



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Departamento de Micologia
Mestrado em Biologia de Fungos

MELLYNA CHAVES LEITE

**FORMAÇÃO DE BIOFILME POR LEVEDURAS EMERGENTES:
DESENVOLVIMENTO, ARQUITETURA E RESPOSTA AO
TRATAMENTO**

Recife
2016

MELYNA CHAVES LEITE

**FORMAÇÃO DE BIOFILME POR LEVEDURAS EMERGENTES:
DESENVOLVIMENTO, ARQUITETURA E RESPOSTA AO
TRATAMENTO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Orientador: Profa. Dra. Rejane Pereira Neves.

Recife
2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Leite, Melyna Chaves

Formação de biofilme por leveduras emergentes: desenvolvimento, arquitetura e reposta ao tratamento / Melyna Chaves Leite. – Recife: O Autor, 2016.

70 f.: il.

Orientadora: Rejane Pereira Neves

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, 2016.

Inclui referências

1. Fungos 2. Leveduras (Fungos) 3. Micologia médica I. Neves, Rejane Pereira (orient.) II. Título.

616.969

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-175

MELYN CHAVES LEITE

**FORMAÇÃO DE BIOFILME POR LEVEDURAS EMERGENTES:
DESENVOLVIMENTO, ARQUITETURA E RESPOSTA AO
TRATAMENTO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Defendida e Aprovada em: 24/02/2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Rejane Pereira Neves/Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo/Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Carolina Maria da Silva/ Universidade Federal de Pernambuco

À Deus e aos meus pais, por seu amor e dedicação incondicional sempre me motivando a lutar pelos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por permitir mais essa conquista em minha vida.

À Universidade Federal de Pernambuco, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida, ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), ao Centro de Pesquisas Ageu Magalhães e ao Laboratório de Micologia Médica pela infraestrutura disponibilizada para realização dos experimentos.

Agradeço aos meus pais, Ivete e Melício, que sempre fizeram de tudo para que eu conquistasse meus objetivos, me incentivando e acreditando em minha capacidade, até quando eu mesma duvidei. A minha irmã Melyssa e ao meu noivo João Bosco, pelo apoio e incentivo e por sempre me apoiarem em tudo.

Agradeço a minha orientadora Profa. Rejane Neves, pela oportunidade, apoio e confiança em mim depositada e por sempre contribuir para o aperfeiçoamento do meu perfil profissional.

Aos professores Oliane Magalhães, Danielle Macêdo e Reginaldo Gonçalves por me aconselharem e estarem dispostos sempre a me ajudar e ao professor Armando Marsden por todos os ensinamentos transmitidos na prática laboratorial.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus amigos do Laboratório de Micologia Médica, Franz de Assis, Michellângelo Nunes, Pamella Ximenes, Ana Paula Rocha, Daniela Buonafina, Ildnay Brandão pela ajuda nos experimentos, momentos de descontração, de desabafos, por estarem sempre ao meu lado. Vocês fazem parte da minha família e sei que posso sempre contar com vocês. Agradeço também a Rair Quirino, Ana Emília, Fabíola Cahú, André Ferraz, Carolina Maria e Ana Maria Rabelo pela parceria e colaboração durante toda a minha trajetória no laboratório. Foi um prazer imenso fazer parte da família Micologia Médica.

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre
ombros de gigantes”

Isaac Newton

RESUMO

As infecções fúngicas invasivas causadas por leveduras representam causa frequente de óbito, especialmente em pacientes de Unidades de Terapia Intensiva. Apesar de *Candida albicans* ser a mais comum, espécies emergentes de *Candida*, tem surgido como importante causa de infecções graves, além de se mostrarem resistentes aos tratamentos. Dentre as mais importantes causas desta infecção, destaca-se a formação de biofilme. O biofilme, conjunto de microrganismos envolvidos numa matriz polimérica extracelular de carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, pode se aderir a tecido vivo e superfície inerte como os dispositivos médicos. Deste modo, conduz importantes repercussões clínicas, uma vez que vem sendo verificado aumento da resistência à terapia antifúngica e da habilidade das células em resistir às defesas do sistema imune. Assim, o objetivo da pesquisa foi avaliar leveduras emergentes quanto à formação de biofilme analisando arquitetura e resposta antifúngica. Foram analisadas 15 leveduras emergentes provenientes de amostras clínicas e estocadas na Micoteca URM, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. As culturas foram autenticadas por características morfofisiológicas e proteômica/MALDI-TOF MS. A avaliação do biofilme foi por redução do XTT (quantitativo) e então, selecionados quanto a maior capacidade de formação. A arquitetura foi avaliada em discos de cateteres, analisados em 24 e 48 horas por microscopia de varredura. Foram realizados tratamento anti-biofilme com anfotericina B e fluconazol seguindo o protocolo do M27-A3 baseado em testes de sensibilidade com células planctônicas. As leveduras testadas formaram biofilme, destacando-se o isolado clínico de *C. ciferri* do qual, não há relatos quanto a este potencial de virulência. Na sensibilidade antifúngica, houve mudança no perfil entre células planctônicas e as agregadas, as quais se mostram mais resistente. Diante do alto potencial de virulência verificado nos isolados, é necessário a busca por novas substâncias como futura alternativa terapêutica de candidíase invasiva.

Palavras-chave: Leveduras emergentes. Arquitetura do biofilme. Resistência fúngica. Tratamento anti-biofilme.

ABSTRACT

Invasive fungal infections caused by yeast are a frequent cause of death, especially in patients of Intensive Care Units. Although *Candida albicans* is the most common, emerging species of *Candida*, it has emerged as a major cause of serious infections, in addition to being resistant to treatments. Among the most important causes of this infection is the biofilm formation. Biofilm, a collection of microorganisms involved in an extracellular polymeric matrix of carbohydrates, proteins and nucleic acids, can adhere to living tissue and inert surfaces such as medical devices. Thus, it has important clinical repercussions, since it has been verified increased resistance to antifungal therapy and the ability of cells to resist immune system defenses. Thus, the objective of the research was to evaluate emerging yeasts regarding biofilm formation analyzing architecture and antifungal response. Fifteen emerging yeasts from clinical samples and stored at the URM Micoteca, Federal University of Pernambuco, Brazil, were analyzed. The cultures were authenticated by morphological and proteomic characteristics / MALDI-TOF MS. The evaluation of the biofilm was by reduction of the XTT (quantitative) and then, selected for the greater capacity of formation. The architecture was evaluated in catheter discs, analyzed in 24 and 48 hours by scanning microscopy. Antibiofilm treatment with amphotericin B and fluconazole following the M27-A3 protocol based on sensitivity tests with planktonic cells was performed. The yeasts tested formed a biofilm, with a clinical isolate of *C. ciferri*, of which there are no reports of this virulence potential. In the antifungal sensitivity, there was a change in the profile between planktonic cells and aggregates, which are more resistant. In view of the high potential of virulence in isolates, it is necessary to search for new substances as a future therapeutic alternative for invasive candidiasis.

Keywords: Emerging yeasts. Biofilm architecture. Fungal resistance. Anti-biofilm treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICO 1	Formação de biofilmes por leveduras emergentes em 24h e 48h	40
GRÁFICO 2	Formação de biofilmes por isolados de <i>Candida haemulonii</i> em 24 e 48h	41
GRÁFICO 3	Formação de biofilmes por isolados de <i>Candida pelliculosa</i> em 24 e 48h	42
GRÁFICO 4	Formação de biofilmes por isolados de <i>Candida lusitaniae</i> em 24 e 48h	42
GRÁFICO 5	Formação de biofilmes por isolados de <i>Candida guilliermondii</i> em 24 e 48h	43
GRÁFICO 6	Perfil de produção de biofilme por leveduras emergentes no período de 24 e 48h	43
FIGURA 1	Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme formado pelo Isolado 63MM <i>Candida guilliermondii</i> em 24 e 48horas	45
FIGURA 2	Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme formado pelo Isolado 6346URM <i>Candida pelliculosa</i> em 24 e 48horas	45
FIGURA 3	Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme formado pelo Isolado 1812MM <i>Candida lusitaniae</i> em 24 e 48horas	46
FIGURA 4	Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme formado pelo Isolado 02MM – <i>Candida ciferri</i> em 24 e 48horas	47
FIGURA 5	Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme formado pelo Isolado 123MM - <i>Candida haemulonii</i> em 24 e 48horas	47
FIGURA 6	Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme formado pelo Isolado 05MM – <i>Candida famata</i> em 24 e 48horas	48
FIGURA 7	Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme formado pelo Isolado ATCC90028 - <i>Candida albicans</i> em 24 e 48horas	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Isolados clínicos de leveduras emergentes obtidos da Micoteca URM da UFPE	39
TABELA 2	Perfil de sensibilidade antifúngica de isolados de leveduras emergentes frente à antifúngicos comerciais	51
TABELA 3	Perfil de sensibilidade antifúngica de biofilmes formados por isolados de leveduras emergentes frente à antifúngicos comerciais	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetil sulfóxido
LB	Luria-Bertani
MALDI TOF-MS	Espectometria de massa por tempo de voo
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NCCLS	Comitê Nacional de Estandarização do Laboratório Clínico
PBS	Tampão Fosfato Salino
SDA	Sabouraud dextrose Agar
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]- 2 <i>H</i> - hidróxido de tetrazolium
YEPD	Meio dextrose peptona extrato de levedura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 INFECÇÕES FÚNGICAS NOSOCOMIAIS EMERGENTES	15
2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>CANDIDA</i>	18
2.2.1 Aderência	18
2.2.2 Biofilmes	20
2.3 TERAPIA ANTIFÚNGICA	23
2.3.1 Polienos	24
2.3.2 Azólicos	25
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	29
4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS ESTOCADOS NA MICOTECA URM	29
4.2 AUTENTICAÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS EMERGENTES	29
4.3 TESTES PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME	32
4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	34
4.5 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA	35
4.6 TRATAMENTO DOS BIOFILMES COM AGENTES ANTIFÚNGICOS-PADRÃO	37
5 ANÁLISE DOS RESULTADOS	38
5.1 OBTENÇÃO E AUTENTICAÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS ESTOCADOS NA MICOTECA URM	38
5.2 TESTE PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME	39
5.3 SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA	50
5.4 TRATAMENTO DOS BIOFILMES COM AGENTES ANTIFÚNGICOS-PADRÃO	52
6 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

As leveduras são fungos que embora apresentem predominantemente células individuais, algumas espécies podem ainda formar hifas. Tais mudanças morfológicas estão relacionadas a características de virulência e patogenicidade, as quais parecem ter estratégias distintas de infectividade (SIMITSOPOULOU *et al.*, 2016). No espectro das leveduras, espécies de *Candida* são as mais associadas com infecções, sobretudo invasivas, as quais tem se tornado crescente nos últimos anos. Este fato tem sido atribuído ao aumento do número de pacientes imunocomprometidos, uso de dispositivos médicos invasivos e o tratamento profilático com antifúngicos (PAPAS, 2012, HOLLAND *et al.*, 2014).

Adicionalmente, *C. albicans* ainda permanece como a espécie mais envolvida nos quadros clínicos graves, contudo, espécies de leveduras emergentes têm surgido como agentes frequentes de candidemia com altos índices de mortalidade (CISTERNA *et al.*, 2010, ARENDRUP, 2013). Entendem-se como emergentes os microrganismos relacionados a processos infecciosos, de forma infrequente, incomum (ANTAS, *et al.*, 2012). Dentre o largo espectro de infecções por leveduras emergentes, a candidemia nosocomial assume um papel de destaque, sendo assim mais frequentes e de intensa refratariedade aos tratamentos. Assim, espécies incomuns de *Candida* associadas a infecções tornam-se cada vez mais diversificadas, a partir do surgimento das espécies emergentes *C. pelliculosa*, *C. haemulonii*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. famata* e *C. ciferrii*, entre outras, cujas pesquisas incluindo os fatores de virulência ainda são escassas (MICELI, *et al.*, 2011; SILVA, *et al.*, 2012; SHIN, *et al.*, 2012; CANTÓN, *et al.*, 2013).

Ademais, nas infecções por *Candida* devem ser considerados os fatores predisponentes, relacionados ao hospedeiro, além do potencial de virulência e patogenicidade das espécies envolvidas. De acordo com CHOW, *et al.* (2008) e MAYER, *et al.* (2013), a aquisição de uma infecção da corrente sanguínea por espécies de *Candida* está associada com vários fatores de risco tais como, permanência prolongada em Unidades de Terapia Intensiva, uso de antibioticoterapia de amplo espectro, corticoidoterapia e doenças imunossupressoras. No entanto, o uso de dispositivos médico-invasivos como cateter venoso central e periférico e sondas representa o fator de risco mais proeminente para o desenvolvimento dessa infecção (TUMBARELLO, *et al.*, 2007).

Entre as espécies de *Candida*, os fatores de virulência variam de forma intrínseca às espécies e, assim, são de extrema relevância no binômio parasita-hospedeiro para que a

infecção fúngica, no caso em particular a candidíase, se estabeleça. É possível que características fenotípicas e genotípicas expressas de maneira peculiar por espécies frequentes, a exemplo de *C. albicans* também estejam fortemente envolvidas no processo patogênico das leveduras emergentes. Desta forma, a detecção de moléculas como adesinas, diferenciação de hifas, produção de enzimas e composição de biofilmes são decisivos no processo infeccioso por estas leveduras (FELDMAN, *et al.*, 2014).

Descrito como importante causa de infecções e altamente resistentes aos tratamentos, o biofilme pode ser definido como um conjunto de um ou mais microrganismos envolvidos numa matriz polimérica extracelular rica em carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, aderido tanto a um tecido vivo como a uma superfície inerte, no qual apresentam características fenotípicas que diferem de suas células planctônicas (TOBUDIC, *et al.*, 2012). A formação dessa comunidade microbiana ocorre em um processo sequencial que, segundo TOBUDIC *et al.* (2012) e FANNING, *et al.* (2012) progride em três fases de desenvolvimento: fase inicial, que envolve aderência a um substrato e adesão intercelular, fase intermediária, em que ocorre proliferação de células e aumento da população do patógeno e maturação, em que há a indução da formação de estruturas invasivas.

O biofilme por *Candida* traz importantes repercussões clínicas, uma vez que vem sendo verificado um aumento da resistência à terapia antifúngica e a habilidade das células dentro de biofilmes de resistir às defesas do sistema imune do hospedeiro (PANNANUSORN *et al.*, 2013). Neste contexto, ainda são insuficientes as pesquisas que busquem o melhor conhecimento dos agentes etiológicos emergentes no que concerne ao potencial patogênico e mecanismos para promoção dos danos que frequentemente culminam com a morte dos acometidos, sendo capazes de deteriorar a saúde dos indivíduos acometidos, com desfecho desfavorável. Ademais, o conhecimento da estrutura dos biofilmes nestes agentes etiológicos incomuns e o estudo de terapias antibiofilmes eficazes poderão apoiar a conduta terapêutica e instituição do antifúngico ideal.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 INFECÇÕES FÚNGICAS NOSOCOMIAIS EMERGENTES

Infecções hospitalares ou nosocomiais correspondem às doenças causadas por microrganismos adquiridas por pacientes ou mesmo profissionais de saúde no ambiente hospitalar, constituindo uma causa crescente de morbidade e mortalidade em hospitais de todo o mundo (OLIVEIRA, *et al.*, 2010). Um elevado número dessas infecções é de origem endógena e outras podem também ser adquiridas por via exógena, pelas mãos de profissionais da área da saúde, infusos contaminados, dispositivos invasivos e fontes inanimadas ambientais (AHMED, *et al.*, 2014). No Brasil, estima-se que as infecções hospitalares sejam responsáveis por cerca de 45.000 óbitos e por prejuízos da ordem de bilhões de reais anualmente (HAN *et al.*, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2012; PAPAS, 2012; GAMALETSOU *et al.*, 2014).

As infecções nosocomiais são apontadas como um dos mais importantes riscos aos pacientes hospitalizados (COLOMBO, *et al.*, 2014). Os pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) abrangem um pequeno subgrupo dos pacientes hospitalizados, representando apenas de 5 a 10% do total, mas contribuem com mais de 20% dos episódios de infecção hospitalar (LIMA, *et al.*, 2007).

Em um estudo realizado no México, PONCE DE LEON *et al.* (2000) verificaram que 58% dos pacientes internados em UTIs estavam infectados por microrganismos sendo a taxa de mortalidade de 22%. Ainda, em um estudo realizado por KLEVENS *et al.* (2002), foi observado que aproximadamente, ocorrem nos Estados Unidos aproximadamente 1,7 milhões de casos com 98.987 óbitos e no Canadá, Israel e em seis países europeus um percentual de 20,6% foi detectado, sendo a mortalidade quatro vezes maior que no grupo sem infecção (ALBERTI *et al.*, 2002).

Evidentemente, são os procedimentos invasivos e os protocolos de tratamento com imunossupressores realizados no ambiente hospitalar, que têm tornado os indivíduos susceptíveis aos patógenos nosocomiais (DELALOYE; CALANDRA, 2014). Assim, como consequência do comprometimento dos mecanismos de defesa dos hospedeiros hospitalizados, estes microrganismos passaram a se comportar como oportunistas, sendo capazes de causar quadros infecciosos de alta letalidade (PAUW & PICAZO, 2008).

Ademais, a incidência de infecções hospitalares de etiologia fúngica tem aumentado consideravelmente nos últimos anos e vem acarretando altos índices de mortalidade que

atingem até 50% dos óbitos, principalmente em pacientes graves internados em Unidades de Terapia Intensiva (BASSETI, *et al.*, 2004). Dentre estas infecções, as causadas por leveduras têm se destacado nas últimas décadas como uma crescente causa de morbidade e mortalidade principalmente devido ao elevado número de pacientes imunocomprometidos (ANTAS, *et al.*, 2012).

De acordo com PFFALER e DIEKEMA (2007) a incidência de infecções invasivas nos Estados Unidos por espécies de *Candida* e *Aspergillus* é de 72.228 e 1.234 por milhão de habitantes, respectivamente. No entanto, RICHARDSON e LASS-FLÖRL (2008) enfatizam que o perfil epidemiológico dessas doenças tem mudado a cada ano, se tornando crescente o isolamento de espécies emergentes, sobretudo agentes de leveduroses.

Apesar de *C. albicans* ser considerada a causa mais comum de tais infecções fúngicas invasivas nosocomiais, o crescente número de novas espécies de *Candida* não *C. albicans* tem surgido como importante fonte de infecções graves. Segundo HORN, *et al.* (2009), 54,4% dos casos de candidemia são causados por espécies de *Candida* não *C. albicans*, assim, outras leveduras menos comuns têm sido associadas com infecções que ameaçam a vida de hospedeiros imunocomprometidos (KULLBERG; ARENDRUP, 2015).

Em uma pesquisa realizada nos Estados Unidos, BENJAMIN *et al.* (2010) diagnosticaram 137 casos de candidemia em recém-nascidos, dentre os agentes etiológicos foram identificados *C. albicans* (87), *C. parapsilosis* (41), *C. glabrata* (5), *C. lusitaniae* (1), *C. tropicalis* (1), *C. guilliermondii* (1).

Apoiando estas informações os dados do Antimicrobial Surveillance Program-Fungal Objective - SENTRY com divulgação acerca das infecções da corrente sanguínea, apontam um percentual de 4,5% dos 348 episódios avaliados em 10 centros na América Latina tendo como causa espécies incomuns incluindo *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. pelliculosa*, *C. famata*, *C. lipolytica*, *C. lambica*, *C. utilis*, *C. haemulonii* e *C. inconspicua*. No entanto, as causas e mecanismos envolvidos não foram determinados (PFALLER, *et al.*, 2011).

MICELI, *et al.* (2011) em um artigo de revisão, relatam que em todo mundo tem sido descrito um aumento na prevalência de infecções fúngicas causadas por espécies de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, assim como espécies raras, consideradas emergentes, como *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa*, *C. kefyr*, *C. rugosa* e *C. famata*.

Descreve-se como emergentes espécies incomuns de um microrganismo tidas até o momento como não usuais, mas que passaram a causar infecções e de forma grave (ANTAS, *et al.*, 2012). Segundo MORSE (1995), o termo “infecções emergentes” pode ser utilizado

para denominar uma infecção que surgiu recentemente na população ou que está rapidamente aumentando sua incidência.

PFALLER, *et al.* (2007) destacaram em um estudo a alta prevalência de infecções causadas por *C. guilliermondii* e *C. rugosa* na América Latina, e *C. inconspicua* e *C. norvogensis* na Europa Oriental, enquanto que a incidência de *C. kefyr* foi notável em surtos de enfermarias hematológicas.

SILVA, *et al.* (2013) relataram cinco casos de candidemia em neonatos internos em UTI no período de abril a junho de 2010 causados por *C. pelliculosa*, os quais apresentavam origem clonal e perfil de sensibilidade aos antifúngicos convencionais variados.

Outra espécie considerada emergente, que tem surgido como agente etiológico de candidíase é a *C. ciferri*. Esta espécie foi citada por RAMOS, *et al.* (2015), os quais isolaram de pacientes com lesões cutâneas, cinco isolados (correspondendo a 8,62%) desta espécie, além de outras espécies emergentes como *C. famata* (18,96%), *C. haemulonii* (12,06%), *C. guilliermondii* (6,90%) e *C. lipolytica* (5,17%). Os autores também avaliaram a capacidade de produção de enzimas por estas espécies, sendo considerados fatores de virulência.

De acordo com PFALLER e DIEKEMA (2004), outra espécie emergente é a *C. guilliermondii* que os autores encontraram como agente de infecções hematogênicas disseminadas e que demonstrou resistência a anfotericina B e maior resistência quando comparado a outras espécies do mesmo gênero. Do mesmo modo, COLOMBO *et al.* (2006), afirmam que em um estudo envolvendo 11 instituições brasileiras, *C. guilliermondii* representou 2,4% dos 712 casos de candidemia diagnosticados.

A alta incidência destas espécies consideradas emergentes está diretamente relacionada à condição de base do paciente e ao estado imunológico do mesmo. Assim, podem ser citados como fatores de risco para o desenvolvimento destas infecções invasivas a condição de base do hospedeiro, prematuridade, uso prolongado de antibióticos de amplo espectro, corticosteróides, tratamento quimioterápicos, nutrição parenteral, uso de dispositivos médico invasivos como cateteres e sondas além de transplantes (CHABASSE, *et al.*, 2009; ANTAS, *et al.*, 2012).

RUIZ *et al.* (2015) ao analisarem os fatores de risco associados a candidemia em pacientes críticos não neutropênicos na Colômbia, destacam como fatores importantes para o desenvolvimento da infecção a estadia hospitalar superior a 25 dias ou mais de 14 dias na UTI e o uso de antibióticos de largo espectro, principalmente meropenem, amplamente utilizado na profilaxia de cirurgia abdominal e hemodiálise.

KLIASOVA, *et al.* (2015) em um período de oito anos, diagnosticaram em 55 pacientes com linfomas e leucemia aguda, candidemia causadas por algumas espécies incomuns de *Candida*, como *C. guilliermondii* (11%), *C. lusitaniae* (6%), *C. glabrata* (3%), *C. famata* (3%), *C. pelliculosa* (3%) e *C. kefyr* (2%), além das espécies mais comuns como *C. albicans* (38%), *C. parapsilosis* (17%), *C. krusei* (11%) e *C. tropicalis* (6%). Ainda, os autores observaram uma maior taxa de recuperação após a administração de antifúngicos no primeiro dia após o diagnóstico micológico e remoção de cateteres.

Em um estudo realizado no Hospital Universitário de Tlemcen (Argélia), foram isolados de cateteres venosos periféricos 19% de leveduras do gênero *Candida*, entre elas, *C. parapsilosis* (60%), *C. albicans* (20%), *C. glabrata* (14.3%) e *C. famata* (5.7%). As quais apresentaram concentrações inibitórias mínimas entre 0.5 e 2 µg/mL para anfotericina B e 0,125 e 2 µg/mL para caspofungina. Ainda, além dos fatores predisponentes relacionados ao hospedeiro, os fatores de virulência dos microrganismos possuem um papel fundamental no estabelecimento da infecção fúngica como afirmam vários autores incluindo SEGHIR, *et al.* (2014).

2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA*

2.2.1 Aderência

A patogenicidade das leveduras do gênero *Candida* envolve mecanismos complexos ainda não totalmente esclarecidos. O que já está bem estabelecido, é que um patógeno deve apresentar alguns fatores de virulência para que a infecção se estabeleça no hospedeiro.

O primeiro evento para o estabelecimento da doença por leveduras do gênero *Candida* é a aderência deste microrganismo à células do hospedeiro ou outro tipo de superfície. Dessa forma, a etapa de adesão é extremamente importante para o processo infeccioso (SILVA *et al.*, 2011). Segundo CALDERONE e GOW *et al.* (2002), a adesão do microrganismo à superfície da mucosa do hospedeiro é um pré-requisito para a instalação de uma infecção e também pode servir como reservatório para a disseminação de infecções fúngicas.

De acordo com CALDERONI e FONZI (2001), a adesão parece ter papel inicial e fundamental no estabelecimento e desencadeamento do processo infeccioso. A adesão às células do hospedeiro é considerada uma propriedade de virulência essencial para o desenvolvimento da candidíase, especialmente em pacientes imunocomprometidos, sendo esta

uma característica importante de sobrevivência e/ou patogenicidade do fungo. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de adesão ao epitélio, sobretudo em espécies de *Candida* não *C. albicans*, ou cerca dos fatores que afetam este processo (HENRIQUES, AZEREDO e OLIVEIRA, 2006; MENEZES *et al.*, 2013).

CHAFFIN *et al.* (2008) relatam que a dimensão da adesão depende das propriedades microbiana, hospedeiro e de superfície abióticas, tais como a hidrofobicidade da superfície celular e a composição da parede celular.

Estudos mostram que a capacidade de aderência nas diversas espécies de *Candida* é diferente (TAMURA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2011). Este fato explica por que alguns isolados colonizam mais frequentemente superfícies mucosas do que outras (SILVA *et al.*, 2011). Adicionalmente podem ser observadas diferenças de adesão dentro de cepas da mesma espécie, pois a possibilidade de mudar o próprio fenótipo tem sido descrita em relação ao gênero *Candida* e pode modular alguns fatores de virulência, inclusive a aderência. Entretanto, os mecanismos que possibilitam esta mudança fenotípica ainda necessitam ser esclarecidos, é provável que estejam associados à riqueza de nutrientes e expressão de genes de adesinas ou de outras proteínas (COSTA, 2009; JACOBSEN *et al.*, 2012).

A maioria dos estudos descreve a aderência de *C. albicans* a células epiteliais, mas outras espécies já começam a receber a mesma atenção. Em um estudo recente, LIMA-NETO e colaboradores (2011) investigaram estas propriedades em *C. albicans* e *C. parapsilosis*, mostrando que a diferença individual entre as linhagens estava relacionada com o conteúdo da superfície celular.

Em 2013, MENEZES e colaboradores avaliaram a capacidade de aderência de 118 isolados clínicos de espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Em um total de 93 (79%) isolados foi identificada a propriedade de aderência, sendo as cepas de *C. tropicalis* as que apresentaram maiores níveis de adesão.

Além de aderir à células epiteliais do hospedeiro, algumas cepas *Candida*, apresentam a capacidade de aderirem à superfícies inertes como sondas e cateteres e este fato pode desencadear o início da formação de biofilme, acarretando agravamento do estado clínico do paciente (DOUGLAS, 2003; MICELI *et al.*, 2011). Assim, a compreensão dos mecanismos que envolvem a formação de biofilme é a etapa inicial para a determinação de sua função e, conseqüentemente, de seu impacto econômico na saúde (HUQ *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2011).

2.2.2 Biofilmes

Nas últimas décadas, bacteriologistas e, mais recentemente, micologistas têm observado que os microrganismos praticamente não existem na sua forma livre ou planctônica nos tecidos do hospedeiro, mas se agrupam formando uma comunidade multicelular e plural.

Essas comunidades foram descritas primeiramente por Anthony van Leeuwenhoek em 1684 ao observar um grande acúmulo de microrganismos em sua placa dental. Já no final da década de 20, vários artigos descreveram filmes microbianos ou camadas de lodo, no entanto pesquisadores alemães utilizavam o termo "*manto de suidade*". Como as propriedades observadas em células microbianas aderidas a superfícies são únicas, quando comparadas a microrganismos em forma planctônica, o emprego do termo "Biofilme" tornou-se útil para descrevê-lo. O uso mais antigo de "*biofilme*" na publicação está na revista sueca Vatten: Harremoës, p. 1977. "Half-order reactions in biofilm and filter kinetics". Vatten, 33 122-143 (CHANDKI *et al.*, 2011; MSU, 2014).

O biofilme, assim denominado, é constituído por um conjunto de microrganismos distintos que convivem em associação sob uma matriz polissacarídica rica em canais em toda a sua extensão que permitem a passagem de nutrientes e oxigênio. Essa estrutura confere proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e entrada de antimicrobianos, dificultando assim a difusão dos fármacos nos tecidos. Além disso, facilita o processo de adesão e colonização das cepas constituintes sobre o hospedeiro ou sobre diferentes dispositivos médicos implantáveis como próteses, sondas e cateteres (RAMAGE *et al.*, 2012; DOUGLAS, 2003; RAMAGE *et al.*, 2009; GIOLO & SVIDZINSKI, 2010).

Em situações em que há o uso de sonda vesical em pacientes graves, acredita-se que estes tornam-se mais susceptíveis às infecções por microrganismos oportunistas, sobretudo leveduras (MATTEDE, *et al.*, 2015).

Historicamente, a *C. albicans* é descrita como o principal patógeno com habilidade para aderir e formar biofilme e tem sido extensivamente estudada, sendo considerada a terceira principal causa de infecções intravasculares relacionadas a cateteres (DOUGLAS, 2003; RAMAGE *et al.*, 2009). O modelo para formação e desenvolvimento de biofilme para a *C. albicans* apresenta várias semelhanças com o modelo bacteriano (DOUGLAS, 2003; HARDING *et al.*, 2009), e de acordo com estes autores, este modelo abrange cinco etapas distintas de desenvolvimento: adsorção das células de leveduras em uma superfície, aderência à superfície, formação de microcolônias de leveduras e um estímulo inicial para o crescimento de hifas, seguida pela formação de microcolônias na camada superior predominantemente de

hifas, e na produção de matriz extracelular que compõe estas microcolônias, maturação do biofilme e dispersão das células do biofilme maduro.

Os biofilmes maduros, com um crescimento de 24 a 48 horas, consistem em uma rede densa de células sob a forma de leveduras, de hifas e pseudo-hifas, além da presença facultativa de bactérias (DOUGLAS, 2004).

A matriz é uma das características mais distintivas de biofilmes microbianos. Possui aspecto tridimensional e altamente hidratado. Em geral a matriz do biofilme compreende hidratos de carbono, proteínas, fósforo e hexosaminas, no entanto, fatores ambientais como composição e pH do meio, disponibilidade de oxigênio, bem como a linhagem de fungos podem afetar a formação e composição da matriz, a exemplo dos biofilmes de *C. parapsilosis* contêm grandes quantidades de hidratos de carbono e apresentam baixo teor de proteínas, quando comparado com agregados de *C. glabrata* e *C. tropicalis* (SILVA *et al.*, 2009a; SILVA *et al.*, 2011).

A formação destes agregados de micro-organismo sobre os dispositivos médicos representa um grave problema na medicina. Nas últimas décadas, a incidência de infecções microbianas correlacionadas com a formação de biofilme chega a 65% dos casos. Alguns estudos têm apontado que a capacidade de formação de biofilme é maior para as espécies de *Candida* não- *C. albicans* do que para espécies *C. albicans* (KUMAR e MENON, 2006).

Atualmente, diferentes espécies do gênero *Candida* tidas como emergentes têm surgido como agentes de infecções graves associadas com a formação de biofilme em dispositivos implantáveis, incluindo a *C. haemulonii*, *C. pelliculosa*, *C. famata*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* (RAMAGE *et al.*, 2009; PANNANUSORN *et al.*, 2013; OH *et al.*, 2011).

FERREIRA *et al.* (2013), relatam formação de biofilme por cepas clínicas de *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Outras espécies também foram descritas como produtoras deste fator de virulência, como descrito por AL-AKEEL *et al.* (2013), dificultando o tratamento destes isolados menos frequentes, porém com maior refratariedade aos antifúngicos.

MALM *et al.* (2010), verificaram a capacidade de *C. famata* se desenvolver em lâminas de vidro isso ocorreu após 24 h de incubação e após 72 h já havia formação de biofilme maduro. Segundo MOHAMMADI *et al.* (2012) deve ser considerada a atuação do biofilme como um reservatório dos microrganismos e assim, dando condições para que haja co-infecção com outros agentes patogênicos, conduzindo a persistência da infecção e aumento da mortalidade.

Segundo VILLAR-VIDAL et al. (2011) e MAHMOUDABADI et al. (2014) a formação de biofilme pode ser detectada em vários isolados fúngicos, mas a diferença entre a capacidade de formação pode não ocorrer mesmo sendo originados de diferentes fontes. Em outro estudo NEGRINI et al (2015) verificaram também diferenças quanto a formação de biofilme entre amostras de *C. tropicalis*.

ESTIVILL et al.(2011) constataram a formação de biofilme por cinco espécies de *Candida*, sendo estas *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* em três tipos de polímeros sintéticos utilizados em dispositivos invasivos como cateteres e próteses.

Para vários autores biofilmes de *Candida* constituem um sério problema na prática clínica, sobretudo quando as infecções estão associadas a biofilme no dispositivo médico como cateter venoso central o que torna um desafio terapêutico. Desta forma, o biofilme tem um significado importante na clínica, pois se torna mais difícil de tratar, mantém o paciente a um maior tempo de internação. Ademais, o dispositivo pode conduzir não apenas a uma infecção, mas também fica prejudicada a funcionalidade do dispositivo (GHANNOUM et al., 2015).

Não há dúvidas que um dos maiores problemas associados a formação dos biofilme, é o aumento da resistência antifúngica. Vários fatores podem estar relacionados com o aumento da resistência dessa comunidade, tais como alteração da taxa de crescimento e metabolismo das células, presença de matriz extracelular com retardo da penetração da droga antifúngica, expressão de genes de resistência e ainda, a presença de células persistentes (TOBUDIC et al., 2012; SANTANA et al., 2013).

Biofilmes de *Candida* são altamente resistentes ao azólicos, não apenas ao fluconazol, mas também ao voriconazol, ravuconazol e posaconazol. Ainda, tem sido relatada que a resistência das células no interior do biofilme ao fluconazol chega a ser 1000 vezes superior quando comparada a células planctônicas (LAMFOM et al., 2004). TOBUDIC et al. (2010) descrevem a atividade reduzida da formulação de anfotericina B frente a biofilmes de *C. albicans* quando comparado à células livres.

Nesse contexto, a incidência de infecções fúngicas oportunistas tem aumentado devido a interação entre sistema imunológico do hospedeiro e fatores de virulência do micro-organismo, e em paralelo com o surgimento de cepas resistentes as terapêuticas antifúngicas (BALKIS et al., 2002).

2.3 TERAPIA ANTIFÚNGICA

Apesar de haver disponíveis no mercado agentes antifúngicos, mais ativos e menos tóxicos além do uso de profilaxia antifúngica, a candidíase continua sendo associada a altas taxas de mortalidade (KRIENGKAUYKIAT, ITO, DADWAL, 2011). Neste contexto, a resistência antifúngica é uma ameaça crescente, conduzindo a falha terapêutica e consequentemente dificuldade no combate a infecções invasivas por espécies de *Candida*. A resistência clínica frequentemente está associada a concentrações inibitórias mínimas (CIMs) elevadas, sendo as principais causas de esquema terapêutico ineficaz a utilização de doses inadequadas, interações medicamentosas e neutropenia grave (LIM *et al.*, 2012).

A crescente utilização de agentes antifúngicos para profilaxia e tratamento de micoses de forma excessiva e indiscriminada tem colaborado para o aumento cada vez mais precoce de resistência (JOHNSON, 2008).

De acordo com NUCCI e COLOMBO (2002) e REX *et al.* (2001), resistência é um conceito derivado de um fenômeno *in vitro* que, teoricamente, está associado com falhas terapêuticas, enquanto que sensibilidade tende a indicar eficácia.

Muitas das espécies de *Candida* não *C. albicans* mais comumente isoladas são menos sensíveis aos derivados azólicos, dificultando o tratamento dessas infecções. Embora a sensibilidade das leveduras do gênero *Candida* aos antifúngicos disponíveis seja variável, nem sempre uma determinada amostra isolada segue o padrão geral. Essa é uma das razões da crescente importância dos testes de sensibilidade antifúngica (CROCCO, 2004).

Os testes de sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos são realizados para avaliar o seu potencial terapêutico, comprovar a sensibilidade do fungo isolado frente aos antifúngicos e ter controle da terapia (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2000). Estes testes permitem determinar a CIM (Concentração Mínima Inibitória) tanto de leveduras como de fungos filamentosos a distintos antifúngicos como anfotericina B, fluconazol, cetoconazol, itraconazol e novos triazoles como voriconazol (MEDRANO, 2004).

A padronização das condições dos testes de sensibilidade para leveduras foi definida em 1992 pelo Comitê Nacional de Estandarização do Laboratório Clínico (NCCLS) com a publicação do documento M27-A2 (REX *et al.*, 1997), a fim de padronizar testes de sensibilidade a drogas antifúngicas, com base no método da microdiluição em caldo (REYES E CHANNOUM, 2000). Por ser o teste da microdiluição mais dispendioso e laborioso, foi proposta, em 1997, a técnica de microdiluição em caldo, por ser mais prático e menos custo.

Além da maior facilidade na sua execução, a microdiluição permite a análise de grande número de amostras, com economia (COLOMBO e ALVES, 2004).

Entre os principais grupos de antifúngicos destacam-se os polienos que promovem alterações a nível de membrana, interagindo com o ergosterol presente na célula fúngica, sendo representantes desse grupo a anfotericina B e suas formulações lipídicas e a nistatina; os azólicos que inibem a síntese do ergosterol, representados pelo cetoconazol, fluconazol, voriconazol e mais recentemente pelo posaconazol; e as equinocandinas de que fazem parte a caspofungina, anidulafungina e micafungina, atuando na parede celular fúngica (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004).

Ainda, a anfotericina B e o fluconazol são as duas drogas mais comumente utilizadas para o tratamento de infecções invasivas por leveduras do gênero *Candida*. No entanto, o uso rotineiro desses agentes antifúngicos tem promovido o desenvolvimento de espécies de *Candida* resistentes e aumentado as infecções por espécies de *Candida* não-*C. albicans* (FERREIRA *et al.*, 2012).

2.3.1 Polienos

O espectro de ação *in vitro* desta classe de antifúngicos abrange leveduras, fungos dimórficos e a maioria dos fungos filamentosos oportunistas, sobre os quais exerce um efeito fungistático ou fungicida (ODDS *et al.*, 2003; WINGARD e LEATHER, 2004). Dentre os antifúngicos poliênicos apenas a anfotericina B com suas diferentes formulações é usada para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (PARAMYTHIOTOU, *et al.*, 2014).

A anfotericina B, produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*, apresenta uma estrutura macrocíclica caracterizada por átomos de carbono dispostos de maneira bivalentes sendo inicialmente isolado em 1955 (GOLD *et al.*, 1956; MARTINEZ, 2006) e, desde então, tem sido amplamente utilizado no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas devido sua ação fungicida (BOLARD *et al.*, 1993).

A anfotericina B é considerada o padrão ouro para o tratamento de infecções invasivas por espécies de *Candida*. Esse antifúngico liga-se ao ergosterol da membrana celular fúngica, formando poros, alterando a permeabilidade e consequentemente induzindo apoptose celular (CARRILO-MUÑOZ *et al.*, 2006). No entanto, esse fármaco apresenta baixa seletividade, sendo potencialmente tóxico as células humanas, apresentando nefrotoxicidade elevada (HA *et al.*, 2011). Por esse motivo, visando à diminuição da toxicidade deste antifúngico têm sido

desenvolvidas formulações lipossomais, porém o custo destas é elevado e a penetração renal pode ser menor (ZAOUTIS *et al.*, 2005).

Apesar de ocasionar inúmeros efeitos colaterais e da introdução de antifúngicos azólicos sistêmicos, esse antifúngico é amplamente utilizado devido a raridade de espécies resistentes (AKINS, 2005) e aos quase 50 anos de experiência clínica, permanecendo como a droga de escolha no tratamento da maioria das micoses sistêmicas (DISMUKES, 2000).

Em estudos brasileiros ANTUNES *et al.* (2004) e Colombo *et al.* (2006) avaliaram a suscetibilidade de isolados de *Candida* provenientes de amostras de sangue, verificando que todos os isolados foram sensíveis a anfotericina B com CIMs < 1 µg/mL.

FAROOQI *et al.* (2013) ainda destacam a rara resistência a este fármaco, em sua pesquisa todos os isolados clínicos de *Candida* provenientes de infecções invasivas foram sensíveis a anfotericina B e ainda reforçam a confiabilidade de deste antifúngico como uma escolha empírica.

No entanto, a emergência de resistência a este fármaco começa a ter relevância clínica (ZAOUTIZ *et al.*, 2005), sendo associada a CIMs superiores a 1 µg/ml (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2007).

Alguns autores relatam a ocorrência de resistência em isolados de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* (PFALLER *et al.*, 2002), *C. lusitaniae* (CHAPMAN, 2007), *Paecilomyces lilacinus*, *Scedosporium apiospermum*, *S. prolificans*, *Aspergillus terreus*, *A. ustus*, *Sporothrix schenckii*, *Penicillium marneffe* e espécies de *Alternaria*, *Fusarium* e *Phialophora* (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2007).

PFALLER *et al.* (2002) avaliaram a resistência de isolados de *Candida*, provenientes de pacientes hospitalizados em todo o continente norte americano a anfotericina B. Detectando que *C. albicans* foi à espécie mais suscetível, com CIM de 1,0 µg/mL, seguida de cepas resistentes de *C. glabrata* (4,0 µg/mL), *C. parapsilosis* (4,0 µg/mL) e *C. krusei* (8,0 µg/mL).

2.3.2 Azólicos

Na década de 80 os antifúngicos azólicos sistêmicos foram introduzidos no mercado como drogas alternativas para o tratamento das micoses invasivas, principalmente em indivíduos debilitados, cujo tratamento com anfotericina B não era possível devido sua

toxicidade (Akins, 2005). Esses antifúngicos apresentam ação fungistática, atuando na inibição do crescimento celular (Chapman 2007).

Constituem antimicóticos químicos, de largo espectro, atuando sobre leveduras e fungos filamentosos e que apresentam um anel imidazol livre unido a outros anéis aromáticos. Estão divididos em duas classes, imidazóis e triazóis. Os imidazóis incluem miconazol e cetoconazol, enquanto que os triazóis incluem fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol (Cortés; Prada, 2012).

O Fluconazol é um derivado azólico pertencente a família dos triazóis de primeira geração, o qual no tratamento das micoses, atua sobre as enzimas do citocromo P450 dos fungos, bloqueando o desmetilação do lanosterol e a síntese de ergosterol, que altera a permeabilidade da membrana e a viabilidade dos fungos. Eles também modificam a síntese de lipídios e inativam as enzimas do processo oxidativo dos fungos (MARTINEZ, 2006). Esses fármacos, em especial fluconazol e itraconazol, são utilizados na profilaxia de pacientes com risco de desenvolverem infecções fúngicas, pois são menos tóxicos do que os poliênicos (CORTÉS; PRADA, 2012).

Uma preocupação em relação ao uso desta droga é o surgimento de resistência, principalmente entre as espécies de *Candida* não-*C. albicans* como *C. krusei* e *C. glabrata* (SABATELLI *et al.*, 2006), sendo também relatada em menor proporção a ocorrência de resistência em isolados de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (CHAPMAN, 2007).

PFALLER *et al.* (2005) afirmam que isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* apresentam sensibilidade ao fluconazol. No entanto a ocorrência de resistência em isolados de *C. tropicalis* pôde ser detectada e cepas de *C. glabrata* apresentam resistência considerável.

Nos últimos anos no EUA, Europa e América do Sul a resistência aos azólicos tem aumentado, em particular ao fluconazol. Até 2005 pouca resistência a este fármaco era relatada (PFALLER E DIEKEMA, 2007), mas dados a partir da segunda metade da década mostram um aumento significativo na resistência, sobretudo, de isolados nosocomiais (Pfaller *et al.*, 2011).

A Sociedade de Doenças Infecciosas recomenda que o tratamento inicial em pacientes com candidemia ou candidíase disseminada inclua algum derivado azólico, caspofungina, anfotericina B, ou uma combinação de fluconazol e anfotericina B nos casos recorrentes. Isso ocorre pela falta de alternativas terapêuticas com drogas mais eficientes e menos tóxicas; contudo, ainda há relatos de resistência a todos os antimicóticos comercialmente disponíveis, fato este atribuído ao uso indiscriminado, sobretudo dos azoles (PFALLER *et al.*, 2007).

Diversos estudos têm demonstrado nos últimos anos, que as leveduras do gênero *Candida* têm se tornado mais resistentes aos azólicos, um fenômeno que está associado com o elevado consumo de fluconazol na medicina (TOBUDIC et al., 2012; PFALLER, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar a capacidade de formação de biofilme por leveduras emergentes quanto à arquitetura em diferentes estágios de maturação e resposta ao tratamento com antifúngicos-padrão.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obter e revisar taxonomicamente culturas de leveduras emergentes isoladas de amostras clínicas invasivas depositadas na Micoteca URM da UFPE;
- Avaliar a capacidade de formação de biofilme quantitativamente pelas leveduras emergentes agentes de infecções fúngicas invasivas;
- Determinar os estágios de formação do biofilme através da Microscopia Eletrônica de Varredura;
- Realizar testes de susceptibilidade antifúngica das leveduras emergentes e selecionar a concentração do fármaco ideal;
- Realizar e avaliar o tratamento antibiofilme com antifúngicos-padrão.

4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS ESTOCADOS NA MICOTECA URM

Foram solicitadas 15 isolados de leveduras clínicas emergentes (*Candida famata*, *C. guilliermondii*, *C. haemulonii*, *C. lusitaniae*, *C. pelliculosa* e *C. ciferri*) depositados na Coleção de Culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os isolados foram autenticados através de critérios morfofisiológicos seguindo os protocolos propostos por BARNETT, *et al.* (2000) e HOOG, *et al.* (2000) e biologia molecular por meio de reação primer espécie específico.

4.2 AUTENTICAÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS EMERGENTES

Autenticação taxonômica clássica

Morfologia das células vegetativas crescidas em meio líquido e sólido

A forma das células vegetativas como critério taxonômico foi verificada através de lâminas contendo fragmentos da cultura (crescimento em meio ágar Sabouraud) corados com azul de Aman (lactofenol cotton blue) e observadas quanto à morfologia (esferoidais, subglobulosa, elipsoidal, ovóide, cilíndrica, botuliforme, alongada, apiculada, ogival ou lunata). Para visualização das características das células vegetativas, material de cultura foi inoculado em 30 mL de extrato de malte e após 72 horas de crescimento sendo mantidas a 25 ± 3 °C, e em seguida o comprimento e largura das células foram medidos e os valores da medição de pelo menos 20 células foram determinados (LODDER, 1970).

Formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro e clamidosporo

Para verificar a formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro e clamidosporo, foram realizadas culturas em placas de acordo com a técnica de DALMAU (1929), na qual 3mL de ágar-fubá (CornMealagar) foi depositado em lâmina contida sobre um suporte de vidro em forma de U dentro de uma placa de Petri. Após solidificação do meio, a levedura foi semeada com auxílio de uma agulha em “L”, fazendo-se duas estrias paralelas, as quais foram recobertas com lamínula esterilizada. Para evitar a dessecação do meio, o procedimento foi realizado em

câmara úmida, acrescentando-se 2 mL de água destilada esterilizada na placa durante o período de incubação do teste. A visualização das estruturas através de microscopia foi feita após 24h, 48h e 72h (LODDER, 1970).

Crescimento em meio sólido

As amostras foram cultivadas em ágar malte e após 72 horas de incubação a $25\pm 3^{\circ}\text{C}$, a textura das colônias foi analisada quanto ao aspecto mucóide, friável, coesa, butirosa ou seca (BARNETT et al., 2000).

Fermentação de fontes de carbono (Zimograma)

Para a realização do teste, tubos (150 mm x 12mm) contendo tubos de Durham (50 mm x 6 mm) invertidos foram preenchidos com solução de extrato de malte a 0,5% acrescida das fontes de carbono a serem testadas na concentração de 4%. Foram utilizadas 47 fontes de carbono, em seguida, foi adicionado 100 μL da suspensão de leveduras ajustada de acordo com a escala 0,5% de MacFarland. Os tubos foram incubados a 25°C por 10 dias e observados diariamente para verificar a produção de dióxido de carbono (BARNETT et al., 2000).

Assimilação de fontes de carbono (Auxonograma)

Para o teste, foram realizadas suspensões de cada isolado de levedura em água com extrato de levedura de acordo com a escala 0,5 de MacFarland. Em seguida, foi realizado *pourplate* em meio isento de carboidratos. Após solidificação, foram adicionadas fontes de carbono e o meio foi incubado a 25°C por três dias, sendo realizada leitura a cada 24 horas por 10 dias para verificar a capacidade de assimilação da levedura (crescimento da levedura) de acordo com BARNETT et al. (2000).

Hidrólise da Uréia

As amostras com 48h de crescimento foram semeadas em meio caldo a base de uréia e incubadas a 37°C . Os tubos foram examinados a cada 30 min por quatro horas a fim de verificar a mudança de cor (amarelo para vermelho), indicando produção de uréase (BARNETT et al., 2000; LACAZ et al., 2002).

Autenticação proteômica MALDI-TOF

O cultivo e manutenção dos isolados de *Candida* foram em meio Dextrose Peptona Extrato de Levedura (YEPD). Células de *Escherichia coli*, utilizadas como calibrante, foram cultivadas e mantidas em meio ágar Luria-Bertani (LB). *Trichophyton rubrum* foi cultivado em YEPD e incorporado nas análises com um controle externo. Incubações foram padronizadas em 20h e as linhagens se desenvolveram aerobicamente a 37°C. Todas as culturas foram analisadas antes do uso quanto à pureza e foram novamente repicadas pelo menos uma vez antes da análise pelo MALDI TOF ICMS.

Fragmento de células (cerca de 50 µg) foi diretamente transferido do meio de cultura para os 48 anéis da placa. Imediatamente, foi adicionado sobre todas as amostras de leveduras 0,5 µL de ácido fórmico a 25% e misturado levemente com o material biológico. Após a total evaporação do meio líquido, foi adicionado 0,5 µL da solução matrix (75 mg/mL de 2,5-ácido dihidroxibenzóico [DHB] em etanol/água/acetonitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético [TFA]) e levemente misturado. Para *E. coli* a adição da solução matrix foi realizada sem tratamento prévio com ácido fórmico.

Todas as amostras foram cristalizadas em temperatura ambiente (20 ± 2 °C). Cada amostra foi transferida em duplicata para testar a reprodutibilidade. Durante as análises todas as soluções foram preparadas e estocadas a +5 °C (PUTIGNANI et al., 2010; VEEN et al., 2010).

Os espectros para determinação do perfil protéico dos isolados foram obtidos através de um laser de nitrogênio (337nm), onde a intensidade do laser foi ajustada ligeiramente acima do limiar para a produção de íons. *E. coli* DH5α com conhecido valores de massa das proteínas ribossomais foi usada para calibração.

A variação de massa entre 2.000 a 20.000 Da foi registrado usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV. Espectros finais foram gerados através da soma de 20 tiros de laser acumulados por perfil e 50 perfis produzidos por amostra, levando a um total de 10.800 disparos de laser somados por espectro. A lista de picos obtidos foi exportada ao software SARAMIS™ (Spectral Archiving and Microbial Identification System, Anagnostec, Postdam-Golm, Germany, www.anagnostec.eu) onde as identificações finais foram alcançadas. Identificação através do software SARAMIS™ foi baseada apenas na presença ou ausência de cada pico no espectro.

4.3 TESTES PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME

Formação de Biofilme em superfície de poliestireno

Preparação do inóculo

A formação de biofilme foi avaliada em isolados clínicos de leveduras emergentes cultivados aerobicamente a 37°C/ 18h, em Sabouraud Dextrose Agar. Suspensões foram preparadas em caldo *Yeast Nitrogen Base*-YNB (Difco) suplementado com 50 mM de glicose. Após 18 h de incubação, as células, foram lavadas duas vezes com PBS (pH 7,2) e ressuspensas em YNB suplementado com glucose a 100 mM. As células foram ajustadas em espectrofotômetro 530 nm para uma concentração final de 10^7 células/ml, correspondendo a 80% de transmitância.

Formação de Biofilme

Da suspensão celular, 100 µL foram colocados em poços de placas de microdiluição de fundo chato contendo 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça), as quais foram mantidas a 37°C por 1,5 h a 75 rpm (fase de adesão). Em seguida o conteúdo foi aspirado e os poços lavados duas vezes com tampão PBS para remoção das células não aderidas.

Para a fase de formação de biofilme, 200 µL de meio YNB suplementado com glicose a 100mM recém-preparado foi adicionado a cada poço. As placas foram incubadas durante 24 e 48 a 37°C a 75 rpm. Após 24 h de incubação, o meio foi aspirado e foram realizadas duas lavagens com PBS com adição de 200 µL de YNB. Nos diferentes pontos de tempo, os biofilmes foram quantificados utilizando o ensaio de redução de 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H- hidróxido de tetrazolium (XTT-Sigma) (SILVA, et al., 2008).

Ensaio para redução do XTT (atividade oxidativa)

Os biofilmes foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS. Em seguida, 158 µl de PBS isentos de glicose e com 200mM de glicose e 40 µL de XTT (1mg/ml) e 2 µL de Menadiona (0,4mM) foram transferidos para cada poço das placas, as quais foram cobertas

com folha de alumínio e incubadas em escuro a 37°C por 3 h. Da solução, 100 µL foram transferidos para novas placas e avaliadas pela mudança colorimétrica lidas a 492 nm através do leitor de microplacas (Spectra- MAX 340 ; Molecular Dispositivos Ltd., Sunnyvale, CA, EUA).

Formação de Biofilme em Discos de Silicone

Um isolado de cada espécie que foi capaz de formar o biofilme mais forte foi selecionado para a avaliação dos estágios de formação do biofilme em disco de silicone.

Preparação do substrato para formação do biofilme em Discos de Silicone

Foram utilizados discos de silicone oriundos de sondas uretrais em silicone com 0,6 mm de diâmetro. Para a confecção dos discos, as sondas foram previamente planificadas entre duas lâminas de vidro e processados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Este material foi lixado em granulação fina (lixa 400) para aumentar a superfície de contato e para melhorar a aderência primária das células fúngicas. Posteriormente, com o auxílio de uma lâmina circular, as tiras de silicone foram cortadas e os discos obtidos lavados com água e sabão e enxaguados com água destilada. Após a secagem do material, o mesmo foi esterilizado em autoclave (HAWSER E DOUGLAS, 1994).

Formação de biofilme

Os ensaios para formação do biofilme foram procedidos de acordo com VANDENBOSCH *et al.* (2010) e Como controle positivo, foi incluída nos testes a linhagem *Candida albicans* ATCC 90028 do American Type Culture Collection.

Meio de Cultivo

O meio de cultura utilizado foi o Yeast Nitrogen Base (YNB, Sigma Sigma-Aldrich) suplementado com 5 mM de glicose (Sigma-Aldrich) e pH final 6,1.

Preparação do inóculo

Os isolados foram crescidos em Sabouraud Dextrose por 16h à 37°C, em seguida foram centrifugados e removido o sobrenadante para lavagem das células com solução salina a 0,85% (três vezes). Estas foram ressuspensas em 1mL de 0,85% de NaCl (Novolab, Geraardsbergen, Bélgica) e o inóculo foi posteriormente diluído em meio de cultura YNB suplementado com 5 mM de glicose para se obter uma densidade óptica de 0,07 a um comprimento de onda de 600 nm.

Teste de formação de biofilme *in vitro*

Para os testes de formação de biofilme, os isolados de *Candida* foram cultivados nos discos de silicone estéreis em placa de microtitulação de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça).

Após a padronização do inóculo fúngicos, 1ml de uma diluição de 1:100 do inóculo em YNB foi adicionado a cada poço contendo um disco de silicone. As placas de microtitulação foram incubadas durante 1h à 37°C. Subsequentemente, os discos de silicone foram lavados (três vezes) com 1mL de 0,9% de NaCl para remover as células não aderentes e assepticamente transferido para um novo poço. Em seguida foi adicionado 1mL de YNB diluído (com uma concentração final de glicose de 0,2 mM), em seguida as placas foram incubadas durante 24h e 48h à 37°C para posterior análise microscópica.

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para a avaliação dos estágios de formação do biofilme por leveduras emergentes, os discos de silicone em que os biofilmes foram formados foram examinados com 24 e 48h por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando um equipamento da marca FEI (Quanta 200 FEG). O processamento das amostras seguiu o protocolo proposto DUARTE et al. (2003).

Os biofilmes formados nos discos de cateter foram fixados em glutaraldeído a 2,5% com tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M por duas horas. Após a fixação, os discos foram lavados com tampão Cacodilato 0,1 M três vezes por 10 minutos para a retirada de todo o

fixador. Após esta etapa foi realizada a pós-fixação na proporção 1:1 Ósmio 2% + tampão Cacodilato 0,1M por 30min, o que permite um maior contraste do material. Foram realizadas duas lavagens por 10 min em tampão Cacodilato 0,1M e água destilada. Posteriormente as amostras foram submetidas à desidratação seriada com acetona, na concentração de 30%,50%,70%,90% e 100% durante 5 minutos e submetidas a secagem ao ponto crítico. A montagem do material foi feita em “stubs” de metal contendo fita de carbono e tinta de prata (que servem como condutor de elétrons) e em seguida, metalizadas através do bombardeamento com ouro.

4.5 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA

O método utilizado seguiu as condições descritas no documento em M27-A3 (CLSI, 2008) e M7-S4 (CLSI, 2012). Para o controle de qualidade, testes com linhagem do American Type Culture Collection (ATCC), recomendadas pelo o NCCLS, *Candida albicans* ATCC 90028, foi incluída.

Além disso, dois poços controles, isentos de antifúngico e leveduras, foram incluídos no ensaio. A concentração inibitória mínima (CIM) foi a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível dos isolados testados, em relação ao poço controle.

Preparação dos antifúngicos

Soluções estoque de anfotericina B foram preparadas utilizando como diluente o dimetilsulfóxido (DMSO) e a diluição de fluconazol foi preparada com água destilada. As concentrações teste para o fluconazol e anfotericina B foram 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

Meio de cultivo

O meio de cultura utilizado foi o Roswell Park Memorial Institute, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. (RPMI-1640) com L-glutamina, 2,0 g/L de glicose, sem bicarbonato de

sódio e tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) a concentração final de $0,165 \text{ mol.L}^{-1}$ e pH 7,0.

Preparação do inóculo

Das colônias de leveduras com crescimento de 24 horas em meio ágar Sabouraud, foram preparadas suspensões em 5mL de solução salina esterilizada (8,5g/L NaCl; salina a 0,85%) cuja concentração final foi de 10^6 cels/mL.

A suspensão resultante foi agitada em vórtex durante 15 segundos e as densidades celulares, ajustadas com espectrofotômetro, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5, em comprimento de onda de 530nm. Esse procedimento fornece uma suspensão-padrão de levedura contendo 1×10^6 a 5×10^6 células por mL. A suspensão de trabalho foi na diluição 1:100 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão padrão com meio RPMI 1640, resultando em concentração de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células por mL.

Teste de sensibilidade *in vitro*

Para os testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com as drogas a serem testadas, e as placas foram incubadas a 35°C durante 48 horas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). As CIMs para anfotericina B foram determinadas para 100% e do fluconazol para $\geq 50\%$ de inibição em relação aos poços controles. Para determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM), o conteúdo dos poços que mostrarem 100% de inibição no crescimento foi cultivado para o meio SDA em placas de Petri. As placas foram incubadas a 35°C durante três dias para determinar a viabilidade fúngica. A CFM foi confirmada pela ausência de crescimento fúngico.

4.6 TRATAMENTO DOS BIOFILMES COM AGENTES ANTIFÚNGICOS-PADRÃO

O tratamento dos biofilmes foi realizado com fluconazol e anfotericina B de acordo com o protocolo descrito por PRAZYNSKA E GOSPODAREK (2014), sofrendo algumas modificações.

Os isolados de *Candida* foram semeados em SDA e incubados a 37°C por 24 horas. Posteriormente o isolado foi semeado no meio YNB (*Yeast Nitrogen Base*) suplementado com 0,25% de glicose e incubados a 37°C durante 24h em *shaker* a 120rpm. As culturas resultantes foram coletadas e lavadas três vezes com uma solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS, pH 7,0 $\pm$ 0,1) e padronizado para 0,5 McFarland em YNB.

Os biofilmes foram formados em microplacas de poliestireno com fundo chato com 96 poços. Cada poço foi preenchido com 100 μ L de suspensões de células de leveduras em triplicata e as placas foram incubadas a 37°C durante 48h, a fim de obter biofilmes estágio de maturação. Posteriormente as suspensões foram descartadas e os poços lavados com PBS estéril três vezes. Os poços revestidos com biofilme foram preenchidos com 100 μ L de diluições em série das drogas antifúngicas.

Os antifúngicos foram diluídos em RPMI 1640. Poços de biofilme não tratado e livre de biofilmes foram incluídos para servir como controles positivos e negativos. Estes poços foram preenchidos com meio RPMI 1640 sem antifúngico. As placas de microtitulação foram incubadas por 24 horas a 35°C. Após 24h e 48h, o meio de cada poço foi aspirado e semeado em ágar Sabouraud Dextrose para ser verificada a viabilidade das culturas.

5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO E AUTENTICAÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS ESTOCADOS NA MICOTECA URM

Da Coleção Micoteca URM, foram obtidos 15 isolados clínicos de leveduras emergentes isoladas de pacientes com diversas condições de base (Tabela 1). Segundo HAWKSWORTH; KIRSOP (1998); KIRSOP; KURTZMAN (1998), culturas de fungos estocados representam elementos fundamentais em diversas pesquisas, tanto de ciência pura quanto aplicada.

Todos os isolados apresentaram-se viáveis e as características morfofisiológicas foram mantidas em todos os isolados. Para SMITH; ONIONS (1994), culturas de fungos podem ser mantidas viáveis durante anos e a estocagem sob óleo mineral previne a desidratação e diminui a atividade metabólica e o crescimento devido à baixa disponibilidade de oxigênio.

Macroscopicamente, a cor das colônias, aspecto, bordo e microscopicamente morfologia das células, tipo de brotação, formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro, fisiologia para assimilação de fontes de Carbono e Nitrogênio, fermentação de fontes de Carbono, produção de urease foram típicas das diferentes espécies estudadas. Os resultados obtidos estão apoiados por BARNETT et al. (2000), HOOG et al. (2000), LACAZ et al. (2002), os quais indicam estes perfis pertinentes às espécies em estudo.

A autenticação taxonômica clássica foi confirmada por meio da espectrometria de massa MALDI-TOF MS, e todas as identificações foram compatíveis com o método clássico.

Vários estudos, como os realizados por IRIART et al. (2010) e SPANU et al. (2012) já demonstraram a confiabilidade da ferramenta proteômica MALDI-TOF MS na identificação rápida de leveduras clínicas, evidenciando a sua relação custo-eficácia em permitir que o início de terapêutica antifúngica segmentados por espécie.

CAROLIS et al. (2014), ao utilizar e validar o método de extração protéica com ácido fórmico, obtiveram 86 (95,6%) dos isolados corretamente identificados ao nível de gênero e 73 (81,1%) dos isolados identificados ao nível de espécie, evidenciando uma identificação de leveduras com rapidez, precisão e superioridade sobre métodos fenotípicos convencionais.

Em 2014, LIMA-NETO e colaboradores, ao requalificar 40 isolados de *Candida* spp. estocados na coleção de Culturas Micoteca URM da UFPE obtiveram 15% de discordância quando comparado com análises morfológicas e bioquímica, sendo os isolados discordantes

analisados por sequenciamento ITS, que confirmou a identificação MALDI-TOF MS. Sendo confirmado a confiabilidade da técnica proteômica MALDI-TOF MS para a identificação de isolados clínicos de espécies de *Candida* preservados.

Tabela 1: Isolados clínicos de leveduras emergentes obtidos da Micoteca URM da UFPE

Isolados Clínicos	Espécies
URM6554	<i>Candida haemulonii</i>
URM2101	<i>C. lusitaniae</i>
URM1812	<i>C. lusitaniae</i>
URM6345	<i>C. pelliculosa</i>
URM6346	<i>C. pelliculosa</i>
URM6384	<i>C. pelliculosa</i>
63MM	<i>C. guilliermondii</i>
39MM	<i>C. guilliermondii</i>
825MM	<i>C. guilliermondii</i>
129MM	<i>C. guilliermondii</i>
123MM	<i>C. haemulonii</i>
347MM	<i>C. haemulonii</i>
01MM	<i>C. lusitaniae</i>
05MM	<i>C. famata</i>
02MM	<i>C. ciferri</i>

5.2 TESTE PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME

Formação de Biofilme em superfície de poliestireno

Todos os isolados de leveduras emergentes mostraram-se capazes de formar biofilmes em 48 horas com diferentes intensidades. Com o teste para quantificação do metabolismo

celular do biofilme, por meio do ensaio de redução do XTT, foi possível selecionar um isolado clínico de cada espécie com maior capacidade de formar tal estrutura. Os isolados de *C. famata* e *C. ciferri* foram utilizados independente da intensidade do biofilme formado devido a ausência de cepas para comparação.

Quando analisados os resultados do biofilme com 24 e 48 horas, foi observado que a maior capacidade de formação do biofilme ocorreu em 48 horas (Gráfico 1). Isso demonstra que o tempo de 24 horas compreende a fase de adesão celular á superfícies inertes como citado por CHANDRA et al. (2001), já em um tempo de 48 horas houve um aumento considerável no metabolismo celular, evidenciando uma grande quantidade de células agrupadas, caracterizando um biofilme maduro.

Nossos resultados estão de acordo com TOBUDIC et al. (2012), que relatam que o biofilme maduro ocorre em um intervalo de tempo entre 31 e 72 horas.

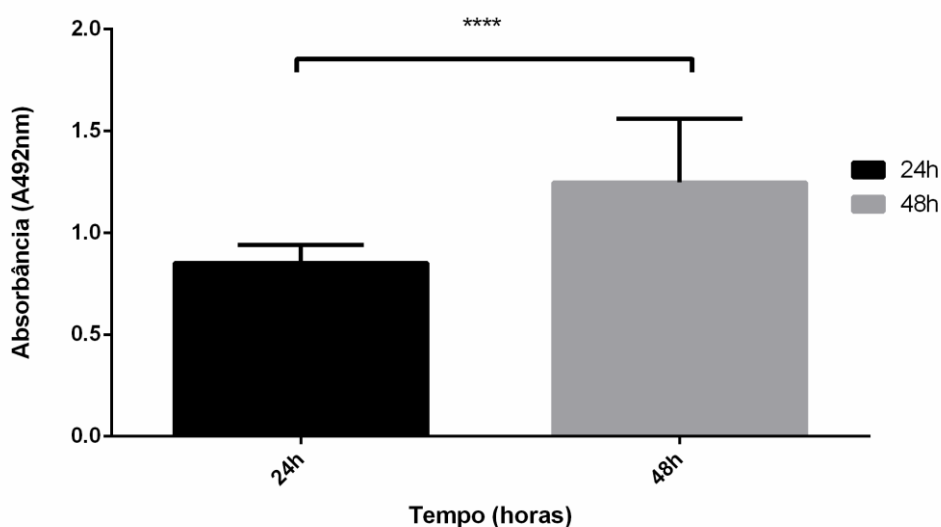


Gráfico 1: Formação de biofilmes por leveduras emergentes em 24h e 48h. ($p \leq 0,5$)

Ao analisar os biofilmes formados pelas espécies *C. haemulonii*, *C. pelliculosa*, *C. luzitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. famata* e *C. ciferri* observou-se que no tempo de 24 horas não houve diferença estatística significativa, desse modo a seleção dos isolados foram feitas por meio do biofilme de 48 horas.

O isolado 347MM *C. haemulonii* (Gráfico 2) foi o que apresentou a maior capacidade para a produção do biofilme, quando analisado pelo método estatístico, sendo o escolhido para a análise dos estágios de formação do mesmo pela microscopia eletrônica de varredura. Para a espécie *C. pelliculosa*, a cepa selecionada para as análises posteriores foi a URM6346 (Gráfico 3) e para a *C. lusitaniae*, o isolado escolhido foi a cepa URM1812 (Gráfico 4).

Para os isolados de *C. guilliermondii*, não houve diferença estatística significativa entre os biofilmes de 24 e 48 horas, desse modo o isolado escolhido para as análises dos estágios de formação do biofilme foi a cepa 129MM (Gráfico 5) a qual apresentou numericamente maior capacidade para formação dessa comunidade microbiana.

Quando analisados os biofilmes produzidos pelos isolados de *C. famata* e *C. ciferri*, ambos mostraram grande capacidade para formação de biofilme, com destaque para *C. famata* (Gráfico 6).

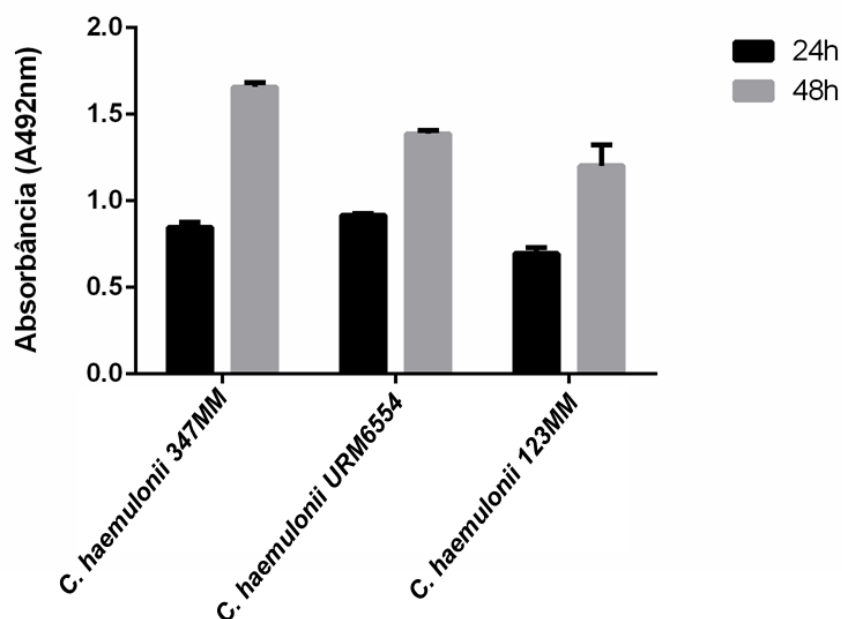


Gráfico 2: Formação de biofilmes por isolados de *Candida haemuloniae* em 24 e 48h. ($p \leq 0,5$)

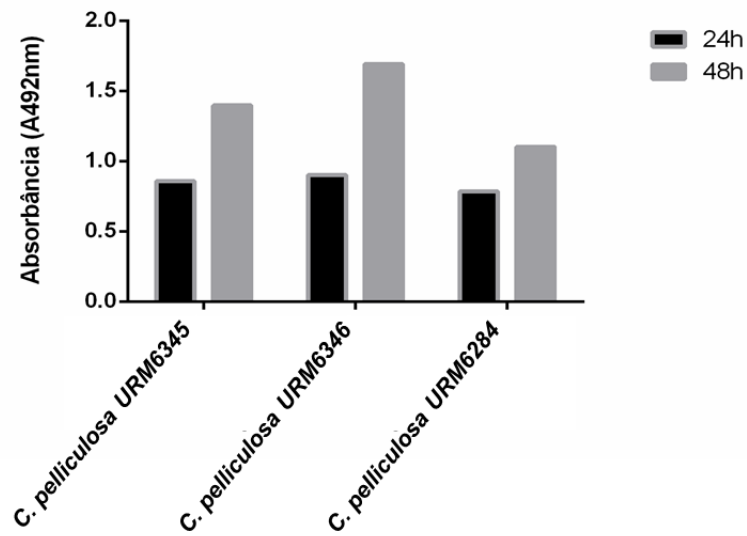


Gráfico 3: Formação de biofilmes por isolados de *Candida pelliculosa* em 24 e 48h. ($p \leq 0,5$)

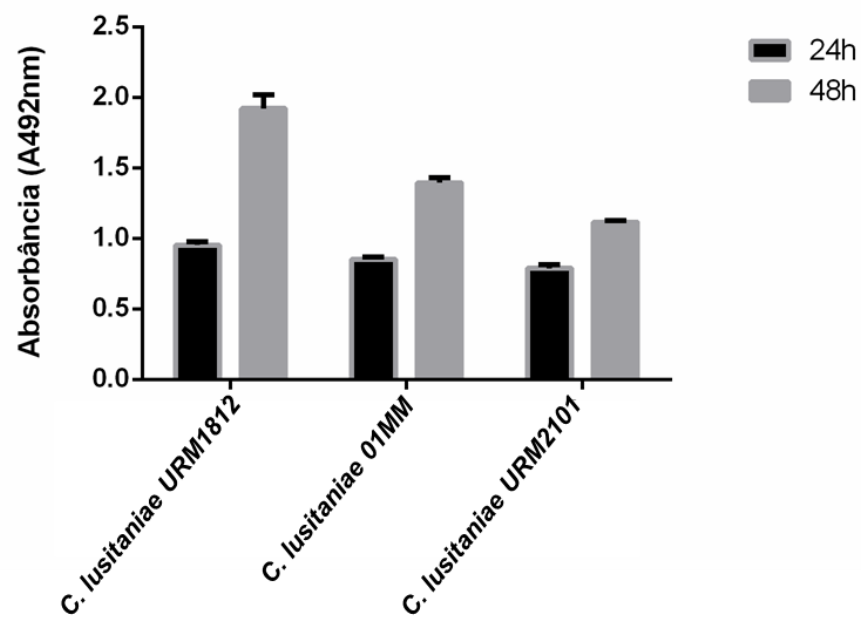


Gráfico 4: Formação de biofilmes por isolados de *Candida lusitanae* em 24 e 48h. ($p \leq 0,5$)

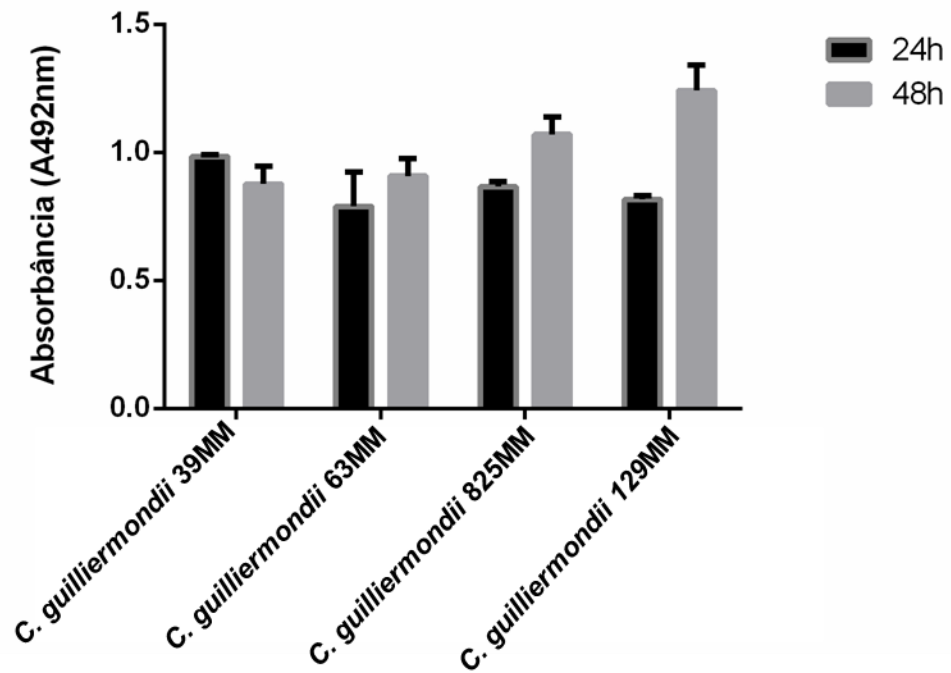


Gráfico 5: Formação de biofilmes por isolados de *Candida guilliermondii* em 24 e 48h. ($p \leq 0,5$)

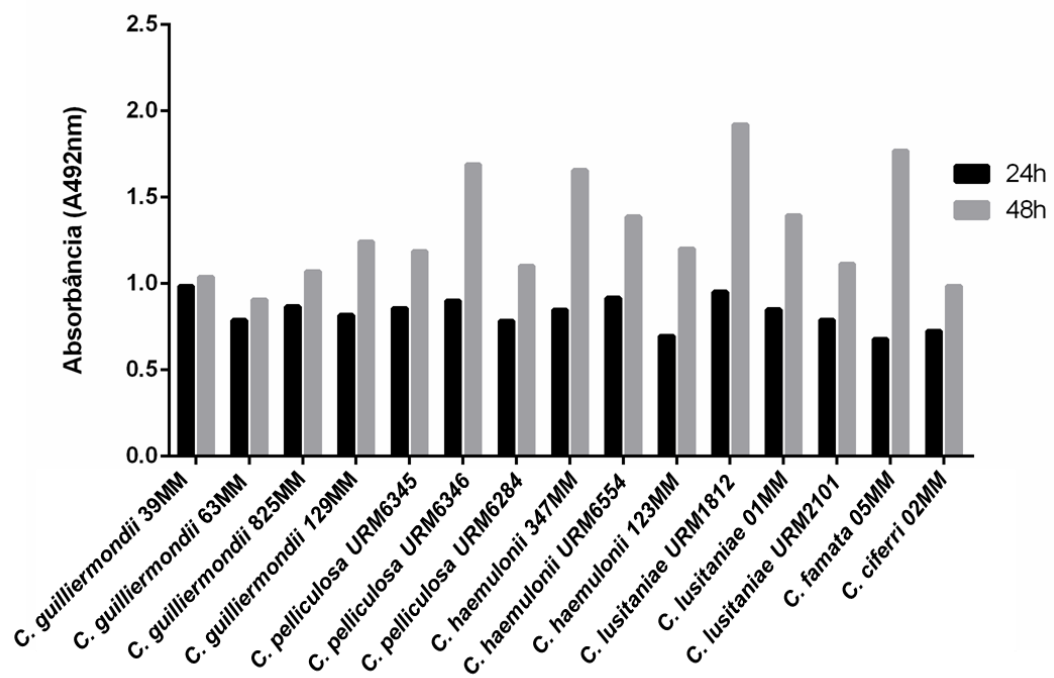


Gráfico 6: Perfil de produção de biofilme por leveduras emergentes no período de 24 e 48h. ($p \leq 0,5$)

Em um estudo realizado por Ferreira et al. (2013), ao analisar cepas clínicas e ambientais de leveduras *Candida albicans* e *Candida* não *C. albicans*, foi observado que os biofilmes formados por isolados clínicos de *C. não C. albicans* apresentaram atividades metabólicas mais elevadas do que biofilmes de *C. albicans*. Na nossa pesquisa cepas clínicas de *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* se destacaram na produção deste fator de virulência, no entanto, os isolados clínicos de *C. ciferri* e *C. famata* não foram capazes de formar biofilme.

Al-akeel et al. (2013) ao analisar isolados clínicos de leveduras vaginais de mulheres grávidas e não grávidas, constataram que isolados de leveduras emergentes como *C. famata*, *C. utilis*, *C. kefir* e *Rhodothorula mucilaginosa* são capazes de formar biofilme. *Candida pelliculosa* também foi descrita com capacidade para formar essa comunidade microbiana, como descrito por Pannanusorn et al. (2013) ao analisar isolados agentes isolados de infecções da corrente sanguínea. No entanto, não há relatos de leveduras da espécie *C. ciferri* causando biofilme, o que torna este estudo o primeiro a relatar este potencial de virulência para esta espécie de levedura.

Oh et al. (2011) detectaram a produção *in vitro* de biofilmes por *C. haemulonii* e *C. pseudohaemulonii*. A formação deste fator de virulência reflete a capacidade destas duas espécies de causar infecções da corrente sanguínea relacionadas ao cateter.

Apesar de dispositivos médico-invasivos exercerem um papel crítico na patogênese da candidíase invasiva, proporcionando uma porta de entrada para *Candida*, bem como uma superfície externa para a adesão e a formação de biofilme, em certas situações o seu uso é indispensável. Cateteres venosos centrais são necessários no tratamento de pacientes em estado grave, minimizando a necessidade de punção venosa e facilitando a administração de nutrição parenteral, hemoderivados, e terapia inotrópica (Benjamin et al., 2010; Yu et al., 2013).

Formação de Biofilme em Discos de Silicone

Na formação de biofilme em superfície de discos de silicone, todos os isolados apresentaram um biofilme maduro após 48 horas de exposição ao microrganismo.

O isolado 63MM *C. guilliermondii* apresentou apenas células de leveduras aderidas à superfície do disco após 24 horas, caracterizando o estágio inicial da formação dessa

comunidade microbiana e com 48 horas um elevado número de células aderidas entre si e recobertas por matriz extracelular (Figura 1).

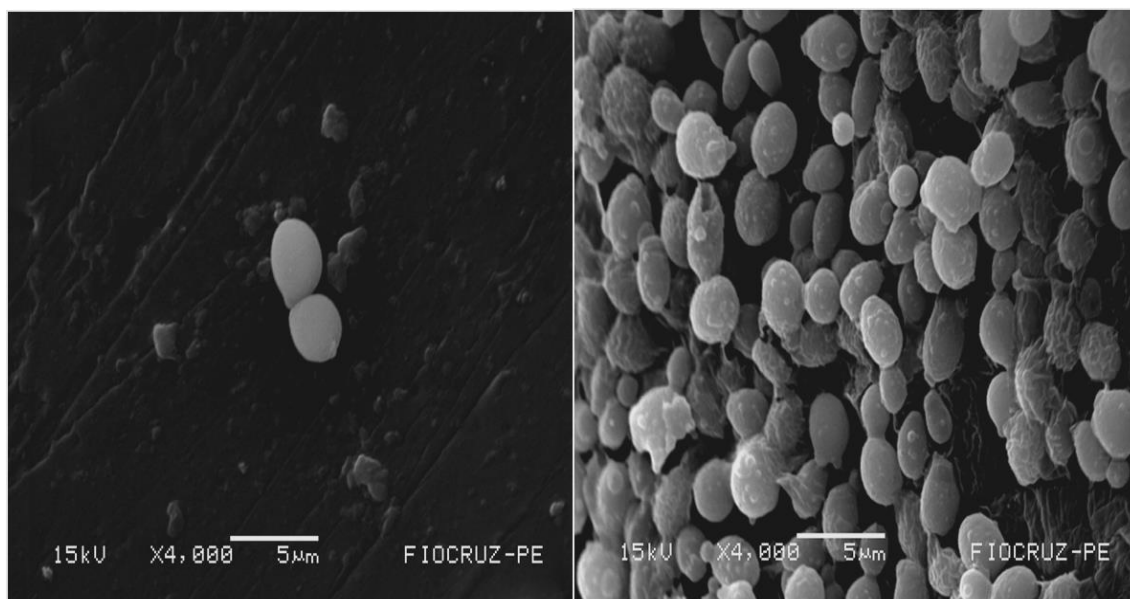


Figura 1: Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme formado pelo Isolado 63MM *Candida guilliermondii* em 24 e 48horas.

A cepa 6346URM *Candida pelliculosa* também apresentou com 24 horas poucas células de leveduras aderidas exibindo brotações, no entanto com 48horas, foi observado um aumento considerável de células com início de adesão intercelular e secreção de matriz extracelular (Figura 2).

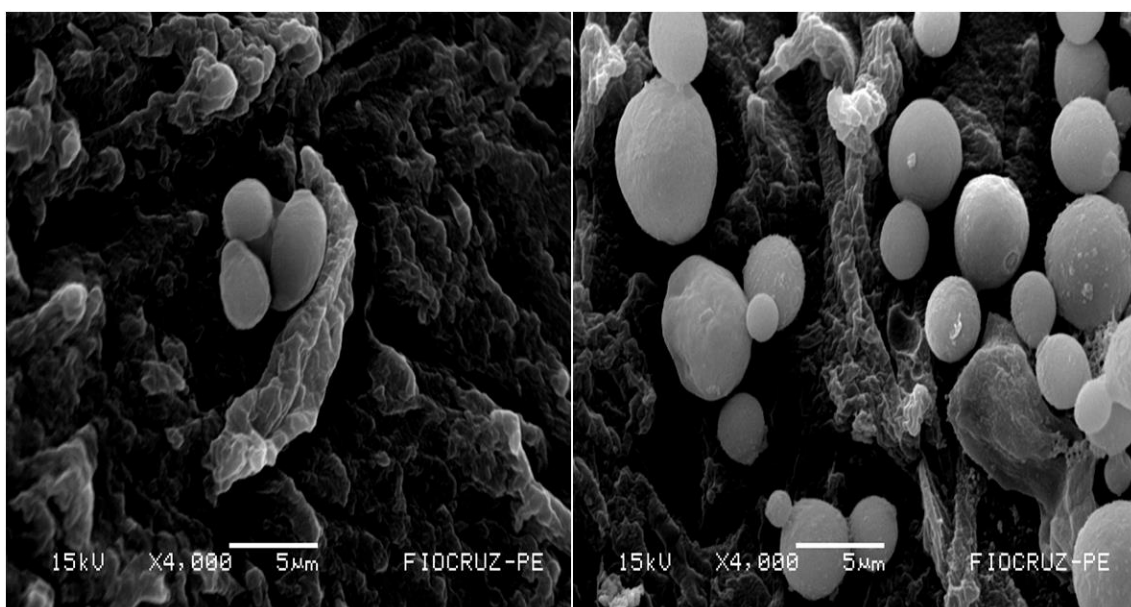


Figura 2: Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme formado pelo Isolado 6346URM *Candida pelliculosa* em 24 e 48horas.

O isolado 1812MM *Candida lusitaniae* apresentou com 24 horas um elevado número de células de leveduras aderidas ao disco de silicone e com intensa adesão intercelular. Com 48 horas foi possível a visualização de um material amorfo, representando a matriz extracelular e caracterizando o biofilme maduro (Figura 3).

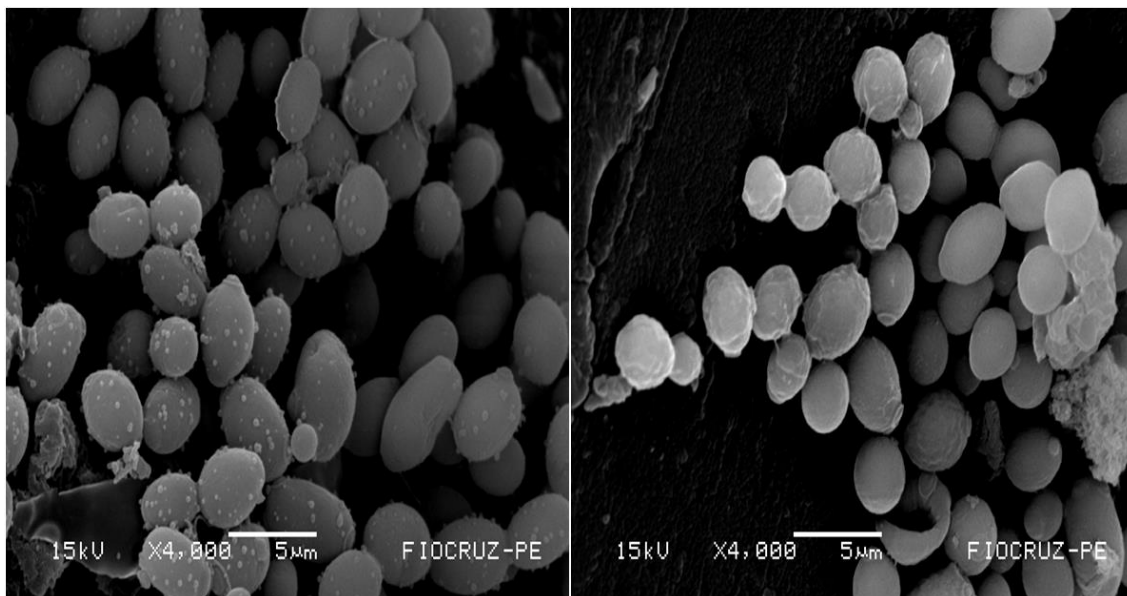


Figura 3: Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme formado pelo Isolado 1812MM *Candida lusitaniae* em 24 e 48 horas

O isolado 02MM *Candida ciferri* apresentou com 24 horas apenas algumas células de leveduras aderidas ao disco de silicone com brotamentos. No entanto, com 48 horas foi possível a visualização de um material amorfo envolvendo as células, representando a matriz extracelular, com intensa adesão intercelular (Figura 4).

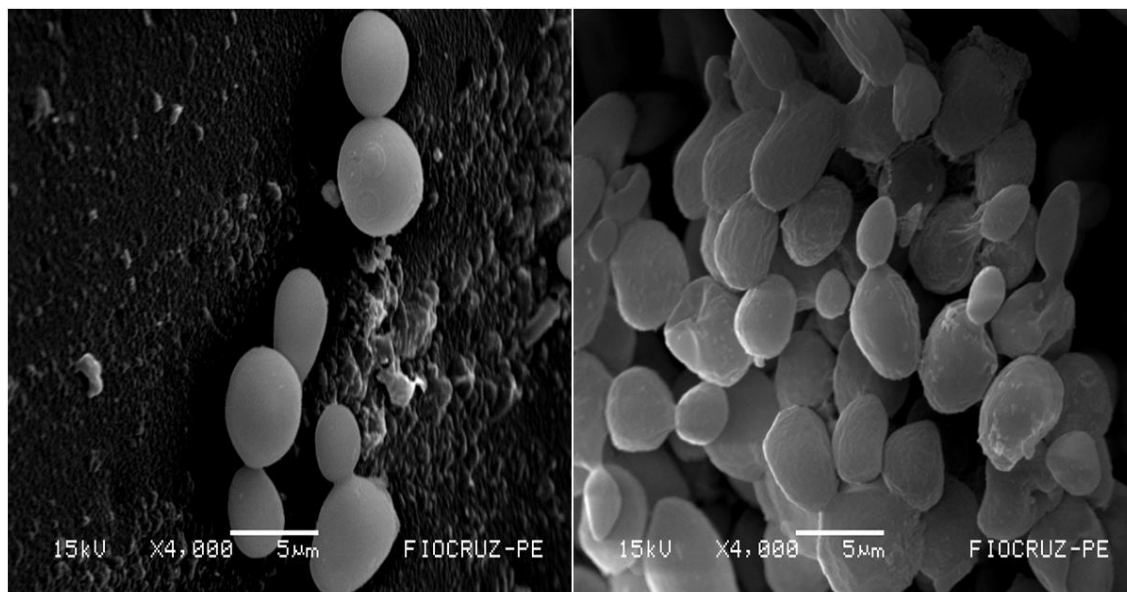


Figura 4: Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme formado pelo Isolado 02MM – *Candida ciferri* em 24 e 48horas.

O isolado 123MM de *C. haemulonii* apresentou um número maior de células de leveduras aderidas à superfície do disco após 24 horas quando comparado a outros isolados, caracterizando o estágio inicial da formação do biofilme e com 48 horas um elevado número de células aderidas entre si e recobertas por matriz extracelular (Figura 5).

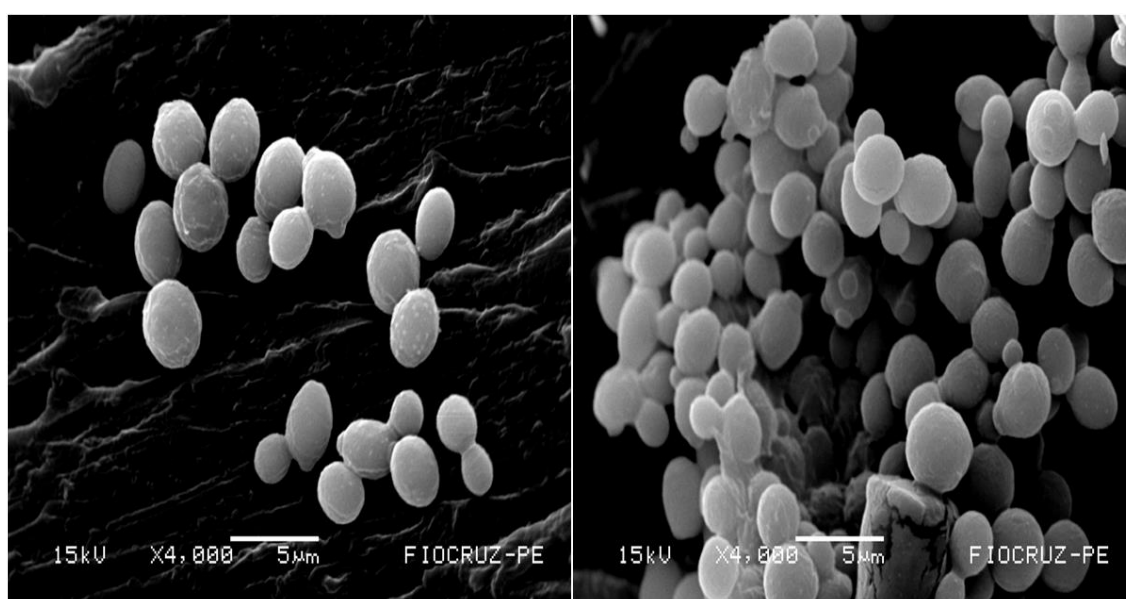


Figura 5: Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme formado pelo Isolado 123MM - *Candida haemulonii* em 24 e 48horas

O isolado 05MM *C. famata* apresentou células de leveduras com vários brotamentos aderidas à superfície do disco após 24 horas, caracterizando o estágio inicial da formação do biofilme e com 48 horas um elevado número de células aderidas entre si e secreção de matriz extracelular (Figura 6).

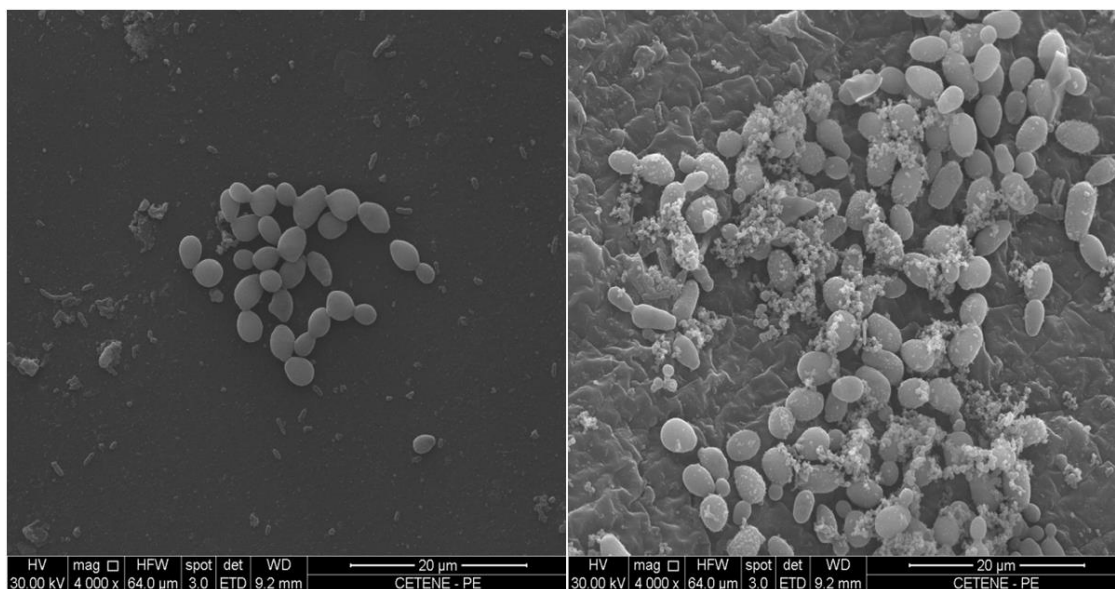


Figura 6: Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme formado pelo Isolado 05MM – *Candida famata* em 24 e 48 horas

A cepa ATCC90028 *Candida albicans* foi utilizada como controle positivo para formação de biofilme. Após 24 horas de exposição à suspensão fúngica, foi possível a observação de poucas células de leveduras aderidas ao disco de silicone, caracterizando a etapa inicial do processo de formação do biofilme, já com 48 horas, foi observado um grande aglomerado de células com adesão intercelular e secreção de um material amorfo denominado matriz extracelular (Figura 7).

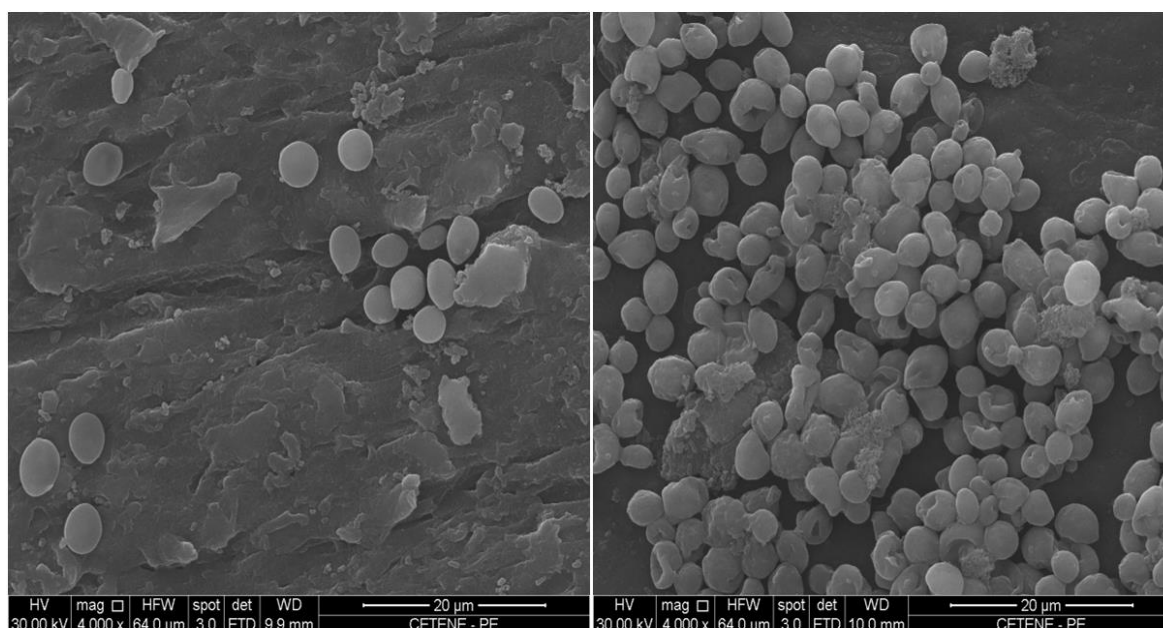


Figura 7: Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme formado pelo Isolado ATCC90028 - *Candida albicans* em 24 e 48 horas

Em nosso estudo, foi observada com 24 horas a aderência das células de leveduras na superfície do disco de silicone, caracterizando o início da formação do biofilme, e com 48 horas foi possível a visualização de um material amorfo, caracterizando a matriz extracelular. O isolado URM1812 *C. lusitaniae*, com 24 horas, exibiu intensa quantidade de células fúngicas, o que sugere que o estágio de aderência de células ocorreu em um período menor de tempo (próximo de 12 horas) quando comparado com as outras cepas.

Segundo Jabra-Rizk et al. (2004), a formação do biofilme ocorre em três etapas: início (0 a 11 h), intermediário (12 a 24 h) e maturação (38 a 72 h). Em nossa pesquisa, o início do desenvolvimento de células de leveduras na superfície dos discos de silicone ocorreu com 24

horas, com exceção do isolado de *C. lusitaniae* que com esse tempo já apresentava-se como o estágio intermediário, com grande número de células.

Embora algumas espécies estudadas apresentem a capacidade de filamentação, como a *C. guilliermondii*, nenhum isolado exibiu a formação de pseudomicélio e hifas verdadeiras na estrutura do biofilme. Essa característica também foi observada por Silva et al. (2011) que descreveram que espécies de *Candida* incluindo *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, que em estado planctônico possuem a capacidade de filamentação, produzem biofilmes ricos em matriz-extracelular mas não apresentam hifas verdadeiras.

As diferentes espécies de *Candida* diferem em sua capacidade de formar biofilmes, podendo variar na morfologia global, composição e resistência antifúngica. Alguns trabalhos também afirmam que diferentes cepas de uma mesma espécie são dramaticamente diferentes na sua capacidade de formar estes agregados celulares, indicando que estirpes formadoras de biofilmes "fortes" e "fracos" podem existir dentro uma mesma espécie (JIN et al., 2003; THEIN et al., 2007).

Segundo Henriques et al. (2006), tais estruturas assumem grande importância no contexto clínico porque estão associadas com a persistência do microrganismo no processo infeccioso e capacidade de expressar resistência contra a maioria dos agentes antimicrobianos.

5.3 SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Foram avaliadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos sete isolados selecionados frente a dois antifúngicos comerciais (Fluconazol e Anfotericina B), segundo a metodologia de microdiluição em caldo, conforme estão demonstrados na Tabela 2.

A variação dos valores de CIM foi de 0,125 a 8 µg/mL para fluconazol, sendo os isolados, portanto, considerados sensíveis (CIM = 8µg/mL), exceto o isolado 129MM *C. guilliermondii* que mostrou-se dose dependente com CIM = 16µg/mL.

Para a anfotericina B a variação dos valores de CIM foi de 0,125 a 8µg/mL. Alguns dos isolados foram sensíveis para este fármaco, com exceção dos isolados 129MM *C. guilliermondii*, 347MM *C. haemulonii* ambos com CIM = 8µg/mL e URM1812 *C. lusitaniae* e 02MM *C. ciferri* com CIM = 4µg/mL.

Tabela 2: Perfil de sensibilidade antifúngica de isolados de leveduras emergentes frente à antifúngicos comerciais e nova proposta terapêutica.

Isolados Cínicos	Anfotericina B (16 – 0,03µg/mL)	Fluconazol (64 – 0,125µg/mL)
129MM (<i>Candida guilliermondii</i>)	8 µg/mL	16µg/mL
347MM (<i>C. haemulonii</i>)	8µg/mL	8µg/mL
URM1812 (<i>C. lusitaniae</i>)	4µg/mL	2µg/mL
URM6346 (<i>C. pelliculosa</i>)	0,125µg/mL	4µg/mL
5MM (<i>C. famata</i>)	0,5µg/mL	0,125µg/mL
02MM (<i>C. ciferri</i>)	4µg/mL	2µg/mL
ATCC90028 (<i>C. albicans</i>)	0,5µg/mL	0,5µg/mL

Legenda: R-resistente

Há relatos na literatura que isolados de *C. haemulonii* e *C. lusitaniae* são intrinsecamente resistentes a anfotericina B. De acordo com outros estudos, como cita Ruan et al. (2009) a maioria dos isolados de *C. haemulonii* relacionadas a candidemia são resistentes a anfotericina B e fluconazol.

Almeida Junior et al. (2012) ao descrever o primeiro caso de *C. haemulonii* no Brasil, relataram elevadas concentrações para anfotericina B e flucitosine, com CIM de 4µg/mL e 64µg/mL respectivamente, no entanto, frente ao fluconazol o isolado mostrou-se sensível com CIM de 8µg/mL.

Silva et al. (2015) também relataram resistência de isolados de *C. haemulonii* frente a anfotericina B com CIM de 8µg/mL e sensibilidade ao fluconazol (CIM:8 µg/mL) e voriconazol (CIM:0.12 µg/mL).

O aumento da incidência de espécies de *Candida* não *C. albicans* pode estar sendo influenciada pela profilaxia antifúngica com o fluconazol, visto que, foi comprovado que pacientes que recebem fluconazol possuem maior facilidade em adquirir infecções por

Candida não *C. albicans* dos que os não tratados profilaticamente com este fármaco (PAGANO et al., 2006).

Apesar de vários estudos que mostram que Anfotericina B tem maior atividade in vitro do que fluconazol contra *C. lusitaniae*, este fungo tem mostrado tradicionalmente resistência clínica a anfotericina, o que corrobora com nosso resultado em que o isolado URM1812 apresentou-se resistente (CIM= 4µg/mL). Já, Sandoval-Denis et al. (2014) em sua pesquisa, obtiveram sensibilidade dos isolados frente a anfotericina B e dose-dependência de fluconazol (CIM =16µg/mL).

No trabalho realizado por Wingeter et al. (2007) com cepas de *Candida* spp isoladas de pacientes portadores do HIV, foi observado uma resistência de 10% dos isolados ao fluconazol e 23% de resistência itraconazol, sendo de 4% a resistência à anfotericina B.

Hagin et al. (2010) descreveram um caso raro de candidemia em uma criança de oito anos de idade por *C. ciferri*, em que o isolado mostrou-se resistente à anfotericina B, fluconazol, caspofungina e anidulafungina, sendo sensível apenas ao voriconazol.

Em nosso estudo, a cepa 129MM *C. guilliermondii* apresentou resistência frente à anfotericina B, o que difere de Mazari et al. (2015), que apresentou todos os isolados desta espécie sensível a este fármaco. Possivelmente, o uso indiscriminado como medidas profiláticas tem levado ao aumento do número de cepas clínicas resistentes aos tratamentos disponíveis, o que gera um aumento dos casos de mortalidade por candidemia.

Apesar de o fluconazol ser uma das drogas mais comumente utilizadas seu uso rotineiro tem sido associado ao desenvolvimento resistência. Estima-se que cerca de 10% dos isolados de *C. albicans* provenientes de amostras de sangue são resistentes ao fluconazol (FERREIRA et al., 2012).

5.4 TRATAMENTO DOS BIOFILMES COM AGENTES ANTIFÚNGICOS-PADRÃO

Foram avaliadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) da Anfotericina B, Fluconazol frente ao biofilme maduro formado pelos sete isolados de leveduras selecionados, segundo a metodologia Prazynska e Gospodarek (2014), conforme estão demonstrados na Tabela 3.

A variação dos valores de CIM foi de 4 a 32 µg/mL para fluconazol. Em todos os isolados, houve um aumento da CIM quando comparados às células planctônicas, no entanto

os isolados URM1812, URM6346 e 02MM, ainda mostram-se sensíveis a estes fármacos com CIM de 4µg/mL. O isolado 129MM continuou dose dependente, com CIM de 32µg/mL e *C. haemuloniae* 347MM também apresentou biofilme dose dependente com CIM = 16 µg/mL. Já o isolado 02MM *C. ciferri* e ATCC90028 apresentaram biofilmes resistentes a esse fármaco.

Para a anfotericina B, também houve um aumento significativo da CIM quando comparados a células planctônicas, com variação dos valores de CIM de 4 a >16µg/mL. Assim, todos os isolados testados apresentaram biofilmes resistentes a este fármaco.

Tabela 3: Perfil de sensibilidade antifúngica de biofilmes formados por isolados de leveduras emergentes frente à antifúngicos comerciais.

Isolados Cínicos	Anfotericina B (16 – 0,03µg/mL)	Fluconazol (64 – 0,125µg/mL)
129MM (<i>Candida guilliermondii</i>)	> 16µg/mL	32µg/mL
347MM (<i>C. haemulonii</i>)	> 16µg/mL	16µg/mL
URM1812 (<i>C. lusitaniae</i>)	8µg/mL	4µg/mL
URM6346 (<i>C. pelliculosa</i>)	4µg/mL	4µg/mL
5MM (<i>C. famata</i>)	8µg/mL	4µg/mL
02MM (<i>C. ciferri</i>)	> 16µg/mL	R
ATCC90028 (<i>C. albicans</i>)	4µg/mL	R

R- resistente

Segundo Harriott et al. (2011), a formação de biofilmes é uma estratégia para a sobrevivência e proliferação das células envolvidas. A complexa estrutura de um biofilme permite a organização das populações de *Candida* de modo a dificultar a ação de agentes antimicrobianos.

Não há estudos que demonstrem o perfil de sensibilidade antifúngica de biofilmes das espécies emergentes testadas em nosso estudo. Os estudos acerca do tratamento de biofilmes formados por espécies de *Candida* ocorrem com a espécie *C. albicans*.

Tobudic et al. (2012), ao avaliar a susceptibilidade antifúngica de biofilmes de *Candida albicans*, verificaram que essas estruturas são altamente resistentes aos azólicos, não só ao fluconazol, mas também para triazóis voriconazol e posaconazol. Ainda, esses autores relatam que a resistência ao Fluconazol tende comprovadamente a um aumento superior a 1000 vezes em biofilmes quando comparados a células planctônicas.

Os mecanismos de resistência aos azólicos de biofilmes de *C. albicans* são específicos de cada fase de desenvolvimento. Enquanto bombas de efluxo desempenham um papel crítico nos biofilmes de fase precoce, alterações na composição de esteróis com níveis reduzidos de ergosterol é um mecanismo importante nas fases intermediária e madura da formação de biofilme (Mukherjee et al., 2003).

Em um estudo realizado por Andes et al. (2002), os autores observaram um aumento notável na CIM para as células associadas ao biofilme em comparação com as planctônicas, com CIM 128 vezes maior do que o CIM para células livres.

Em nosso estudo, foi utilizado a formulação padrão de Anfotericina B, que segundo Tobudic et al. (2010) apresenta atividade reduzida contra biofilmes de *C. albicans* quando comparados com células planctônicas. Em contraste, como cita Kuhn et al. (2002), formulações lipídicas de anfotericina B (AMB lipossomal e ABLC) exibem atividades inibidoras contra biofilmes de *C. albicans* com CIMs semelhantes aos observados para células planctônicas. Os mecanismos por trás das atividades exclusivas dessas formulações são desconhecidos.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados ao longo do desenvolvimento da pesquisa podemos concluir que:

- A Técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF é válida e confiável para a identificação de espécies de *Candida*;
- Isolados de *C. guilliermondii*, *C. haemulonii*, *C. lusitaniae*, *C. famata*, *C. pelliculosa* e *C. ciferri* são capazes de produzir biofilmes maduros em dispositivos médico-invasivos em 48 de exposição;
- Os isolados testados não apresentam produção de hifa verdadeira na estrutura do biofilme formado em até 48 horas;
- Os isolados 347MM *C. haemulonii*, 129MM *C. guilliermondii*, URM1812 *C. lusitaniae* e 02MM *C. ciferri* apresentam resistência à anfotericina B;
- O isolado 129MM *C. guilliermondii* apresenta sensibilidade dose dependente ao fluconazol;
- O Terpenóide apresentou atividade antifúngica frente aos isolados de *C. haemulonii*, *C. pelliculosa*, *C. famata* e *C. ciferri* testados;
- Biofilmes formados pelos isolados emergentes de *C. guilliermondii*, *C. haemulonii*, *C. lusitaniae*, *C. famata*, *C. pelliculosa* e *C. ciferri* são resistentes a anfotericina B;
- Os isolados de *C. lusitaniae*, *C. famata*, *C. pelliculosa* formaram biofilmes sensíveis ao fluconazol;

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S. Inflammation and cancer: How hot is the link? *Biochemical Pharmacology*, v.72, p. 1605-1621. 2006.
- AL-AKEEL, A.R., EL-KERSH, A.T., AL-SHEIKH, A.Y., AL-AHMADEY, Z.Z. Heparin-benzyl alcohol enhancement of biofilms formation and antifungal susceptibility of vaginal *Candida* species isolated from pregnant and nonpregnant Saudi women. *Bioinformation* 9(7): 357–362. 2013.
- AKINS, R.A. An update on antifungal agents and mechanism of resistance in *Candida albicans*. *Medical Mycology* 42: 285-318. 2005.
- AHMED A, AZIM A, BARONIA AK, MARAK KRSK, GURJAR M. Risk prediction for invasive candidiasis. *Indian J Crit Care Med* 18(10): 682–688. 2014.
- ALMEIDA JR., J. N.; MOTTA, A. L.; ROSSI, F.; ABDALA, E.; PIERROTTI, L. C.; KONO, A. S. G.; DIZ, M. D. P. E.; DEL NEGRO, G. M. B. First report of a clinical isolate of *Candida haemulonii* in Brazil. *Medical Mycology* 67: 1229-1231. 2012.
- ANTAS, P.R.Z., BRITO, M.M.S., PEIXOTO, E., PONTE, C.G.G., BORBA, C.M. Neglected and emerging fungal infections: review of hyalohyphomycosis by *Paecilomyces lilacinus* focusing in disease burden, in vitro antifungal susceptibility and management. *Microbes and infection* 14:1-8. 2012.
- ANTHONY, J.P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components-a resource for antiparasitic agents? *TRENDS in Parasitology*, v.21, p.462- 468. 2005.
- ANTUNES, A.G.V., PASQUALOTTO, A.C., DÍAZ, M.C., D' AZEVEDO, P.A., SEVERO, L.C. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46: 239-241. 2004.

ARENDRUP, M. C., DZAJIC, E., JENSEN, R. H., JOHANSEN, H. K., KJÆLDGAARD, P., KNUDSEN, J. D., KRISTENSEN, L., LEITZ, C., LEMMING, L. E., NIELSEN, L., OLESEN, B., ROSENVINGE, F. S., RØDER, B. L., SCHØNHEYDER, H. C. Epidemiological changes with potential implication for antifungal prescription recommendations for fungaemia: data from a nationwide fungaemia surveillance programme. *Clinical Microbiology and Infection* 19: E343–E353. 2013.

BALKIS, M.M., LEIDICH, S.D., MUKHERJEE, P.K., GHANNOUM, M.A. Mechanisms of Fungal Resistance: An Overview. *Drugs*. 62: 1025-1040. 2002.

BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil. Vitoria: Edufes, 624. 2008.

BARNETT, J.A., PAINE, R.W., YARROW, D. Yeasts: Characteristics and Identification. *Cambridge, Cambridge University Press*. 2000.

BASSETTI M, RIGHI E, ANSALDI F, MERELLI M, TRUCCHI C, DE PASCALE G. A multicenter study of septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of mortality. *Intensive Care Med* 40(6):839– 45. 2014.

BELETTI, N.; NDAGIJIMANA, M.; SISTO, C.; GUERZONI, M.E.; LANCIOTTI, R.; GARDINI, F. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p.6932-6938. 2004.

BENJAMIN JR, D.K., STOLL, B.J., GANTZ, M.G. *et al.* Neonatal Candidiasis: Epidemiology, Risk Factors, and Clinical Judgment. *Pediatrics* 126 (4): 865-873. 2010.

BURDOCK, G. A.; Fenaroli's Handbook of Flavour Ingredients, 3rd ed., CRC: Boca Raton, 1995.

BORMAN, A.M., PETCH, R., LINTON, C.J., PALMER, M.D., BRIDGE, P.D., JOHNSON, E.M. *Candida nivariensis*, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 933–38. 2008.

CALDERONI, R.A., FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiol*, 9: 327-35. 2001.

CANTÓN, E, PEMÁN, J, HERVÁS, D, ESPINEL-INGROFF, A. Examination of the in vitro fungicidal activity of echinocandins against *Candida lusitanae* by time-killing methods. *J Antimicrob Chemother* 68: 864–868. 2013.

CARRILLO-MUÑOZ¹, A.J., GIUSIANO, G., EZKURRA, P.A., QUINDÓS, G. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioterap* 19(2): 130-139. 2006.

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.*, 183, 5385–5394. 2001.

CHAFFIN, W.L. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 495–544. 2008.

CHANDKI, R.; BANTHIA, P.; BANTHIA, R. Biofilms: A microbial home. *Journal of Indian Society of Periodontology* 15: (2) 111–114. 2011.

CHAPMAN, R.L. Prevention and Treatment of *Candida* Infections in Neonates. *Seminars in Perinatology* 31:39-46. 2007.

CHOW JK, GOLAN Y, RUTHAZER R et al. Factors associated with candidemia caused by non-albicans *Candida* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit. *Clin Infect Dis*; 46:1206–13. 2008.

COLOMBO, A.L., NUCCI, M. PARK, B.J, NOUÉR, S.A., ARTHINGTON-SKAGGS, B., MATTA, D.A., et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J. Clin. Microbiol.* 44: 2816-2823. 2006.

COLOMBO AL, GUIMARÃES T, SUKIENIK T, PASQUALOTTO AC, ANDREOTTI R, QUEIROZ-TELLES F. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter centers sequentially conducted over a 9-year Period. *M. Intensive Care Med* 40(10): 1489–98. 2014.

CORTÉS, J. A.; PRADA, G. Protocolo de estudio y manejo de pacientes con candidiasis sistêmica em adultos. *Infection Asociación Colombiana de Infectología*, 16: 118-122, 2012.

COSTA, K.R.C. Aspectos fenotípicos e moleculares da adesão e atividade enzimática de *Candida* sp isolada de pacientes com sinais clínicos de candidíase oral. *Tese de Doutorado em Biociências Aplicada a Farmácia - USP Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto*. 2009.

CROCCO, MIMICA, MURAMATU, GARCIA, SOUZA, RUIZ & ZAITZ. Identification of *Candida* species and antifungal susceptibility in vitro: a study on 100 patients with superficial candidiasis. *Anais brasileiro de Dermatologia* 9: 689-697. 2004.

CROWEL, P. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *American Society for Nutritional Sciences*, v.129, p.775S-778S. 1999.

DALMAU, L.M. Observations on mycological technique with particular references to pathogenic fungi. *Journal Public Heath Tropical Medicine* 5: 302-311. 1929.

DELALOYE J, CALANDRA T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence* 5(1):161–9. doi: 10.4161/viru.26187 PMID: 24157707. 2014.

DEMYTTENAERE, J.; KIMPE, N.; J. MOL. CATAL. B: Enzym.11, 265. 2001

DINIZ, J.N.M.; SILVA, R. A. M.; MIRANDA, E.T.; GIANNINI, M. J. S. M. Monitoramento de fungos anemófilos e de leveduras em unidade hospitalar. 2005.

DISMUKES, W.E. Introduction to antifungal drugs. *Clin. Infect. Dis.* 30: 653-657.

DOUGLAS, J.L. 2004. Candida biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiol* 11: 30-36. 2000.

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

DUARTE, L.C., JUCHEM, P.L., PULZ, G.M., BRUM, T.M.M., CHODUR, N., LICCARDO, A., FISCHER, A.C., ACAUAN, R.B. Aplicações de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e sistema de energia dispersiva no estudo de gemas: exemplos brasileiros. *Pesquisa em geociências* 30(2): 3-15. 2003.

ESPINEL-INGROFF, A. Clinical Relevance of fungal susceptibility testing and antifungal resistance. *Clinical microbiology Newsletter* 22: 137-140. 2000.

ESTIVILL, D., ARIAS, A., TORRES-LANA, A., CARRILLO-MUÑOZ, A.J., ARÉVALO, M.P. Biofilm formation by five species of Candida on three clinical materials. *Journal of Microbiological Methods* 86 238–242. 2011.

FANNING, S., MITCHELL, A.P. Fungal Biofilms. *PLoS Pathog.* 8(4): e1002585. 2012.

FAROOQI, J.Q., JABEEN, K., SAEED, N., IQBAL, N., MALIK, B., LOCKHART, S.R., ZAFAR, A., BRANDT, M.E., HASAN, R. Invasive candidiasis in Pakistan: clinical characteristics, species distribution and antifungal susceptibility. *Journal of Medical Microbiology* 62: 259–268. 2013.

FELDMAN, M., AL-QUNTAR, A., POLACHECK, I., FRIEDMAN, M., STEINBERG, D. Therapeutic Potential of Thiazolidinedione-8 as an Antibiofilm Agent against Candida albicans. *PLoS ONE* 9(5): e93225. 2014.

FERREIRA, B.F.F., RAGAZZINI, L.J., ANDRADE, M.C. Investigação da Sensibilidade ao Fluconazol e Produção de Enzimas Hidrolíticas por *Candida* sp. Isoladas do Trato Respiratório de Pacientes Internados em um Hospital no Sul de Minas Gerais. *Rev Ciências Saúde* 2: 1-9. 2012.

GIOLO, M.D., SVIDZINSKI, T.I.E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *J Bras Patol Med Lab* 46(3): 225-234. 2010.

GHANNOUM M, ROILIDES E, KATRAGKOU A, PETRAITIS V, WALSH T.J. The Role of Echinocandins in Candida Biofilm-Related Vascular Catheter Infections: In Vitro and In Vivo Model Systems. *Clin Infect Dis.* 1;61 Suppl 6:S618-21. 2015.

GOLD, N., STOUT, H.A., PAGANO, I.F.; DONOVICK, R. Amphotericin A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. *In vivo* studies. *Antibiot. Annu.* 1955-1956: 579-586. 1956.

HAN, S. S.; YIM, J. J.; YOO, C. G.; KIM, Y. W.; HAN, S. K.; SHIM, Y. S.; LEE, S. M. Clinical Characteristics and Risk Factors for Nosocomial Candidemia in Medical Intensive Care Units: Experience in a Single Hospital in Korea for 6 Years. *Journal of Korean Medical Science* 25: 671-6. 2010.

HARRIOTT, M.M.; NOVER, M.C. Importance of Candida –bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol* 19, 557-563. 2011.

HAWSER, S.P., DOUGLAS, L.J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infection and Immunity* 62: 915-21. 1994.

HENRIQUES, M., AZEREDO, J., OLIVEIRA, R. *Candida* species adhesion to oral epithelium: factors involved and experimental methodology used. *Crit Rev Microbiol* 32: 217–226. 2006.

HOBSON, R.P. The global epidemiology of invasive *Candida* infections is the tide turning? *Journal Hospital Infection* 55: 159-68. 2003.

HOLLAND, L.M., SCHRÖDER, S.M., TURNER, S. A., TAFF, H., ANDES, D., GRÓZER, Z., GÁCSE, A., AMES, L., HAYNES, K., HIGGINS, D.G., BUTLER, G. Comparative Phenotypic Analysis of the Major Fungal Pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *PLoS Pathogens* 10(9): e1004365. 2014.

HOOG, G. S., GUARRO, J., GENE, J., FIGUERAS, M. J. *Atlas of Clinical Fungi*, 2 ed., Utrecht/Reus, Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili. 2000.

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

IBRAHIM, M.A.; PIRJO, K.; AFLATUNI, A.; TIILIKKALA, K.; HOLOPAINEN, J.K. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: With special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. *Agricultural and Food Science in Finland*, v. 10, p.243-259. 2001.

IRIART, X., LAVERGNE, R.A., FILLAUX, J., VALENTIN, A., MAGNAVAL, J.F., BERRY, A., CASSAING, S. Routine identification of medical fungi by the new Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight system with a new time-effective strategy. *J. Clin. Microbiol* 50:2107–2110. 2012.

JIN, Y., YIP, H.K., SAMARANAYAKE, Y.H., YAU, J.Y., SAMARANAYAKE, L.P. 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* 41: 2961–2967. 2003.

KIM, J.; MARSHALL, M.R.; WEI, C.. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2839–2845. 1995

KRIENGKAUYKIAT, J., ITO, J.I., DADWAL, S.S. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. *Clinical Epidemiology* 3: 175–191. 2011.

KUMAR, C.P.G., MENON, T. Biofilm production by clinical isolates of *Candida* species. *Medical Mycology* 44: 99–101. 2006.

KUHN DM, GEORGE T, CHANDRA J, MUKHERJEE PK, GHANNOUM MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrobial Agents Chemother* 46:1773–80. 2002.

KULLBERG BJ, ARENDRUP MC. Invasive Candidiasis. *N Engl J Med* 373;15. 2015.

LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J. E. C., HEINS-VACCARI, E. M., MELO, N.T. *Tratado de Micologia Médica*, 9 ed., São Paulo, Sarvier. 2002.

LIM, C.S.Y, ROSLI, R., SEOW, H.F., CHONG, P.P. Candida and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 21–31. 2012.

LIMA, E.M., ANDRADE, D., HAAS, J,V. Avaliação Prospectiva da Ocorrência de Infecção em Pacientes Críticos de Unidade de Terapia Intensiva. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* 19 (3). 2007.

LIMA-NETO, R.G., BELTRÃO, E.I.C., OLIVEIRA, P.C., NEVES, R.P. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. *Mycoses* 54(1): 23–29. 2011.

LODDER, J. The yeasts: a taxonomic study. *London: Amsterdam North Holland* 1385. 1970.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *J. bras. pneumol.* 32 (5). 2006.

MAYER F,L., WILSON, D., HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4: 119–128. 2013.

MATTEDE, M.G.S., PIRAS, C., MATTEDE , K.D.S., FERRARI, A.T., BALDOTT, L.S., ASSBU, Z.M.S. Infecções urinárias causadas por *Trichosporon* spp. em pacientes graves internados em unidade de terapia intensiva. *Rev Bras Ter Intensiva* 27(3):247-251.2015.

MAHMOUDABADI, A.Z., ZARRIN, M., KIASAT, N. Biofilm Formation and Susceptibility to Amphotericin B and Fluconazole in *Candida albicans*. *Jundishapur J Microbiol* 7(7): e17105. 2014.

MAZARI, W., BOUCHERIT-OTMANI, Z., BOUCHERIT, K. In vitro susceptibility of amphotericin-B, voriconazole and caspofungin against *Candida guilliermondii* biofilms,

isolated from dentals units water pipes, under different growth phases. *Journal of Medical Mycology* 25: 57–62. 2015.

MAZZANTI, G.; BATTINELLI, L.; SALVATORE, G. Antimicrobial properties of the linalol-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var *decumbens* (Lamiaceae). *Flavour and Fragrance Journal* 13: 289-294. 1998.

MENEZES, V.M., FARIAS VALE, I.N., 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* 42(3): 289-300. 2013.

MICELI, M.H., DIAZ, J.A., LEE, S.A. Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet infectious diseases* 11(2):142-51. 2011.

MOHAMMADI, P., SHOAIE, N., MOHAMMADI, S.R. Isolation and Detection of Yeast Biofilms From Urine Catheters of Infectious Patients. *Jundishapur J Microbiol* 5(4):533–6. 2012.

MORSE, S.S. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases* 1:7-15. 1995.

MUKHERJEE PK, CHANDRA J, KUHN DM, GHANNOUM MA. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun* 71: 4333–40. 2003.

MSU, Montana State University, Center for Biofilm Engineering. Brief history of "biofilm". Disponível em: <http://www.biofilm.montana.edu/node/2930>. Acesso em 13 jan.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard: document no M27-A2. Wayne, PA: NCCLS, 2002. 2014.

NEGRI, M., SILVA S, CAPOCI I.R, AZEREDO J, HENRIQUES M. *Candida tropicalis* Biofilms: Biomass, Metabolic Activity and Secreted Aspartyl Proteinase Production. *Mycopathologia*. Nov 16. 2015

NUCCI, M., COLOMBO, A. L. Risk Factors for Breakthrough Candidemia. *European Journal Microbiology Infections Diseases* 27: 209-211. 2002.

ODDS, F.C., BROWN, A.J., AND GOW, N.A. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 11: 272-279. 2003.

OH, B.J., SHIN, J.H., KIM, M.N., SUNG,H., LEE, K., JOO, M.Y. Biofilm formation and genotyping of *Candida haemulonii*, *Candida pseudo haemulonii*, and a proposed new species (*Candida auris*) isolates from Korea. *MedMycol* 49(1):98-102. 2011.

PAGANO, L. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Hematologica/the hematology journal* 91: 1068-1075. 2006.

PANNANUSORN, S., FERNANDEZ,V., ROMLING, U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. *Mycoses* 56,264–272. 2013.

PAPPAS, P.G. Micafungin for candidiasis. *Mycoses* 55:8–12. 2012.

PARAMYTHIOTOU, E., FRANTZESKAKI, F., FLEVARI, A., ARMAGANIDIS, A., DIMOPOULOS, G. Invasive Fungal Infections in the ICU: How to Approach, How to Treat. *Molecules* 19: 1085-1119. 2014.

PAUW, B. E.; PICAZO, J. J. Present situation in the treatment of invasive fungal infection. *International Journal of Antimicrobial Agents* 32: 167-171. 2008.

PFALLER MA, DIEKEMA DJ, GIBBS DL. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of

Candida species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol* 45: 1735–45. 2007.

PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4419–4431. 2004.

PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J., RINALDI, M.G., BARNES, G., HU, B., VESELOV, A.V. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* and Other Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole by Standardized Disk Diffusion Testing. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (12): 5848-5859. 2005.

PFALLER, M.A., MOET, G.J., MESSER, S.A., JONES, R.N., CASTANHEIRA, M. Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *J Clin Microbiol* 49(1):396-9. 2011.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Role of Sentinel Surveillance of Candidemia: Trends in Species Distribution and Antifungal Susceptibility. *Journal Clinical Microbiological* 40: 3551-3557. 2002.

PRATES, H.T.; SANTOS, J.P. Óleos essenciais no controle de pragas de grãos armazenados. p.443-461. In: LORINI, I.; MIIKE, L.H.; SENSSEL, V.M. (eds.), Armazenagem de grãos. Campinas: Instituto Bio Geneziz, 1000.

PRAZYNSKA, M., GOSPODAREK, E. 2014. In Vitro Effect of Amphotericin B on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* Biofilm Formation. *Mycopathologia* 177:19–27. 2002.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v.39, p.603-613. 2001.

REX, J.H.; PFALLER, M.A.; GALGANI, J.N. Development of interpretive Breakpoints for antifungal susceptibility testing: Conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo

correlation data for fluconazole, itraconazole and *Candida* infection. *Clinical Infection Diseases* 24: 235-247. 1997.

REX, J.H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T.J.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M.A.; GOSEY, L.; ODDS, F.C.; RINALD, M.G.; SHEEHAN, D.; WARNOCK, D. W. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clinical Microbiological* 14: 643-658. 2001.

REYS, G.; GHANNOUM, M.A. Antifungal susceptibility testing of yeast: uses and limitations. *Drug Resistance Update* v: 14-19. 2000.

ROSA, M.S.S.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; BIZZO, H.R.; SOARES, R. M. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C.S.; LOPES, A.C.H.C.L. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 1895-1901. 2003.

RUAN, S.Y., KUO, Y.W., HUANG, C.T., HSIUE, H.C., HSUEH, P.R. Infections due to *Candida haemulonii*: species identification, antifungal susceptibility and outcomes. *Int J Antimicrob Agents* 35(1):85-8. 2010.

SABATELLI, F., PATEL, R., MANN, P.A. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 2009-2015. 2006.

SANTANA, D.P., RIBEIRO, E.L., MENEZES, A.C.S., NAVEZ, P.L.F. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.* 12(2): 229-233. 2013.

SHIN JH, KIM MI-NA, JANG S J, JU, MY, KIM SH, SHIN MG, SUH SP, RYANG DW. Detection of Amphotericin B Resistance in *Candida haemulonii* and Closely Related Species by Use of the Etest, Vitek-2 Yeast Susceptibility System, and CLSI and EUCAST Broth Microdilution Methods. *J. Clin. Microbiol.*, 50(6):1852. 2012.

SILVA CM, PARAHYM AMCR, LEÃO MPC, OLIVEIRA NT, AMORIM RJM, NEVES RP. Fungemia by *Candida pelliculosa* (*Pichia anomala*) in a Neonatal Intensive Care Unit: A possible Clonal Origin. *Mycopathologia*. 2012.

SILVA, C.M. ; PARAHYM, A. M. R. C. ; MACEDO, D. P. C. ; LIMA-NETO, R. G. ; FRANCISCO, E. C. ; MELO, A. S. A. ; SILVA, M. C. M. ; JUCÁ, M.B. ; MELO, L. R. B. ; AMORIM, R. ; NEVES, R. P. Neonatal Candidemia Caused by *Candida haemulonii*: Case Report and Review of Literature. *Mycopathologia* 179: 1-5. 2015.

SILVA, C.M., CARVALHO, P.A.M.R., LEÃO, M.P.C., OLIVEIRA, N.T., JESUS, M.A.R., NEVES, R.P. Fungemia by *Candida pelliculosa* (*Pichia anomala*) in a Neonatal Intensive Care Unit: A Possible Clonal Origin. *Mycopathologia*, 174: 2. 2013.

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

SILVA, S., NEGRI, M., HENRIQUES, M., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D., AZEREDO, J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol* 19: 241-247. 2011.

SILVA, S., NEGRI, M., HENRIQUES, M., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D., AZEREDO, J. Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. *J Med Microbiol* 59: 747-754. 2010.

SIMITSOPOULOU, M., CHATZIMOSCHOU, A., ROILIDES, E. Biofilms and Antifungal Susceptibility Testing. *Methods Mol Biol.*, 1356:183-97. doi: 10.1007/978-1-4939-3052-4_14. 2016.

SPANU, T., POSTERARO, B., FIORI, B., D'INZEO, T., CAMPOLI, S., RUGGERI, A., TUMBARELLO, M., CANU, G., TRECARICHI, E.M., PARISI, G., TRONCI, M., SANGUINETTI, M., FADDA, G. Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing blood-stream infections: an

observational study in two large microbiology laboratories J.Clin.Microbiol 50:176–179. 2012.

SUN, J. D-Limonene: Safety and clinical applications. Altern. Med. Rev.12: 259-264. 2007.

TAMURA, N.K., NEGRI, M.F.N., BONASSOLI, L.A., SVIDZINSKI, T.I.E. Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers'. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 91-93. 2007.

THEIN, Z.M., SAMARANAYAKE, Y.H., SAMARANAYAKE, L.P. *In vitro* biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch Oral Biol* 52: 761–767. 2007.

TOBUDIC S, LASSNIGG A, KRATZER C, GRANINGER W, PRESTERL E. Antifungal activity of amphotericin B, caspofungin and posaconazole on *Candida albicans* biofilms in intermediate and mature development phases. *Mycoses* 53: 208– 14. 2010.

TOBUDIC S, KRATZER C, LASSNIGG A, PRESTERL E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses* 55, 199–204. 2012.

TUMBARELLO M, POSTERARO B, TRECARICHI EM et al. Biofilm production by *Candida* species and in adequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol*; 45:1843–50. 2007.

UEDO, N.; TATSUTA, M.; LISH, H.; BABA, M.; SAKAI, N.; YANO, H.; OTANI, T. Inhibition by d-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-NO-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Letters*, v. 137, p.131-136. 1999.

VILLAR-VIDAL M, MARCOS-ARIAS C, ERASO E, QUINDOS G. Variation in biofilm formation among blood and oral isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*;29(9):660–5. 2011.

WINGARD, J.R., LEATHER, H. A new era of antifungal therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 10: 73-90. 2004.

WINGETER, M.A.; GUILHERMETTI, E.; SHINOBU, C.S., TAKAKI, I.; SVIDZINSKI, T.I.E. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. *Revista Brasileira de Medicina Tropical* 40: 272-27. 2007.

YU, Y., DU, L., YUAN, T., *et al.* Risk factors and clinical analysis for invasive fungal infection in neonatal intensive care unit patients. *Am J Perinatol* 30(7):589–94. 2013.

ZAOUTIS T.E., FORAKER, E., MCGOWAN K.L., *et al.* Antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric patients: A survey of 4 children's hospitals. *Diag Microbiol Infect Dis* 52:295-298. 2005.