adicionado MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e isopropanol para a leitura das amostras (nos comprimentos de onda 570 nm e 690 nm). Todos os ensaios foram repetidos três vezes em duas ocasiões distintas e lidos no SpectraMax M<sub>2</sub>. Considera-se como resultado positivo aquele composto que obter > 80% de remoção do biofilme.

#### **4.8 Avaliação do Potencial Zeta**

Em um tubo de vidro foi adicionado um inóculo de  $1$  a  $5 \times 10^6$  células/mL) em 6 mL de salina 10mM. Este inóculo foi preparado tanto para as células planctônicas como para as células de biofilme. Logo, foi retirado 500  $\mu$ L destes frascos e adicionados em outro tubo contendo o C<sub>16</sub>MImCl. A concentração utilizada do sal imidazólico para as células de vida livre foi de 0,9  $\mu$ g/mL e de 0,056  $\mu$ g/mL para as células sésseis. Para fins comparativos, foi utilizado o fluconazol, sendo a concentração 8  $\mu$ g/mL tanto para células planctônicas como para biofilme. Na determinação do potencial zeta (mV), foi utilizado o equipamento de Zetasizer (Malvern) a 25 °C e a leitura foi realizada nos tempos 0, 1 e 3 horas, em triplicata.

#### **4.9 Análise dos resultados CIMs, CFMs, CMEB**

Os resultados das CIMs e das CFMs foram avaliados segundo a variação dos valores, representando os limites inferiores e superiores destas concentrações para cada composto referente às diferentes espécies testadas.

A CMEB foi avaliada através das absorbâncias obtidas no comprimento de onda de 570nm e 690nm, comparando com os valores do controle positivo.

#### 4.10 Análise dos resultados do biofilme

Os resultados obtidos no teste do biofilme foram avaliados através do cálculo das UFC/cm<sup>2</sup>, sendo estes resultados convertidos em log.

$$\text{UFC/cm}^2 =$$

$$\frac{\text{A}}{\text{mL}} \times \frac{50 \text{ mL (Água Peptonada)}}{1 \text{ cm}^2 \text{ (Tamanho do Cateter)}}$$

sendo **A**: contagem das UFC/mL x 50 (fator de conversão para transformar 20µL a 1000µL ou 1 mL) x **Diluição**



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da capacidade de formação do biofilme pelo método

#### Cristal Violeta em microplaca

**TABELA 2.** Método de detecção do biofilme de *C. tropicalis* em microplaca com o corante Cristal Violeta.

<i>C. tropicalis</i>	Média das absorbâncias (UA)*
<b>72A</b>	0,086
<b>72P</b>	0,101
<b>94P</b>	0,099
<b>102A</b>	0,15
<b>17A</b>	0,082
<b>57A</b>	0,281

\*valor expresso pela média das absorbâncias, em triplicata, sendo: Forte > 0,280; Médio > 0,170 – 0,279; Fraco: 0,070 – 0,170; Não formador < 0,070.

Dentre os isolados testados, todos foram capazes de formar biofilme, destacando o isolado 57A como forte formador e os isolados 72A, 72P, 94P, 102A e 17A como fracos formadores. A faixa atingida por esta espécie foi de 0,082 a 0,281.

## 5.2 Teste de Susceptibilidade

### 5.2.1 *Screening* da atividade antifúngica dos sais imidazólicos e das saponinas (F70 e F90) dos frutos de erva mate frente aos isolados de *C. tropicalis*

Dos quatorze sais imidazólicos testados, C<sub>10</sub>MImCl, C<sub>16</sub>MImCl, C<sub>16</sub>MImPF<sub>6</sub>, C<sub>10</sub>MImMeS, C<sub>16</sub>MImBF<sub>4</sub> e C<sub>14</sub>MImNTf<sub>2</sub> foram capazes de inibir o crescimento fúngico na concentração de 500 µg/mL, e por essa razão foram selecionados para o teste de susceptibilidade para obtermos a CIM de cada composto.

Nenhuma das FSEM apresentou atividade antifúngica, por isso foi dispensada a determinação dos valores de CIM de ambas.

### 5.2.3 Teste de Suscetibilidade aos sais imidazólicos

Os resultados da determinação dos valores de CIM dos sais imidazólicos contra os isolados de *C. tropicalis* mostraram uma variação de 0,9µg/mL a 250µg/mL. O sal imidazólico C<sub>16</sub>MImCl e C<sub>16</sub>MIm BF<sub>4</sub> apresentaram os melhores espectros antifúngicos frente a todos os isolados, com inibição total na menor concentração testada (0,9 µg/mL), conforme mostra a tabela 3.

**TABELA 3.** Comparativos da susceptibilidade *in vitro* de isolados de *C. tropicalis* frente aos sais imidazólicos

<i>C. tropicalis</i>	C <sub>10</sub> MImCl	C <sub>16</sub> MImCl	C <sub>16</sub> MImPF <sub>6</sub>	C <sub>10</sub> MImMeS	C <sub>16</sub> MImBF <sub>4</sub>	C <sub>14</sub> MimNTf <sub>2</sub>
<b>72A</b>	0,9*	0,9	1,9	1,9	0,9	0,9
<b>72P</b>	1,9	0,9	0,9	1,9	0,9	0,9
<b>94P</b>	1,9	0,9	0,9	1,9	0,9	0,9
<b>102A</b>	1,9	0,9	1,9	15,6	0,9	0,9
<b>17A</b>	31,2	0,9	3,9	125,0	0,9	250,0
<b>57A</b>	1,9	0,9	3,9	1,9	0,9	125,0
<b>Variação</b>	0,9 – 31,2	0,9 – 0,9	0,9 – 3,9	1,9 – 125,0	0,9 – 0,9	0,9 – 250,0
<b>MIC 50</b>	1,9	0,9	1,9	1,9	0,9	0,9

\*Todos os valores são expressos em µg/mL.

A partir destes resultados, o sal imidazólico escolhido para os testes posteriores foi o C<sub>16</sub>MImCl. Para este composto, foi reavaliada a CIM partindo de concentrações menores que 0,9 µg/mL e logo foi constatado 0,014 µg/mL como valor da CIM. Isso mostra o quanto estes isolados emergentes são sensíveis ao sal imidazólico. Já o agente antifúngico fluconazol apresentou uma variação de CIMP no valor entre 0,125 e 128 µg/mL, constatando então isolados resistentes (72A, 72P e 94P) e sensíveis (102A, 17A e 57A), como é possível observar na Tabela 4.

**TABELA 4.** Susceptibilidade das células planctônicas de *C. tropicalis* frente ao sal imidazólico C<sub>16</sub>MImCl.

<b>Substância</b>	<i>C. tropicalis</i>	<b>CIM *</b>	<b>CIM<sub>50</sub>*</b>	<b>Varição *</b>
<b>C<sub>16</sub>MImCl</b>	72A	0,014		
	72P	0,014		
	94P	0,014		
	102A	0,014		0,014
	17A	0,014	0,014	
	57A	0,014		
<b>Fluconazol</b>	72A	128,0		
	72P	128,0		0,125 - 128,0
	94P	64,0	0,125	
	102A	0,125		
	17A	0,125		
	57A	0,125		

\* Todos os valores de CIM e CIM<sub>50</sub> são expressos em µg/mL.

Os valores obtidos do CFM para o composto C<sub>16</sub>MImCl foi o próprio CIM frente aos isolados, ou seja, CFM foi considerado como a concentração fungicida mínima em que não ocorreu crescimento visível, o equivalente a 0,014 µg/mL. Para o fluconazol, é importante ressaltar que este possui ação fungistática.

### 5.3 Avaliação do ensaio da formação de biofilme em Cateter

#### Traqueal

No ensaio da formação do biofilme em CT, todos os isolados de *C. tropicalis* foram capazes de formar biofilme e isso é constatado através da contagem em UFC/cm<sup>2</sup>, como é demonstrado na tabela 5. Na diluição 10<sup>-2</sup>, foi observado que os valores em log variaram de 5,39 a 6,39. Dentre os fungos emergentes, 72A foi o que obteve o maior valor para formação de biofilme, seguido dos isolados 72P, 94, 102A, 17A e 57 A, respectivamente.

**TABELA 5.** Formação do biofilme nos isolados de *C. tropicalis* no Cateter traqueal após 96 horas de incubação em meio líquido.

<i>C. tropicalis</i>	Diluição	Média*	UFC/cm <sup>2</sup>	log
72A	10 <sup>-2</sup>	10	2,5x10 <sup>6</sup>	6,39
72P	10 <sup>-2</sup>	3	7,5x10 <sup>5</sup>	5,87
94P	10 <sup>-2</sup>	1	2,5X10 <sup>5</sup>	5,39
102A	10 <sup>-2</sup>	1	2,5X10 <sup>5</sup>	5,39
17A	10 <sup>-2</sup>	1	2,5X10 <sup>5</sup>	5,39
57A	10 <sup>-2</sup>	1	2,5X10 <sup>5</sup>	5,39

\*Média: soma das colônias, em triplicata, e logo transformadas para log.

### 5.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) pelo sal imidazólico C<sub>16</sub>MImCl

Conforme citado anteriormente, no teste de sensibilidade em células planctônicas, o CIMP do C<sub>16</sub>MImCl para todas as cepas testadas foi 0,014 µg/mL. Por outro lado, fluconazol apresentou valores CIMP altamente variáveis, dependendo do isolado (0,125-128 µg/mL). Após a formação do biofilme, C<sub>16</sub>MImCl apresentou algumas variações sobre CIMB, dependendo do isolado (0,028-0,225 µg/mL). O fluconazol exibiu variação considerável na CIMB (4,0 - 128,0 µg/mL), em que o melhor resultado apresentado para fluconazol foi duas ordens de grandeza menos eficazes do que o pior resultado para C<sub>16</sub>MImCl (Tabela 6).

**Tabela 6.** Susceptibilidade das células de biofilme e das células planctônicas frente ao sal imidazólico C<sub>16</sub>MImCl.

Substâncias	<i>C. tropicalis</i>	MIC*	MIC 50%*	Varição*	
<b>C<sub>16</sub>MImCl</b>	72A Planctônica	0,014			
	72P Planctônica	0,014			
	94P Planctônica	0,014	0,014	0,014	
	102A Planctônica	0,014			
	17A Planctônica	0,014			
	57A Planctônica	0,014			
	72A Biofilme	0,056			
	72P Biofilme	0,056			
	94P Biofilme	0,225	0,056	0,028-0,225	
	102A Biofilme	0,056			
	17A Biofilme	0,028			
	57A Biofilme	0,056			
	<b>Fluconazol</b>	72A Planctônica	128,0		
		72P Planctônica	128,0		
94P Planctônica		64,0	0,125	0,125 – 128,0	
102A Planctônica		0,125			
17A Planctônica		0,125			
57A Planctônica		0,125			
72A Biofilme		8,0			
72P Biofilme		128			
94P Biofilme		32,0	128,0	4,0 – 128,0	
102A Biofilme		128,0			
17A Biofilme		4,0			
57A Biofilme		64,0			

\*Valores expressos em log

### **5.5 Atividade antibiofilme do sal imidazólico C<sub>16</sub>MImCl e Frações de saponinas da erva mate**

A atividade antibiofilme apresentada por C<sub>16</sub>MImCl (0,9 µg/mL) foi considerada elevada, não só por evitar completamente o crescimento de células de *C. tropicalis* no ensaio de susceptibilidade, mas também pela sua eficácia numa concentração 1.000 vezes e 10 vezes mais baixa em relação as FSEM (1mg/mL) e ao fluconazol (8 µg/mL), respectivamente, como demonstrado na tabela 7. A concentração de 0,9 µg/mL do sal imidazólico foi selecionada para o teste antibiofilme devido a sua capacidade de inibir 100% do crescimento fúngico. As FSEM por não apresentarem CIM, foram avaliadas em 1mg/mL, pois em concentrações menores não houve atividade antimicrobiana. Já para os testes com o fluconazol, foi estabelecido a concentração de 8 µg/mL, pois este é o breakpoint de resistência dos isolados testados.



**TABELA 7.** Avaliação da atividade antibiofilme do C<sub>16</sub>MImCl e das Frações de saponinas da erva mate em relação aos isolados clínicos de *C. tropicalis* após 96 horas de incubação

Substâncias	<i>C. tropicalis</i>	Diluição	Média*	UFC/cm <sup>2</sup>	log
<b>C<sub>16</sub>MImCl (0,9 µg/mL)</b>	72A	10 <sup>-1</sup>	2	5x10 <sup>4</sup>	4,69
	72P	10 <sup>-1</sup>	0	0	0
	94P	10 <sup>-1</sup>	1	2.5x10 <sup>4</sup>	4,39
	102A	10 <sup>-1</sup>	2	5x10 <sup>4</sup>	4,69
	17A	10 <sup>-1</sup>	1	2.5x10 <sup>4</sup>	4,39
	57A	10 <sup>-1</sup>	1	2.5x10 <sup>4</sup>	4,39
<b>Fluconazol (8 µg/mL)</b>	72A	10 <sup>-1</sup>	10	25x10 <sup>4</sup>	5,43
	72P	10 <sup>-1</sup>	4	1x10 <sup>5</sup>	5,00
	94P	10 <sup>-1</sup>	5	1.25x10 <sup>5</sup>	5,09
	102A	10 <sup>-1</sup>	2	5x10 <sup>4</sup>	4,69
	17A	10 <sup>-1</sup>	5	1.25x10 <sup>5</sup>	5,09
	57A	10 <sup>-1</sup>	5	1.25x10 <sup>5</sup>	5,09
<b>FSEM 1mg/mL</b>	72A	10 <sup>-1</sup>	1	2.5x10 <sup>4</sup>	4,39
	72P	10 <sup>-1</sup>	1	2.5x10 <sup>4</sup>	4,39
	94P	10 <sup>-1</sup>	4	1x10 <sup>5</sup>	5,00
	102A	10 <sup>-1</sup>	2	5x10 <sup>4</sup>	4,76
	17A	10 <sup>-1</sup>	1	2.5x10 <sup>4</sup>	4,39
	57A	10 <sup>-1</sup>	4	1x10 <sup>5</sup>	5,00

\*Média: soma das colônias, em triplicata, e logo transformadas para log.

Em geral, todas as substâncias testadas quando comparadas ao fluconazol apresentaram atividade antibiofilme. O fluconazol (8,0 µg/mL), quando testado apresentou uma variação na inibição do biofilme de 4,69 a 5,43.

A substância que apresentou melhor atividade foi o C<sub>16</sub>MImCl. Isso pode ser observado através dos valores de log obtidos para cada um dos isolados 72A, 72P, 94P, 102A, 17A, 57A, que foram de 4,69; 0; 4,39; 4,69; 4,39; 4,39, respectivamente.

As FSEM apresentaram valores expressivos, inibindo todos os isolados, exceto a 102A. Os valores de log destas frações foram: 4,39; 4,39; 5,0; 4,76; 4,39; 5,0, para os respectivos isolados: 72A, 72P, 94P, 102A, 17A, 57A.

Entre os tensoativos testados, o que apresentou melhor desempenho geral para a atividade antibiofilme foi o C<sub>16</sub>MImCl. Com exceção do isolado 72A, onde os tensoativos naturais foram capazes de uma inibição mais eficiente do biofilme.

## **5.6 Resultado da atividade removedora em Cateter Traqueal do C<sub>16</sub>MImCl e das Frações de saponinas da erva mate**

No ensaio de remoção do biofilme em CT, a água destilada foi utilizada como referência, de modo que foi obtida uma faixa de log no valor de 5,00 a 5,57, sendo: 5,39; 5,57; 5,00; 5,47; 5,00; 5,00 para 72A, 72P, 94P, 102A, 17A, 57A, respectivamente.

Conforme dados da tabela 8, o composto que obteve a melhor atividade removedora, quando comparado a água destilada foi o C<sub>16</sub>MImCl (0,9 µg/mL). Isso foi avaliado através da soma, em UFC/cm<sup>2</sup>, do BI com o BC. O BI foi considerado o contato direto, no tempo de 1 minuto, do C<sub>16</sub>MImCl com o cateter contaminado. O BC foi um procedimento posterior ao BI, onde o cateter foi transferido para um frasco contendo AP (50mL), por 10 minutos, para ocorrer o desprendimento das células. A contagem das células foi realizada nas duas etapas (BI e BC) e a soma destes valores para o C<sub>16</sub>MImCl foi maior que para os demais compostos (variação de 5,09 a 5,79), evidenciado uma melhor atividade deste sal imidazólico. Destaca-se que houve maior remoção com a utilização deste frente ao isolado 72P (5,79), em relação à referência (5,57).

A variação apresentada pelo fluconazol (8,0 µg/mL) foi de 5,00 a 5,72. A atividade removedora dos compostos testados quando comparados a este antifúngico comercial foi melhor para o C<sub>16</sub>MImCl, exceto para o isolado 94P. Para este isolado, o fluconazol apresentou um valor de 5,72 e o C<sub>16</sub>MImCl de 5,3.

As FSEM (1 mg/mL) não apresentaram uma boa atividade removedora, apresentando somente atividade frente ao isolado 102A no valor de 5,57 quando comparadas com a água destilada (5,47). As FSEM (1 mg/mL) apresentaram atividade removedora superior ao fluconazol apenas para os isolados 72A, 102A no valor de 5,17 e 5,57, respectivamente. Entretanto estes valores ainda demonstraram ser menores que para o C<sub>16</sub>MImCl, conforme tabela 8.

**TABELA 8.** Atividade removedora do C<sub>16</sub>MImCl, das Frações de saponinas da erva mate em relação aos isolados clínicos de *C. tropicalis* após 96 horas de incubação.

Substâncias	<i>C. tropicalis</i>	Diluição	BI*	BC**	log
<b>C<sub>16</sub>MImCl (0,9µg/mL)</b>	72A	10 <sup>-1</sup>	15x10 <sup>4</sup>	15x10 <sup>4</sup>	5,47
	72P	10 <sup>-1</sup>	2,2x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>5</sup>	5,79
	94P	10 <sup>-1</sup>	5x10 <sup>4</sup>	15x10 <sup>4</sup>	5,30
	102A	10 <sup>-1</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>	3,7x10 <sup>5</sup>	5,72
	17A	10 <sup>-1</sup>	1,0x10 <sup>5</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>	5,39
	57A	10 <sup>-1</sup>	2,5x10 <sup>4</sup>	10x10 <sup>4</sup>	5,09
<b>Fluconazol (8µg/mL)</b>	72A	10 <sup>-1</sup>	1x10 <sup>5</sup>	0	5,00
	72P	10 <sup>-1</sup>	37,5x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>4</sup>	5,60
	94P	10 <sup>-1</sup>	37,5x10 <sup>4</sup>	15x10 <sup>4</sup>	5,72
	102A	10 <sup>-1</sup>	15x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>5</sup>	5,39
	17A	10 <sup>-1</sup>	2,5x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>5</sup>	5,09
	57A	10 <sup>-1</sup>	3,75x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>	5,67
<b>Saponinas (F70 e F90) 1mg/mL</b>	72A	10 <sup>-1</sup>	15x10 <sup>4</sup>	0	5,17
	72P	10 <sup>-1</sup>	1x10 <sup>5</sup>	0	5,00
	94P	10 <sup>-1</sup>	1x10 <sup>5</sup>	0	5,00
	102A	10 <sup>-1</sup>	3,75x10 <sup>5</sup>	0	5,57
	17A	10 <sup>-1</sup>	2,5x10 <sup>4</sup>	0	4,39
	57A	10 <sup>-1</sup>	1x10 <sup>5</sup>	0	5,00
<b>Água Destilada</b>	72A	10 <sup>-1</sup>	2,5x10 <sup>5</sup>	0	5,39
	72P	10 <sup>-1</sup>	3,75x10 <sup>5</sup>	0	5,57
	94P	10 <sup>-1</sup>	1x10 <sup>5</sup>	0	5,00
	102A	10 <sup>-1</sup>	3x10 <sup>5</sup>	0	5,47
	17A	10 <sup>-1</sup>	1x10 <sup>5</sup>	0	5,0
	57A	10 <sup>-1</sup>	1x10 <sup>5</sup>	0	5,0

BI\*: banho de imersão ; BC\*\*: banho de coleta

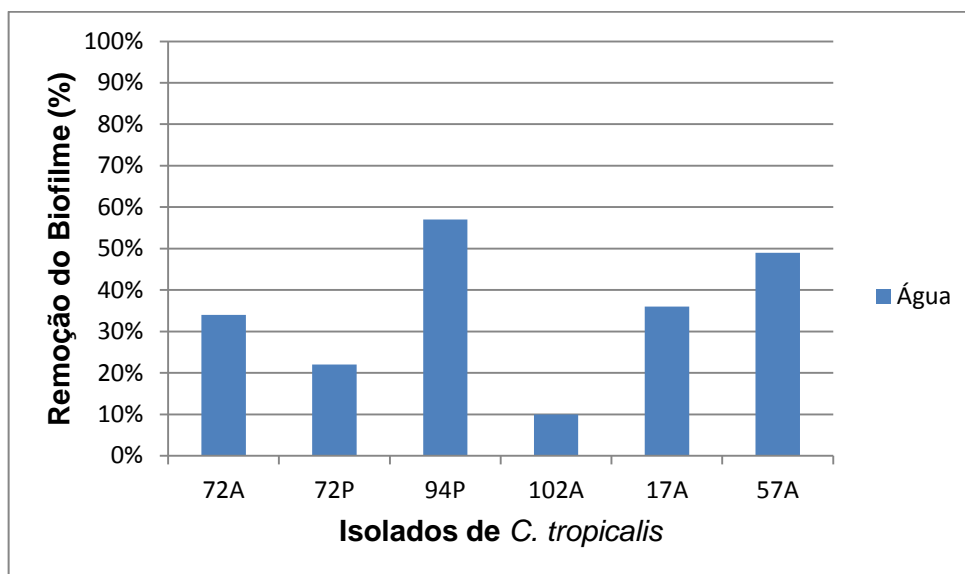
### **5.7 Avaliação do potencial zeta**

Para as células planctônicas, o isolado 72A, tratado e não tratado com fluconazol (8 $\mu$ g/mL), não apresentou variação no seu potencial no tempo 0 e após 4 horas (-21,9 e -19,0; -20,6 e -18,6 mV, respectivamente. O isolado 72A tratado com C<sub>16</sub>MImCl variou de -8,04 para -13,8 mV no tempo 0 e após 4 horas, respectivamente.

O controle positivo (72A) das células de biofilme apresentou uma diminuição em módulo de -23,7 e -11,5 mV, no tempo 0 a 4 horas, respectivamente. Isso também foi observado para o mesmo isolado tratado com fluconazol, nos mesmos tempos de tratamento, isto é, -18,6 e -16,8 mV, respectivamente. Nas mesmas condições experimentais, o teste com C<sub>16</sub>MImCl mostrou valores de -13,1 e -14,8 mV, indicando uma menor repulsão eletrostática quando comparado às células planctônicas.

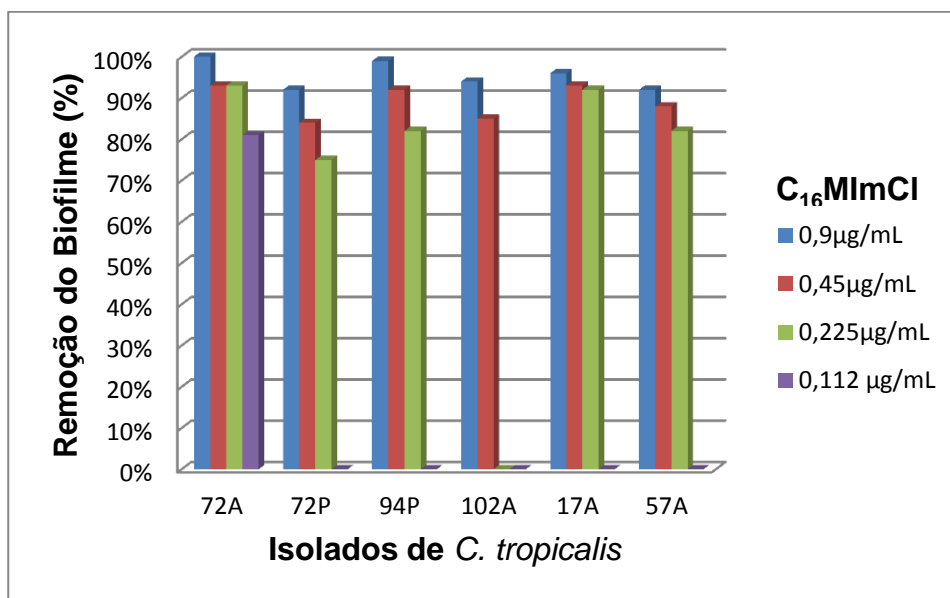
### **5.8 Avaliação da Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme (CMEB) do C<sub>16</sub>MImCl e erva mate em microplacas de 96 poços**

No ensaio do CMEB, a água destilada foi utilizada como referência, de modo que esta não foi capaz de erradicar o biofilme pré formado, pois suas porcentagens sofreram variações entre 10% a 57%, conforme mostra figura 11.



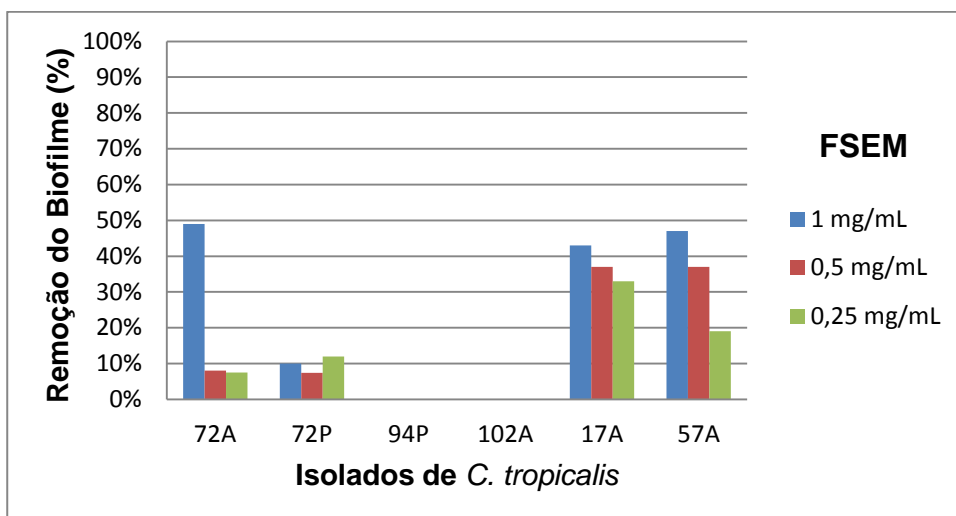
**FIGURA 11.** Erradicação do biofilme (%) com a Água em comparação com os isolados de *C. tropicalis*

Ao realizar este teste, o composto que apresentou maior capacidade de erradicar o biofilme pré-formado foi o C<sub>16</sub>MImCl. Este composto apresentou remoção (> 80%) nas concentrações de 0,9 µg/mL, 0,45 µg/mL, 0,225 µg/mL e 0,112 µg/mL, sendo este último eficaz somente para o isolado 72A, removendo 81% do biofilme formado. Em 0,9 µg/mL, todas as *C. tropicalis* apresentaram uma variação na remoção, de 92% a 100%. Na concentração de 0,45 µg/mL, a taxa de variação da remoção do biofilme foi de 84% a 93%, em 0,225 µg/mL a taxa de remoção variou de 75% a 93%. Para todas as concentrações testadas, o isolado que obteve maior remoção pelo sal imidazólico foi a 72A (Figura 12).



**FIGURA 12.** Erradicação do biofilme (%) com C<sub>16</sub>MImCl (0,9 µg/mL, 0,45 µg/mL, 0,225 µg/mL e 0,112 µg/mL) em comparação com os isolados de *C. tropicalis*.

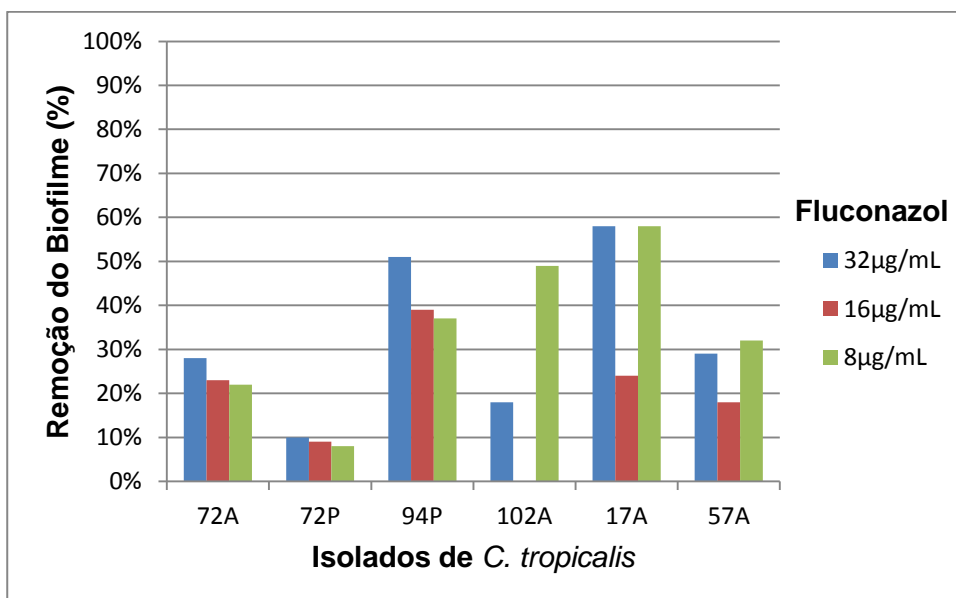
As FSEM não apresentaram uma concentração erradicadora do biofilme formado na faixa de 1mg/mL - 0,9 µg/mL. Na concentração de 1 mg/mL, a eficácia para a remoção foi < 80%, sendo a variação de 10% a 49% para os isolados testados. Em 0,5 mg/mL a variação foi de 7,4% a 37% e na concentração de 0,25 mg/mL a faixa de porcentagem foi de 7,5% a 33% (Figura 13).



**FIGURA 13.** Erradicação do biofilme (%) com Frações de saponinas da erva mate em 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL em comparação com os isolados de *C. tropicalis*.

O fluconazol não foi capaz de erradicar o biofilme formado nas concentrações na faixa de 32  $\mu\text{g/mL}$  a 0,031  $\mu\text{g/mL}$ . Em 32  $\mu\text{g/mL}$ , a variação da porcentagem da erradicação do biofilme foi de 10% a 58%. Para a concentração de 16  $\mu\text{g/mL}$  a faixa obtida foi de 9% a 39% e na concentração de 8  $\mu\text{g/mL}$  a variação foi de 8% a 58%, conforme mostra a figura 14.





**FIGURA 14.** Erradicação do biofilme (%) com fluconazol em 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL em comparação com os isolados de *C. tropicalis*.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Avaliação da capacidade de formação do biofilme

Patógenos oportunistas leveduriformes, como *C. tropicalis*, são capazes de promover a resposta imune celular do hospedeiro e danos nas células durante doenças infecciosas progressivas. Em algumas partes do mundo, *C. tropicalis* emergiu como o segundo ou o terceiro agente mais comum de candidemia, principalmente em pacientes imunocomprometidos, sendo a principal causa de candidemia no Brasil, sendo epidemiologicamente semelhante ao de *C. albicans* (Nucci & Colombo, 2007). De acordo com Pannanusorn et al. (2013), uma alta frequência de até 87%, os isolados clínicos de *C. tropicalis* são fortes produtores de biofilme, tornando as infecções associadas com biofilme de difícil tratamento e recorrentes.

A formação de biofilme por espécies de *Candida* tem sido demonstrada num certo número de superfícies abióticas, incluindo dispositivos médicos (Ramage, et al., 2006). A fase inicial de formação do biofilme de *Candida* começa com a adesão das células de levedura para a superfície do substrato, seguido por germinação e formação de micro-colônias. A atividade metabólica é intensa e o material extracelular surge durante a fase intermediária. Apesar das fases de desenvolvimento serem similares, variações na atividade do metabolismo da formação de biofilmes sobre a superfície do poliestireno foram detectados entre os isolados de *C. tropicalis*. Diferentes isolados de *C. albicans* também mostraram variações na formação de biofilmes na superfície de

cateteres (Hawser e Douglas, 1994). Estes resultados provavelmente refletem as diferenças fisiológicas entre as cepas.

A formação do biofilme através do método da microplaca por fungos leveduriformes oriundos de amostras clínicas foi avaliada neste estudo. Dos isolados selecionados de *C. tropicalis*, todos foram capazes de produzir biofilme, sendo o isolado 57A considerado o mais forte formador de filme e, em grau menor, os isolados 72A, 72P, 94P, 102A e 17A. O biofilme formado por estas espécies, através do método CV, obteve uma faixa de absorvância de 0,082 a 0,281. Estes dados corroboram estudos anteriores (Pierce et al., 2008), nos quais diversas espécies de fungos, incluindo isolados de *C. tropicalis*, apresentaram alta capacidade de formação de biofilme em superfícies de poliestireno. Neste estudo, a capacidade de *C. tropicalis* aderir na forma de biofilme em superfícies de poliestireno e cateteres sob condições estáticas foi demonstrada.

Shin et al. (2002), ao comparar várias espécies de *Candida*, no que diz respeito à sua capacidade para produzir o biofilme sobre a superfície de poliestireno, em caldo Saboraud Dextrose, contendo 8 % de glicose, constataram que *C. tropicalis* foi a mais frequente espécie produtora de biofilme.

Todos os isolados de *C. tropicalis* foram capazes de formar biofilme no CT e isso é constatado através da contagem em UFC/cm<sup>2</sup>. Foi observado que os valores em log variaram de 5,39 a 6,39. Dentre os fungos emergentes, 72A

foi o que obteve o maior valor logaritmo, portanto houve maior formação de biofilme por este, seguido do isolado 72P, 94, 102A, 17A e 57 A.

A adesão das células fúngicas na superfície do cateter pode ser explicada através do ensaio do potencial zeta. Observa-se que quando adicionamos o composto C<sub>16</sub>MImCl, as células planctônicas e de biofilme diferem entre si devido as cargas geradas. Para as células planctônicas, o C<sub>16</sub>MImCl apresentou uma variação no potencial gerado de -8 a -13 mV, enquanto que para as células sésseis não houve diferença do potencial gerado (-13,1 a -14,8 mV). Esta pequena modificação do potencial para as células planctônicas sugere uma atividade sobre a superfície celular. E fato que parece não ocorrer sobre a superfície do biofilme, o que contribui para manter a estabilidade de sistemas microparticulados (Mora-Huertas et al., 2010). O fluconazol não apresentou variação no seu potencial tanto para as células planctônicas como as de biofilme (em torno de 18,6 mV), o que sugere ausência de atividade em nível de superfície, senão a própria falta de atividade do fluconazol em ambos casos.

## **6.2 Teste de Susceptibilidade aos tensoativos**

A resistência a alguns antifúngicos usados no tratamento de infecções por *C. tropicalis* estão entre os fatores que contribuem para a elevada patogenicidade das espécies que pertencem a este gênero (Ramage et al., 2012). Esta característica pode ser detectada por testes de susceptibilidade *in vitro* correlacionando as células planctônicas com as células de biofilme (Chandra et al, 2001; Ramage et al, 2001c).

Neste estudo, a maioria dos isolados de *C. tropicalis* (células sésseis) foram resistentes ao fluconazol, com exceção do 17A que foi sensível quando submetido ao teste de formação de biofilme. Do mesmo modo, todos os isolados sésseis de *C. tropicalis* foram mais resistentes ao C<sub>16</sub>MImCl quando comparado às células planctônicas. Entretanto, com base nos valores de CIM observados aplicando esta técnica, o C<sub>16</sub>MImCl apresentou concentrações ativas extremamente baixas, quando comparados com os CIMs encontrados para fluconazol. Estes resultados se mostraram bastante relevantes quando comparados a outros agentes antifúngicos relatados na literatura. Pemán et al. (2008) revelou que as CIMs obtidas para a Anidulafungina, caspofungina e micafungina frente as células de biofilme foram 11,2 µg/mL, 8,97 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente.

O C<sub>16</sub>MImCl apresentou CIM entre 0,028 µg/mL a 0,225 µg/mL, ou seja, em concentrações 100 vezes mais baixas do que fluconazol, capazes de exercerem um nítido efeito antifúngico contra a *C. tropicalis*. No que tange às saponinas do mate, estas não apresentaram atividade antifúngica, quando testadas no ensaio de susceptibilidade frente a *C. tropicalis*.

### **6.3 Metodologias aplicadas para a atividade de remoção e antibiofilme**

A formação de biofilmes por micro-organismos torna-os ainda mais difíceis de serem erradicados, pois estas estruturas são mais resistentes do que sua forma livre de desenvolvimento (Lewis, 2001).

Nesse contexto a pesquisa de substâncias antibiofilmes foi realizada neste trabalho, tendo como base métodos e técnicas de uso padrão na literatura científica. Um dos métodos mais aplicados e também utilizado neste estudo de remoção do biofilme foi o ensaio colorimétrico com MTT. Este teste avaliou o efeito sobre a biomassa total do biofilme. O CMEB foi determinado por identificação da concentração mais baixa do antimicrobiano que impede o recrescimento dos micro-organismos do biofilme tratado. Este teste envolveu a prevenção de perda de cateter com a terapia antimicrobiana adequada, sendo assim um mecanismo fundamental para diminuir a morbidade secundária a infecções e cirurgias (Girard et al., 2010). Este método utilizou microplacas de poliestireno e apresentou como vantagens a rapidez, o baixo custo, facilidade de execução, precisão e reprodutibilidade, como citado na literatura (Ramage et al., 2001c). Outro método aplicado para avaliar a capacidade de remoção e atividade antibiofilme envolve a utilização de corpos de prova (Kishikawa et al., 2013; Rossi et al., 2013), cada vez mais incorporado na pesquisa moderna. Células que ainda ficaram aderidas após a exposição à substância são retiradas do corpo de prova e cultivadas em ágar para posterior contagem das UFC/cm<sup>2</sup>. Não obstante, o método apresenta um maior número de etapas de execução, o teste tem por principal vantagem o caráter semi-quantitativo dos resultados obtidos.

Os valores obtidos do CMEB mostraram que o C<sub>16</sub>MImCl foi certamente o melhor removedor do biofilme fúngico, quando comparado ao fluconazol, saponinas do mate e a água. C<sub>16</sub>MImCl foi capaz de remover o biofilme nas concentrações de 0,9, 0,45, 0,225 e 0,112 µg/mL. Na concentração de 0,9

$\mu\text{g/mL}$ , este composto foi capaz de remover de 92% a 100% o biofilme, o que corrobora com os resultados obtidos no ensaio com corpo de prova, utilizando a mesma concentração deste sal imidazólico. No teste com corpo de prova, o melhor isolado (72P), obteve uma remoção em log no valor de 5,79 e o mesmo, no ensaio do CMEB exibiu uma remoção de 92%. Fluconazol não foi capaz de remover o biofilme nas concentrações testadas de 32 a 0,031  $\mu\text{g/mL}$ , observando-se valores de remoção de 10% a 58%, na concentração de 32 $\mu\text{g/ml}$ . Este resultado confirma também no ensaio com o CT, quando esse antifúngico apresentou baixa taxa logarítmica de remoção na concentração de 8  $\mu\text{g/mL}$  (5,0 a 5,72). As frações purificadas de mate não foram capazes de remover o biofilme nas concentrações testadas (1,0 a 0,9  $\mu\text{g/mL}$ ), obtendo-se taxas de remoção de 10% a 49%, na maior concentração testada. Quando comparado aos resultados do ensaio utilizando corpo de prova, houve também uma baixa remoção de todos os isolados testados (log de 5,0 a 5,7), sendo C<sub>16</sub>MImCl o melhor removedor, com taxas logarítmicas de remoção de 5,09 a 5,79. Para ambos os ensaios de remoção, as frações purificadas do mate não apresentaram capacidade de remoção, quando comparadas ao fluconazol.

Entretanto, dados da literatura citam que substâncias naturais vem sendo muito utilizadas como agentes removedores de biofilme. Uma substância que se apresentou mais efetiva que o fluconazol frente a biofilmes pré-formados de *C. albicans* foi o óleo de eucalipto, que com uma concentração de 0,84% (v/v) foi capaz de reduzir em 80,87% o biofilme, enquanto que para o fluconazol uma concentração de 72 $\mu\text{g/mL}$  exibiu uma redução de 78% (Carlini et al., 1986).

Em suma, o C<sub>16</sub>MImCl removeu, em valores de log, melhor que a erva mate (5,79 para o composto sintético enquanto que para o composto natural foi 5,0). Comparando ao fluconazol (8,0 µg/mL), C<sub>16</sub>MImCl removeu melhor o biofilme. Este resultado corrobora a atividade atribuída a este composto sobre biofilmes (Ramage et al., 2011).

C<sub>16</sub>MImCl apresentou uma atividade antibiofilme (0,9 µg/mL) expressivo, quando comparado ao antifúngico comercial fluconazol (8,0 µg/mL). Observando os valores, o sal imidazólico apresentou uma variação na atividade antibiofilme de 0 a 4,7, enquanto que o fluconazol exibiu no valor de 4,7 a 5,4. A utilização de compostos e agentes quelantes de coordenação, tais como o EDTA são sugeridos como eficazes para inibir biofilmes fúngicos, porém somente quando aplicada a terapia de bloqueio do cateter, utilizando concentrações elevadas de 40,000 mg/L (Percival et al., 2005). Isto corrobora também com a eficácia estrutural do C<sub>16</sub>MImCl. O tensoativo conjugado, quelante e com características antifúngicas permite mais facilmente a penetração e mobilidade no hidrogel do biofilme de *C. tropicalis*, atravessando a estrutura rígida formada pelas camadas de células sésseis, exercendo assim o seu efeito antifúngico em doses mais baixas. Uma vez que o fluconazol é um agente antifúngico com caráter neutro, não se adaptaria ao ambiente com condições variáveis hidrofílicas-hidrofóbicas, pois este antifúngico ficaria preso dentro do biofilme e, portanto, não exercendo uma atividade antifúngica eficaz (Nweze et al., 2012). Isto explica a expressiva atividade antibiofilme do C<sub>16</sub>MImCl (0-4,7), em comparação com o fluconazol (4,7-5,4), mesmo em concentrações drasticamente inferiores. A Terapia de bloqueio do cateter com



antifúngico é uma técnica útil para reduzir a reinserção de cateteres em pacientes hospitalizados a longo prazo (Walraven & Lee, 2013). As características físico-químicas avançadas em conjunto com as pronunciadas propriedades antifúngicas e antibiofilme do  $C_{16}MImCl$ , sugere-se a possibilidade de uma alternativa mais branda a terapia de bloqueio do cateter. Isto iria evitar a desvantagem de uma alta concentração de fármaco na superfície do cateter e conseqüentemente menor exposição do paciente a produtos químicos tóxicos.

O tensoativo natural (frações purificadas do mate) apresentou um efeito antibiofilme eficaz frente aos isolados de *C. tropicalis*, na concentração de 1 mg/mL, principalmente quando comparados ao fluconazol (8  $\mu$ g/mL). Os valores das frações de erva mate variaram entre 4,39 a 5,0, e para o antifúngico comercial foi de 4,69 a 5,43. Este fato é inédito, pois não há dados na literatura revelando que frações purificadas do mate possuem atividade antibiofilme. Esse resultado é mais interessante quando comparado a concentração dos extratos que vem sendo utilizados para inibir o biofilme fúngico. Alguns extratos vêm mostrando alta atividade antimicrobiana frente aos fungos de *C. albicans*, são eles: *Echinacea angustifolia*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis* com valores de CIM entre 0,38 a 2,5 mg/mL (Sandasi et al., 2011).

Conforme dados apresentados na literatura, o cateter é um importante recurso na assistência a saúde, porém seu uso é frequentemente excessivo e depois de inserido, muitas vezes permanece por um tempo muito maior do que o necessário (Pratt et al., 2007). Já foi estimado que cerca de 20% a 50% dos

pacientes hospitalizados são submetidos a cateterização e alguns estudos sugerem que até 38% dos médicos desconhecem que o paciente está sondado, o que contribui para que o cateter seja mantido além do tempo necessário, ocasionando dor e desconforto para o paciente (Raffaele et al., 2008). Conforme Rutala (1989), é muito utilizado nos hospitais para esterilizar os cateteres o glutaraldeído (2%), o qual o tempo de exposição é durante 30 minutos. Outro composto usado para esterilizar cateteres nos hospitais é o formaldeído, o qual o tempo mínimo de exposição é de 18 horas.

#### **6.4 Mecanismo de ação e Toxicidade do C<sub>16</sub>MImCl**

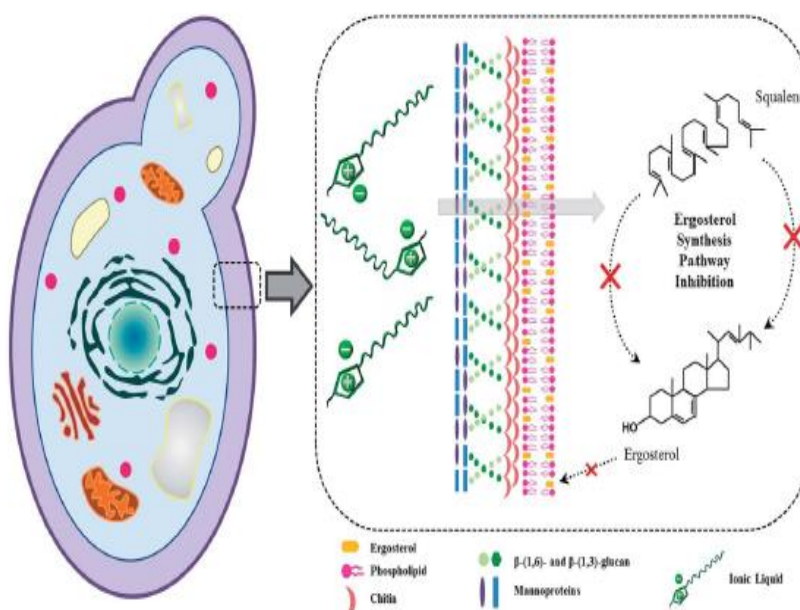
Observando os dados positivos alcançados pelo C<sub>16</sub>MImCl, apresentando uma baixa concentração tanto no teste de susceptibilidade como na atividade antibiofilme e remoção, foi analisada para este composto o seu provável mecanismo de ação e toxicidade.

A escolha do fluconazol neste estudo para termos de comparação ao sal imidazólico deve-se ao fato deste antifúngico comercial ser um derivado azólico e a droga de escolha para o tratamento das espécies de *Candida*. Conforme dados na literatura, antifúngicos azólicos atuam através da inibição da enzima lanosterol 14 - demetilase e, devido à semelhança estrutural entre os azóis e os sais imidazólicos, o potencial do C<sub>16</sub>MImCl para danificar a membrana do fungo das leveduras emergentes por inibição da biossíntese de ergosterol foi estudado. O teor total de ergosterol foi determinado para cada isolado cultivado, através da aplicação de uma concentração do C<sub>16</sub>MImCl sub-inibitória (0,45 µg/mL), conforme descrito por (Arthington-Skaggs et al., 2000).

A porcentagem de redução do teor médio de ergosterol celular para os isolados clínicos, em comparação com o conteúdo das células de controle cultivadas sem tratamento antifúngico, variou 33-89 % para as células cultivadas. Com base nestes resultados, pode-se concluir que este sal imidazólico inibe a enzima lanosterol 14 $\alpha$ - demetilase e tem como alvo a biossíntese do ergosterol. Curiosamente, esta redução parcial do conteúdo de ergosterol induzida por C<sub>16</sub>MImCl na concentração sub – CIM abre a possibilidade de utilizar este, em combinação com antifúngicos comerciais disponíveis como uma abordagem no sinergismo de drogas, incluindo antifúngicos que atuam como inibidores da biossíntese de esteróis. Santos et al. (2012), relataram sobre a interação antagônica entre fluconazol e AmB no CIM. O fluconazol diminuiu o número de sítios de ligação disponível para a ação AmB devido à sua forte ação inibitória da biossíntese de ergosterol no nível CIM . Dentro deste contexto, o sal imidazólico é um promissor candidato para o tratamento de infecções fúngicas resistentes, tanto como um único componente ou em combinação com, por exemplo, os azóis.

Há duas proposições para o possível mecanismo de ação do C<sub>16</sub>MImCl (Figura 15). O primeiro seria que o sal imidazólico necessita permear para dentro da membrana da célula fúngica, em que a via da síntese do ergosterol ocorre. Isto explicaria a permeabilidade exclusiva de que o sal imidazólico possui cadeias alquílicas mais longas, o qual possui estruturas semelhantes para a bicamada anfifílica fosfolipídica da membrana celular. A segunda sugestão poderia ser resolvido com a inibição real do efeito. Com base em mecanismos de inibição conhecidos, o C<sub>16</sub>MImCl podia perturbar vários

procedimentos metabólicos na célula fúngica, como por exemplo, antifúngicos azólicos tradicionais, podem inibir Citocromo P450, responsável pela respiração celular, por meio de desmetilação do 14 - alfa- lanosterol e conseqüente interrupção da membrana da célula através da diminuição da formação do ergosterol (Musiol & Kowalczyk, 2012). Além disso, como o sal imidazólico é um sal orgânico, ele poderia interferir na osmolaridade e no equilíbrio da célula fúngica. A presença do C<sub>16</sub>MImCl na parede da célula poderia induzir um efeito de "salting out" e conseqüente coagulação da parte proteica, causando sua desrupção (Hirayama et al., 2012).



**FIGURA 15.** Representação esquemática do mecanismo de ação do C<sub>16</sub>MImCl. Penetração do C<sub>16</sub>MImCl na célula fúngica e a sua interferência no processo de síntese do ergosterol. Fonte: Schrekker et al., 2013.

Em relação a toxicidade em humanos, estudos genotóxicos *in vitro* foram realizados em células de leucócitos humanos por aplicação do sal imidazólico em concentrações inibitórias mínimas. Os glóbulos brancos são as células mais comumente testadas para o ensaio cometa (Tice et al., 2000; Nadin et al., 2001; Dos Santos Montagner et al., 2010). Este é um método amplamente utilizado para detectar quebras de cadeia simples como dano inicial das moléculas de DNA, uma vez que é um processo rápido e sensível para detectar a genotoxicidade em células de mamíferos (Møller, 2006). O C<sub>16</sub>MImCl não mostrou dano no DNA na concentração utilizada no ensaio de eletroforese em gel, não sendo então capaz de ocasionar a ruptura na estrutura do DNA. Comparando com dados da literatura, o sal imidazólico apresentou níveis de viabilidade celular semelhante aos encontrados para os controles negativos e DMSO (Mischell & Shiingi, 1980). Isto mostra que o sal imidazólico não é capaz de ocasionar dano na membrana de leucócitos de células humanas. Portanto, este sal pode ser considerado como uma potencial droga no tratamento de leveduras patogênicas emergentes.

## 7 CONCLUSÕES

✓ Todos os isolados testados foram capazes de formar biofilme pelo método do CV e pela técnica semi-quantitativa, o qual utilizou o CT como corpo de prova.

✓ No teste da atividade antibiofilme, entre os tensoativos testados, as FSEM apresentaram resultados inferiores ao sal imidazólico.

✓ O tensoativo natural exibiu uma atividade antibiofilme expressivo, quando comparado ao antifúngico comercial fluconazol, podendo ser considerado um promissor composto antibiofilme de *C. tropicalis*.

✓ O composto C<sub>16</sub>MImCl apresentou propriedade antibiofilme e também removedora deste, usando como modelo de estudo um CT. Este estudo sugere esse sal imidazólico como uma potencial alternativa para o conjunto de ferramentas de assepsia clínica e terapia de bloqueio anti-fúngico, especialmente para dispositivos médicos invasivos.

✓ Sobretudo, o composto C<sub>16</sub>MImCl é promissor candidato para utilização como um produto farmacêutico antimicótico, especialmente para infecções nosocomiais de biofilme ocasionadas por *C. tropicalis*.

## 8 PERSPECTIVAS

✓ Avaliar a capacidade dos sais em inibir e remover o biofilme formado por fungos filamentosos.

✓ Testar *in vivo*, a capacidade de bloqueio da disseminação do biofilme de *Candida tropicalis* em cateteres pelo sal imidazólico C<sub>16</sub>MImCl.

✓ Testar *in vitro* e *in vivo* a capacidade antibiofilme de cateteres constituídos de um polímero complexado com o composto C<sub>16</sub>MImCl.

## 9 REFERÊNCIAS

AL-FATTANI, M.A. & DOUGLAS, L.J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **J Med Microbiol**, v. 55, n. 8, p. 999-1008, 2006.

ANTUNES, A.G., PASQUALOTTO, A.C., DIAZ, M.C., D'AZEVEDO, P.A., SEVERO, L.C. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Rev Inst Med Trop**, v. 46, n. 5, p. 239-41, 2004.

AQUINO, V.R.; LUNARDI, L.W.; GOLDANI, L.Z.; BARTH, A.L. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 5, p. 411-8, 2005.

ARTHINGTON-SKAGGS, B.A., WARNOCK, D.W. & MORRISON, C.J. Quantitation of *Candida albicans* Ergosterol Content Improves the Correlation between In Vitro Antifungal Susceptibility Test Results and In Vivo Outcome after Fluconazole Treatment in a Murine Model of Invasive Candidiasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 8, p. 2081, 2000.

ATHAYDE, M.L., COELHO, G.C. & SCHENCKEL, E.P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Phytochem**, v. 55, n. 7, p. 853-857, 2000.

BADER, G. & HILLER, K. New findings on the structure and biological activity of triterpene saponins. **Pharmazie**, v. 42, n. 9, p. 577-97, 1987.

BAILLIE, G.S. & DOUGLAS, L.J. *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents. **Methods Enzymol**, v. 310, p. 644-56, 1999.

BAILLIE, G.S. & DOUGLAS, L.J. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 8, p. 1900-1905, 1998.

BAKKALI, F., AVERBECK, S. & IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils--a review. **Food Chem Toxicol**, v. 46, n. 2, p. 446-75, 2008.



BASTOS, D.H.M., FORNARI, A.C., QUEIROZ, Y.S., TORRES, E.A.F.S. Bioactive compounds content of Chimarrao infusions related to the moisture of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Braz Arch Biol Technol**, v. 49, n. 3, p. 399-404, 2006.

BEDINI, A., VENTURELLI, C., MUSSINI, C., GUARALDI, G., CODELUPPI, M., BORGHI, V. et al. Epidemiology of candidaemia and antifungal susceptibility patterns in an Italian tertiary-care hospital. **Clin Microbiol Infect**, v. 12, n. 1, p. 75-80, 2006.

BEHLAU, I. & GILMORE, M.S. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. **Arch Ophthalmol**, v. 126, n. 11, p. 1572-81, 2008.

BIZERRA, F.C., NAKAMURA, C.V., DE POERSCH, C., SVIDZINSKI, T.I.E., QUESADA, R.M.B., GOLDENBERG, S. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Res**, v. 8 p. 442-450, 2008.

BOUCHERIT-ATMANI, Z., SEDDIKI, S.M.L., BOUCHERIT, K., SARI-BELKHAROUBI, L., KUNKEL, D. *Candida albicans* biofilms formed into catheters and probes and their resistance to amphotericin B. **J Med Myc**, v.21 p. 182–187, 2011.

BRAMMER, K.W. Management of fungal infection in neutropenic patients with fluconazole. **Haematol Blood Transfus**, v. 33, p. 546-50, 1990.

BRUN-BUISSON, C., DOYON, F., SOLLET, J.P., COCHARD, J.F., COHEN, Y. Prevention of intravascular catheter-related infection with newer chlorhexidine-silver sulfadiazine-coated catheters: a randomized controlled trial. **Intensive Care Med**, v. 30, n. 5, p. 837-43, 2004.

BURTON, E., GAWANDE, P.V., YAKANDAWALA, N., LOVETRI, K., ZHANEL, G.G., ROMEO, T. et al. Antibiofilm activity of GlmU enzyme inhibitors against catheter-associated uropathogens. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 5, p. 1835-40, 2006.

CANTO, G.S., TRETER, J., YANG, S., BORRÉ, G.L, PEIXOTO, M.P.G., ORTEGA, G.G. Evaluation of foam properties of saponin from *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (*Aquifoliaceae*) fruits. **Braz J Pharm Sci**, v. 46, n. 2, p. 237, 2010.

CARDOSO, A.C. & GEORGE-KRAEMER, J.E. Variabilidade genética em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hilaire) em populações naturais da região noroeste do Rio Grande do Sul. **Anais do 54º Congresso Brasileiro de Genética**, 2008.

CARDOSO, B. C. Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Universidade do Minho, 75f, 2004.

CARLINI, E.A., CONTAR, J.D.P., SILVA-FILHO, A.R., FROCHTENGARTEN, M.L., BUENO, O.F. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus Stapf*). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **J Ethnopharmacol**, v. 17, n. 1, p. 37-64, 1986.

Carmen, J.C., RODER, B.L., NELSON, J.L., ROBISON OGILVIE, R.L., ROBISON, R.A., et al. Treatment of Biofilm Infections on Implants with Low-frequency Ultrasound and Antibiotics. **Am J Infect Control**, v. 33, n. 2, p. 78-82. 2005.

CARPENTIER, B. & CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **J Appl Bacteriol**, v. 75, n. 6, p. 499-511, 1993.

CHANDRA, J., KUHN, D.M., MUKHERJEE, P.K., HOYER, L.L, McCORMICK, T., GHANNOUM, M.A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J Bacteriol**, v. 183, n. 18, p. 5385-94, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Third Informational. Supplement M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Fourth Informational Supplement M27-S4. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012.

COCUAUD, C., RODIER, M.H., DANIAULT, G. IMBERT, C. Anti-metabolic activity of caspofungin against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, n. 3, p. 507-12, 2005.

COLOMBO, A.L., GUIMARÃES, T., SILVA, L.R.F., MONFARDINI, L.P.A., CUNHA, A.K.B., RADY, P. et al. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 28, n. 5, p. 570-6, 2007.

COLOMBO, A.L. & GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

CORNELLAS, A., PEREZ, L., COMELLES, F., RIBOSA, I., MANRESA, A., GARCIA, M. T. Self- aggregation and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium based ionic liquids in aqueous solution. **J Colloid Interface Sci**, v. 355, n. 1, p. 164-171, 2011.

COSTA, A.C.B.P., PEREIRA, C.A., FREIRE, F. JUNQUEIRA, J.C., JORGE, A.O.C. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed in vitro. **Mycoses**, v. 56, n. 6, p. 614-22, 2013.

COSTA, A.C.B.P., RASTEIRO, V.M.C., PEREIRA, A.P., HASHIMOTO, E.S.H.S., JUNIOR, M.B., JUNQUEIRA, J.C. et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. **Arch Oral Biol**, v. 56, n. 11, p. 1299-305, 2011.

COSTERTON J.W. & LAPPIN-SCOTT H.M. Introduction to biofilm. **Int J Antimicrob Agents**, v. 11, n. 3-4, p. 217-21, 1999.

COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., KORBER, D.R., LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 49, p. 711, 1995.

COTTER, G. & KAVANAGH, K. Adherence mechanisms of *Candida albicans*. **Br J Biomed Sci**, v. 57, n. 3, p. 241-9, 2000.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 4, p. 564-82, 1999.

CROSS, L.J., BAGG, J., WRAY, D., AITCHISON, T. A comparison of fluconazole and itraconazole in the management of denture stomatitis: a pilot study. **J Dent**, v. 26, n. 8, p. 657-64, 1998.

CRUMP, J. A. & COLLIGNON, P. J. Intravascular Catheter - Associated Infections. **EJCMID**, v. 19, n. 1, p. 1-8. 2000.

CUENCA-ESTRELLA, M., GOMES-LOPEZ, A., MELLADO, E., BUITRAGO, M.J., MONZON, A., RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 3, p. 917-21, 2006.

DA SILVA MALHEIROS, P., DOS PASSOS, C.T., CASARIN, L.S., SERRAGLIO, L., TONDO, E.C.. Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. **Food Control**, v. 21, n. 3, p. 298-301, 2010.

DAVEY, M.E. & O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 64, n. 4, p. 847-67, 2000.

DE MENEZES, V.M., VALE, I.N.F., MONTEIRO, S.G., GONÇALVES, L.H.B., FIGUEIREDO, P.M.S., MONTEIRO, C.A. Classificação da capacidade de adesão de isolados clínicos de *Candida* spp em padrões de arranjos celulares distintos. **Rev Patol Trop**, v.42 n.3 p. 289-300, 2013.

DE PRIJCK, K., DE SMET, N., COENYE, T., SCHACHT, E., NELIS, H.J. Prevention of *Candida albicans* biofilm formation by covalently bound dimethylaminoethylmethacrylate and polyethylenimine. **Mycopathologia**, v. 170, n. 4, p. 213-21, 2010.

DEMBERELNYAMBA, D., KIM, K.S., CHOI, S., PARK, S.Y., LEE, H., KIM, C.J. et al. Synthesis and antimicrobial properties of imidazolium and pyrrolidinium salts. **Bioorg Med Chem**, v. 12, n. 5, p. 853-857, 2004.

DENNING, D.W., HANSON, L.H., PERLMAN, A.M., STEVENS, D.A. In vitro susceptibility and synergy studies of *Aspergillus* species to conventional and new agents. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 15, n. 1, p. 21-34, 1992.

DONLAN, R.M. Biofilms and device-associated infections. **Emerg Infect Dis**, v. 7, n. 2, p. 277-281, 2001.

DOS SANTOS MONTAGNER, G.F., SAGRILLO, M., MACHADO, M.M., ALMEIDA, R.C., DUARTE, M.M. et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicol In Vitro**, v. 24, n. 5, p. 1410-1416, 2010.

DOUGLAS, L.J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 1, p. 30-6, 2003.

DUNNE, W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 2, p. 155-66, 2002.

DUPONT, J., CONSORTI, C.S. & SPENCER, J. Room Temperature Molten Salts: Neoteric "Green" Solvents for Chemical Reactions and Processes. **J Braz Chem Soc**, v. 11 p. 337-344, 2000.

EDMOND, M.B., WALLACE, S.E., McCLISH, D.K., PFALLER, M.A., JONES, R.N., WENZEL, R.P. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three- year analysis. **Clin Infect Dis**, v. 29, n. 2, p. 239, 1999.

ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. **Rev Iberoam Micol**, v. 25, n. 2, p. 101-6, 2008.

ESTIVILL, D., ARIAS, A., TORRES-LANA, A., CARRILO-MUÑOZ, A.J., ARÉVALO, M.P. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. **J Microbiol Methods**, v. 86, n. 2, p. 238-42, 2011.

EVANS; FENNELL; STOKES, R. **Fundam Interf Eng**, Wiley, Canada 1997.

FERRAZ, R., BRANCO, L.C., PRUDENCIO, C., NORONHA, J.P., PETROVSKI, Z. Ionic liquids as active pharmaceutical ingredients. **ChemMedChem**, v. 6, n. 6, p. 975-85, 2011.

FILIP, R., LOTITO, S.B., FERRARO., FRAGA, C.G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutr Res**, v. 20, p. 1437-1446., 2000.

FISCHBACH, M.A. & WALSH, C.T. Antibiotics for emerging pathogens. **Science**, v. 325, n. 5944, p. 1089-93, 2009.

FOKSOWICZ-FLACZYK, J. & WALENTOWSKA, J. Antifungal activity of ionic liquid applied to linen fabric. **Int Biodeterior Biodegrad**, v. 84, p. 412-415, 2012.

FONSECA, C.A., OTTO, S.S., PAUMGARTTEN, F.J.R., LEITAO, A.C. Nontoxic, mutagenic, and clastogenic activities of Mate-Chimarrão (*Ilex paraguariensis*). **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, v. 19, n. 4, p. 333-46, 2000.

FRANCA, J.C.; RIBEIRO, C.E.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: incidence, frequency of different species, risk factors and antifungal susceptibility. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 1, p. 23-8, 2008.

GIRARD, L.P., CERI, H., GIBB, A.P., OLSON, M., SEPANDJ, F. MIC versus MBEC to determine the antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* in peritoneal dialysis peritonitis. **Perit Dial Int**, v. 30, n. 6, p. 652-6, 2010.

GORDON C.A., HODGES N.A. & MARRIOTT, C. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antimicrob Chemother**, v. 22 n. 5 p. 667-674, 1988.

GUPTA, M. Efficient synthesis of antifungal active 9-substituted-3-aryl-5H,13aH-quinolino[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-b][1,2,4]triazepines in ionic liquids. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 21, n. 16, p. 4919-23, 2011.

HARDING, M.W., MARQUES, L.L.R., HOWARD, R.J., OLSON, M.E. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends in Microbiol**, v. 17, n. 11, p. 475-80. 2009.

HAWSER, S.P. & DOUGLAS, L.J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. **Infect Immun**, v. 62, n. 3, p. 915-21, 1995.

HELJIC, S.; HUKIC, M.; DZINOVIC, A.; DOZIC, M.; BABIC, M. [Fungal colonization of newborn in neonatal intensive care unit: a prospective study]. **Med Arh**, v. 59, n. 4, p. 211-3, 2005.

HETRICK, E.M., PRICHARD, H.L., KLITZMAN, B., SCHOENFISCH, M.H. Reduced foreign body response at nitric oxide-releasing subcutaneous implants. **Biomaterials**, v. 28, n. 31, p. 4571-80, 2007.

HIRAYAMA, N., HIGO, T. & IMURA, H. Evaluation of a hydrophilic ionic liquid as a salting-out phase separation agent to a water-tetrahydrofuran homogeneous system for aqueous biphasic extraction separation. **Anal Sci**, v. 28, n. 6, p. 541-3, 2012.

HUANG, M.Y. & WANG, J.H. Impact of antibiotic use on fungus colonization in patients hospitalized due to fever. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 36, n. 2, p. 123-8, 2003.

IKBAL, C., MOUNIR, T., HALIMA-KAMEL, B., HABIB, B.H.M. Histological effects of *Cestrum parqui* saponins on *Schistocerca gregaria* and *Spodoptera littoralis*. **J Biomater Sci**, v. 7, n. 1, p. 95-101, 2007.

JIN, Y., YIP, H.K., SAMARANAYAKE, Y.H., YAU, J.Y., SAMARANAYAKE, L.P. 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. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 7, p. 2961-7, 2003.

Jabra-Rizk, M.A., Falkler, W.A., & Meiller, T.f. Fungal biofilms and drug resistance. **Emerg Infect Dis**, v. 10, p. 14–9, 2004.

JUNQUEIRA, J.C., FUCHS, B.B., MUHAMMED., COLEMAN, J.J., MAH SULEIMAN, J., VILELA, S.FG. et al. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. **BMC Microbiology**, v. 11, p. 247-247, 2011.

KANAFANI, Z.A. & PERFECT, J.R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 1, p. 120-8, 2008.

KIEDROWSKI, M.R. & HORSWILL, A.R. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1241, p. 104-21, 2011.

KISHIKAWA, H., EBBERYD, A., ROMLING, U., BRAUNER, A., LUTHJE, P., LUNDBERG, J.O. et al. Control of pathogen growth and biofilm formation using a urinary catheter that releases antimicrobial nitrogen oxides. **Free Radical Biol Med**, v. 65, p. 1257, 2013.

KUMAMOTO, C.A. *Candida* biofilms. **Curr Opin Microbiol**, v. 5, n. 6, p. 608-11, 2002.

LAFLEUR, M.D., KUMAMOTO, C.A., LEWIS, K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 11, p. 3839-46, 2006.

LAMFON, H., PORTER, S.R., McCULLOUGH, M., PRATTEN, J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. **J Antimicrob Chemother**, v. 53, n. 2, p. 383-5, 2004.

LA TOURETTE PROSSER, B., TAYLOR, D., DIX, B.A., CLEELAND, R. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. **Antimicrob Agents Ch**, v. 31, n. 10, p. 1502-1506, 2003.

LEITÃO, A.C. & BRAGA, R.S. Mutagenic and genotoxic effects of mate (*Ilex paraguariensis*) in prokaryotic organisms. **Braz J Med Biol Res**, v. 27, n. 7, p. 1517-25, 1994.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 4, p. 999-1007, 2001.

LIU, W., ZUO, Z., MA, R. ZHANG, X. Effect of Mechanical Cleaning of Endotracheal Tubes with Sterile Urethral Catheters to Reduce Biofilm Formation in Ventilator Patients. **Pediatr Crit Care Med**, v. 14, n. 7, p. 338-43, 2013.

LU, J., YAN, F. & TEXTER, J. Advanced applications of ionic liquids in polymer science. **Prog Polym Sci**, v. 34, p. 431-448, 2009.

MAZZAFERA, P. Mate drinking: Caffeine and phenolic acid intake. **Food Chem**, v. 60, n. 1, p. 67-71, 1997.



MERMEL, L.A., FARR, B.M., SHEIRETZ, R.J., RAAD, I.I., GRADY, N.O., HARRIS, J.S. et al. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. **J Intraven Nurs**, v. 24, n. 3, p. 180-205, 2001.

MICELI, M.H., DÍAZ, J.A. & LEE, S.A. Emerging opportunistic yeast infections. **Lancet Infect Dis**. v. 11, n. 2, p. 142-51, 2011.

MIGOWSKI, P. & DUPONT, J. Catalytic applications of metal nanoparticles in imidazolium ionic liquids. **Chem Eur J**, v. 13, n. 1, p. 32-39, 2007.

MISCHELL, B.B., & SHIINGI, S.M. **Selected methods in cellular immunology**. 1980, 486p.

MORA-HUERTAS, C.E., FESSI, H. & ELAISSARI, A. Polymer- based nanocapsules for drug delivery. **J Pharm**, v. 385, n. 1, p. 113-142, 2010.

Moreira, M.I.M.C.G. Azóis: farmacologia e interações medicamentosas. Licenciatura em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa, 2010.

MORSCHHÄUSER, J. Regulation of white-opaque switching in *Candida albicans*. **Med Microbiol Immunol**, v. 199, n. 3, p. 165-72, 2010.

MORSCHHÄUSER, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1587, n. 2-3, p. 240-8, 2002.

MUSIOL, R. & KOWALCZYKW, W. Azole antimycotics--a highway to new drugs or a dead end? **Curr Med Chem**, v. 19, n. 9, p. 1378-88, 2012.

MØLLER, P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 98, n. 4, p. 336-45, 2006.

NADIN, S.B., VARGAS-ROIG, L.M., CIOCCA, D.R. A silver staining method for single-cell gel assay. **J Histochem Cytochem**, v. 49, n. 9, p. 1183, 2001.

NAVA-ORTIZ, C.A.B., BURILLO, G., CONCHEIRO, A., BUCIO, E., MATTHIJS, N., NELIS, H. et al. Cyclodextrin-functionalized biomaterials loaded with miconazole prevent *Candida albicans* biofilm formation in vitro. **Acta Biomater**, v. 6, n. 4, p. 1398-404, 2010.

NETT, J., CAIN, M.T., CRAWFORD, K., ANDES, D.R. Optimizing a *Candida* biofilm microtiter plate model for measurement of antifungal susceptibility by tetrazolium salt assay. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 4, p. 1426-33, 2011.

NETT, J., LINCOLN, L., MARCHILLO, K., MASSEY, R., HOLOYDA, K., HOFF, B. et al. Putative Role of  $\beta$ -1,3 Glucans in *Candida albicans* Biofilm Resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 2, p. 510, 2007.

NGUYEN, M.H., PEACOCK, J.E., MORRIS, A.J., TANNER, D.C., NGUYEN, M.L., SNYDMAN, D.R. et al. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. **Am J Med**, v. 100, n. 6, p. 617-23, 1996.

NIKAWA, H.J.I.N.C., MAKIHIRA, S., EQUUSA, H., HAMADA, T., KUMAGAI, H. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers in vitro. **J Oral Rehabil**, v. 30, n. 3, p. 243-50, 2003.

NITSCHKE, M. & COSTA, S.G.V.O. Biosurfactants in food industry. **Trends Food Sci Technol**, v. 18, p. 252-259, 2007.

NITSCHKE, M., PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Quim Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NIU, Y.P., WU, L.M., JIANG, Y.L., WANG, W.X., LI, L.D. Beta-escin, a natural triterpenoid saponin from Chinese horse chestnut seeds, depresses HL-60 human leukaemia cell proliferation and induces apoptosis. **J Pharm Pharmacol**, v. 60, n. 9, p. 1213-20, 2008.

NUCCI, M. & COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 58, n. 1, p. 77-82, 2007.

NWEZE, E.I., GHANNOUNM, A., CHANDRA, J., GHANNOUM, M.A., MUKHERJEE, P.K. Development of a 96-well catheter-based microdilution method to test antifungal susceptibility of *Candida* biofilms. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 1, p. 149-53, 2012.

OLESZEK, W. A. Chromatographic determination of plant saponins. **J Chromatogr A**, v. 967, n. 1, p. 147-162, 2002.

O'TOOLE, G.A. & KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Mol Microbiol**, v. 28, n. 3, p. 449-461, 1998.

PANNANUSORN, S., FERNANDEZ, V. & RÖMLING, U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 264-272, 2013.

PAVEI, C. **Desenvolvimento de métodos analíticos e tecnológicos aplicados à fração saponosídica presente nos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004. 134 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia).

PEIXOTO, M.P., KAISER, S., VERZA, S.G., DE RESENDE, P.E., TRETER, J., PAVEI, C. et al. LC- UV Assay Method and UPLC/ Q- TOF- MS Characterisation of Saponins from *Ilex Paraguariensis* A. St. Hil. (Mate) Unripe Fruits. **Phytochem Ana**, v. 23, n. 4, p. 415-420, 2012.

PEIXOTO, M.P., TRETER, J., DE RESENDE, P.E., DA SILVEIRA, N.P., ORTEGA, G.G. et al. Wormlike micellar aggregates of saponins from *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate): a characterisation by cryo- TEM, rheology, light scattering and small- angle neutron scattering. **J Pharm Sci**, v. 100, n. 2, p. 536, 2011.

PEMÁN, J., CANTÓN, E. & VALENTÍN, A. Activity of anidulafungin against *Candida* biofilms. **Rev Iberoam Micol**, v. 25, n. 2, p. 124-8, 2008.

PERCIVAL, S.L.; HILL, K.E.; WILLIAMS, D.W.; HOOPER, S. J.; THOMAS, D. W.; COSTERTON, J.W. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. **Wound Repair Regen**, v. 20, n. 5, p. 647-57, 2012.

PERCIVAL, S.L., KITE, P., EASTWOOD, K., MURGA, R., CARR, J., ARDUINO, M.J. et al. Tetrasodium EDTA as a novel central venous catheter lock solution against biofilm. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 26, n. 6, p. 515-9, 2005.

PETROVIĆ, Z.D., COMIC, L., STEFANOVIC, O., SIMIJONOVIC, D., PETROVIC, V.P. Antimicrobial activity of the ionic liquids triethanolamine acetate and diethanolamine chloride, and their corresponding Pd(II) complexes. **J Mol Liq**, v. 170, p. 61-65, 2012.

PFALLER, M.A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **Am J Med**, v. 125, n. 1, p. S3-13, 2012.

PIERCE, C.G., UPPULURI, P., TRSITAN, A.R., WORMLEY, F.L.Jr., MOWAT, E., RAMAGE, G. et al. A simple and reproducible 96- well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**, v. 3, n. 9, p. 1494, 2008.

PRADE, S.S., FRANKART L, COPIN P, ALEXIOU A, HENRY N, SAUVAN V, PITTET D. Prevalence of nosocomial infections in a university hospital: distribution, predisposing factors and diagnostic indices. **Europe PMC**, v. 128, n. 50 p. 1973-1983, 1998.

PRATT, R.J., PELLOWE, C.M., WILSON, J.A., LOVEDAY, H.P., HARPER, P.J., JONES, S.R. et al. epic2: National evidence-based guidelines for preventing healthcare-associated infections in NHS hospitals in England. **J Hosp Infect**, v. 65, p. S1-64, 2007.

RAAD, I., HANNA, H. & MAKI, D. Intravascular catheter-related infections: advances in diagnosis, prevention, and management. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 10, p. 645-57, 2007.

RAFFAELE, G., BIANCO, A., AIELLO, M., PAVIA, M. Appropriateness of use of indwelling urinary tract catheters in hospitalized patients in Italy. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 29, n. 3, p. 279-81, 2008.

RAMAGE, G., RAJENDRAN, R., SHERRY, L., WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **Int J Microbiol**, p. 1-14, 2012.

RAMAGE, G., JOSE, A., COCO, B., RAJENDRAN, R., RAUTEMAA, R., MURRAY, C. et al. Commercial mouthwashes are more effective than azole antifungals against *Candida albicans* biofilms in vitro. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 111, n. 4, p. 456-60, 2011.

RAMAGE, G., MOWAT, E., JONES, B., WILLIAMS, C., LOPEZ-RIBOT, J. Our current understanding of fungal biofilms. **Crit Rev Microbiol**, v. 35, n. 4, p. 340-355, 2009.

RAMAGE, G., MARTÍNEZ, J.P. & LÓPEZ-RIBOT, J.L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 7, p. 979-86, 2006.

RAMAGE, G., VANDE WALLE, K., WICKES, B.L., LÓPEZ-RIBOT, J.L. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 9, p. 3234-40, 2001a.

RAMAGE, G., VANDE WALLE, K., WICKES, B.L., LÓPEZ-RIBOT, J.L. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Rev Iberoam Micol**, v. 18, n. 4, p. 163-70, 2001b.

RAMAGE, G., VANDE WALLE, K., WICKES, B.L., LÓPEZ-RIBOT, J.L., Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 9, p. 2475-9, Sep 2001c.

RESENDE, P.E., VERZA, S.G., KAISER, S., GOMES, L.F., KUCHARSKI, L.C., ORTEGA, G.G. The activity of mate saponins (*Ilex paraguariensis*) in intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. **J Ethnopharmacol**, v. 144, n. 3, p. 735-40, 2012.

ROGERS, T.R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? **Int J Antimicrob Agents**, v. 27 p. 7-11. 2006.

ROSEN, M. J.; KUNJAPPU, J. T. **Surfactants and Interfacial Phenomena**. 4. ed. Wiley, 2012.

ROSSI, E.M., SCAPIN, D. & TONDO, E.C. Survival and transfer of microorganisms from kitchen sponges to surfaces of stainless steel and polyethylene. **J Infect Dev Ctries**, v. 7, n. 3, p. 229-34, 2013.

RUTALA, W A. Draft guideline for selection and use of disinfectants. **Americ. J, Infect Control**, v17, p. 24-38,1989.

SANDASI, M., LEONARD, C.M., VAN VUUREN, S.F., VIJOEN, A.M. Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms in vitro. **S Afr J Bot**, v. 77, n. 1, p. 80-85, 2011.

SANTOS, J.R.A., GOUVEIA, L.F., TAYLOR, E.L.S., RESENDE-STOIANOFF, M.A., PIANETTI, G.A., CÉSAR, I.C., SANTOS, D.A. Dynamic interaction between fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 5, p. 2553-8, 2012.

SCHREKKER, H.S., DONATO, R.K., FUENTEFRIA, A.M., BERGAMO, V., OLIVEIRA, L.F., MACHADO, M.M. Imidazolium salts as antifungal agents: activity against emerging yeast pathogens, without human leukocyte toxicity. **Med Chem Commun**, v. 4, n. 11, p. 1457-1460, 2013.

SEGRETI, J. Nosocomial infections and secondary infections in sepsis. **Crit Care Clin**, v. 5, n. 1, p. 177-89, 1989.

SENEVIRATNE, C.J., SILVA, W.J., JIN, L.J., SAMARANAYAKE, Y.H., SAMARANAYAKE, L.P. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. **Arch Oral Biol**, v. 54, n. 11, p. 1052-60, 2009.

SHIN, J.H. KEE, S.J., SHIN, M.G., KIM, S.H., SHIN, D.H., LEE, S.K. et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 4, p. 1244-8, 2002.

SILVA, S., HENRIQUES, M., MARTINS, A., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D.W, AZEREDO, J. Biofilms of non- *Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Med Mycol**, v. 47, n. 7, p. 681-689, 2009.

STEPANOVIĆ, S. VUKOVIC, D., HOLA, V., DI BONAVENTURA, G., DJUKIC, S., CIRKOVIC, I. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891-9, 2007.

STIGTER, M., BEZEMER, J., GROOT, K., LAYROLLE. Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy. **J Control Release**, v. 99, n. 1, p. 127-37, 2004.

STEINBERG, J. The chronic wound and the role of biofilm. In: podiatry, 2011, p. 181 -190. management.

TAFF, H.T., NETT, J.E. & ANDES, D.R. Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation assays. **Med Mycol**, v. 50, n. 2, p. 214-8, 2012.

TALARMIN, J.P., BOUTOILLE, D., TATTEVIN, P., DARGÈRE, S., WEINBRECK, P., ANSART, S. et al. Epidemiology of candidemia: a one-year prospective observational study in the west of France. **Med Mal Infect**, v. 39, n. 12, p. 877-85, 2009.

TICE, R.R., AQUIRELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TIWARI, P., SINGH, D. & SINGH, M.M. Anti-Trichomonas activity of Sapindus saponins, a candidate for development as microbicidal contraceptive. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, n. 3, p. 526-34, 2008.

TOBUDIC, S., KRATZER, C. & PRESTERL, E. Azole- resistant *Candida* spp. – emerging pathogens? **Mycoses**, v. 55, p. 24-32, 2012.

TONDO, E.C., MACHADO, T.R.M., MALHEIROS, P.S., PADRÃO, D.K., DE CARVALHO, A.L., BRANDELLI, A. Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. **Braz J Microbiol**, v. 41, n. 4, p. 1027-37, 2010.

VANDEPUTTE, P. LARCHER, G., BERGÈS, T., RENIER, G., CHABASSE, D., BOUCHARA, J.P. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 11, p. 4608-15, 2005.

VIGOUROUX, S., MORIN, O., MOREAU, P., HAROUSSEAU, J.L., MILPIED, N. Candidemia in patients with hematologic malignancies: analysis of 7 years' experience in a single center. **Haematologica**, v. 91, n. 5, p. 717-8, 2006.

WAGNER, H. & ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2-3, p. 97-110, 2009.

WALRAVEN, C.J. & LEE, S.A. Antifungal lock therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 1, p. 1-8, 2013.

WASSERSCHIED, P. & WELTON, T. **Ionic Liquids in Synthesis**, ed. VCH Wiley, Weinheim, 2<sup>nd</sup> edn., 2008.

WU, P. & GRAINGER, D. W. Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis. **Biomaterials**, v. 27, n. 11, p. 2450-67, 2006.

ZOLFAGHARI, P.S. & WYNCOLL, D.L. The tracheal tube: gateway to ventilator-associated pneumonia. **Crit Care**, v. 15, n. 5, p. 310, 2011.