

# ATIVIDADE *in vitro* DE FLUCONAZOL E ITRACONAZOL EM BIOFILMES DE *Candida albicans*

ABRÃO, F.Y.<sup>1</sup>; PONTES, N.P.<sup>2</sup>; SILVA, M.R.R.<sup>2</sup>; LINO, JR.R.S<sup>2</sup>; SOUZA, P.H.H<sup>3</sup>; SOUZA, L.K.H.<sup>4</sup>

Universidade Federal de Goiás/Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

[yanobruce@gmail.com](mailto:yanobruce@gmail.com) e [lucia@padrao.com.br](mailto:lucia@padrao.com.br)

Palavras-chave: *Candida albicans*, Biofilme, Itraconazol e Fluconazol

## 1. INTRODUÇÃO

Fungos do gênero *Candida* fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal e genitourinário e demais superfícies do homem. Alterações das barreiras teciduais, da própria microbiota ou da resposta imune promovem um desequilíbrio na relação hospedeiro-parasita, permitindo a invasão do microrganismo nos tecidos do hospedeiro, causando infecções denominadas de candidíases (DRAGO et al., 2000; CALDERONE e FRONZI, 2001; BERMAN e SUDBERY, 2002; JIN et al., 2004; SILVA et al., 2008; HASAN et al., 2009).

Candidíase representa a terceira causa de infecção nosocomial por todo mundo, sendo *Candida albicans* a espécie mais frequente (KUHN et al., 2002b). O aumento no número de hospedeiros suscetíveis, como pacientes submetidos a tratamentos imunossupressivos, uso prolongado de antibióticos de amplo espectro e uso de dispositivos implantados, como cateteres e sondas têm favorecido o aumento da prevalência desta infecção (MOLERO et al., 1998; CHANDRA et al., 2001b; RAMAGE et al., 2001a). O índice de mortalidade mesmo após o tratamento medicamentoso é alto, variando de 40 a 60% (WARNOCK, 2007; SENEVIRATNE et al., 2008; BARNES, 2008).

*C. albicans* por fazer parte da microbiota normal humana, entra em contato com dispositivos implantados, tais como próteses, tubos endotraqueais e vários tipos de cateteres. Este contato com estas superfícies pode levar a formação de uma comunidade altamente estruturada que são envolvidos por uma matriz extracelular, denominada de biofilme

---

-Revisado pelo orientador- Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Kioko Hasimoto e Souza. Aluno de iniciação científica: Fernando Yano Abrão. Legenda:<sup>1</sup>Aluno de iniciação científica do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP). <sup>2</sup>Autores da instituição IPTSP. <sup>3</sup>Acadêmico da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Goiás. <sup>4</sup>Profa. Orientadora Doutora do IPTSP.

(DOUGLAS, 2002; KOJIC e DAROUICHE, 2004; BLANKENSHIP e MITCHELL, 2006; PIERCE et al., 2008). O biofilme de *C. albicans* é resultado da adesão a um material e formação de uma camada basal de células confluentes, que se dividem e produzem hifas compartimentalizadas, com projeções longas, tubulares que se entrelaçam na região superior do biofilme. Estas células são responsáveis pela liberação de uma matriz extracelular estável de substâncias poliméricas. Dessa forma é criado um micro-ambiente que protege as células, evitando que sejam lavadas e levadas de áreas com fluxo de líquidos, como boca, intestinos e vagina, além de promover resistência aos antibióticos e a invasão por células de defesa do sangue (SOLL, 2008). Em um último estágio, são produzidas células filhas menos aderidas, que podem se desprender do biofilme maduro (BORECKÁ-MELKUSOVÁ e BUJDAKOVA, 2008), funcionando como um reservatório de células infectantes (RAMAGE et al., 2005) podendo ser responsável por septicemia no paciente (VINITHA e BALLAL, 2007).

Infecções associadas a biofilmes são de difícil tratamento uma vez que estas estruturas microbianas apresentam resistência, tanto aos antimicrobianos quanto aos mecanismos de defesa do hospedeiro (HAWSER e DOUGLAS, 1994; KUMAMOTO et al., 2002; KROM et al., 2007). Os derivados azólicos como o fluconazol e o itraconazol tem como mecanismo de ação a inibição da biossíntese do ergosterol pela interação com a enzima lanosterol demetilase, responsável pela conversão do lanosterol a ergosterol, componente essencial da membrana fúngica (WYNN et al., 2003). Segundo Kumamoto et al. (2002), células de *C. albicans* dispostas como biofilme são 100 vezes ou mais resistentes ao fluconazol em comparação às células planquitônicas (células não sesséis). O aumento da resistência ao fluconazol durante a maturação do biofilme parece estar associado com um decréscimo significativo no conteúdo total de ergosterol, devido o ergosterol ser o sítio de ação dos fármacos azólicos (MUKHERJEE et al., 2003 e PÉRMAN et al., 2008). Outra hipótese, para explicar a resistência de biofilmes aos antifúngicos, é a presença da matriz extracelular que teria a função de impedir a sua difusão para o interior da estrutura formada, e apenas a camada superficial do biofilme estaria exposta a dose letal do fármaco administrado (AL-FATTANI e DOUGLAS, 2004).

Na maioria dos casos a estratégia mais efetiva para tratamento destas infecções pode ser a remoção do dispositivo contaminado pelo biofilme (DONLAN, 2001), o que pode ter sérias implicações como no caso de válvulas cardíacas, próteses articulares e válvulas do sistema nervoso central (KUHN et al., 2002b). Tais características tornam infecções relacionadas à formação de biofilmes de *Candida* um problema clínico crescente, tornando necessário novos

estudos nesta área de pesquisa (RAMAGE et al., 2001b). Portanto, o entendimento sobre formação, desenvolvimento e suscetibilidade é indispensável para a elaboração de estratégias terapêuticas para o tratamento de infecções relacionadas aos biofilmes de *Candida*.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar a cinética de formação de biofilmes de diferentes isolados *Candida albicans* e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do fluconazol e itraconazol sobre biofilmes e células planquitônicas por meio da determinação das concentrações inibitórias mínimas.

## **3. METODOLOGIA**

### **3.1. Isolados**

Foram avaliados 10 isolados de *C. albicans* provenientes de diferentes fontes, como cateter (C180, C140), sangue (S157, S211), unha (U02, U15) e mucosas bucal (M02, M36) e vaginal (V58, V60). As cepas foram isoladas e identificadas segundo Kurtzman e Fell (1998) no Laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP-UFG). *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. albicans* ATCC 28367 foram usadas como controle.

### **3.2. Suscetibilidade antifúngica *in vitro* para células planquitônicas**

Todas as leveduras foram submetidas ao teste de suscetibilidade através da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo M27-A3 do Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI 2008), para determinar a CIM. Foram avaliados dois agentes antifúngicos: itraconazol (Johnson e Johnson) e fluconazol (Pfizer). O meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640), com 0,165 mol/L de tampão MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico) em pH 7,0 foi utilizado. Foram distribuídos a partir da 2ª coluna de cada placa de microtitulação, 100 µL deste meio.

O inóculo foi preparado a partir de colônias de *C. albicans* cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) por 24 horas a 35°C. Uma suspensão foi preparada em salina na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL. Esta suspensão foi diluída a 1:50 em água destilada e a seguir, 1:20 em RPMI 1640 para se obter uma concentração de 0,5 a  $2,5 \times 10^3$  células/mL.

As concentrações dos antifúngicos avaliadas variaram de 0,031 a 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o itraconazol e de 0,125 a 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o fluconazol. Na primeira coluna das placas de microtitulação foram colocados 200  $\mu\text{L}$  do antifúngico com o dobro da concentração inicial desejada e a partir desta, foram realizadas diluições seriadas, caindo a concentração pela metade no decorrer da linha, utilizando meio de RPMI.

Para a realização dos testes de suscetibilidade, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  do inóculo em cada orifício da placa, contendo o antifúngico diluído. Controles do meio de cultura, do agente antifúngico e do inóculo foram realizados em cada placa. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como controle. A representação esquemática do teste de suscetibilidade in vitro para fungos é demonstrada na figura 1.

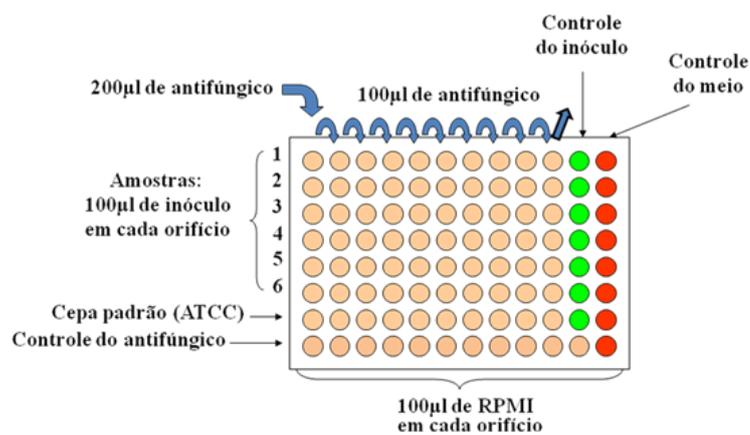


Figura 1. Representação esquemática da realização do teste de suscetibilidade in vitro pelo método de microdiluição em caldo.

Para leitura dos resultados foi verificado o crescimento das leveduras, através da observação da turvação do meio, comparado ao controle de crescimento (livre de antifúngico). A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir 80% do crescimento dos isolado de *C. albicans*, comparado com o controle.

Para a interpretação dos resultados os isolados com valores de CIM  $\geq 1$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  para itraconazol e  $\geq 64$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o fluconazol foram considerados como resistentes, seguindo valores preconizados no documento M27-A3 do CLSI (2008).

### 3.3. Formação do biofilme fúngico

A obtenção dos biofilmes de *Candida* foi realizada utilizando placas de microtitulação de poliestireno, segundo metodologia descrita por Hawser e Douglas (1994) e Pierce et al. (2008), com modificações.

Para o preparo do inoculo, células de *Candida* provenientes de culturas em ASD (48 h) foram inoculadas em líquido YPD (extrato de levedura peptonado dextrosado) e incubadas “overnight” em agitador orbital a 30°C. As células foram então centrifugadas a 3.000 g por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o sedimento foi ressuspenso em 10 mL de PBS estéril gelado, através de vigorosa agitação em vórtex, seguida de nova centrifugação. Ao precipitado final foi adicionado aproximadamente 2 mL de meio RPMI pré-aquecido a 37°C e foram realizadas diluições para ajustar a 85% transmitância a 530 nm ( $1,0 \times 10^6$  células/mL). Para a formação do biofilme, 100 µL deste inoculo foi adicionado aos orifícios da placa de microtitulação.

A cinética de formação dos biofilmes foi realizada para diferentes períodos de incubação: 24 h, 48 h, 72 h e 96 h. Após a formação dos biofilmes, o meio foi aspirado e as células não aderidas foram removidas através da lavagem com PBS. A medida da atividade metabólica das células do biofilme formado foi avaliada utilizando-se o ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio, por 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium bromide (MTT), que produz cristais formazan azul-escuros e insolúveis, no interior das células. A quantidade de cristais formados foi determinada espectrofotometricamente, através das leituras de densidade óptica (DO) em 550 nm, servindo como uma estimativa do número de mitocôndrias e conseqüentemente o número de células viáveis na amostra (FREIMOSER et al., 1999).

O MTT foi utilizado como uma solução de 0,5g/L em PBS, para cada 10mL foi adicionado 1 µL de solução de menadiona (10 µM acetona). Um volume de 100 µL de MTT-menadiona foi então adicionado a cada orifício contendo o biofilme pré-lavado e também aos orifícios controle (sem biofilme). As placas foram então incubadas no escuro por 150 minutos a 37°C e após, o conteúdo dos orifícios foram descartados e adicionou-se em cada, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), em agitação por 15 min, para a solubilização dos cristais formazan. A solução final de cada orifício foi transferida para novas placas e a presença de coloração foi medida a 550 nm em leitora de placas de ELISA (Behring). Pocinhos contendo DMSO foram utilizados como “branco” da reação. Os valores de DO

obtidos do branco, foram subtraídos dos resultados obtidos das demais leituras e valores de DO maior ou igual a 0,200 foram considerados formadores de biofilme (VALENTÍN et al., 2007). Os valores de DO dos biofilmes formados individualmente, em quadruplicada, nos diferentes intervalos de tempo (24 h, 48 h, 72 h e 96 h), foram comparados pelo teste ANOVA e pós-teste Tukey. Foi considerada diferença estatisticamente significativa quando  $P < 0,05$ . A análise foi feita com o programa SigmaStat versão 2.03 para Windows.

### **3.4. Teste de suscetibilidade antifúngica para biofilmes**

Os testes de suscetibilidade antifúngica dos biofilmes foram realizadas segundo Pierce et al. (2008). As concentrações dos antifúngicos avaliadas foram de 0,031 a 16  $\mu\text{g/mL}$  para itraconazol e de 1 a 1.024  $\mu\text{g/mL}$  para fluconazol. Aos biofilmes formados (48 h) foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de cada concentração do antifúngico e incubados por 48 h a 37°C. Os testes foram realizados em duplicata, sendo realizados concomitantemente controles de crescimento e esterilidade do meio.

As CIMs dos antifúngicos para os biofilmes foram definidas como as menores concentrações capazes de produzir reduções na DO igual a 50% (CIMS50) e a 80% (CIMS80), em comparação ao controle de crescimento (sem antifúngico).

## **4. RESULTADOS**

A técnica de microdiluição em caldo permitiu obter valores de CIM para células planquitônicas de *C. albicans* de 1 a 8  $\mu\text{g/mL}$  para o fluconazol e entre 0,0625 a 1  $\mu\text{g/mL}$  para itraconazol. O isolado U02 mostrou com CIM igual a 1  $\mu\text{g/mL}$  para o itraconazol, valor considerado resistente. Os valores das CIMs das células planquitônicas estão apresentados na tabela 1.

O estudo da cinética de formação dos biofilmes dos diferentes isolados de *Candida* mostrou que todos os isolados foram capazes de produzir biofilme ( $\text{DO} \geq 0,200$ ) e que a atividade metabólica das células sésseis aumentou nas primeiras 48 h de incubação (Figura 4).

Os isolados M02 e U02 apresentaram as maiores atividades metabólicas, o que pode indicar uma maior produção de biofilme por parte destes isolados. O isolado V58 e a cepa padrão de *C. albicans* ATCC28367 mostraram uma maior atividade metabólica dos biofilmes com 24 h de formação. Por outro lado, para os demais isolados avaliados, os valores de DO

obtidos no intervalo de 48 h apresentaram diferença estatisticamente significativa, quando comparados com os obtidos nos demais intervalos de tempo ( $P < 0,05$ ).

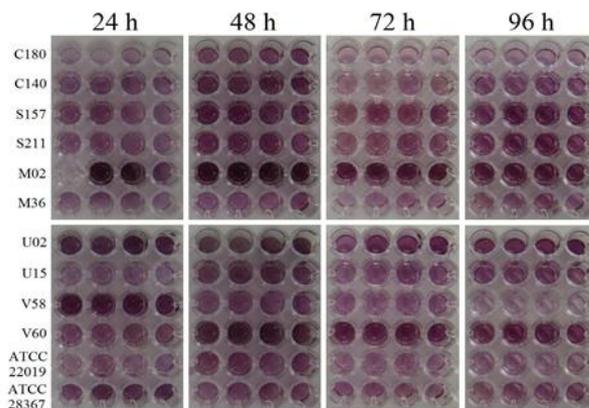


Figura2

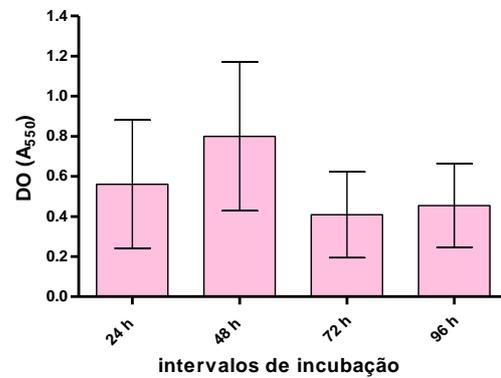


Figura3

Figura 2. Cinética de formação de biofilmes por isolados de *Candida* utilizando o ensaio colorimétrico (MTT), após a solubilização dos cristais formazan com DMSO, mostrando o aumento da atividade metabólica proporcional à intensidade da cor obtida.

Figura 3. Médias das DOs obtidas para todos os isolados de *Candida* sp. a cada intervalo de tempo (24 h, 48 h, 72 h e 96 h).

Os valores de DO obtidos com 24, 48, 72 e 96 horas de incubação variaram de 0,244 (U15) a 1,217 (M02); 0,433 (M36) a 1,541 (M02); 0,201 (C180) a 0,789 (M02) e de 0,140 (V58) a 0,813 (U02) respectivamente (Figura 4). A leitura das DOs dos isolados M02, U02 e V60 mostrou que as atividades metabólicas destes se destacaram em relação aos demais analisados, apresentando valores de DO  $> 1,237$  com 48 h de incubação.

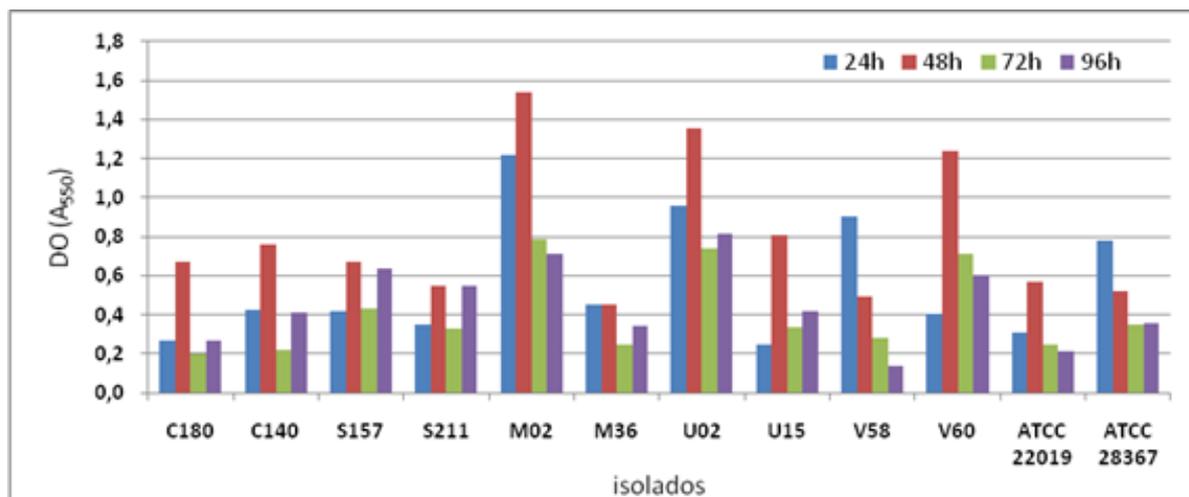


Figura 4. Avaliação da atividade metabólica de biofilmes formados por isolados de *Candida sp.* em diferentes intervalos de tempo (horas), através da leitura de DO ( $\lambda = 550$  nm).

Tabela 1. Valores de CIMP (células planquitônicas), CIMS<sub>50</sub> e CIMS<sub>80</sub> (biofilme) de diferentes isolados de *Candida sp.* para fluconazol e itraconazol.

Resultados ( $\mu\text{g/mL}$ )						
Amostras	Fluconazol			Itraconazol		
	CIMP	CIMS <sub>50</sub>	CIMS <sub>80</sub>	CIMP	CIMS <sub>50</sub>	CIMS <sub>80</sub>
C140	4	1.024	>1.024	0,12	> 16	>16
C180	8	1.024	> 1.024	0,25	>16	>16
M02	4	> 1.024	> 1.024	0,5	>16	>16
M36	8	512	> 1.024	0,12	16	>16
S157	8	> 1.024	> 1.024	0,12	>16	>16
S211	8	> 1.024	> 1.024	0,06	16	>16
U02	4	16	1.024	1	>16	>16
U15	4	8	1.024	0,5	>16	>16
V58	1	8	> 1.024	0,5	8	>16
V60	2	> 1.024	>1.024	0,5	>16	>16
ATCC 22019	1	16	1.024	0,25	4	16
ATCC 28367	4	> 1.024	> 1.024	0,5	16	>16

CIMP = concentração inibitória mínima de células planquitônicas; CIMS = concentração inibitória mínima de células sésseis (biofilme).

A avaliação da atividade *in vitro* dos antifúngicos fluconazol e itraconazol sobre biofilmes de *C. albicans* mostrou que para o fluconazol os valores obtidos para CIMS50 variaram de 8 µg/mL a > 1.024 µg/mL e para CIMS80  $\geq$  1.024 µg/mL. Com itraconazol a CIMS50 variou de 4 µg/mL a > 16 µg/mL e a CIMS80  $\geq$  16 µg/mL. Estes dados revelaram um aumento da CIMS50 e CIMS80 de fluconazol para os biofilmes, em comparação aos valores obtidos para células planquitônicas. Este antifúngico apresentou CIMS50 de 8 µg/mL para os isolados clínicos U15 e V58; de 16 µg/mL para o isolado clínico U02 e *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e de 512 µg/mL para M36. Para os demais isolados os resultados foram iguais ou maiores que 1.024 µg/mL. Os valores de CIMS80 foram todos  $\geq$  1.024 µg/mL. Em relação ao itraconazol, os biofilmes formados pela maioria dos isolados apresentaram CIM50 e CIM80  $\geq$  16 µg/mL, resultados 40 vezes maiores do que o valor médio obtido para CIMP, que foi de 0,39 µg/mL. Entretanto uma redução de 50% da atividade metabólica pode ser percebida nos biofilmes dos isolados V58 e *C. parapsilosis* ATCCs, em concentrações abaixo de 16 µg/mL (tabela 1).

## 5. DISCUSSÃO

A observação de um aumento na incidência de isolados de *C. albicans* resistentes aos antifúngicos, como os derivados azólicos, pode ter como consequência um aumento na taxa de mortalidade de pacientes com candidíase, devido também a dificuldade no tratamento (MISHRA et al., 2007). Neste trabalho, a maioria dos isolados de *C. albicans* avaliados não foram resistentes ao fluconazol e itraconazol, quando submetidos ao teste de microdiluição em caldo para células planquitônicas. Apenas o isolado U02, foi resistente ao itraconazol, com CIM de 1 µg/mL. Isolados de *C. albicans* resistentes a este antifúngico foi também observado por Carrillo-Muñoz et al. (2008), que obtiveram 1% dos isolados resistente ao avaliar 100 isolados clínicos através da técnica de disco difusão. Hawser et al. (1998), ao avaliarem a suscetibilidade de *C. albicans* ao itraconazol, através de ensaio colorimétrico por redução de sais de XTT e microdiluição em caldo, encontraram valores de CIM entre 0,125 µg/mL e > 16 µg/mL. Entretanto, os isolados de *C. albicans* aqui avaliados apresentaram CIMs para itraconazol que variaram entre 0,0625 µg/mL e 1 µg/mL, resultados próximos ao menor valor obtido pelo referido autor.

Ramage et al. (2001a) ao avaliarem a suscetibilidade antifúngica de isolados de *C. albicans* ao fluconazol, mostraram CIMs que variaram de 0,25 a 16 µg/mL, semelhantes aos valores obtidos no presente trabalho (1 a 8 µg/mL). Valores inferiores de CIM foram

observados por Kuhn et al. (2002a) entre 0,25 a 1µg/mL. Os valores de atividade antifúngica obtidos para células planquitônicas, demonstram a eficácia do fluconazol no tratamento das infecções por *Candida*.

No estudo de cinética de formação, a maioria dos biofilmes produzidos pelos isolados de *Candida* apresentaram aumento da atividade metabólica até 48 h de crescimento e posterior decréscimo. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Hawser e Douglas (1994) em experimento utilizando superfície de cateter, no qual observaram um crescimento máximo dos biofilmes de *C. albicans* até 48 h, com posterior declínio. Tal fato pode ser explicado devido à diminuição do oxigênio e dos nutrientes disponíveis no interior do biofilme. Acredita-se que a limitação de nutrientes no biofilme maduro possa levar à dispersão, mediada por comunicação intercelular, de células-filhas menos aderidas à matriz do biofilme (UPPULURI et al., 2010).

A variabilidade intra e interespecífica em relação à capacidade de formação de biofilme por espécies de *Candida* são observadas em alguns estudos (VALENTÍN et al., 2007). Hasan et al. (2009) ao compararam a produção de biofilme entre espécies de *Candida*, isoladas de pacientes com candidemia, com *C. albicans* isoladas de lesões orofaríngeas de pacientes com AIDS, observaram que a formação de biofilme variou significativamente entre espécies e entre isolados de *C. albicans*. No presente trabalho, todos os isolados avaliados mostraram capacidade de formar biofilmes, sendo observadas diferenças entre os isolados em cada um dos intervalos de incubação. Os isolados de *C. albicans* U02, M02 e V60 se destacaram quanto à atividade metabólica observada, principalmente, com 48 h de crescimento.

A resistência a alguns antifúngicos utilizados na terapia da candidíase está entre os fatores que contribuem para alta patogenicidade de *Candida*. Esta característica pode ser detectada através da realização dos testes de suscetibilidade *in vitro* (CHANDRA et al., 2001a; RAMAGE et al., 2001a). A técnica de microdiluição em caldo é adequada para avaliar a concentração mínima do fármaco capaz de inibir o crescimento do fungo (CIM), se mostrando uma ferramenta importante para evitar o uso de uma terapia inadequada, em casos de resistência. Entretanto, os resultados produzidos por esta técnica não levam em consideração a resistência intrínseca exibida por culturas de células sésseis (biofilme), não havendo um método padronizado para tal avaliação (RAMAGE et al., 2001b). Uma associação de métodos (PIERCE et al., 2008; HAWSER e DOUGLAS, 1994) com utilização

de placas de microtitulação de poliestireno nos permitiu uma análise semiquantitativa da atividade dos antifúngicos sobre os biofilmes, mediante ensaio colorimétrico com MTT, se apresentado como um método rápido, eficaz e reprodutível.

O teste de suscetibilidade antifúngica das células sésseis foi realizado sobre biofilmes de 48 h de crescimento, intervalo de tempo no qual a maioria dos isolados apresentou maior atividade metabólica, verificada por meio de avaliação da redução de MTT. Segundo Pierce et al. 2008, entre 24 e 48 h de incubação, biofilmes de *Candida* apresentam arquitetura tridimensional característica, na forma de comunidades multicelulares, podendo ser utilizados em testes de suscetibilidade antifúngica.

Hawser e Douglas (1995) foram os primeiros avaliaram a suscetibilidade antifúngica de anfotericina B, fluconazol, flucitocina, itraconazol e cetoconazol sobre biofilmes, utilizando discos de cateter. Os valores de CIMS80 obtidos foram muito superiores às necessárias para inibir o crescimento das células na forma planquitônica, confirmando desta forma a menor suscetibilidade de biofilme de *Candida*.

Pierce et al. (2008) em análise da suscetibilidade de biofilmes de isolados de *C. albicans* observaram valores de CIMS80  $\geq 1.024 \mu\text{g/mL}$  para fluconazol, semelhantes aos nossos, cujos resultados são 16 vezes maior que o valor considerado como resistentes de células planquitônicas. Entretanto, estes mesmos autores apresentaram valores de CIMS50  $\geq 1.024 \mu\text{g/mL}$ , enquanto que em nossa avaliação, variaram entre 8 e  $> 1.024 \mu\text{g/mL}$ .

O itraconazol não apresentou boa ação sobre os biofilmes formados por todos os isolados de *Candida sp.* Entretanto, a discussão destes resultados se torna difícil, uma vez que poucos trabalhos da atividade in vitro deste antifúngico sobre biofilmes de *Candida* são relatados.

A dificuldade no tratamento das candidíases em pacientes hospitalizados, especialmente aqueles que fazem uso de dispositivos médicos invasivos, levando a altas taxas de mortalidade, pode estar relacionada ao aumento da resistência de *C. albicans* sob a forma de biofilme, confirmados com este estudo. Assim, são necessários o desenvolvimento de novas substâncias antifúngicas capazes de agir efetivamente sobre biofilmes, assim como pesquisas de biomateriais a serem utilizados na fabricação dispositivos médicos invasivos, com características para prevenir a adesão inicial das leveduras.

## 6. CONCLUSÕES

Os antifúngicos fluconazol e itraconazol mostraram atividade *in vitro* sobre todos os isolados de *C. albicans*, sob a forma planquitônica, apenas uma (U02) foi resistente ao itraconazol. Todos os isolados de *Candida sp.* foram capazes de formar biofilme nas primeiras 24 h de incubação, sendo que a maior atividade metabólica foi observada com 48 h de crescimento, indicando um maior número de células agregadas à estrutura, nesta fase considerada de maior maturação. Os resultados de CIM que inibiram 80% (CIMS80) da atividade metabólica das células sésseis mostraram valores  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$  para itraconazol e  $\geq 1.024 \mu\text{g/mL}$  para fluconazol, demonstrando a resistência dos biofilmes a estes antifúngicos. Estes resultados confirmam a dificuldade no tratamento de infecções associadas à formação de biofilmes de *C. albicans* associados a dispositivos médicos invasivos.

## 7. REFERÊNCIAS

- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS L. J. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 48(9):3291-3297. 2004.
- BARNES, R. A. Early diagnosis of fungal infection in immunocompromised patients. **J Antimicrob Chemother.** 61(Suppl 1):i3-6. 2008.
- BERMAN, J.; SUDBERY, P. E. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nature Reviews Genetics** 3:918-930. 2002.
- BLANKENSHIP, J.R.; MITCHELL, A.P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current Opinion in Microbiology** 9:588-594. 2006.
- BORECKÁ-MELKUSOVÁ , S.; BUJDAKOVA, H. Variation of cell surface hydrophobicity and biofilm formation among genotypes of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* under antifungal treatment. **Can J Microbiol** 54:718-724. 2008.
- CALDERONE, R. A.; FRONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microb** 9:327-335. 2001.
- CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; QUINDÓS, G.; DEL VALLE O.; SANTOS, P.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P. A.; ESTIVILL, M. D.; CASALS, J. B. Activity of caspofungin and voriconazole against clinical isolates of *Candida* and other medically important yeasts by the CLSI M-44A disk diffusion method with neo-sensitabs tablets. **Chemotherapy** 54:38-42. 2008.

CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; MUCKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M. A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture and drug resistance. **Journal of Bacteriology** 183(18):5385-5394. 2001a.

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; LEIDICH, S. D.; FADDOUL, F. F.; HOYER, L. L.; DOUGLAS, L. J.; GHANNOUM, M. A. Antifungal resistance of Candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. **J Dent Res** 80(3):903-909.2001b.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard M27–A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

DOUGLAS, L. J. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. **Rev. Iberoam. Micol.** 19:139–143, 2002.

DRAGO, L.; MOMBELLI, B.; VECCHI DE; BONACCORSO, C.; FASSINA, M.C.; GISMONDO, M. R. *Candida albicans* cellular internalization: a new pathogenic factor? **Int J Antimic Agents** 16:545-547. 2000.

FREIMOSER, F. M.; JAKOB, C. A.; AEBI, M.; TUOR, U. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. **Applied and environmental Microbiology** 65(8):3727-3729. 1999.

HASAN, F.; XESS, I.; WANG, X.; JAIN, N.; FRIES, B. C. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. **Microbes Infect** 11(8-9):753-761. 2009.

HAWSER, S. P. e DOUGLAS, L. J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. **Infection and Immunity** 62(3):915-21.1994.

HAWSER, S. P. e DOUGLAS, L. J. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 39(9):2128-2131. 1995.

HAWSER, S. P.; NORRIS, H.; JESSUP, C. J.; GHANNOUM, M. A. Comparison of a 2,3-Bis(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-5-[(Phenylamino)Carbonyl]-2H-Tetrazolium Hydroxide (XTT) Colorimetric Method with the Standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards Method of Testing Clinical Yeast Isolates for Susceptibility to Antifungal Agents. **Journal of Clinical Microbiology** 36(5):1450-1452. 1998.

JIN, Y.; SAMARANAYAKE, L. P.; SAMARANAYAKE, Y.; YIP, H.K. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. **Arch Oral Biol.** 49:789–798. 2004.

KOJIC, E. M. and DAROUICHE, R.O. *Candida* infections of medical devices. **Clin. Microbiol. Rev.** 17:255–267, 2004.

KROM, B. P.; COHEN, J. B.; FESER, G. E. M.; CIHLAR, R. L. Optimized Candidal biofilm microtiter assay. **J Microb Meth.** 68: 421–423. 2007.

KUHN, D. M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infection and Immunity** 70(2):878-888. 2002a.

KUHN, D. M.; GEORGE, H.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: Unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 46(6):1773-1780. 2002b.

KUMAMOTO, C.A. *Candida* biofilms. **Current Opinion in Microbiology** 5:608-611.2002.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. *The Yeast, a Taxonomic Study*, 4th ed., Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokio, 420 pp. 1998.

MISHRA, N. N.; PRASAD, T.; SHARMA, N.; PAYASI, A.; PRASAD, R.; GUPTA, D. K.; SINGH, R. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica** 54(3):201-235. 2007.

MOLERO, G.; DÍEZ-OREJAS, R.; NAVARRO-GARCIA, F.; MONTEOLIVA L, P.L.A. J.; GIL, C.; SÁNCHEZ-PÉREZ, M.; NOMBELA. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. **Internatl Microbiol.** 1:95-106. 1998.

MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; GHANNOUM, M. A. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. **Infect Immun.** 71: 4333–40. 2003.

PÉRMAN, J.; CANTÓN, E.; VALENTIN, A. Actividad de la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida*. **Ver Iberoam Micol** 25:124-128. 2008.

PIERCE, C. G.; UPPULURI, P.; TRISTAN, A. R.; WORMLEY, J. R. F. L.; MOWAT, E.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature protocols** 3(9):1494-1500. 2008.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S.P.; THOMAS, D.P. LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* biofilms: na update. **Eukaryotic Cell.** 4(4):633-638. 2005.

- RAMAGE, G.; WALLE, K.V.; WICKES, B. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 45(9):2475-2479. 2001a.
- RAMAGE, G.; WALLE, K. V.; WICKES, B. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Rev Iberoam Micol.** 18:163-170. 2001b.
- SOLL, D. R. *Candida* Biofilms: Is Adhesion Sexy? **Current Biology** 18(16): 717-720. 2008.
- SENEVIRATNE, C. J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Dis.** 14:582-590, 2008.
- SILVA, W. J. D. A.; SENEVIRATNE, J.; PARAGHITIYAWA, N.; ROSA, E. A. R.; SAMARANAYAKE, L. P.; DEL CURY, A. A. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. **Braz Dent J** 19(4):364-369. 2008.
- UPPULURI, P.; CHATURVEDI, A. K.; SRINIVASAN, A.; BANERJEE, M.; RAMASUBRAMANIAM, A. K.; KÖHLER, J. R.; KADOSH, D.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental Cycle. **Plos Pathogens** 6(3):1-13. 2010.
- VALENTÍN, A.; CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; QUINDÓS, G. Actividad in vitro de la anfotericina B y la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. **Ver Iberoam Micol** 24:272-277. 2007.
- VINITHA, M.; BALLAL, M. Biofilm as virulence marker in *Candida* isolated from blood. **World Journal of Medical Sciences** 2(1):46-48, 2007.
- WARNOCK, D. W. Trends in the Epidemiology of Invasive Fungal Infections. **Jpn. J. Med. Mycol.** Vol. 48, 1-12, 2007.
- WYNN, R. L.; JABRA-RIZK, M. A.; MEILLER, T. F. Fungal drug resistance, biofilms, and new antifungals. **Gen Dent.** 51:94-8. 2003.