



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

DIORGENES PINTO SANTANA

AÇÃO DE CHALCONAS SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME DE
Candida albicans ISOLADAS DE CAVIDADE BUCAL

Orientador

Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves

Anápolis-Go
2012

DIORGENES PINTO SANTANA

AÇÃO DE CHALCONAS SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME DE
Candida albicans ISOLADAS DE CAVIDADE BUCAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Orientador: Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves

Anápolis-Go
2012

Agradecimentos

A **Deus**, primeiramente por sempre me acompanhar renovando minhas forças e saúde necessárias. Toda honra e glória seja dada a Ti.

À minha **família** a quem sempre me apoia e em especial a minha esposa **Ana Caroline Nunes Costa Santana** pelo respeito, incentivo e paciência.

Ao orientador **Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves** pelos valiosos conhecimentos a mim repassados e pelos períodos de sua atenção e paciência ao ensinar.

Ao **Prof. Dr. Evandro Leão Ribeiro**, por ceder às amostras de *Candida albicans* e por sua gentileza em dispor das informações e análises feitas.

Ao **Prof. Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino**, pela parceria cedendo os compostos de chalconas e acrescentando conhecimento ao trabalho.

A **CAPES** pela concessão da bolsa, que contribuiu financeiramente para esse projeto.

A todos os alunos de iniciação científica do Laboratório de Microbiologia - UEG, e ao técnico de laboratório **Oswaldo Gomes Pinto**.

Enfim a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

Rom. 11: 36
Porque Dele, e por meio Dele, e para
Ele são todas as coisas. A Ele, pois, a
glória eternamente. Amem!

Resumo

A incidência de infecções fúngicas vem aumentando significativamente nos últimos anos. A espécie *Candida albicans* é a levedura responsável pela maioria destas infecções. Este fungo é um oportunista dimórfico que se apresenta sob forma de levedura no estado sapróbio associada à colonização assintomática, ou como forma filamentosa de pseudo-hifas e hifas verdadeiras em processos infecciosos. O conjunto de determinados fatores de virulência, tais como adesinas, produção de proteinases e fosfolipases, além da formação de comunidades microbianas denominadas biofilme, facilitam a penetração nos tecidos e conferem uma maior patogenicidade a estas leveduras. Embora exista quantidade considerável de antifúngicos disponíveis, grande parte deles apresenta modos de ação similares, fato que contribui para o aumento da incidência de resistência entre os fungos patogênicos. Diante disso, há uma crescente necessidade de novas alternativas terapêuticas. Neste contexto, o controle da expressão dos fatores de virulência de *C. albicans* encontra-se como uma interessante abordagem complementar ao arsenal antifúngico disponível e a investigação de compostos derivados da estrutura básica de chalconas tem mostrado resultados promissores na inibição de micro-organismos. No presente trabalho foram estudados fatores de virulência de 32 amostras *C. albicans* isoladas de cavidade bucal, tais como a morfotipagem, tubotipagem, enzimotipagem e a formação de biofilme além da tipagem por toxinas *killer*. Os compostos sintetizados foram avaliados quanto à toxicidade pelo ensaio de letalidade de *Artemia salina*, atividade antifúngica e impacto de concentrações subinibitórias na formação de biofilme por estes micro-organismos. Os resultados mostraram que os isolados de *C. albicans* expressaram de forma variável os fatores de virulência, que todas as leveduras foram formadoras de biofilme e que não houve correlação entre esta propriedade e a expressão concomitante dos outros fatores de virulência estudados. As chalconas apresentaram-se com baixa toxicidade contra *A. salina*, com pouca atividade antifúngica e com uma significativa ação inibitória da formação de biofilme por *C. albicans*.

Palavra chave: *Candida albicans*, Biofilme, Fatores de virulência, Chalconas.

Abstract

The incidence of fungal infections has increased significantly in recent years. *Candida albicans* yeast is responsible for most of these infections. It fungus is an opportunistic dimorphic which presents itself in the form of yeast in the state saprobic associated with asymptomatic colonization, or as a form of pseudo-filamentous hyphae and true hyphae in infectious processes. The set of specific virulence factors, such as adhesins, production of proteases and phospholipases, besides the formation of microbial communities called biofilms, facilitate tissue penetration and confer a higher pathogenicity to these yeasts. Although there is considerable amount of available antifungal agents, many of them have similar modes of action, a fact which contributes to the increasing incidence of resistance among pathogenic fungi. Therefore, there is a growing need for new therapies. In this context, the control of the expression of virulence factors of *C. albicans* is found as an interesting complementary approach to the antifungal armamentarium available and investigation of compounds derived from the basic structure of chalconas have shown promising results in inhibition of microorganisms. In this work we studied virulence factors of 32 samples *C. albicans* isolated from the oral cavity, such as morphotyping, tubotipagem, enzimatipagem and biofilm formation by typing addition to killer toxins. The synthesized compounds were evaluated for toxicity testing of brine shrimp lethality, antifungal activity and impact of subinibitory concentrations in biofilm formation by these micro-organisms. The results showed that isolates of variably expressed virulence factors *C. albicans*, all yeasts were biofilm formers and that there was no correlation between this property and the concomitant expression of other virulence factors. The chalconas presented with low toxicity against *A. salina*, with little antifungal activity and a significant inhibitory effect of biofilm formation by *C. albicans*.

Key words: *Candida albicans*, biofilm, virulence factors, Chalconas.

Sumário

1.	Introdução	1
2.	Objetivos	4
2.1.	Objetivos Gerais	4
2.2.	Objetivos Específicos	4
3.	Referencial Teórico	5
3.1.	Leveduras do Gênero <i>Candida</i>	5
3.2.	Importância Clínica de <i>Candida albicans</i>	5
3.3.	Aspectos Moleculares da Superfície de <i>Candida albicans</i>	7
3.4.	Fatores de Virulência de <i>Candida albicans</i>	8
3.4.1	Adesão	8
3.4.2.	Formação de Biofilme	9
3.4.3.	Produção de Exoenzimas	12
3.4.4	Dimorfismo Celular	13
3.5.	Sensibilidade aos Antifúngicos	15
3.6.	Chalconas	16
3.6.1.	Propriedades Antifúngicas	17
4.	Materiais e Métodos	18
4.1.	Síntese de Chalconas	18
4.2.	Condições Preliminares de Cultivo	18
4.3.	Fatores de Virulência de <i>Candida albicans</i>	18
4.3.1.	Morfotipagem	19
4.3.2.	Tubotipagem (Teste de Reynolds-Braude)	19
4.3.3.	Enzimotipagem (Aspartil Proteinases e Fosfolipases)	19
4.4.	Tipagem pela Sensibilidade a Toxina <i>Killer</i>	20
4.5.	Preparo de Saliva Artificial	20
4.6.	Formação de Biofilme	21
4.7.	Análise Estatística	22
4.8.	Ensaio de Letalidade em <i>Artemia salina</i>	23
4.9.	Determinação da Suscetibilidade <i>in vitro</i>	23

5.0.	Interferência das Chalconas na Formação de Biofilme	25
5.	Resultados e Discussão	26
5.1.	Síntese de Chalconas	26
5.2.	Fatores de Virulência de <i>Candida albicans</i>	26
5.2.1	Morfotipagem	26
5.2.2.	Tubotipagem (Teste de Reynolds-Braude)	27
5.2.3.	Enzimotipagem (Aspartil Proteinases e Fosfolipases)	28
5.3.	Tipagem pela Sensibilidade à Toxina <i>Killer</i>	29
5.4.	Formação de Biofilme	30
5.4.1	Densidades Ópticas - Cristal Violeta	30
5.4.2	Formação Específica do Biofilme	31
5.5.	Estudo da Toxicidade das Chalconas pelo Ensaio de Letalidade com <i>Artemia salina</i> Leach.....	32
5.6.	Determinação de Suscetibilidade <i>in Vitro</i>	33
5.7.	Impacto de Concentrações Subinibitórias das Chalconas na Formação de Biofilme	35
6.	Conclusões	39
7.	Referências Bibliográficas	40
8.	Anexos	50

Lista de Abreviaturas

ATCC – *American Type Culture Collection* (Coleção Cultura Tipo Americana)

BHI – *Brain Heart Infusion* (Infusão de cérebro e coração)

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CWP – *Cell Wall Protein* (Proteínas de parede)

DL₅₀ - Dose Letal para 50% de indivíduos de uma determinada população

DNA – *Desoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucléico)

GlvNan – N-Acetilglucosamina

HIV - *Human immunodeficiency virus* (Vírus da imunodeficiência humana)

IgA – Imunoglobulina A

pH - potencial de hidrogênio iônico

Pir-CWP - *Cell Wall Protein* (Proteína de parede celular com seqüência interna repetitiva).

RNA – *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucléico)

UFC – Unidade Formadora de Colônia

YNB – *Yeast Nitrogen Base* (Base Nitrogênio Levedura)

Lista de gráficos

Gráfico 1. Índice de Formação Específico de Biofilme por <i>Candida albicans</i>	31
--	----

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura da parede celular de <i>Candida albicans</i>	7
Figura 2. Desenvolvimento do biofilme de <i>Candida albicans</i>	10
Figura 3. Células de <i>Candida albicans</i>	14
Figura 4. Estrutura básica das chalconas	16
Figura 5. Esquema do processo de quantificação de biofilme	22
Figura 6. Organização de amostras e compostos químicos na placa de microtiter.....	24

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Composição química do biofilme	11
Tabela 2.	Metodologias de estudo de biofilmes microbianos	12
Tabela 3.	Composição do meio de cultura saliva artificial	21
Tabela 4.	Compostos selecionados	26
Tabela 5.	Morfotipos detectados nas amostras de <i>Candida albicans</i> estudadas	27
Tabela 6.	Formação de tubo germinativo por <i>Candida albicans</i> em soro fetal bovino	28
Tabela 7.	Produção de aspartil proteinases e fosfolipase por <i>Candida albicans</i>	28
Tabela 8.	<i>Killer</i> -tipos de <i>Candida albicans</i> da cavidade bucal	29
Tabela 9.	Médias e desvios-padrão das densidades ópticas (DO) de <i>Candida albicans</i>	30
Tabela 10.	Dose letal para <i>Artemia salina</i>	32
Tabela 11.	Concentração mínima inibitória de antifúngicos	33
Tabela 12.	Atividade antimicrobiana das chalconas contra <i>Candida albicans</i>	34
Tabela 13.	Formação específica de biofilme das cepas expostas a concentrações subinibitórias de chalconas	36
Tabela 14.	Número de cepas com inibição significativa da formação de biofilme pelas chalconas avaliadas.....	37

1. Introdução

As leveduras do gênero *Candida* são encontradas como comensais na superfície da pele, no sistema digestivo, no trato urogenital e ainda na cavidade bucal, onde podem viver sem causar danos ao hospedeiro a menos que existam condições predisponentes que permitam a ocorrência de infecções superficiais ou sistêmicas (VRIONI *et al.*, 2001; KAUFMAN, 2007).

A maior parte das infecções causadas por *Candida albicans* é de origem endógena. Recentemente, a transmissão exógena, principalmente intra-hospitalar, de *C. albicans* e de outras espécies do gênero tem sido relatada (TRABULSI L.R.; ALTERTHUM F., 2005).

O fungo manifesta maior poder invasivo em pacientes debilitados ou em tratamento com antimicrobianos e drogas imunossupressoras, no decurso de doenças crônicas, com deficiência nutricional e imunodeprimidos com frequência aumentando ao longo dos anos. *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente identificada como principal responsável, no entanto, o número de infecções provocadas por outras espécies de *Candida* também vem elevando-se (TRABULSI R.L.; ALTERTHUM F., 2005; CARDOSO, 2007).

Além de características inerentes ao paciente, fatores de virulência desta levedura têm um papel essencial na gênese do processo infeccioso. Aderência, dimorfismo (formação de micélio), variabilidade fenotípica (*switching*), produção de enzimas extracelulares e toxinas constituem os principais fatores relacionados a esta levedura (RIBEIRO, 2008).

A formação de micélio ou pseudo-micélio pelas espécies de *Candida* tem sido relacionada ao aumento da virulência em decorrência da variabilidade antigênica da superfície e do formato micelial que favorece maior aderência, dificultando a fagocitose extra e intracelular pelo sistema imune (VIDOTTO *et al.*, 2002).

A espécie *C. albicans* é considerada atualmente o fungo patógeno humano com maior capacidade de crescer em biofilme. A capacidade de formar biofilmes permite a persistência da levedura e facilita a colonização, invasão e disseminação da infecção (RUIZ, 2006). Células em biofilme possuem fenótipo alterado e uma resistência extraordinária a muitos antifúngicos, tornando sua erradicação um processo difícil (NETT *et al.*, 2007).

O biofilme é uma comunidade microbiana onde as células dos organismos estão irreversivelmente aderidas a uma superfície e embebidas em uma matriz extracelular de substâncias poliméricas, que as próprias células produzem (RUIZ, 2006).

A composição do biofilme de *C. albicans* consiste em uma mistura de células hospedeiras, células em forma de leveduras, pseudo-hifas e hifas, além de matriz extracelular composta de proteínas e polissacarídeos (MUKHERJEE *et al.*, 2005). Podem formar coagregados e/ou ligar a bactérias formando biofilmes mistos, são frequentemente formados pela adesão inicial de micro-colônias fundadoras que em seguida são protegidas do sistema imune pela síntese de exopolímeros e que possuem um lento ritmo de crescimento (LAFLEUR, 2008).

Além disso, mecanismos responsáveis pela resistência a antifúngicos podem estar relacionados a fatores como limitações difusionais dos antimicrobianos pela matriz extracelular, alterações fenotípicas das células no biofilme e ainda com o desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células (CHANDRA *et al.*, 2001; CARDOSO, 2004).

Dado o aumento da resistência de micro-organismos patogênicos aos antibióticos e quimioterápicos utilizados atualmente, os produtos naturais derivados de plantas são considerados como uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos (MESSIER, *et al.*, 2011)

A necessidade de novas alternativas terapêuticas impulsiona investigações com derivados de plantas na perspectiva de se conhecer as propriedades biológicas e terapêuticas eficazes e com menores efeitos colaterais. Os componentes naturais produzidos pelo metabolismo das plantas são fontes potenciais de novos tipos de antifúngicos (MATOS *et al.*, 2009; CASTRO; LIMA, 2010; DINIZ *et al.*, 2010; SILVA; RANGEL, 2010).

Os constituintes químicos encontrados nos vegetais são sintetizados e degradados por inúmeras reações que constituem o metabolismo das plantas. A síntese de compostos essenciais para a sobrevivência dos vegetais faz parte do metabolismo primário das plantas, enquanto que os compostos sintetizados por outras vias fazem parte do metabolismo secundário (SOUSA *et al.*, 2004).

Dentre os produtos do metabolismo secundário estão substâncias com

estrutura básica de chalconas, isoladas de plantas ou produzidas sinteticamente, têm se mostrado interessantes e promissores potenciais como compostos protótipos em inibir o crescimento de micro-organismos como fungos (NIELSEN *et al.*, 2004; SHAHARYAR *et al.*, 2006).

Diante deste contexto e da relevância dos biofilmes para resistência e colonização tanto de tecidos como de superfícies inertes, o objetivo deste trabalho foi avaliar a formação de biofilme por *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal e o impacto de derivados de chalconas na inibição desta estrutura microbiana, por meio de ensaios de suscetibilidade das formas planctônicas e sésseis.

2. Objetivos

2.1. *Objetivos Gerais*

- Avaliar a expressão de fatores de virulência, notadamente a formação de biofilme por amostras de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal e a atividade antifúngica e de inibição da formação de biofilme por chalconas.

2.2. *Objetivos Específicos*

- Definir a habilidade das amostras de *Candida albicans* para formação de biofilme em saliva artificial;
- Correlacionar a formação de biofilme com a expressão concomitante de outros fatores de virulência, tais como a morfotipagem, tubotipagem, enzimatipagem, tipagem por toxinas *killer*;
- Avaliar a toxicidade das chalconas pelo ensaio de letalidade de *Artemia salina*;
- Estudar a atividade antifúngica das chalconas e o impacto de concentrações subinibitórias na formação de biofilme por *C. albicans*.

3. Referencial Teórico

3.1. Leveduras do gênero *Candida*

O gênero *Candida* foi taxonomicamente descrito por Berkhout (1923) e Kregen van Rij (1984). São micro-organismos unicelulares, pleomórficos, de ciclo sexual incompleto e pertencentes ao Reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes* e Família *Cryptococcaceae*. É caracterizado por leveduras que apresentam formas arredondadas ou ovais que medem aproximadamente de 2,0 a 4,0mm. São descritas atualmente 197 espécies, sendo que apenas 10% destas são reconhecidas como agentes etiológicos de infecções em seres humanos (MALUCHE; SANTOS, 2008; RIBEIRO, 2008; VALLE; RENDE; OKURA, 2010).

As espécies de *Candida* são consideradas micro-organismos oportunistas presentes na microbiota sapróbia da cavidade bucal e tratos gastrointestinais e urogenitais de seres humanos. Geralmente não ocasionam processos patológicos em indivíduos saudáveis, mas podem acometer pacientes imunocomprometidos e/ou sob terapia antimicrobiana por um período de tempo prolongado (SUZUKI, 2009; MATOS *et al.*, 2009).

No gênero destaca levedura da espécie *Candida albicans* reconhecida por sua maior patogenicidade e responsável pela maioria das infecções nosocomiais. Estas leveduras secretam enzimas proteolíticas capazes de degradar, destruir ou transformar constituintes da membrana celular do hospedeiro induzindo a uma disfunção e/ou destruição física. O papel das enzimas proteolíticas pode ser unicamente digerir proteínas do hospedeiro gerando uma fonte de nitrogênio para a célula e contribuindo para adesão e invasão dos tecidos do hospedeiro (NAGLIK *et al.*, 2003).

3.2. Importância Clínica de *C. albicans*

A partir da metade do século 20, cresceram significativamente os relatos de infecções por *C. albicans* e espécies não-*albicans*. De comensal a importante agente de infecções, o gênero *Candida* converteu-se em sério problema de saúde pública, tal transformação deve-se em grande parte ao próprio progresso da medicina, que ampliou largamente os procedimentos invasivos, violadores das barreiras de

proteção natural, que desenvolveu e intensificou o uso de antibióticos de amplo espectro, alteradores da microbiota sapróbia do organismo humano e que oferece hoje amplas condições para prolongar a vida de pessoas muito debilitadas e suscetíveis a micro-organismos oportunistas (VALLE, 2010).

Candidíases são infecções nas quais as lesões podem ser brandas, agudas ou crônicas, superficiais ou profundas, e de espectro clínico bem variável. O principal agente das candidíases é a *C. albicans*, porém a infecção pode ser causada por outras espécies não-*albicans* (AGUIAR, 2007; BARBEDO & SGARBI, 2010).

O primeiro contato de *C. albicans* com as mucosas ocorre no parto o que pode induzir à primeira manifestação clínica de candidíase, nessa fase a única fonte de defesa são as imunoglobulinas IgA adquiridas durante a amamentação (MATTHEWS R.C. 1994; CARVALHO L.P. *et al.*, 2003).

A incidência de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal é relatada em 45% dos recém-nascidos, 45-65% das crianças saudáveis, 30-45% dos adultos saudáveis, 50-65% das pessoas que usam dentaduras, 90% dos pacientes com leucemia aguda submetidos à quimioterapia e 95% dos pacientes com HIV (AKPAN; MORGAN, 2002). De acordo com RIBEIRO (2006) crianças com Síndrome de Down também possuem uma predisposição a incidência de candidíase, sendo que durante a fase de portador assintomático, estas leveduras apresentam-se na forma arredondada e em elevado número na cavidade bucal facilitando o desenvolvimento nos portadores desta cromossomopatia. A candidíase bucal pode apresentar-se clinicamente de duas formas distintas: agudas ou crônicas. As formas agudas são diferenciadas em candidíase pseudomembranosa aguda e candidíase eritematosa (ou atrófica) aguda. As formas crônicas da doença são conhecidas como atróficas (estomatite ulcerosa relacionada à prótese e quelite angular) e hiperplásicas (NETO, *et al.*, 2005; AGUIAR, 2007).

Quando o equilíbrio biológico entre a microbiota e o organismo hospedeiro encontra-se rompido, as espécies de *Candida* especialmente *C. albicans* têm a capacidade de provocar infecções superficiais acometendo pele, mucosas e sistêmicas que comprometem vísceras, através de disseminações hematogênicas de leveduras pelo organismo, só acometem pacientes que apresentam condições predisponentes como desnutrição, neutropenia, *diabetes mellitus*, desequilíbrio da

microbiota sapróbia pela antibioticoterapia prolongada e uma depressão no sistema imune por várias causas, dentre ela a infecção pelo HIV e a terapia antineoplástica (FURLANETO-MAIA 2007; MALUCHE 2008).

3.3. Aspectos moleculares da superfície de *C. albicans*

Embora haja mais semelhanças do que diferenças entre as células humanas e as fúngicas, a principal característica que é reconhecida pelo sistema imune inato dos hospedeiros infectados, é a parede celular. A composição da parede celular das leveduras possui quantidades significativas de polissacarídeos com β -glucano, quitina e manana (NETEA *et al.*, 2008).

A parede celular é o ponto de contato direto com as células do hospedeiro, possuindo uma estrutura dinâmica e robusta, que protege as células das mudanças no ambiente extracelular (FONTINHA, 2010).

Os componentes da parede celular podem ser distinguidos em duas camadas principais: uma camada exterior que é composta de glicoproteínas e uma camada interna que contém uma estrutura esquelética de polissacarídeos (Figura 1). A estrutura da parede celular é composta de uma estrutura de núcleo de β -(1,3) – glucano covalentemente ligados a β -(1,6) – glucano e quitina (um polímero β -(1,4) ligados de N-acetilglucosamina (GlcNAn) (Fig. 1). Estes polímeros formam ligações de hidrogênio entre microfibrilas polissacarídeos adjacentes (NETEA, M.G. *et al.*, 2008).

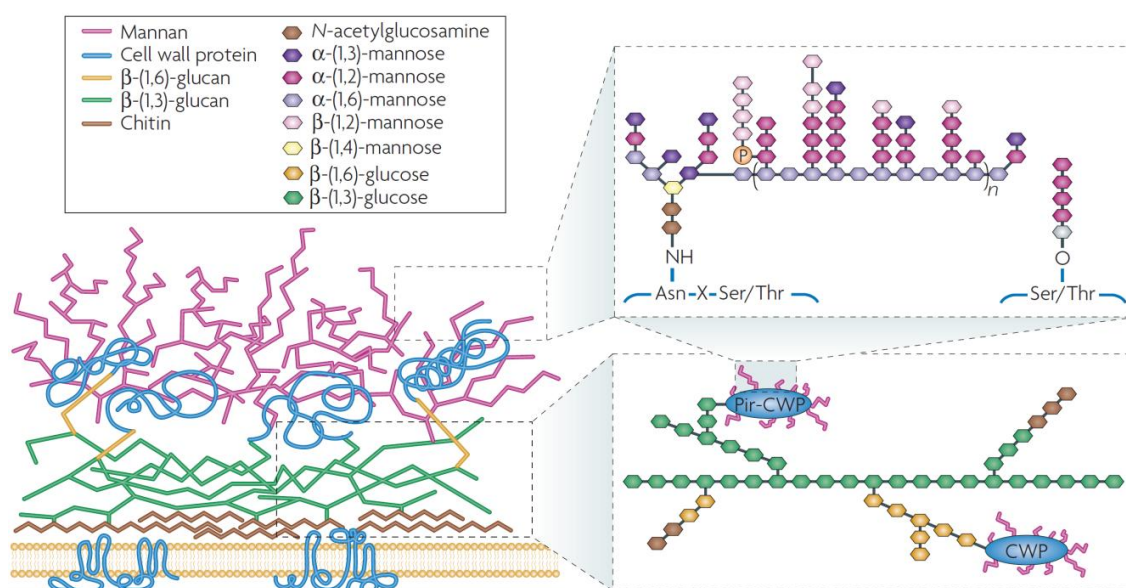


Figura 1. Estrutura da parede celular de *Candida albicans* (Adaptado de NETEA, M.G. *et al.*, 2008).

A parede celular de leveduras é altamente elástica e consideravelmente estendida em células vivas, devido à pressão do turgor exercida nas paredes. A elasticidade da parede reflete a conformação helicoidal das moléculas de β -1,3-glucana. Tais moléculas podem assumir conformações diversas variando entre um estado condensado a um estado completamente estendido (KLIS *et al.*, 2009).

3.4. Fatores de virulência de *C. albicans*

3.4.1. Adesão

Os micro-organismos vivem na cavidade bucal em um ciclo biológico dinâmico, somente podem sobreviver quando conseguem se aderir a superfícies, principalmente os micro-organismos responsáveis por processos patológicos (ACOSTA, 2009).

A adesão é um fenômeno controlado por um sistema de equilíbrio presente na cavidade bucal, onde diversas forças promovem a remoção microbiana como, por exemplo, a deglutição, fricção pela dieta, movimentação da língua, higiene bucal e a auto limpeza da cavidade bucal através dos movimentos mastigatórios (ACOSTA, 2009). E fatores de aderência como produção do tubo germinativo, carboidratos, pH, temperatura, fosfolipases, proteases e outras enzimas extracelulares também podem interferir neste processo (HENNING; PERRONE, 2001; VIDOTTO *et al.*, 2003).

Já o processo de adesão às superfícies do hospedeiro envolve fatores biológicos regulados por mecanismos moleculares específicos, glicoproteínas e proteínas do tipo lectinas. Além de um conjunto de adesinas diretamente envolvidas na adesão de *Candida albicans* ao epitélio humano no qual se ligam a receptores como fibrina, fibronectina e laminina do hospedeiro (CARDOSO, 2004; RIBEIRO, 2008).

Relativamente também estão associadas ao processo de adesão fatores não biológicos, incluídos neste grupo, as forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Outro processo por parte do fungo que proporciona maior aderência é a formação do micélio (DUNNE, 2003; RAMAGE, 2004).

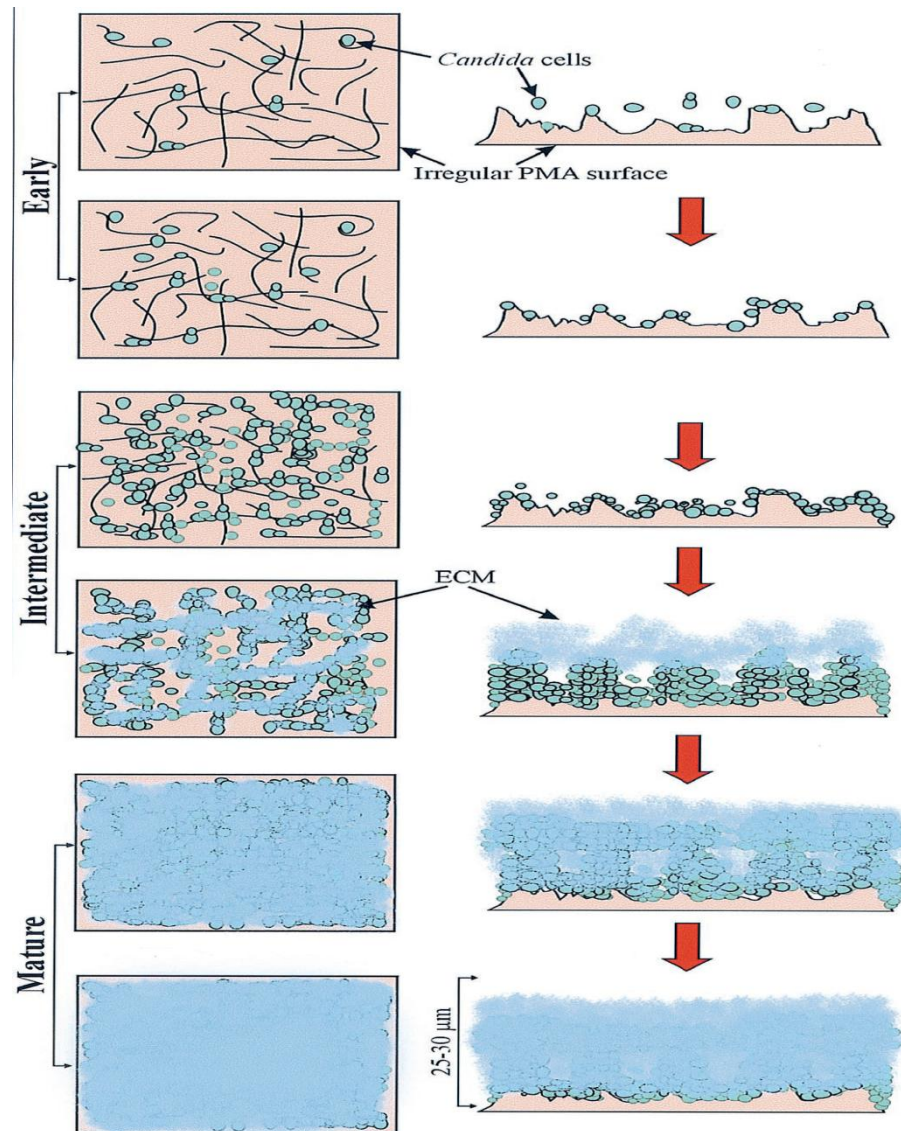
3.4.2. Formação de biofilme

A patogenicidade ou potencial de virulência pode ser definido com a capacidade da levedura em aderir na superfície do hospedeiro, infectar e causar doenças. Um dos principais mecanismos de virulência de *C. albicans* é a sua capacidade em adesão e adaptação a superfícies variadas, formando as comunidades microbianas denominadas biofilme (SUZUKI, 2009).

Os biofilmes microbianos são definidos como comunidades de micro-organismos irreversivelmente aderidas a uma superfície e que produzem substância polimérica extracelular e que exibem um estado metabólico distinto ao do crescimento planctônico correspondente, especialmente com respeito à transcrição e interações entre as células (LINDSAY & HOLY, 2008).

As vantagens dos micro-organismos se organizarem em comunidades consistem na maior capacidade de captação de nutrientes, favorecendo um crescimento mais ordenado da comunidade e maior proteção contra radiações UV, fagocitose, desidratação e resistência a antimicrobianos (SUZUKI, 2009).

O desenvolvimento desta estrutura (Figura 2) pode ser demonstrado em três fases. Na fase inicial, as células planctônicas aproximam-se ao substrato, existe uma interação hidrofóbica e eletrostática que juntamente com outros fatores biológicos promovem uma aderência à superfície do substrato. Na fase intermediária a proliferação como microcolônias dando início a síntese da matriz extracelular. Com o desenvolvimento do biofilme há o aparecimento de mecanismos de comunicação intercelular que ocasiona uma expressão diferencial de genes. Esses genes são responsáveis pela transição de leveduras para hifas, modificação na arquitetura da parede celular e na coesividade do biofilme dada pela matriz. Na fase madura, o biofilme recém-formado é constituído de uma transição de pseudo-hifas, hifas e leveduras, tudo envolvido pela matriz extracelular polimérica, promovendo crescimento tridimensional (MUKHERJEE, *et al.*, 2005).



Fonte: Adaptado de Chandra, 2001.

Figura 2. Desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*

Legenda: Early – inicial; Intermediate – intermediário; Mature – Maduro; ECM – Polissacarídeo extracelular; Irregular PMA surface – Superfície irregular.

Num biofilme maduro, as células mais próximas da superfície tornam-se inativas e numa fase posterior morrem devido à falta de nutrientes, diminuição do pH, diminuição da concentração de oxigênio e acumulação de produtos tóxicos resultantes no metabolismo celular (LA TOURETTE PROSSER B. *et al.*, 2003 , CARDOSO, 2004)

Estudos recentes sugerem que o desenvolvimento primário, a maturação e o envelhecimento de um biofilme são regulados pela expressão de genes da qual é

dependente da transmissão de sinais entre as células (LA TOURETTE PROSSER B. *et al.*, 2003; CARDOSO, 2004).

A matriz do biofilme possuem canais que permitem a circulação de nutrientes dentro do biofilme (DORLAN & COSTERTON, 2002). A composição da matriz varia de acordo com a natureza dos organismos presentes, um estudo realizado por Douglas (2003) demonstrou que a glicose é o componente principal da matriz do biofilme de *C. albicans* (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química da matriz do biofilme

Componentes	Porcentagem de compostos no biofilme (%)
Glicose	32,2
Outros carboidratos	7,4
Hexosamina	3,3
Fósforo	0,5
Proteínas	5,0
Ácido urônico	0,1

Fonte: Douglas, 2003

A sinalização célula a célula, em especial o *quorum sensing* (sensor de quorum) que corresponde a um processo de comunicação intra e interespecies microbianas é fundamental na formação de biofilmes microbianos. Esta comunicação através de auto-reguladores impede a superpopulação desnecessária e controla a competição por nutrientes e tem implicações importantes no processo infeccioso, particularmente para disseminação e estabelecimento de sítios de infecções (DORLAN, 2002; RAMAGE, 2005).

Tem sido demonstrado que algumas moléculas do *quorum sensing* como o farnesol e dodecanol, inibem a filamentação e tem sido associada à hidrofobicidade de superfície celular, outra molécula autorreguladora é o tirasol que desempenha um papel no crescimento e na morfogênese de *C. albicans*, estimula a filamentação em condições permissivas para a formação do tubo germinativo, apesar do seu papel não está esclarecido em biofilmes (CHEN, 2004; RAMAGE, 2005).

Vários métodos são utilizados para caracterizar as propriedades globais de biofilmes formados por *Candida albicans*. Com algumas exceções esses métodos foram adaptados a partir de métodos relatados para bactérias (DOUGLAS, 2003).

Os procedimentos descritos na tabela 2 vão desde técnicas simples considerando condições de incubação estática, a técnicas que mimetiza condições *in vivo*, onde os biofilmes em desenvolvimento estão sujeitos a um fluxo de líquido, em condições laboratoriais isso pode ser alcançado por agitação ou sistemas de bombeamentos.

Tabela 2. Metodologias de estudo de biofilmes microbianos

Metodologias	Referencias Bibliográficas
Modelos de Crescimento	
Discos de acrílico	Baillie G.S., Douglas L.J. (2003); Hawser S.P. <i>et al.</i> , (1995)
Bandas de acrílico	Nikawa H. (2003); Chandra J. (2003)
Placas de cultura celular 96 Poços	Ramage G. <i>et al.</i> , (2001)
Filtros de celulose	Baillie G.S. <i>et al</i> (2003)
Reator de crescimento	Baillie G.S., Douglas L.J. (2003); Cotter G., Kavanagh K. (2000)
Análise da Ultraestrutura	
Microscopia eletrônica de varredura	Hawser S.P., Douglas L.J. (1995); Baillie <i>et al.</i> , (2003)
Microscopia confocal de varredura a laser	Ramage G. <i>et al.</i> , (2001); Chandra J.,(2001)
Análise Quantitativa do crescimento microbiano	
Peso seco	Robertson D. (1981); Hawser S.P., Douglas L.J. (1995)
Incorporação de isótopos	Robertson D. (1981); Hawser S.P., Douglas L.J. (1995)
Indicadores metabólicos	Baillie <i>et al.</i> , (2003), Chandra J. (2003), Jain <i>et al.</i> , (2007)
Ensaio bioluminescentes de ATP	Nikawa H. (2003); Awong J., Bitton G. & Koopman B. (1985)

Fonte: Adptado de Cardoso, 2004.

3.4.3. Produção de exoenzimas

As espécies de *Candida* apresentam uma grande variedade de enzimas que facilitam o desenvolvimento do processo infeccioso, destacando-se as proteinases e fosfolipases, capazes de promover a destruição das membranas celulares nas células hospedeiras. As fosfolipases degradam especificamente os fosfolipídios nesta estrutura alterando as características da superfície dessas células, facilitando a aderência e, conseqüentemente, a infecção pela levedura. As proteinases

hidrolisam ligações peptídicas das proteínas presentes nas células do hospedeiro (AGUIAR, 2009).

Staib (1965) descreveu pela primeira vez a produção e secreção de proteinases por espécies de *C. albicans*, característica presente não só nesta espécie mais em todo gênero *Candida*.

Segundo MacDonald & Odds (1983) a produção de proteinases seriam um dos fatores determinantes na patogenicidade de espécies de *C. albicans* na invasão e destruição dos tecidos de camundongos. Posteriormente, Ghannoum & Abu-Elteen (1986) corroborando tais achados, mostraram que a produção de proteinases por *Candida* é essencial para que haja a invasão nos tecidos, levando a uma ruptura na adesão entre as células ou até na lise da membrana celular do hospedeiro.

Esta classe de enzima, durante a colonização do fungo, é responsável pela degradação das barreiras da mucosa do hospedeiro, facilitando a sua aderência, digestão de proteínas com finalidade nutricional e quebra da barreira imunológica através do ataque aos linfócitos e macrófagos (PORTELA, 2006).

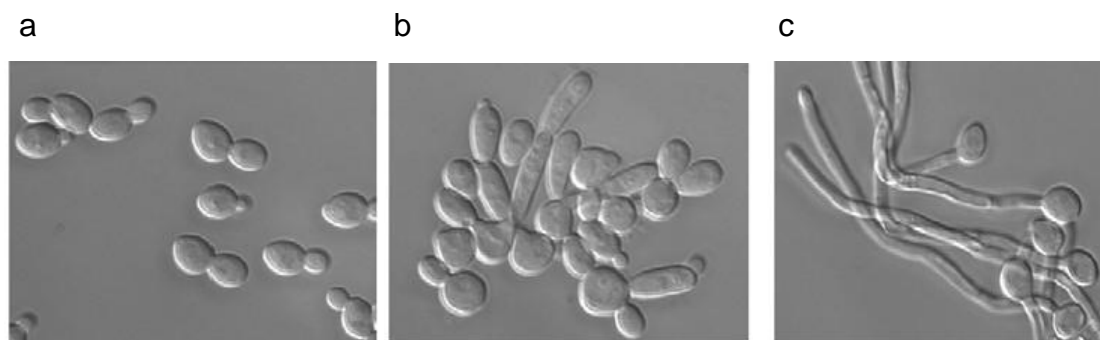
Já as fosfolipases que constituem outro grupo de enzimas associadas aos mecanismos de colonização e/ou infecciosidade de *C. albicans*, foram descritas inicialmente por Werner (1966) que observou tal atividade entre isolados desta levedura em meio enriquecido com gema de ovos (fosfodilcolina e fosfatidiletanolamina).

A produção de fosfolipase é considerada um fator importante para o processo de infecção. Esta enzima, localizada na superfície da levedura e na extremidade do tubo germinativo, atua na hidrólise de fosfolipídios de membrana, causando dano à célula epitelial. Este atributo é específico de *C. albicans*, sendo esta atividade muito alta durante a invasão tecidual (ZARDO; MEZZARI, 2004; KULETA; KOZIK, 2009).

3.4.4. Dimorfismo celular

As espécies do gênero *Candida* têm a capacidade de alterar seu fenótipo em resposta a mudanças do ambiente, fenômeno conhecido como dimorfismo (Figura 3), ou seja, podem crescer em forma de levedura (célula esférica) e também sob a forma filamentosa com hifas (cadeias de células alongadas em paralelo com

constricção e septo) ou pseudohifas (cadeias de células variavelmente alongadas de forma semelhante sem constricções e septo) (KUMAMOTO, 2005).



Fonte: Adaptado de LU Y *et al.*, 2011

Figura 3. Células de *C. albicans* a) levedura, b) pseudo-hifa, c) hifas

A maior parte das espécies de *Candida* mostra um predomínio da forma filamentosa em meios com baixas concentrações de glicose e concentrações elevadas de CO₂. A forma de levedura prevalece quando são cultivadas em meios com elevadas concentrações de glicose e baixas concentrações de CO₂ (CARDOSO, 2004).

Alguns fatores ambientais podem induzir a transição de levedura, hifas ou pseudo-hifas como temperatura, pH, meios que contenham substâncias indutoras (soro, N-acetil-D-glicosamina, L-prolina, etanol) e agentes quelantes que inativam a disulfidril redutase, enzima responsável pela redução das pontes dissulfeto da parede celular (RIBEIRO, 2010).

A infecção causada por *C. albicans* pode ser facilitada pelo desenvolvimento do micélio e do formato tubular da sua forma filamentosa, o qual diminui a capacidade de fagocitose de células do sistema imune, enquanto a forma de micélio proporciona maior aderência à superfície da célula (CLAUDINO, 2007).

Atualmente estudos suportam a conclusão de que a forma de hifas é importante para a virulência. É também muito claro que os genes que controlam a morfologia das hifas são co-expressados com genes que codificam fatores de virulência clássicos, tais como proteinase e adesinas. Assim, a formação de hifas é um componente da estratégia de patogenicidade de *C. albicans* (KUMAMOTO, 2005).

Na forma de hifa existem propriedades invasivas que podem promover a penetração no tecido e escapar do sistema imunológico, enquanto que as células de

levedura são adequadas para disseminação na corrente sanguínea (LU Y *et al.*, 2011).

3.5. *Sensibilidade aos antifúngicos*

O tratamento convencional de candidíases bucais é feito através de uso de agentes antifúngicos sintéticos, tópicos ou sistêmicos, auxiliando a imunidade celular. Dentre os compostos poliênicos a nistatina e a anfotericina B, nucleósidos análogos (pirimidinas-fluorotinas, exemplo: 5 – fluorocitosina) são os mais utilizados, e dentre os compostos azólicos, os mais frequentemente utilizados são o miconazol, cetoconazol e recentemente os triazólicos fluconazol e itraconazol. Outras classes também utilizadas são pneumocandinas-equinocandinas, pradimicinas-benanicinas, nicomicinas, alilaminas e tiocarbamatos (GROLL *et al.*, 2004).

Os antifúngicos possuem moléculas alvos, localizados em componentes estruturais dos fungos, ou em vias metabólicas específicas. Esta propriedade caracteriza seu mecanismo de ação, permitindo a classificação dos compostos antifúngicos em (ZACCHINO, 2001; TORTORA *et al.*, 2000; ODDS *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2003):

- Inibidores da síntese da parede celular fúngica;
- Inibidores dos esteróis de membrana celular;
- Inibidores da síntese do DNA;
- Inibidores de síntese de RNA;
- Inibidores da topoisomerase.

Com o aumento significativo nas duas últimas décadas de candidemias, tem havido de uma maneira geral, um maior interesse pela terapia antifúngica, bem como pelos métodos laboratoriais de detecção da suscetibilidade que auxiliam na escolha da melhor droga a ser empregada ou na análise de eventuais fracassos terapêuticos (PAPPAS, 2006).

No entanto o aumento da incidência de micoses oportunistas vem sendo acompanhado pela resistência aos antifúngicos, apesar de diversos fatores condicionarem essa resistência, o amplo e indiscriminado uso de antifúngicos

azólicos parece ser determinante no aumento da frequência deste fenômeno (NEUFELD, 2009).

O processo de resistência microbiana pode ser definido como a perda de suscetibilidade temporária ou permanente de um micro-organismo sob determinadas circunstâncias. A resistência microbiana geralmente é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação dos agentes antimicrobianos (TRISTÃO, 2008).

3.6. Chalconas

As chalconas (Figura 4) são um grupo de substâncias naturais chamadas de cetonas α , β -insaturadas, precursoras da biossíntese dos flavonóides e isoflavonóides. São encontradas em frutos, folhas e raízes. Os grupamentos aromáticos são encontrados ligados tanto na carbonila quanto na porção olefínica, comumente designados como anel A e anel B, provenientes da reação de condensação (NOWAKOWSKA; WYRZYKIEWICZ; KEIDZIA, 2001; MONOSTORY *et al.*, 2003; NOWAKOWSKA, 2007).

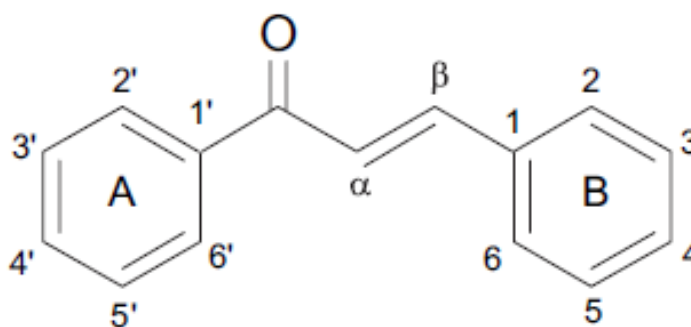


Figura 4. Estrutura básica das chalconas

As chalconas foram inicialmente sintetizadas em 1800 e isoladas em 1910, entretanto seu potencial biológico vem sendo explorado desde a década de 40, mas somente na década de 70 que houve um notável interesse devido ao fato de esta classe de substâncias terem demonstrado atividades antitumoral e antiparasitária (NOWAKOWSKA, 2007; TRISTÃO, 2008).

Nos estudos recentes sobre as propriedades das chalconas tem se comprovado um grande espectro de atividade biológica, o que vem reforçando a realização desde o isolamento, a síntese, a identificação e investigação dos efeitos biológicos. Atualmente sabe-se que as chalconas têm propriedades antiinflamatória, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, citotóxica, antitumoral e anticancerígena (CAMPOS-BUZZI *et al.*, 2006; BOECK *et al.*, 2006; LAHTCHEW *et al.*, 2008; NAVARINI *et al.*, 2009; NOWAKOWSKA; WYRZYKIEWICZ; KEIDZIA, 2001 Apud PADARATZ, 2009).

As reações de substituição no anel A e B podem resultar em compostos com propriedades farmacológicas totalmente distintas, justificando-se o aumento de estudos dos possíveis substituintes e alterações das atividades biológicas dos compostos modificados em relação às moléculas originais (CHIARADIA *et al.*, 2008).

3.6.1. Propriedades antifúngicas

Estudos recentes demonstram que as chalconas apresentam atividade inibitória frente a diversos fungos incluindo espécies de *Candida*, portanto estes compostos são candidatos promissores a protótipos com ação antifúngica. (BOECK *et al.*, 2005; BATOVASKA, 2007;). Um possível mecanismo de ação das chalconas é a inibição da síntese de 1,3- β -D-glucana impedindo assim a formação da parede celular (SIVAKUMAR P.M, 2007).

De acordo com Batovska (2007) e Lahtchev (2008), as chalconas poderiam também inibir a glutathione-S-transferase uma enzima que parece estar envolvida no processo de resistência aos antifúngicos, sendo a atividade antifúngica fortemente dependente dos substituintes dos anéis aromáticos, que se liga com o grupo tiol das proteínas e foi correlacionada com a habilidade de interação do radical sulfídrico dos compostos devida a interação dos efeitos eletrônicos dos radicais substituídos dos anéis aromáticos.

4. Materiais e Métodos

4.1. Síntese de chalconas

Os compostos foram sintetizados a partir de benzaldeídos e acetofenonas pelo Grupo de Química Orgânica da Universidade Estadual de Goiás. As estruturas foram confirmadas quanto ao rendimento, ponto de fusão, ressonância magnética de hidrogênio e cromatografia gasosa.

4.2. Condições preliminares de cultivo

As 32 amostras de *Candida albicans* utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Fungos Patogênicos do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

Inicialmente as amostras de *C. albicans* foram isoladas de pacientes atendidos na Unidade da Clínica de Odontologia Infantil da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, na cidade de Goiânia- GO. As colônias leveduriformes de cor branco-amareladas, cremosas e úmidas foram identificadas, segundo Kreeger-Van Rij, 1984 e Lacaz *et al.*, 1991 e mantidas no Laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública / UFG.

As amostras de *C. albicans* foram crescidas em ágar Sabouraud dextrose com incubação por 48h a 37°C. Após a incubação, cinco colônias foram transferidas para tubos com ágar Sabouraud dextrose inclinado para a manutenção das amostras a temperatura ambiente com repiques mensais, além disso, foram repicadas colônias em ágar BHI com 20% glicerol para congelamento a -5°C.

Além das amostras previamente descritas, também foi avaliada a cepa *C. albicans* ATCC 10231 nos testes de suscetibilidade e ensaios de biofilme.

4.3. Fatores de Virulência de *C. albicans*

Os fatores de virulência de morfotipagem, enzimatipagem, tubotipagem e tipagem por toxinas *killer* foram realizados no Instituto de Patologia tropical e Saúde Pública na Universidade Federal de Goiás.

4.3.1. Morfotipagem

A morfotipagem foi realizada segundo Phongpaichit *et al.*, (1987) e Hunter *et al.*, (1989). As leveduras do gênero *Candida*, cultivadas em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud dextrose por 48 horas a 37°C, foram utilizadas na preparação de 3,0mL de suspensões feitas em água destilada e esterilizada (inóculo ajustado a 3 na Escala de McFarland). Cada suspensão foi inoculada (três por placa de Petri) na superfície do ágar extrato de malte com auxílio de *swabs* esterilizados a fim de formar uma estria padronizada de 8mm de largura por 60mm de comprimento. As placas foram incubadas a 25°C por dez dias, com a inoculação de cada levedura sempre realizada em duplicata. As leituras foram feitas com base nos aspectos macromorfológicos da franja e topografia da colônia.

4.3.2. Tubotipagem (Teste de Reynolds-Braude)

As amostras de *Candida*, foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose por 48 horas, foram inoculadas, após obtenção de suspensão de 1,0mL em água destilada e autoclavada, contendo aproximadamente 10^2 a 10^3 UFC/mL através de contagem das células em câmara de Neubauer, centrifugação a baixa rotação e ressuspensas em tubos de ensaio, contendo 0,5mL de soro fetal bovino, aquecidos em banho-maria a 37°C por quatro horas. Durante este período, a cada intervalo de uma hora, uma gota de suspensão destas amostras foram examinadas ao microscópio (objetiva de 40X) entre a lâmina e lamínula. A evidenciação do tubo germinativo configura teste positivo.

4.3.3. Enzimotipagem (Aspartil Proteinases e Fosfolipases)

As amostras de *Candida*, obtidas de culturas de 48 horas em ágar Sabouraud dextrose, foram semeadas em placa de Petri com alça de platina em pontos equidistantes no meio de albumina e incubadas a 37°C durante 48 horas para a detecção da produção de aspartil proteinases (Rüchel *et al.*, 1982) e no meio enriquecido com gemas de ovo e incubadas por 72-96 horas a 37°C para verificação da produção de fosfolipases (Prince *et al.*, 1982).

A leitura de cada atividade enzimática (Pz) das amostras-teste decorreu da detecção de um halo opaco de precipitação ao redor do ponto de inoculação das

amostras de levedura, medida através da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (dcp), ou seja, $Pz = dc/dcp$ e utilizada como unidade de medida o centímetro (cm). Os resultados foram agrupados em dois níveis, $Pz \geq 0,5$, correspondentes às amostras com baixa atividade enzimática e $Pz < 0,5$, correspondentes às amostras com alta atividade enzimática.

4.4. Tipagem pela Sensibilidade a Toxina Killer

As amostras de *Candida* estudadas, bem como as leveduras produtoras de toxinas killer (K1 a K9), foram previamente incubadas em meio de ágar Sabouraud dextrose modificado, sem azul de metileno, a 37°C por 48 horas antes dos testes. Das amostras-teste, foram preparada suspensões em tubos de ensaio de contendo 1,0mL de água destilada e esterilizada, propiciando a formação de inóculo correspondente a 5 na escala McFarland e esta foi adicionada e homogeneizada em placa de Petri com 20mL do meio de Sabouraud modificado previamente fundido e resfriado a 45°C. Após a homogeneização, foram semeadas com alça de platina no meio solidificado, em pontos equidistantes, as amostras de leveduras killer (K1 a K9). As placas foram incubadas a 25°C por 72 horas. Foram considerados sensíveis (+), os cultivos que produziram halo incolor e/ou zona de inibição com colônias azuis, ao redor do cultivo padrão e resistentes (-), crescimento ao redor das leveduras *killer*.

4.5. Preparo de Saliva Artificial

Os ensaios de formação de biofilme foram realizados em saliva artificial preparada segundo Gal *et al.*, (2001), cuja formulação está descrita na tabela 3. O pH do meio foi ajustado para 6,8, logo após foi esterilizado por filtração e armazenado em geladeira até o momento do uso, por um período máximo de uma semana.

Tabela 3. Composição do meio de cultura saliva artificial

Reagentes	Concentração
NaCl	125,6 mg/L
KCl	963,9 mg/L
KSCN	189,2 mg/L
KH ₂ PO ₄	654,5 mg/L
Uréia	200,0 mg/L
Na ₂ SO ₄	763,2 mg/L
NH ₄ Cl	178,0 mg/L
CaCl ₂	227,8 mg/L
NaHCO ₃	630,8 mg/L
Glicose	2,0 g/L
Extrato de levedura	5,0 g/L
Peptona	5,0 g/L

Fonte: Gal *et al.*, 2001

4.6. Formação de Biofilme

As amostras foram reativadas em ágar Sabouraud dextrose a 37°C por 48 horas, em seguida foram transferidas três colônias para tubos de ensaio com 5mL de caldo Sabouraud dextrose e foram incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente alíquotas de 20µL do caldo crescido, com inóculo variando entre 3×10^7 a $1,8 \times 10^8$ UFC/mL, foram transferidas para poços com 180µL de saliva artificial em placas microtiter de poliestireno não tratadas que foram incubadas por 24 horas a 37°C (JAIN *et al.*, 2007).

As placas foram posteriormente tratadas segundo metodologia descrita por Naves *et al.*, (2008), com a determinação do crescimento total (CT) pela medida da densidade óptica a 630nm, em leitora de microplaca TP-Reader NM Thermo Plate, seguida da remoção do caldo crescido, lavagem dos poços com solução fisiológica e secagem a temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir os poços foram corados com 200µL de cristal violeta a 1% por cinco minutos, após esse período o corante foi desprezado e os poços lavados quatro vezes com 300µL de água destilada. As placas foram incubadas a 37°C por 20 minutos para secagem, posteriormente adicionaram-se 200µL de etanol absoluto em cada poço e a placa microtiter foi

incubada durante 5 minutos.

Após o processamento de coloração das placas as densidades ópticas foram lidas a 492 nm em leitora de microplaca TP-Reader NM Thermo Plate. As leituras de densidade óptica permitiram o cálculo do Índice de Formação Específica de Biofilme (FEB) por meio da fórmula $FEB = LA - PC/CT$, aonde LA = levedura aderida, PC = poço controle não inoculado e CT = crescimento total. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em experimentos independentes (figura 5).

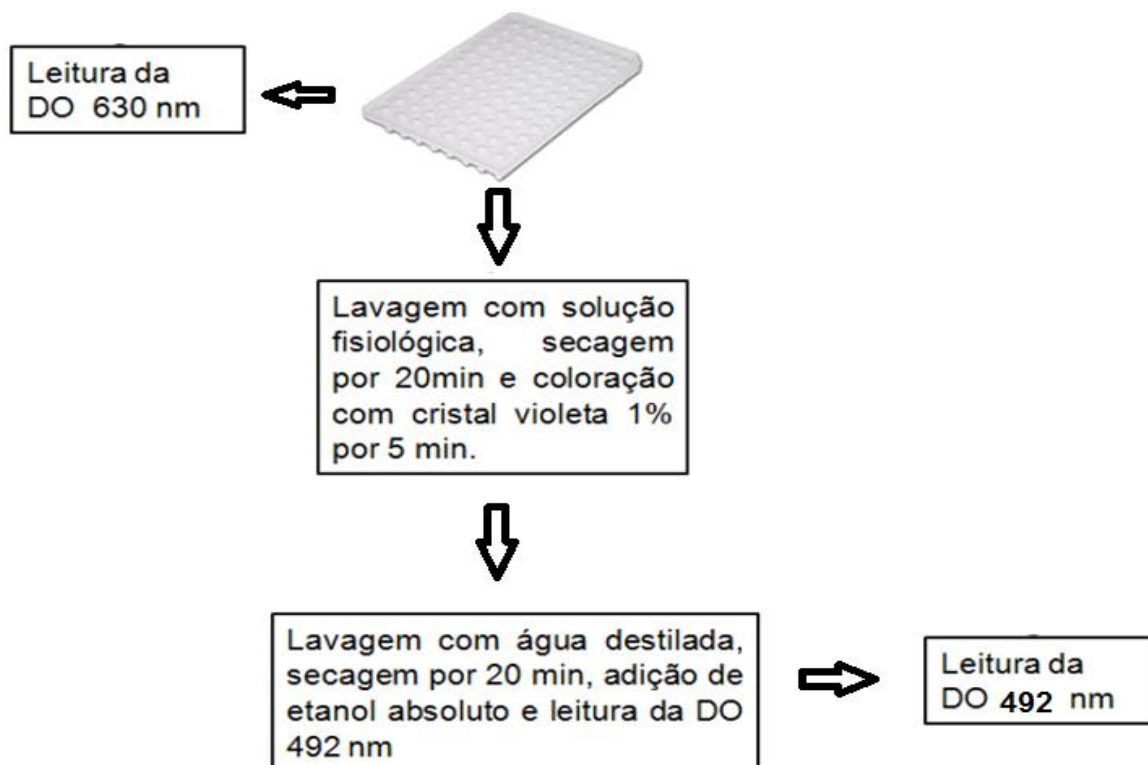


Figura 5. Esquema do processo de quantificação de biofilme.
Legendas: DO – Densidade óptica.

4.7. Análise Estatística

Para análise da correlação entre a formação específica de biofilme (FEB) e a expressão dos demais fatores de virulência de *C. albicans*, tais como morfologia, formação de tubo germinativo, produção de exoenzimas e a sensibilidade a toxinas *killer*, foi utilizada o teste Fisher com $p < 0,05$.

4.8. Ensaio de Letalidade com *A. salina*

O ensaio de toxicidade em microplacas com *A. salina* consistiu nos seguintes passos: A água salina foi preparada com a dissolução de sal marinho em água destilada (40 g/L) e os ovos de *A. salina* foram incubados em água salina por um período de 48 horas a temperatura ambiente (22-29 °C). Após este período, os náuplios foram atraídos por uma fonte de luz e coletados com uma pipeta de Pasteur. Os compostos foram diluídos em série em placas microtiter contendo 96 poços e suspensões homogêneas de náuplios contendo 10-15 larvas (100 µl) foram transferidas para cada poço, logo a placa foi tampada e incubada a temperatura ambiente por um período de 24 horas. Posteriormente as placas foram examinadas utilizando o microscópio óptico, o número de larvas mortas (não moveis) contabilizado em cada poço. Logo após as larvas vivas foram inativadas com 100 µl de metanol em cada poço e após 15 minutos de incubação o número total de náuplios contado, e os valores de DL₅₀ calculados pelo método PROBIT de análise (MOLINA, *et al.*, 2006).

4.9. Determinação de Susceptibilidade *in Vitro*

Todas as amostras de *C. albicans* foram testadas quanto a suscetibilidade aos compostos estudados, seguindo a metodologia proposta por Messier *et al.*, (2011) com modificações. As amostras foram plaqueadas em ágar Sabourand dextrose e incubado por 48 horas a 37°C. As amostras de chalconas foram dissolvidas em 1mL de dimetilsufóxido (DMSO) e transferidos 0,2mL da solução inicial para outro tubo com 9,8 mL de caldo YNB com 0,1% de dextrose, para obtenção da primeira concentração, com auxílio da pipeta multicanal foram feitas sucessivas diluições na microplaca e uma coluna será como controle de crescimento, sem os compostos de chalconas, conforme demonstrado na figura 6. A concentração final de DMSO nos ensaios não excedeu 2%.

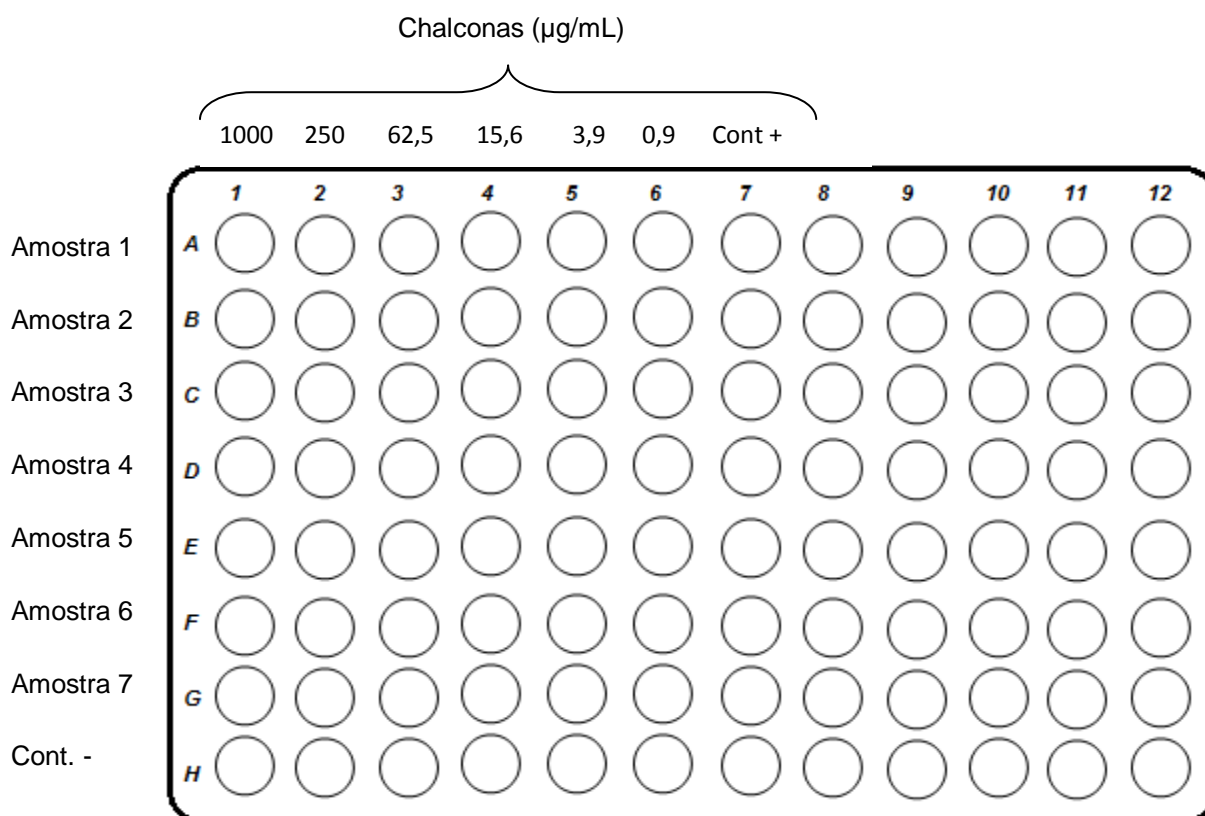


Figura 6. Organização das amostras e dos compostos químicos na placa de microtiter.

Para preparação do inóculo foram suspensas colônias pequenas em 5mL de solução fisiológica estéril (ajustado a escala 0,5 McFarland), seguido de uma diluição (1/100), em caldo YNB, obtendo assim um concentração de aproximadamente 5×10^4 UFC/mL. Para confirmar a concentração do inóculo foram diluído 0,1mL da suspensão em 9,9mL de solução fisiológica estéril com o plaqueamento de 100 μ L.

Para realização dos testes foram transferidos 100 μ L do inóculo ajustado por poço, exceto para os poços controle e 100 μ L da solução com chalconas em diferentes concentrações (0,9, 3,9, 15,6, 62,5, 250 e 1000 μ g/mL) e incubados a 35 °C por 48 horas. Na leitura visual, foi considerada como CMI a menor concentração do composto, que resultou na inibição do crescimento visível nos poços teste em relação aos poços controle.

Após a leitura visual foram feitas leituras espectrofotométricas utilizando leitora de microplaca TP-Reader NM Thermo Plate, o que possibilitou a quantificação da inibição do crescimento de 50% de leveduras em cada poço.

5.0. Interferência das chalconas na formação de biofilme

Definidas as CMI, foram utilizadas concentrações subinibitórias para avaliar o impacto das chalconas na formação do biofilme. As amostras de *Candida albicans* foram cultivadas conforme a metodologia descrita nos estudos de formação de biofilme na presença de concentrações subinibitórias de chalconas.

Para avaliar se as diferenças foram estatisticamente significativas foi realizado o teste t Student pareado, com $p > 0,05$.

5. Resultados e Discussão

5.1. Seleção das chalconas

A escolha dos compostos baseou-se na atividade relatada por Batovska *et al.* (2007) que sintetizaram uma série de chalconas com diversas substituições nos anéis aromáticos, principalmente no anel B e analisaram os efeitos eletrônicos provocados por esses substituintes sobre *C. albicans*. A atividade antifúngica destas substâncias foi correlacionada com a localização do grupo hidroxil no anel B das chalconas.

Na tabela 4 mostra as chalconas selecionadas onde se manteve o grupamento hidroxil no anel B, com modificações no anel A.

Tabela 4. Compostos selecionados

Compostos	Código
Chalconas	
(2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(4-hidroxifenil) prop-2-em-1-ona	I
(2E)-1-(4-metilfenil)-3-(4-hidroxifenil) prop-2-em-1-ona	II
(2E)-1-(4-nitrofenil)-3-(4-hidroxifenil) prop-2-em-1-ona	III
(2E)-1-fenil-3-(4-hidroxifenil) prop-2-em-1-ona	IV

5.2. Fatores de virulência de *C. albicans*

5.2.1. Morfotipagem

A morfotipagem de 32 amostras de *C. albicans*, permitiu caracterizar nove morfotipos. Observou-se o predomínio do morfotipo 5530 - colônia fúngica com franja contínua em leque, igual ou maior a 6mm, de textura intermediária e superfície lisa (Tabela 5).

Tabela 5. Morfotipos detectados nas amostras de *C. albicans* estudadas.

Morfotipo	<i>Candida albicans</i>	
	n=32	%
3240	2	6,3
3340	2	6,3
5320	2	6,3
5330	6	18,8
5340	3	9,4
5530	11	34,4
5540	3	9,4
7530	1	3,1
7540	2	6,3

A capacidade de induzir a formação de franjas por *C. albicans* é uma característica de virulência que pode ser correlacionado pela aderência da levedura em células da mucosa em superfícies inanimadas com vidro tubos de ensaio (PIRES *et al.*, 2001).

A relevância da formação de franjas por colônias de *C. albicans* reforça a importância dessa propriedade fúngica no processo de colonização de mucosas. Estudos mostram que em *C. albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças recém nascidas, pacientes com HIV e de mulheres gestantes, esta característica da levedura em formar colônias fúngicas franjadas foi presenciada em maior frequência (BARRETO, 1995; CARAMALAC, 1995 MAFFEI, 1996; GIAMMANCO *et al.*, 2005 Apud RIBEIRO, 2008).

5.2.2 Tubotipagem (Teste de Reynolds-Braude)

Todas as amostras de *C. albicans* analisadas induziram a formação de tubos germinativos dentro de duas horas, sendo que houve uma quantidade expressiva de leveduras capazes de formá-lo em uma hora (Tabela 6).

Tabela 6. Formação de tubo germinativo por *Candida albicans* em soro fetal bovino.

Tempo de Formação do tubo germinativo	<i>Candida albicans</i>	
	n=32	%
1 hora	15	46,8
2 horas	17	53,2

A análise da formação de tubo germinativo por *C. albicans* em determinado período denota a capacidade de aderência destas leveduras à mucosa do hospedeiro. O dimorfismo morfológico apresentado por *C. albicans* tem papel preponderante na virulência, mediante a passagem da forma leveduriforme (infectante) a filamentosa (parasitária) (LACAZ *et al.*, 1998; SIDRIM & ROCHA, 2004).

Apesar de alguns recursos terapêuticos estarem disponíveis para o controle da candidíase bucal, constantes recidivas destas infecções reforçam a necessidade de aprofundamento do estudo da relação parasita hospedeiro com vistas ao desenvolvimento de novas alternativas para o controle e tratamento destas infecções.

5.2.3 Enzimotipagem (Aspartil Proteinases e Fosfolipases)

Detectaram-se 23 (71,8%) amostras com alta atividade enzimática de aspartil proteinase enquanto para fosfolipase se observou 24 com alta atividade enzimática de fosfolipases (Tabela 7).

Tabela 7. Produção de aspartil proteinase e fosfolipase por *Candida albicans*.

	<i>Candida albicans</i>			
	Aspartil proteinases		Fosfolipases	
	n=32	%	n=32	%
Alta produção enzimática	23	71,8	24	75,0
Baixa produção enzimática	9	28,2	8	25,0

A produção de exoenzimas pelas leveduras *C. albicans* constitui um fator determinante de virulência deste fungo. Diversos estudos têm demonstrado que a maioria das amostras de *C. albicans* é produtora de aspartil proteinases e fosfolipases, reforçando a relevância destas enzimas como elementos de virulência fúngica.

A detecção da produção de enzimas extracelulares por *C. albicans*, isoladas da boca de pacientes diabéticos, fumantes, imunodeprimidos, oncológicos, isenta de lesões clínicas, colonizada por bactérias e fungos e ausência de dentes cariados, mostrou variações da atividade enzimática com a produção de aspartil proteinases entre 68,7% e 100% das amostras e de fosfolipases entre 71,9% e 100% (CÂNDIDO *et al.*, 2000; MARTINS *et al.*, 2002; MARDEGAN *et al.*, 2006).

Neste estudo as amostras estudadas foram isoladas de cavidade bucal e mostraram *in vitro* uma atividade enzimática alta, o que facilitaria a instalação de um processo infeccioso por *C. albicans* nos pacientes.

5.3. Tipagem pela Sensibilidade às Toxinas Killer

A biotipagem de *C. albicans* isolados da cavidade bucal frente às leveduras produtoras de toxinas *killer* permitiu a detecção de cinco *killer*-tipos. O *killer*-tipo 111 predominou no grupo em estudo (Tabela 8).

Tabela 8. *Killer*-tipos de *Candida albicans* da cavidade bucal.

<i>Killer</i> -tipo	<i>Candida albicans</i>	
	n=32	%
111	14	43,8
112	12	37,5
121	3	9,4
186	2	6,3
888	1	3,1

A diversidade de *killer*-tipos foi constatada nas cepas de *C. albicans* com predominância dos *killer*-tipos 111 e 112. A sensibilidade a toxinas *killer* constitui um dos métodos fenotípicos empregados para tipificar leveduras de *Candida*, além de permitir uma melhor compreensão da epidemiologia leveduriforme quanto à variabilidade de isolados envolvidos na colonização de um sítio anatômico e/ou no estabelecimento de uma infecção por *Candida* (RIBEIRO, 2008).

5.4. Formação do Biofilme

5.4.1. Densidades Ópticas – Cristal violeta

A tabela 9 mostra as médias e os desvios-padrão das densidades ópticas obtidas para o cálculo da formação específica de biofilme por *C. albicans*.

Tabela 9. Médias e desvios-padrão das densidades ópticas (DO) de *C. albicans*

Cepas	D.O 492 nm Med (SD)	D.O 630 nm Med (SD)	Cepas	D.O 492 nm Med (SD)	D.O 630 nm Med (SD)
ATCC	0,766 (0,276)	0,732 (0,040)	Ca 18	0,338 (0,093)	0,679 (0,221)
Ca 1	0,277 (0,094)	1,046 (0,254)	Ca 19	0,352 (0,082)	0,670 (0,123)
Ca 2	0,341 (0,149)	0,991 (0,297)	Ca 20	0,423 (0,147)	1,109 (0,145)
Ca 3	0,399 (0,126)	1,222 (0,074)	Ca 21	0,370 (0,166)	0,938 (0,186)
Ca 4	0,262 (0,102)	0,897 (0,244)	Ca 22	0,453 (0,190)	0,992 (0,210)
Ca 5	0,293 (0,075)	1,035 (0,185)	Ca 23	0,395 (0,139)	0,788 (0,196)
Ca 6	0,310 (0,076)	0,825 (0,123)	Ca 24	0,425 (0,100)	0,873 (0,253)
Ca 7	0,391 (0,107)	1,162 (0,124)	Ca 26	0,407 (0,085)	0,630 (0,030)
Ca 8	0,347 (0,090)	1,190 (0,130)	Ca 30	0,370 (0,186)	0,897 (0,327)
Ca 10	0,353 (0,082)	0,943 (0,284)	Ca 31	0,366 (0,111)	0,998 (0,257)
Ca 11	0,341 (0,126)	1,030 (0,205)	Ca 32	0,341 (0,115)	0,989 (0,255)
Ca 12	0,343 (0,100)	0,944 (0,173)	Ca 34	0,704 (0,274)	0,775 (0,090)
Ca 13	0,385 (0,164)	1,095 (0,234)	Ca 35	0,364 (0,051)	1,179 (0,055)
Ca 14	0,329 (0,073)	0,747 (0,242)	Ca 36	0,440 (0,125)	1,033 (0,226)
Ca 15	0,389 (0,114)	1,173 (0,056)	Ca 37	0,311 (0,094)	0,865 (0,244)
Ca 16	0,453 (0,172)	1,015 (0,255)	Ca 40	0,417 (0,179)	1,024 (0,244)
Ca 17	0,435 (0,133)	1,065 (0,198)	PC	0,060 (0,026)	0,087(0,020)

LA – Levedura aderida; CT – Crescimento total; PC – Poço controle não inoculado; Ca – *Candida albicans*.

O método de coloração por cristal violeta é amplamente utilizado por corar tanto células ativas como a matriz extracelular dos biofilmes, facilitando a detecção da variação do biofilme entre as amostras (RAMAGE, 2005).

O cristal violeta é um corante básico, que se liga à moléculas de superfície carregadas negativamente e a polissacarídeos da matriz extracelular (LI *et al.*, 2003). A utilização do cristal violeta foi descrita pela primeira vez por Christensen *et al.*, (1985) e desde então metodologias tem sido modificada para aumentar a sua precisão e para permitir a quantificação da biomassa em todo o biofilme (STEPANOVIC *et al.*, 2000).

5.4.2. Formação Específica de Biofilme

No gráfico 1 são apresentados os índices de formação específica de biofilme pelas leveduras estudadas. Em nossas condições experimentais todas as amostras foram capazes de formar biofilme, ainda que em graus variáveis. Para fins de comparação entre a habilidade de formar biofilme, os resultados foram ranqueados pela média total, separando-se dois grupos distintos: formadoras fracas (48%) e fortes de biofilme (52%).

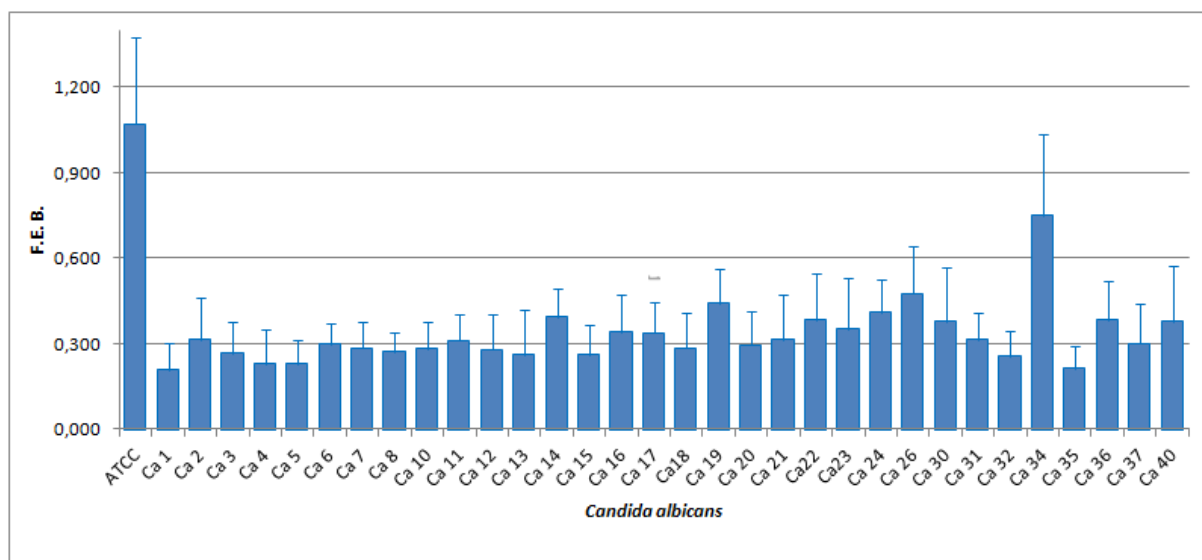


Gráfico 1. Índice de Formação Específico de Biofilme por *C. albicans*

Um dos mais importantes fatores de virulência da espécie de *C. albicans* é a sua habilidade em formar biofilmes. Estas estruturas assumem grande importância

no contexto clínico porque estão associadas com a persistência do micro-organismo no processo infeccioso e capacidade de expressar resistência contra a maioria dos agentes antimicrobianos (HENRIQUES *et al.*, 2005).

A formação de biofilmes é uma estratégia para a sobrevivência e proliferação no ambiente bucal. A complexa estrutura de um biofilme permite a organização das populações de *C. albicans* de modo a oferecer proteção contra os mecanismos de remoção pela saliva e dificultar a ação de agentes antimicrobianos (HOFLING *et al.*, 2004).

Por meio do agrupamento dos resultados e aplicação do teste de Fisher, verificou-se que a formação de biofilme e a ocorrência dos demais fatores de virulência foram independentes nas condições de nosso estudo, sugerindo que o processo de formação do biofilme é um fenômeno independente dos demais fatores de virulência de *C. albicans*.

5.5. Estudo da toxicidade das chalconas pelo ensaio de letalidade com *Artemia salina* Leach

A tabela 10 indica os valores da dose letal de 50% (DL₅₀) obtidos na avaliação da toxicidade utilizando o microcústáceo *Artemia salina*, estes resultados mostraram que as chalconas em estudo possuem elevados valores de DL₅₀, o que indica uma baixa toxicidade dos compostos analisados.

Tabela 10. Dose letal para *Artemia salina*

Compostos	DL₅₀ (µg/mL)
Chalcona I	1798,1
Chalcona II	1241,6
Chalcona III	714,3
Chalcona IV	1264,7

DL₅₀ – Dose letal para 50% das larvas de *A. salina*

O teste de letalidade de *Artemia salina* Leach foi proposto inicialmente no ano de 1956, por Michael, Thompson e Abramovitz (LHULLIER *et al.*, 2006). A partir de tal proposição vem sendo utilizado como um bioensaio preliminar aos estudos da atividade biológica de diversos compostos, devido ao fato de possuir boa correlação

de toxicidade em avaliações antifúngicas, antivirais, antimicrobianas, parasiticidas, antitumorais e tripanossomicidas (PISUTTHANAN *et al.*, 2004; KRISHNARAJU *et al.*, 2005). Sua boa correlação e ampla utilização devem-se também ao fato de ser um teste simples, rápido e de baixo custo, não necessitando de técnicas assépticas e de fácil interpretação (LUNA *et al.*, 2005; PISUTTHANAN *et al.*, 2004; KRISHNARAJU *et al.*, 2005).

Em 1981 Vanhaeche e colaboradores (LHULLIER *et al.*, 2006) aprimoraram a técnica proposta por Meyer e a utilizaram para avaliar a toxicidade de extratos brutos de algumas espécies de plantas pertencentes à família *Euphorbiaceae*. A partir de então esta metodologia para a determinação da letalidade obteve reconhecimento como um teste preliminar para a validação toxicológica de diversos compostos (PISUTTHANAN *et al.*, 2004).

A dose tóxica para *Artemia salina* geralmente está situada num intervalo de 10 a 100 vezes mais elevados em comparação com métodos de culturas celulares humanos e de outros animais (CARBALLO *et al.* 2002). Desta forma, mostra-se um método preliminar e alternativo de estudos que tem sido crescentemente utilizado e aceito para ensaios de citotoxicidade. (PELKA *et al.*, 2000).

5.6. Determinação de Suscetibilidade *in Vitro*

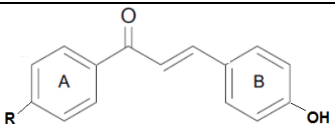
A atividade antimicrobiana das chalconas foi testada contra *C. albicans*, sendo comparada com antifúngicos convencionais, conforme descrito na Tabela 11. As amostras de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal se mostraram sensíveis às drogas antifúngicas convencionais, sendo que a anfotericina B e o itraconazol foram os antifúngico que apresentaram a menor concentração mínima inibitória.

Tabela 11. Concentração mínima inibitória de antifúngicos

Antifúngicos convencionais	<i>C.albicans</i> isoladas da cavidade bucal
	Intervalo (µg/mL)
Anfotericina B	0,08 - 1,00
Fluconazol	0,25 - 4,00
Itraconazol	0,08 - 1,00
5-fluoritosina	0,024 - 1,56

De acordo com a Tabela 13, verifica-se que não houve variação na leitura dos resultados dos ensaios de microdiluição para a determinação da concentração mínima inibitória das chalconas frente às amostras de *C. albicans*. A chalcona IV foi o composto que apresentou a maior atividade contra as leveduras isoladas da cavidade bucal com CMI de 62,5µg/mL e contra a cepa ATCC 10231 apresentou CMI de 250µg/mL. As chalconas II e III apresentaram CMI de 1000µg/mL e a chalcona I > 1000µg/mL contra todas as amostras.

Tabela 12. Atividade antimicrobiana das chalconas contra *C. albicans*

 Compostos	<i>C. albicans</i> isoladas da cavidade bucal (µg/mL)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 (µg/mL)
Chalcona I (R – CH ₃ O)	> 1000	> 1000
Chalcona II (R – CH ₃)	1000	1000
Chalcona III (R – NO ₂)	1000	1000
Chalcona IV (R – H)	62,5	250

As propriedades antifúngicas de chalconas e derivados vêm sendo crescentemente descritos na literatura, esses estudos avaliam a relação entre estrutura - sobretudo com a adição de substituintes nas moléculas, com alterações na bioatividade, notadamente em busca de uma atividade inibitória mais pronunciada contra os micro-organismos patogênicos.

Lopes *et al.*, (2001) demonstraram que chalconas, com substituintes diferentes nos anéis A e B, possuem uma atividade antifúngica contra dermatófitos. Os compostos ativos foram ensaiados quanto à sua capacidade *in vitro* de inibição de β (1,3) - glucano e quitina sintetases, sendo estas enzimas que catalisam a síntese dos dois polímeros principais da parede da celular fúngica, β (1,3)-glucana e quitina. Segundo este estudo alguns dos derivados de chalcona e análogos atuam na inibição da biossíntese de um ou de ambos polímeros da parede celular de fungos.

A parede celular de fungos e as enzimas envolvidas na biossíntese e montagem dos seus componentes são considerados alvos potenciais de compostos com ação antifúngica, sendo a parede celular uma estrutura essencial para os fungos e ausente nos hospedeiros mamíferos. Os inibidores da biossíntese de β (1, 3) quitina glucano e manoproteínas dos componentes da parede da celular fúngica são, portanto, candidatos interessantes para aplicação farmacêutica destes compostos (LIU, 2001).

Batovska *et al.* (2007) estudaram 44 chalconas e descobriram que todas eram moderadamente ativas contra o crescimento de *C. albicans*, apresentando CMI que oscilaram entre 31,0 e 62,5 μ g/mL. De acordo com esses pesquisadores os compostos com ação sobre *C. albicans* são dependente da habilidade da molécula de chalcona em interagir com grupo sulfidrilas das proteínas formadoras da membrana celular da levedura.

Segundo Nowakowska *et al.* (2007), dentre os efeitos dos substituintes do anel A e B das chalconas sobre *C. albicans*, os substituintes do anel A, não provocaram influência no potencial de atividade, sendo os substituintes do anel B das chalconas que modulam a atividade sobre *C. albicans*. De acordo com Batovska *et al.* (2007) essa atividade antifúngica está correlacionada com a posição do substituinte hidroxil no anel B da chalcona.

Dentre as chalconas sintéticas avaliadas neste trabalho, manteve-se o substituinte hidroxil na posição *para* do anel B, além desta molécula avaliaram-se três substituintes diferentes na posição *para* do anel A quanto à sua atividade anticandida, os resultados confirmam a ação da chalcona com o grupo hidroxil (chalcona IV) e demonstram que as três chalconas com modificações no anel A não obtiveram um ganho no potencial inibitório de *C. albicans*.

5.7. Impacto de concentrações subinibitórias das chalconas na formação de biofilme

As concentrações subinibitórias das chalconas utilizadas foram estipuladas como metade da menor concentração capazes de inibir $\geq 50\%$ das leveduras isoladas, que foram 0,45 μ g/mL para chalconas I, II e IV, e a concentração de 0,9 μ g/mL para chalcona III.

Os resultados observados na tabela 14 mostram o impacto de

concentrações subinibitórias das chalconas na formação de biofilme em saliva artificial pelas leveduras estudadas.

Tabela 13. Formação específica de biofilme das cepas expostas a concentrações subinibitórias de chalconas.

	Controle +		Chalcona I		Chalcona II		Chalcona III		Chalcona VI	
	Med	(SD)	Med	(SD)	Med	(SD)	Med	(SD)	Med	(SD)
ATCC	1,070	(± 0,306)	0,097	(± 0,030)*	0,028	(± 0,020)*	0,070	(± 0,010)*	0,041	(± 0,026)*
Ca 1	0,208	(± 0,094)	0,189	(± 0,061)	0,114	(± 0,085)	0,128	(± 0,032)*	0,165	(± 0,013)
Ca 2	0,312	(± 0,150)	0,135	(± 0,027)*	0,142	(± 0,088)*	0,123	(± 0,029)*	0,165	(± 0,066)
Ca 3	0,266	(± 0,110)	0,140	(± 0,045)*	0,127	(± 0,027)*	0,113	(± 0,018)*	0,157	(± 0,053)
Ca 4	0,228	(± 0,120)	0,132	(± 0,016)	0,072	(± 0,017)*	0,059	(± 0,037)*	0,073	(± 0,019)*
Ca 5	0,229	(± 0,083)	0,131	(± 0,028)*	0,164	(± 0,130)	0,180	(± 0,057)	0,219	(± 0,062)
Ca 6	0,296	(± 0,073)	0,139	(± 0,029)*	0,119	(± 0,071)*	0,167	(± 0,076)*	0,101	(± 0,063)*
Ca 7	0,285	(± 0,092)	0,148	(± 0,042)*	0,249	(± 0,150)	0,155	(± 0,084)*	0,131	(± 0,068)*
Ca 8	0,271	(± 0,067)	0,111	(± 0,044)*	0,140	(± 0,036)*	0,144	(± 0,076)*	0,103	(± 0,019)*
Ca 10	0,281	(± 0,093)	0,120	(± 0,017)*	0,123	(± 0,038)*	0,158	(± 0,096)*	0,111	(± 0,084)*
Ca 11	0,311	(± 0,094)	0,102	(± 0,032)*	0,120	(± 0,058)*	0,164	(± 0,069)*	0,162	(± 0,048)*
Ca 12	0,278	(± 0,125)	0,100	(± 0,018)*	0,164	(± 0,055)	0,147	(± 0,035)	0,107	(± 0,041)*
Ca 13	0,260	(± 0,158)	0,073	(± 0,009)*	0,218	(± 0,106)	0,113	(± 0,023)	0,161	(± 0,019)
Ca 14	0,393	(± 0,098)	0,036	(± 0,020)*	0,091	(± 0,019)*	0,046	(± 0,035)*	0,088	(± 0,064)*
Ca 15	0,261	(± 0,106)	0,066	(± 0,027)*	0,103	(± 0,054)*	0,110	(± 0,009)*	0,140	(± 0,079)*
Ca 16	0,341	(± 0,132)	0,100	(± 0,066)*	0,154	(± 0,081)*	0,097	(± 0,026)*	0,095	(± 0,056)*
Ca 17	0,338	(± 0,107)	0,074	(± 0,043)*	0,118	(± 0,087)*	0,054	(± 0,031)*	0,135	(± 0,080)*
Ca 18	0,284	(± 0,124)	0,148	(± 0,034)*	0,160	(± 0,034)	0,113	(± 0,040)*	0,197	(± 0,094)
Ca 19	0,440	(± 0,120)	0,107	(± 0,085)*	0,173	(± 0,068)*	0,136	(± 0,086)*	0,153	(± 0,123)*
Ca 20	0,294	(± 0,120)	0,069	(± 0,084)*	0,117	(± 0,079)*	0,100	(± 0,055)*	0,218	(± 0,111)
Ca 21	0,312	(± 0,161)	0,067	(± 0,063)*	0,100	(± 0,077)*	0,071	(± 0,030)*	0,162	(± 0,063)*
Ca 22	0,382	(± 0,164)	0,054	(± 0,017)*	0,068	(± 0,039)*	0,180	(± 0,168)	0,102	(± 0,082)*
Ca 23	0,350	(± 0,179)	0,067	(± 0,057)*	0,059	(± 0,036)*	0,068	(± 0,065)*	0,119	(± 0,065)*
Ca 24	0,411	(± 0,116)	0,068	(± 0,041)*	0,063	(± 0,033)*	0,147	(± 0,072)*	0,122	(± 0,036)*
Ca 26	0,475	(± 0,169)	0,116	(± 0,049)*	0,085	(± 0,055)*	0,145	(± 0,064)*	0,198	(± 0,059)*
Ca 30	0,138	(± 0,080)	0,078	(± 0,028)	0,102	(± 0,084)*	0,140	(± 0,037)	0,113	(± 0,034)
Ca 31	0,312	(± 0,096)	0,109	(± 0,026)*	0,109	(± 0,081)*	0,164	(± 0,079)*	0,119	(± 0,097)*
Ca 32	0,254	(± 0,091)	0,165	(± 0,060)	0,147	(± 0,091)*	0,086	(± 0,067)*	0,078	(± 0,063)*
Ca 34	0,749	(± 0,287)	0,041	(± 0,016)*	0,032	(± 0,012)*	0,037	(± 0,018)*	0,048	(± 0,052)*
Ca 35	0,211	(± 0,078)	0,082	(± 0,037)*	0,138	(± 0,089)	0,179	(± 0,058)	0,295	(± 0,052)
Ca 36	0,383	(± 0,139)	0,099	(± 0,022)*	0,110	(± 0,099)*	0,173	(± 0,043)*	0,081	(± 0,049)*
Ca 37	0,300	(± 0,141)	0,058	(± 0,037)*	0,053	(± 0,031)*	0,045	(± 0,042)*	0,089	(± 0,005)*
Ca 40	0,377	(± 0,193)	0,131	(± 0,026)*	0,084	(± 0,059)*	0,087	(± 0,012)*	0,110	(± 0,063)*

* diferenças estatisticamente significativas $p > 0,05$; FEB – Formação específica de biofilme.

Os resultados na tabela 14 demonstram que a inibição foi dependente das chalconas e sobretudo, dependente das amostras, nota-se que houve uma variação significativa na inibição da formação de biofilme das amostras quando expostas a concentrações subinibitórias dos compostos testados. Podendo destacar uma redução expressiva na formação de biofilme por *Candida albicans* na presença da chalcona I.

Tabela 14. Número de cepas com inibição significativa da formação de biofilme pelas chalconas avaliadas.

Compostos	Concentração (µg/mL)	Amostras com Inibições Significativas	
		n = 32	% de inibição
Chalcona I	0,45	29	90,0
Chalcona II	0,45	26	81,0
Chalcona III	0,90	27	84,0
Chalcona IV	0,45	24	75,0

A formação de biofilme microbiano é um mecanismo que permite que eles se tornem colonizadores persistentes, para resistir à depuração pelo sistema imune do hospedeiro, para melhorar a sua resistência a antibióticos e para trocar material genético. Neste mecanismo as células microbianas interagem com a superfície de adesão e promovem o crescimento de microcolônias originando, após um período de tempo, os biofilmes (DONLAN E COSTERTON 2002).

Com o aumento da resistência microbiana e do uso de dispositivos intracorporais com materiais que favorecem a aderência de *Candida*, torna-se cada vez mais importante estabelecer metodologias padronizadas que permitam a avaliação dos antifúngicos convencionais e de novos agentes com potencial de ação contra micro-organismos associados a biofilmes (CRUMP, 2000).

Um levantamento realizado por Ramage (2005) descreve alguns métodos rápidos, eficientes e reprodutíveis para análises biofilmes pré-formados, sendo que a necessidade de uma padronização de estudos na interferência da formação das

comunidades microbianas sésseis ainda continua.

Segundo Cardoso (2005), as propriedades superficiais das células são alteradas quando estas são expostas a concentrações subinibitórias de anfotericina B e itraconazol, este fato sugere que os antifúngicos em concentrações baixas são particularmente úteis na inibição de mecanismos de resistência como a aderência e posteriormente a formação e biofilme.

O presente estudo teve como um dos objetivos demonstrar uma inovadora metodologia para dificultar a colonização de leveduras com a utilização de concentrações subinibitórias de compostos para a prevenção da formação de biofilmes e inibição de outros fatores de virulência de *C. albicans*.

Nos resultados observamos que as chalconas possuem a capacidade de inibir a formação de biofilmes em *C. albicans*, embora que tais compostos apresentem pouca ação antifúngica nos ensaios *in vitro*.

6. Conclusões

- Os fatores de virulência morfotipagem, formação tubo germinativo, produção de aspartil proteinases, fosfolipases, formação de biofilme e sensibilidade a toxinas *killer* das 32 amostras de *C. albicans* se expressaram de forma variável.
- Todas as amostras de *C. albicans* foram consideradas formadoras de biofilme em nossas condições experimentais sendo que o processo de formação de biofilme ocorreu de forma independente dos demais fatores de virulência.
- As leveduras não apresentaram correlação entre a expressão concomitante dos fatores de virulência estudados e o índice de formação de biofilme, sugerindo que o processo de formação do biofilme é um fenômeno independente dos demais fatores de virulência de *C. albicans*.
- A avaliação preliminar da toxicidade das chalconas indicou doses letais de 50% das *A. salina* a concentração variando entre 714,3 a 1798,1µg/mL.
- As chalconas I, II e III apresentaram CMI \geq 1000µg/mL enquanto que a chalcona IV apresentou resultados mais satisfatórios inibindo as leveduras isoladas da cavidade bucal com concentrações de 62,5µg/mL e a cepa ATCC 10231 com 250µg/mL.
- As concentrações subinibitorias reduziram significativamente a formação de biofilme por *C. albicans*, sendo que a chalcona I reduziu a formação de biofilme de 29 (90%) leveduras, a chalcona II de 26 (81%), a chalcona III de 27 (84%) e a chalcona IV de 24 (75%) das leveduras.

7. Referências Bibliográficas

ACOSTA, E.J.T.R., **Hidrofobicidade superficial e colonização de *Candida albicans* sobre resina acrílica termopolimerizável para confecção de bases de prótese totais após desinfecção em soluções químicas.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. SP, 2009.

AGUIAR, A. P. S. *et al.* Avaliação *in vitro* da ação do extrato glicólico de gengibre sobre *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 21, n. 2, p. 144-9, mai-ago, 2009.

AGUIAR, M. M. G. B. **Desenvolvimento de Novos Comprimidos Bucais de Nistatina para o Tratamento de Candidíase Oral.** 2007.146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral Candidiasis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 78, p. 455-459, 2002.

AWONG J., BITTON G. AND KOOPMAN B. ATP Oxygen Uptake Rate and INTdehydrogenase activity of Actinomycete foams. **Wat.Res.** 19 917-921, 1985.

BAILLIE, G.S. & DOUGLAS, L.J. *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents. **Methods Enzymol.** 310, 644–656, 1999.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **J. Brás. Doenças Sex. Transm.**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BARRETO DE OLIVEIRA, M.T. **Leveduras isoladas da mucosa bucal de portadores sadios, pacientes com SIDA e neoplasias. Produção de exoenzimas e tipagem das amostras de *C. albicans*.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1993. 107 p.

BATOVSKA, D.; PARUSHEV, St.; SLAVOVA, A.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, I.; NONOVA, M.; NAJDENSKI, H.; “Study on the substituent ´s effects of a series of synthetic chalcones against the yeast *Candida albicans*”; **E. J. of Medicinal Chemistry** 42 , 87-92, 2007.

BERKHOUT, C. M. Les genres Monilia, Oidium, Oospora et Torula. Typewritten translation by E. A. R. F. **Baudet**. Thesis, Utrecht University, 1923.

BOECK, P.; FALCÃO, C. A. B.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; FILHO, V. C.; TORESSANTOS, E. C.; ROSSI-BERGMANN, B. Synthesis of Chalcone Analogues with Increased Antileishmanial Activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 5, p. 1538-1545, 2006.

CAMPOS-BUZZI, F.; CAMPOS, J.P.; TONINI, P.P.; CORRÊA, R. ; YUNES, R. A.; BOECK, P.; CECHINEL-FILHO, V., Antinociceptive effects of synthetic chalcones obtained from xanthoxylene. **Arch. Pharm. Life. Sci.** V.339, p. 361-365, 2006.

CÂNDIDO, R.C.; AZEVEDO, R.V.P.; KOMEAU, M.C. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas na mucosa bucal. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 33(6): 437-442, 2000.

CARAMALAC, D.A. **Ocorrência de leveduras em parturientes e recém-nascidas: tipagem das amostras de *C. albicans***. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. p. 123, 1995.

CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z. L. H.; PÉREZ, P., GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. A Comparison Between two Brine Shrimp Assays to Detect *in vitro* Cytotoxicity in Marine Natural Products. **BMC Biotechnology**, v. 2, n. 17, p. 1-5, 2002.

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

CARVALHO LP *et al.*, Avaliação da resposta imune celular em pacientes com candidíase recorrente. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 36(5): 571-576, set-out, 2003.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida spp.* **Rev Odontol UNESP**, Araraquara, v. 39, n. 3, p. 179-184, maio/jun., 2010.

CHANDRA, J., D. M. KUHN, P. K. MUKHERJEE, L. L. HOYER, T. MCCORMICK, AND M. A. GHANNOUM. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J. Bacteriol.** 183: 5385–5394.

CHEN, H., M. FUJITA, Q. FENG, J. CLARDY, AND G. R. FINK. **Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans***. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:5048–5052, 2004.

CHIARADIA, L.D.; DOS SANTOS, S.; VITOR, C.E; VIEIRA, A. A.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Synthesis and pharmacological activity of chalcones derived from 2,4,6-trimethoxyacetophenone in Raw 264.7 cells stimulated by LPS: quantitative structure-activity relationships. **Bioorg. Med. Chem.** V.16. p. 658 – 667, 2008.

CHRISTENSEN, G.D., SIMPSON, W.A., YOUNGER, J.J., BADDOUR, L.M., BARRETT, F.F., MELTON, D.M., BEACHEY, E.H., Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices. **J. Clin. Microbiol.** 22, 996–1006, 1985.

CLAUDINO, A. L. R. **Caracterização de Isolados de *Candida spp.* de Cavidade Bucal Quanto aos Aspectos Fenotípicos e Moleculares e Obtenção de Mutantes Heteroresistentes à Anfotericina B e Fluconazol**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, 80f, 2007.

COSTA, M.B. **Síntese de 2-trialoacetil-1-Metoxicicloalquenos e sua aplicação na obtenção de cicloalca-pirazóis e isoxazóis derivados**. Tese de Doutorado. Fl. 195. Universidade Estadual de Santa Maria. Santa Maria-RS. 2008.

CRUMP, J. A.; P. J. COLLIGNON. Intravascular catheter-associated infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19:1–8, 2000.

DINIZ, D. N. *et al.* Efeito antifúngico *in vitro* do extrato da folha e do caule de *Myrciaria cauliflora* berg. sobre microrganismos orais. **Rev Odontol UNESP**, Araraquara, v. 39, n.3, p. 151-156, maio/jun., 2010.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg. Infect. Dis.** 8:881–890, 2002.

DORLAN, R. M.; COSTERTON. J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, Atlanta, Geórgia v. 15, n. 2, p.167-193, 2002.

DOUGLAS J.L. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**. Vol.11 (1): 30-36. 2003.

DUNNE W.M. *Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?* **Clinical Microbiology Reviews**. 15 155-166. 2003.

FONTINHA, A. L. D. **Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição**. Monografia (Licenciatura em Ciências Farmacêuticas- Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, fl66. 2010.

FURLANETO-MAIA L, SPECIAN AFL, THÖRN DSW, OLIVEIRA MT, FURLANETO MC. **Estudo da incidência de amostras clínicas do gênero *Candida* isoladas de diversos sítios anatômicos**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. *Acta Sci Health Sci*; Maringá, 29(1): 33-37, 2007.

GAL J., FOVET Y. AND ADIB-YADZI M. About a synthetic saliva for in vitro studies. **Talanta**. 53 1103-1115, 2001.

GHANNOUM, M. & ABU-ELTEEN, K. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. **J Med Vet Mycol**, v. 24, n. 5, p. 407-13, Oct., 1986.

GIAMMANCO, G.M.; LOPES, M.M.; COIMBRA, R.S.; PIGNATO, S.; GRIMONT, P.A.D.; GRIMONT, F.; FREITAS, G.; GIAMMANCO, G. Value of morphotyping for the characterization of *C. albicans* clinical isolates. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 100(5): 483-490, 2005.

GROLL, A. H., PISCITELLI, S C AND WALSH, T J. Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: a comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds, and putative targets for antifungal drug development. 500. **Advances in Pharmacology**. 44 343-500, 2004.

HAWSER, S.P. AND DOUGLAS, L.J. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother**. 39, 2128–2131, 1995.

HENNING, M.M.; PERRONE, M. Factores determinantes de patogenicidad en relacion a La ecologia de *C. albicans* en cavidad bucal. **Acta Odontol. Venez.** Caracas, v. 39, n.2, 2001. Disponível em: <<http://www.actaodontologica.com>>. Acesso em: 20 agosto 2011.

HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: comparasion of biofilms in terms of biomass and activity. **British Journal of Biomedical Science**. v. 63, n. 1, 2005.

HOFLING, J. F. *et al.* Colonização bucal por espécies de *Candida*: Adesão, formação de biofilme e interações microbianas. **Revista da Faculdade de Odontologia**, v. 9, n. 1, p. 22-26, 2004.

HUNTER, P.R.; FRASER, C.A.M.; MACKENZE, D.W.R. Morphotype markers of virulence in human candidal infections. **J. Med. Microbiol.**, 28: 85-89, 1989.

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

JAYAPAL, M.R.; PRASAD, S.K.; SREEDHAR, Y.N. **Synthesis and characterization of 2,4-dihydroxy substituted chalcones using aldol condensation by SOCI₂/EtOH**. J. Chem. Pharm. Res., v.2, n.3, p.127-132, 2010.

KATRITZKY, A.R. e RESS, C.W. Comprehensive heterocyclic chemistry. **Pergamon Press**, Oxfort, New York. Vol.1-8 ed. 2, 1995.

KAUFMAN, D. A. Fungal infections in neonates: update on prevention and treatment. **Minerva Ginecol**. v. 59, n. 3 p. 311-329, 2007.

KLIS.F.M.; SOSINSKAG.J.;GROOT, P.W.J., BRUL, S.; **FEMS yeast research**. Vol. 9(7) p.1013-28, 2009.

KREEGER-Van RIJ. The yeast: a taxonomic study. Amsterdam: **Elsevier**. p. 1082, 1984.

KRISHNARAJU, A. V.; RAO, T. V. N.; SUNDARARAJU, D. ; VANISREE M.; TSAY, H.S.; SUBBARAJU, G. V. Assessment of Bioactivity of Indian Medicinal Plants Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay. **International Journal of Applied Science and Engineering**.vol.3,n.2, p. 125-134, 2005.

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

KUMAMOTO, A.C. & VINCES, M.D., Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. **Cellular Microbiology** 7 (11), 1546–1554, 2005.

LA TOURETTE PROSSER B., TAYLOR D., DIX B.A. AND CLEELAND R. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 31 1502-1506, 2003.

LACAZ, C.S. **Candidíases**. São Paulo: EPU e EDUSP. p. 190, 1980.

LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C. **Micologia Médica**. 8. ed. São Paulo: Sarvier , p. 695, 1991.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACARRI, E.M.; MELO, N.T. **Guia para identificação fungos actinomicetos algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier. p. 445. 1998.

LAFLEUR, M.D. **Characterization and eradication of persisters in *Candida albicans* biofilms**. Dissertation of Doctor of Philosophy. Northeastern University. Department of Biology. 90f, 2008.

LAHTCHEV K.L., BATOVSKA D.I., PARUSHEV S.P., UBIYVOVK V.M., SIBIRNY A.A. Antifungal activity of chalcones: a mechanistic study using various yeast strains. **Eur J Med Chem**;43:2220– 2228, 2008.

LEVITZ SM. **Cell Host Microbe**.Apr 23;5(4):311-3, 2009.

LHULLIER, C.; HORTA, P.A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. vol.2; p. 158-163, 2006.

LI, X., YAN, Z., XU, J., Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology** 149, 353–362, 2003.

LINDSAY, D.; HOLY. V. A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. **J Hosp Infect** . V. 64, P. 313-325, 2008.

LIU J, BALASUBRAMANIAN M.K. 1,3- β -glucan synthase: a useful target for antifungal drugs. **Curr Drug Targets Infect Disord** :159–69, 2001.

LOPES, N.S.; *et al.*, In vitro antifungal evaluation and structure–activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 9, 2001.

LU Y, SU C, WANG A, LIU H. Hyphal Development in *Candida albicans* Requires Two Temporally Linked Changes in Promoter Chromatin for Initiation and Maintenance. **PLoS Biol** 9(7), 2011.

LUNA, J.S., SANTOS, A.F., LIMA, M.R.F., OMENA, M.C., MENDONÇA, F.A.C., BIEBER, L.W., SANT'ANA, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal Ethnopharmacol.** vol. 97, n.2, p. 199-206, 2005.

MacDONALD, F. & ODDS, F. C. Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. **J Gen Microbiol**, v. 129, part 2, p. 431-38, Feb., 1983.

MAFFEI, C.M.L. **Amostras de *C. albicans* isoladas de gestantes: fatores de virulência, sensibilidade a antifúngicos, tipagem fenotípica e genotípica.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. 183 p, 1996.

MALUCHE ME, SANTOS JI. ***Candida* sp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais.** Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil. **RBAC**, 40(1): 65-67, 2008.

MARDEGAN, R.C.; KLEIN, M.I.; GOLVEA, M.B.; RODRIGUES, J.A.O.; GONÇALVES, R.B.; HÖFLING, J. F. Biotyping and genotyping diversity oral *C. albicans* strains from caries-free and caries-actives healthy children. **Braz. J. Microbiol.**, 37: 26-32, 2006.

MARTINS, C.A.P.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. Presence of *Staphylococcus* spp and *Candida* spp in the human oral cavity. **Braz. J. Microb.**, 33: 236-240, 2002.

MARTINS, C.A.P.; SANTOS, S.S.F.; LOBERTO, J.S.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, O.C. Presença *Candida* spp em pacientes com periodontite crônica. **Cienc. Odontol. Bras.**, 5(3): 75-85, 2002.

MATOS, B. M. *et al.* Atividade antifúngica do extrato alcoólico de *Mentha piperita* sobre *Candida albicans* e *C. tropicalis*. **Rev Odontol UNESP**, Araraquara, v. 38, n. 4, p. 244-48, jul./ago. 2009.

MATTHEWS RC. Pathogenicity determinants of *C. albicans*: potencial targets for immunotherapy? **Microbiology**, v.140, p. 1505-1511, 1994.

MESSIER, C.; EPIFANO, F. GENOVESE, S.; GRENIER, D., Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation and yeast-hyphal transition by 4-hydroxycordoin. **Phytomedicine**. v.18. p. 380 – 383, 2011.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E. J.; McLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Plant Med.**, 45: 31, 1982.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**.vol. 45, p. 31-34, 1982.

MOLINA, M.G.S.; SALVADOR, S.F., A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). **Pharmacologyonline**, 3: 633-638. 2006.

MONOSTORY, K.; TAMÁSI, V.; VERECZKEY, L.; PERJÉSI, P. A study on CYP1A Inhibitory Action of E-2-(4'-methoxybenzylidene)-1-benzosuberone and Cyclic Chalcone Analogues. **Toxicology**, v. 184, n. 2-3, p. 203-210, 2003.

MUKHERJEE, P. K. *et al.* *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. **Med Mycol**, v. 43, n.3, p. 191-208, 2005.

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

NAVARINI, A. L. F.; LOCATELLI, C.; CHIARADIA, L. D.; MASCARELLO, A.; NUNES, R.S.; YUNES, R.A; PASA, T. B. C., Hydroxychalconas induce apoptosis in B16-F10 melanoma cells via GHS and ATP depletion. **Eur. J. Med. Chem.** V. 44. p. 1630-1637, 2009.

NAVES, P.L.F. *et al.* Correlation between virulence factors and *in vitro* biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microb. Pathogen**, v. 45, p. 86-91, 2008.

NETEA, M.G., BROWN; G.D., KULLBERG, B.J.;GOW, N.A., **Nat. Rev. Microbiol.** 6, 67–78, 2008.

NETO, M. M.; DANESI, C. C.; UNFER,D. T. Candidíase Bucal: Revisão da Literatura. **Saúde**, v. 31, n.1 – 2, p. 16-26, 2005.

NETT, J. *et al.* Putative Role of -1,3 Glucans in *Candida albicans* Biofilme Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 510-520, Feb. 2007.

NEUFELD, P.M. *et al.*, Prevalencia e Susceptibilidade in vitro a Itraconazol e Anfotericina B de Isolados Clínicos de *Candida*. **RBAC**, vol. 41(2): 119-125, 2009.

NIELSEN, S. F.; BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHONNING, K.; KROMANN, H. Antibacterial Chalcones – Bioisosteric Replacement of the 4'-Hidroxy Group. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n.11, p. 3047-3054, 2004.

NIKAWA H., The role of saliva and serum in *Candida albicans* biofilm formation on denture acrylic surfaces. **Microb.Ecol.Health Dis.** 9 35-48. 2003.

NOWAKOWSKA, Z. A review of Anti-infective and Anti-inflammatory Chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 125-137, 2007.

NOWAKOWSKA, Z.; KEDZIA, B.; SCHOERDER, G. Synthesis, Physicochemical Properties and Antimicrobial Evaluation of New (E)-chalcones. **Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 4, p.707 - 713, 2007.

NOWAKOWSKA, Z.; WYRZYKIEWICZ, E.; KEDZIA, B. Synthesis and Antimicrobial Properties of N-substituted Derivatives of (E)-azachalcones. **II Farmaco**, v. 56, p. 325-329, 2007.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal Agents Mechanisms of Action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, 2003.

PADARATZ, P. **Síntese e avaliação do potencial biológico de chalconas e substâncias relacionadas**. Dissertação Mestrado – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí. 89f. 2009.

PAPPAS P.G. Invasive candidiasis. **Infect Dis Clin North Am**. 20(3):485-506, 2006.

PELKA, M.; DANZL, C.; DISTLER, W.; PETSCHERT, A. A New Screening Test for Toxicity Testing of Dental Materials. **Journal of Dentistry**, v. 28, p. 341–345, 2000.

PHONGPAICHIT, S., MACKENZIE, D.W.R., FRASER, C. Strain differentiation of *C. albicans* by morphotyping. **Epiderm. Inf.**, 99: 421-428, 1987.

PIRES, M.F.C.; CORRÊA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. Experimental model of *C. albicans* (serotypes A and B) adherence *in vitro*. **Braz. J. Microbiol.**, 32: 163-169, 2001.

PIRES, M.F.C.; CORRÊA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. Experimental model of *C. albicans* (serotypes A and B) adherence *in vitro*. **Braz. J. Microbiol.**, 32: 163-169, 2001.

PISUTTHANAN, S.; PLIANBANGCHANG, P.; PISUTTHANAN, N.; RUANRUAY, S.; MUANRIT, O. Brine shrimp lethality activity of Thai medicinal plants in the family *Meliaceae*. **Naresuan University Journal**. vol. 12, n.2, p. 13-18, 2004.

PORTELA, M. B., **Estudo de proteínas funcionais de Candida spp. Isoladas da cavidade bucal de crianças infectadas pelo vírus da imunodeficiência adquirida**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2006.

PRINCE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate methods for detection of phospholipase activity in *C. albicans*. **Sabouraudia**, 20: 15-20, 1982.

RAMAGE, G. *et al.* *Candida* Biofilms: an Update. **American Society for Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 633-638, apr., 2005.

RIBEIRO, E. L. *et al.* Tubos germinativos na genotipagem de isolados bucais de *Candida albicans* de crianças com Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis. **Revista Clínica e Pesquisa em Odontologia – UNITAU**, v. 2, n. 1, p.34-38, 2010.

RIBEIRO, E. L. **Leveduras de Candida isoladas da boca de crianças com Síndrome de Down: aspectos feno-genotípicos, relação intrafamiliar e perfil de imunoglobulinas**. 2008. 129 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

RIBEIRO, E.L. *et al.* Phenotypic aspects of oral strains of *C. albicans* in children with Down's syndrome. **Braz. J. Biol.**, v. 66, n. 3, p. 939-944, 2006.

RIBEIRO, E.L. **Leveduras de *Candida* isoladas da boca de crianças com e sem Síndrome de Down: aspectos feno-genotípicos, relação intrafamiliar e perfil de imunoglobulinas.** 2008.131f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) Universidade de Brasília – UnB, Brasília, 2008.

RIBEIRO, M.A. **Exoenzimas e mecanismos moleculares de resistência ao fluconazol de *C. albicans* isoladas de mulheres HIV positivas.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. p.156, 2002.

ROBERTSON D., Membrane Structure. **J.Cell Biol.** 91 1895-1981, 1981.

RUCHEL, R.; TESELLER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *C. albicans*. **Sabouraudia**, 20: 233-244, 1982.

RUIZ, F. J. G. **Estudo Retrospectivo Correlacionando a Frequência de Isolamento de Leveduras do Gênero *Candida* ao Estado Imunológico de Pacientes em Hospital Geral: Análise de Cinco Anos.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, 76f, 2006.

SHAHARYAR, M.; SIDDIQUI, A. A.; ALI, M. A.; SRIRAM, D.; YOGESHWARI, P. Synthesis and *in vitro* Antimycobacterial Activity of N1-nicotinoyl(4'-hidroxy-3'-metyl phenyl)-5-[(sub)phenyl]-2-pyrazolines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 15, p. 3947 – 3949, 2006.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. p. 388.

SILVA, T. B.; RANGEL, E.T. Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Extrato Etanólico do Tomilho (*Thymus vulgaris L.*) *in vitro*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, n. 2, p. 48–58, 2010.

SIVAKUMAR P.M., SEENIVASAN S.P., KUMAR V., DOBLE M. Synthesis, antimycobacterial activity evaluation, and QSAR studies of chalcone derivatives. **Bioorg Med Chem Lett**;17:1695–1700, 2007.

SOUSA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L. & CRAVEIRO, A. A. In: MATOS, F. J. A. (Org.). **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras.** Fortaleza: Ed. UFC, p. 448, 2004.

SOUZA, M. M.; CRUZ, A. B.; SCHUMACHER, M. B.; KREUGER, M. R. O.; FREITAS, R. A.; CRUZ, R. C. B. **Métodos de Avaliação de Atividade Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos.** In: BRESOLIN, T. M. B., CECHINEL FILHO, V. Ciências farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 109-166, 2003.

STAIB, F. Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. **Sabourandia**, v. 4, n. 3, p. 187-93, Oct., 1965.

STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., DAKIC, I., SAVIC, B., SVABIC-VLAHOVIC, M., A modified microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. **J. Microbiol. Methods** 40, 175–179, 2000.

SUZUKI, L. C. **Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans* in vitro para estudo da terapia fotodinâmica**. 2009. 48f. Tese (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Materias)- Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TAWEECHAIPAPONG, S., CHOOPAN, T., SINGHARA, S., CHATRCHAIWIWATANA, S., WONGKHAM, S. In vitro effect of *Streblus asper* leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. **J. Ethnopharmacol.** 96, 221–226. 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6a ed. Porto Alegre:Artmed, 827p, 2000.

TRABULSI, L.R., ALTERTHUM F. **Microbiologia**. 4ª ed.São Paulo. Ed. Ateneu. p. 495 – 500, 2005.

TRISTÃO, T.C. **Triagem para a atividade antimicrobiana e potencial tóxico de uma nova série de chalconas sintéticas e seus derivados análogos**. Dissertação Mestrado – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí. 77f. 2008.

URIZAR, J.M.A. Candidiasis orales. **Rev. Iberoam. Micol.**, 19: 17-21, 2002.

VALLE, G. C.; RENDE, J. C.; OKURA, M. H. Estudo da Incidência do Gênero *Candida* em Hospital Público Universitário. **Revista NewsLab**, ed. 101, p. 202-222, 2010.

VIDOTTO, V. *et al.* Adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to buccal and vaginal cells. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Espanha, v.20, p. 52-54, 2003.

VRIONI, G. *et al.* Molecular typing of *Candida* isolates from patients hospitalized in an intensive care unit. **Journal of Infection**, v. 42, n. 1, p. 50-56, Jan, 2001.

WERNER, H. Untersuchunger uber die lipase - aktivitat bei hefen und hefeahuliehen pilzen. **Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. A.**, 200: 113-116, 1966.

ZACCHINO, S. A. Estratégias para a Descoberta de Novos Agentes Antifúngicos. In:YUNES, R. A.; CALIXTO, João Batista. **Plantas Medicinais: Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 523p, 2001.

ZARDO, V.; MEZZARI, A. Antifúngicos nas infecções por *Candida sp.* **Revista Newslab**, ed. 63, p. 136-146, 2004.

8. Anexos

PREVALÊNCIA DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Candida albicans* ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE CRIANÇAS PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DE SÍNDROME DE DOWN

Diorgenes Pinto Santana¹, Thagiane Rodrigues², Sílvia Oliveira de Souza², Plínio Lázaro Faleiro Naves³, Evandro Leão Ribeiro⁴

1 Bolsista CAPES, mestrando em Ciências Moleculares, Universidade Estadual de Goiás, Brasil. diorgenesps@hotmail.com

2 Bolsistas PIBIC/ CNPq, graduandas do curso de Farmácia, Universidade Estadual de Goiás, Brasil.

3 Professor, Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Brasil

4 Professor, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Brasil

Resumo

A incidência de infecções fúngicas vem aumentando significativamente nos últimos anos, *Candida albicans* é a levedura responsável pela maioria destas infecções. A candidíase bucal é uma das infecções fúngicas mais frequentes e o período da infância parece ser mais propício para a sua manifestação. As irregularidades metabólicas causadas pela Síndrome de Down, figuram dentre os fatores que podem levar a ruptura do equilíbrio da microbiota bucal e uma maior predisposição do indivíduo a manifestar este tipo de infecção. Como consequência disto, as candidíases bucais são umas das infecções mais frequentes em crianças com Síndrome de Down. *Candida albicans* são as leveduras predominantes como agentes etiológicos destas infecções. O conjunto de determinados fatores de virulência, tais como adesinas, variações fenotípicas, produção de proteinases e fosfolipases, facilitam a penetração nos tecidos e conferem uma maior patogenicidade a estas leveduras. Apesar de alguns recursos terapêuticos estarem disponíveis para o controle da candidíase bucal, constantes recidivas das infecções bucais em crianças portadoras da síndrome de Down, reforçam a necessidade de novas alternativas para o tratamento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência de determinados fatores de virulência em cepas de *Candida albicans* isoladas, tanto de crianças portadoras de Síndrome de Down, como de crianças não portadoras desta Síndrome. As características mais prevalentes nas cepas isoladas das crianças portadoras de Síndrome de Down foram a diversidade de morfotipos, alta produção de aspartil proteinase e fosfolipase, formação de tubo germinativo em menor tempo e um maior número de *killer* tipos.

Palavras Chaves: *Candida albicans*; fatores de virulência; leveduras; crianças; Síndrome de Down

Prevalence of virulence factors of *Candida albicans* isolated from oral cavity of children with and without Down Syndrome

ABSTRACT

The incidence of fungal infections has increased significantly in recent years, the yeast *Candida albicans* is responsible for most of these infections. Oral candidiasis is one of the most common fungal infections and childhood period seems to be more conducive to these infections. The metabolic irregularities caused by Down syndrome are listed among the factors that can lead to disruption of the balance of the oral microflora and a willingness of individuals to express this type of infection. As a result, the oral candidiasis is one of the most common infections in children with Down syndrome. *Candida albicans* is the predominant yeasts as etiological agents of these infections. The set of certain virulence factors such as adhesins, phenotypic variation, production of proteinases and phospholipases facilitate tissue penetration and confer greater pathogenicity of these yeasts. Although some therapeutic resources are available for the control of oral candidiasis, constant recurrence of oral infections in children with Down syndrome, reinforcing the need for new alternatives for treatment. The aim of this study was to evaluate the prevalence of certain virulence factors of *Candida albicans* strains isolated from both children with Down syndrome, as children without this syndrome. The characteristics more prevalent in strains isolated from children with Down syndrome were: diversity of morphotypes, high production of aspartyl proteinase and phospholipase, the germ tube formation in less time, and a greater killer types.

Keywords: *Candida albicans*, virulence factors, yeast, children, Down Syndrome

INTRODUÇÃO

Candida são considerados micro-organismos oportunistas presentes na microbiota normal da cavidade oral e dos tratos gastrointestinal e urogenital de seres humanos. Geralmente não ocasionam processos infecciosos em indivíduos saudáveis, mas podem acometer pacientes imunocomprometidos e/ou sob terapia antimicrobiana por um período de tempo prolongado (SUZUKI, 2009; MATOS et al., 2009).

Estas infecções são mais comuns em indivíduos com o sistema imunitário comprometido e a sua frequência vêm aumentando ao longo dos anos. *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente identificada como principal responsável, no entanto, o número de infecções provocadas por outras espécies de *Candida* também vem aumentando (CARDOSO, 2007).

Uma vez rompido o equilíbrio biológico entre a microbiota e o organismo hospedeiro, as espécies de *Candida* têm a capacidade de provocar infecções, ocasionando quadros agudos, subagudos ou crônicos, superficiais ou profundos. (NEUFELD, 1999; EGGIMANN et al., 2003; MENEZES & NEUFELD, 2006).

C. albicans é reconhecida por sua maior patogenicidade, secretam proteinases e fosfolipases capazes de degradar, destruir ou transformar constituintes da membrana celular do hospedeiro induzindo a uma disfunção e/ou destruição

física. O papel das enzimas proteolíticas pode ser digerir proteínas do hospedeiro promovendo uma fonte de nitrogênio para a célula e contribuir para adesão e invasão dos tecidos do hospedeiro (HUBE & NAGLIK, 2001). Além disso, esta levedura apresenta dimorfismo - variação de antígeno de parede, expressão de adesinas na superfície e *switching* - variação fenotípica (TRABULSI L.R. & ALTERTHUM F., 2005).

A formação de micélio ou pseudo-micélio pelas espécies de *Candida* tem sido relacionada ao aumento da virulência em decorrência da variabilidade antigênica da superfície e do formato micelial que favorece maior aderência, dificultando a fagocitose extra e intracelular pelo sistema imune (KALO-KLEIN & WITKIN, 1990; MAFFEI, 1996; GALE et al., 1998; VIDOTTO et al., 2002).

O fungo manifesta maior poder invasivo em pacientes debilitados pelo tratamento com antimicrobianos e drogas imunossupressoras e no decurso de doenças crônicas, ou em pacientes com deficiência nutricional e imunodeprimidos. (TRABULSI R.L.; ALTERTHUM F., 2005).

De acordo com RIBEIRO et al (2006) durante a fase de portador assintomático, as leveduras de *Candida* na cavidade oral apresentam-se na forma arredondada e em baixo número. A transição da forma sapróbia para a patogênica é multifatorial e tem associação com ruptura do equilíbrio parasita-hospedeiro. No hospedeiro, essa levedura pode ligar-se a proteínas extracelulares, como a fibronectina, a laminina, o fibrinogênio e colágeno do tipo 1 e 4 (CALDORI & FONSI, 2001; WILLIS, A.M et al., 2006; DOROCKA-BOBKOWSKA et al., 2003).

As implicações médicas da Síndrome de Down abrangem distúrbios cardíacos congênitos, anormalidades de desenvolvimento, traços dimórficos, maior risco à leucemia e a deficiências imunológicas e endócrinas (ROZONE & MUSTACCHI, 1990; DANIELSKI, 2002). A expressão genética da trissomia do cromossomo 21 propicia ainda irregularidades quanto à função bioquímica de diversas substâncias em indivíduos portadores de Síndrome de Down. O nível sanguíneo de superóxido dismutase é detectado em média 1,5 vezes mais acentuado. Isto resulta em uma taxa elevada de conversão de superóxidos (O_2^-) em peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) que pode danificar estruturas celulares de ácido desoxirribonucleico (DNA) e lipídios, e em baixa concentração de superóxidos implica na diminuição da capacidade lítica dos neutrófilos frente às infecções provocadas por *Staphylococcus aureus* e *C. albicans* (COELHO & LOEVY, 1982).

Outras irregularidades metabólicas ocasionadas pelos genes do cromossomo 21 podem manifestar-se em indivíduos acometidos de Síndrome de Down. As deficiências da fosfofrutoquinase e cistationina beta-sintetase que são doenças autossômicas recessivas. A primeira é uma glicogenose tipo VII na qual é necessário o controle da ingestão de carboidratos. A segunda é relacionada ao metabolismo da metionina, aminoácido que atua na utilização dos fosfolipídios (TOMMASO, 2004; ORPHANET, 2005). Estas alterações metabólicas parecem induzir alterações na microbiota de pacientes com síndrome de Down, inclusive *Candida*.

OBJETIVO

Avaliar a prevalência de fatores de virulência em cepas de *Candida albicans* isoladas, tanto de crianças portadoras de Síndrome de Down, como de

crianças não portadoras desta Síndrome e comparar as possíveis diferenças entre estes dois grupos.

METODOLOGIA

Foram isoladas 51 cepas de *C. albicans*, sendo 37 a partir de saliva de crianças com Síndrome de Down (CCSD) e 14 de crianças sem a síndrome (CSSD). As amostras foram obtidas de pacientes atendidos na Unidade da Clínica de Odontologia Infantil da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, na cidade de Goiânia- GO.

Após a homogeneização de cada amostra contendo saliva dispersa no meio, o material foi semeado assepticamente, em duplicata, em tubos de ensaio contendo 5,0mL de ágar Sabouraud dextrose inclinado acrescido de 0,1 mg/mL de cloranfenicol, pH ajustado entre 5,6 a 6,0 e mantido a temperatura ambiente por 15 dias. Uma amostra de *C. albicans* ATCC 18804 foi empregada como controle em todos os testes realizados.

Morfotipagem

A morfotipagem foi realizada segundo Phongpaichit et al., (1987) e Hunter et al., (1989). As leveduras do gênero *Candida*, cultivadas em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud dextrose por 48 horas a 25°C, foram utilizadas na preparação de 3,0mL de suspensões feitas em água destilada e esterilizada (inóculo ajustado a 3 na Escala de McFarland). Cada suspensão foi inoculada (três por placa de Petri) na superfície do ágar extrato de malte com auxílio de *swabs* esterilizados a fim de formar uma estria padronizada de 8mm de largura por 60mm de comprimento. As placas foram incubadas a 25°C por dez dias, com a inoculação de cada levedura sempre realizada em duplicata. A leitura foi feita com base nos aspectos macromorfológicos da franja e topografia da colônia.

Enzimotipagem (aspartil proteinases e fosfolipases)

As amostras de *Candida*, obtidas de culturas de 24-48 horas em ágar Sabouraud dextrose, foram semeadas em placa de Petri com alça de platina em pontos equidistantes no meio de albumina e incubadas a 37°C durante 24-48 horas para a detecção de produção de aspartil proteinases (RÜCHEL et al., 1982) e no meio enriquecido com gemas de ovo e incubadas por 72-96 horas a 37°C para verificação da produção de fosfolipases (PRINCE et al., 1982).

A leitura de cada atividade enzimática (Pz) das amostras-teste decorreu da detecção de um halo opaco de precipitação ao redor do ponto de inoculação das amostras de levedura, medida através da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (dcp), ou seja, $Pz = dc/dcp$ e utilizada como unidade de medida o centímetro (cm). Os resultados foram agrupados em dois níveis, $Pz > 0,5$ que correspondeu as cepas com baixa atividade enzimática e $Pz \leq 0,5$, alta atividade enzimática.

Tipagem pela sensibilidade a toxinas *killer*

As cepas de *Candida* estudadas, bem como as leveduras produtoras de toxinas *killer* (K1 a K9), foram previamente incubadas em meio de ágar Sabouraud dextrose modificado, sem azul de metileno, a 25°C por 48 horas antes dos testes.

Das amostras-teste, foi preparada uma suspensão em tubos de ensaio de contendo 1,0mL de água destilada e esterilizada, propiciando a formação de inóculo correspondente a 5 na escala McFarland e esta foi adicionada e homogenizada em placa de Petri com 20mL do meio de Sabouraud modificado previamente fundido e resfriado a 45°C. Após a homogeneização, foi semeada com alça de platina no meio solidificado, em pontos eqüidistantes, às amostras de leveduras *killer* (K1 a K9). As placas foram incubadas a 25°C por 72 horas. Foram considerados sensíveis (+), os cultivos que produziram halo incolor e/ou zona de inibição com colônias azuis, ao redor do cultivo padrão, e resistentes (-), crescimento ao redor das leveduras *killer*.

Análise estatística

A prevalência das características / fatores de virulência nos grupos CCSD e CSSD foi analisada por meio do teste de Fisher. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Morfotipagem

A morfotipagem de 51 *C. albicans*, permitiu caracterizar 11 morfotipos. No grupo CCSD observou-se o predomínio do morfotipo 5530 (colônia fúngica com franja contínua em leque, igual ou maior 40 a 6mm, de textura intermediária e superfície lisa). O grupo CSSD caracterizou-se pelo elevado número do morfotipo 5240 (colônia fúngica com franja contínua em leque, igual ou menor a 2mm, de textura fina e superfície lisa) (Tabela 1).

Tabela 1. Morfotipos de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças com e sem Síndrome de Down.

Morfotipo	<i>Candida albicans</i>	
	CCSD n=37	CSSD n=14
2330	-	2
3240	2	-
5240	-	6
3340	2	-
5320	2	3
5330	7	3
5340	3	-
5530	15	-
5540	3	-
7530	1	-
7540	2	-

Enzimotipagem

Aspartil proteinases

Na tabela 2 estão representadas as 30 cepas de *C. albicans* isoladas de ambos os grupos apresentaram alta atividade enzimática para aspartil proteinases. No grupo de CCSD detectaram-se 27 (73,0%) cepas com alta atividade enzimática, enquanto que no outro grupo apenas 3 (21,4%), sendo esta diferença significativa ($p=0,0013$).

Tabela 2. Produção de aspartil proteinases por *Candida albicans* da cavidade bucal de crianças com e sem Síndrome de Down.

Aspartil protease	<i>Candida albicans</i>			
	(CCSD)		(CSSD)	
	n=37	%	n=14	%
Alta produção enzimática	27	73,0	3	21,0
Baixa produção enzimática	10	27,0	11	79,0

Legenda: * $p = 0,0013$

CCSD – Crianças com Síndrome de Down

CSSD – Crianças sem Síndrome de Down

Fosfolipases

Trinta e sete cepas de *C. albicans* isoladas de ambos grupos apresentaram com alta atividade enzimática de fosfolipases (Tabela 3).

Tabela 3. Perfil da atividade de fosfolipases por *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças com e sem Síndrome de Down.

Fosfolipase*	<i>Candida albicans</i>			
	(CCSD)		(CSSD)	
	n=37	%	n=14	%
Alta produção enzimática	30	81,0	01	7,1
Baixa Produção enzimática	7	19,0	13	92,8

Legenda: * $p = 0,0109$

CCSD – Crianças com Síndrome de Down

CSSD – Crianças sem Síndrome de Down

A produção de exoenzimas pelas leveduras *C. albicans* constitui um fator determinante de virulência deste fungo. Diversos estudos têm demonstrado que a maioria das cepas de *C. albicans* é produtor de aspartil proteinases e fosfolipases, reforçando a relevância dessas enzimas como elementos integrantes do mecanismo de virulência fúngica.

Estas observações corroboram os resultados encontrados em nosso estudo. Cerca de 81,0% das cepas de *C. albicans* isoladas de CCSD possuem uma alta atividade enzimática na produção de fosfolipase e apenas 7,1% de CSSD tem essa característica, sendo esta diferença significativa ($p = 0,0001$).

A detecção da produção de enzimas extracelulares por *C. albicans*, isoladas da boca de pacientes diabéticos, fumantes, imunodeprimidos, oncológicos, isenta de lesões clínicas, colonizada por bactérias e fungos e com ausência de dentes cariados, mostrou variações da atividade enzimática com a produção de aspartil proteínases entre 68,7 e 100,0% das amostras e de fosfolipases entre 71,9 e 100,0% (CANDIDO et al., 2000; MARTINS et al., 2002; MARDEGAN et al., 2006).

Em nosso estudo, as cepas provenientes do grupo CCSD mostraram *in vitro* uma maior atividade enzimática, fato esse aliado a uma maior susceptibilidade dos portadores de Síndrome de Down, facilitaria a instalação de um processo infeccioso por *C. albicans* nestes pacientes.

Tipagem pela sensibilidade a toxinas killer

A biotipagem das *C. albicans* da boca de CCSD e CSSD, frente às leveduras produtoras de toxinas *killer*, permitiu a detecção de cinco *killer*-tipos. Maior diversidade destes *killer*-tipos foi verificada no grupo de CCSD. O *killer*-tipo 111 predominou nos dois grupos em estudo, não sendo observada nenhuma diferença significativa entre os dois grupos estudados (Tabela 4).

Tabela 4. *Killer*-tipos de *Candida albicans* da boca de crianças com e sem Síndrome de Down.

Killer – tipo	<i>Candida albicans</i>			
	(CCSD)		(CSSD)	
	n=37	%	n=14	%
111	17	46	11	78,6
112	14	37,8	3	21,4
121	3	8,1	-	-
186	2	5,4	-	-
888	1	2,7	-	-

Legenda: CCSD – Crianças com Síndrome de Down
CSSD – Crianças sem Síndrome de Down

A diversidade de *killer*-tipos foi constatada em ambos os grupos de *C. albicans* com predominância do *killer*-tipo 111 e 112, sendo que o grupo CCSD apresentam maior diversidade (111, 112, 121, 186, 888), enquanto o grupo CSSD apresentaram (111, 112).

Formação do Tubo Germinativo

Todas as cepas de *C. albicans* dos grupos analisados induziram a formação de tubos germinativos dentro de duas horas, sendo que o maior índice de cepas capazes de formá-los em uma hora foi detectado no grupo CCSD, ainda que estes resultados não tenham sido significativos estatisticamente ($p=0,0526$) (Tabela 6).

Tabela 6. Formação de tubos germinativos por *Candida albicans* oriundas da boca de crianças com e sem Síndrome de Down em soro fetal bovino.

Tempo de Formação Tubo Germinativo*	<i>Candida albicans</i>			
	(CCSD)		(CSSD)	
	n=37	%	N=14	%
1 h	17	45,9	02	14,3
2 h	20	54,1	12	85,7

Legenda: * p = 0,0127

h - horas

CCSD – Crianças com Síndrome de Down

CSSD – Crianças sem Síndrome de Down

A análise da formação de tubos germinativos por *C. albicans* em determinado período de tempo mostra a capacidade de aderência das leveduras à mucosa de indivíduos colonizados por este fungo. O dimorfismo morfológico apresentado por *C. albicans* tem papel preponderante na virulência, mediante a passagem da forma leveduriforme (infectante) a filamentosa (parasitária) (LACAZ et al., 1998; SIDRIM & ROCHA, 2004).

Apesar de alguns recursos terapêuticos estarem disponíveis para o controle da candidíase bucal, constantes recidivas das infecções bucais em crianças portadoras da síndrome de Down, reforçam a necessidade de aprofundamento do estudo da relação parasita hospedeiro com vistas ao desenvolvimento de novas alternativas para o controle e tratamento destas infecções.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e a CAPES pela concessão das bolsas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CÂNDIDO, R.C.; AZEVEDO, R.V.P.; KOMEAU, M.C. Enzimatipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas na mucosa bucal. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 33(6): 437-442, 2000.

CALDORI, R.A. & FONSI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n.7, p.327-335, 2001.

CARDOSO, B.C. Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. 2007. 85f. **Dissertação (Mestrado em engenharia biológica)** – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho. 2007.

COELHO, C.R.Z., LOEVY, H.T. Aspectos Odontológicos da Síndrome de Down. São Paulo: **ARS Cvrandi em Odontologia**, p. 9-16, 1982.

DANIELSKI, V. **Síndrome de Down**. São Paulo: Ave Maria, p. 156, 2002. different strains of *C. albicans*. **Sabouraudia**, 20: 233-244, 1982.

DOROCCA-BOBKOWSKA, B. KONOPKA, K.; DUZGUNES, N. Influence of anifungal polyenes on the adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to human epithelial cells in vitro. **Archives of Oral Biology**, v.48, n12, p. 805-814, 2003.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically non-immunosupressed patients. *The Lancet Infectious Diseases*, v.3, p. 685-702, 2003.em: <<http://www.hepcentro.com.br/glicogenoses.htm>>. Acesso em 20 agosto 2010.

GALE, C.A.; BENDEL, C.M.; McCLELLAN, M.; BECKER, J.M.; BERMAN. J.; HOSTETTER, M.K. Linkage of adhesion, filamentous growth and virulence in *C. albicans* to a single gene INT1. **Science**, 279: 1355-1358, 1998.

HUBE B, NAGLIK J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**. 2001; 147(8): 1997-2005.

HUNTER, P.R.; FRASER, C.A.M.; MACKENZE, D.W.R. Morphotype markers of virulence in human candidal infections. **J. Med. Microbiol.**, 28: 85-89, 1989.

KALO-KLEIN, A.; WITKIN, S.S. Prostaglandin E2 enhances and gamma interferon inhibits germ tube formation in *C. albicans*. **Infect. Immun.**, 58: 260-262, 1990.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACARRI, E.M.; MELO, N.T. **Guia para identificação fungos actinomicetos algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier. 1998. p. 445.

MAFFEI, C.M.L. Amostras de *C. albicans* isoladas de gestantes: fatores de virulência, sensibilidade a antifúngicos, tipagem fenotípica e genotípica. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas 1996. 183 p.

MARDEGAN, R.C.; KLEIN, M.I.; GOLVEA, M.B.; RODRIGUES, J.A.O.; GONÇALVES, R.B.; HÖFLING, J. F. Biotyping and genotyping diversity oral *C. albicans* strains from caries-free and caries-actives healthy children. **Braz. J. Microbiol.**, 37: 26-32, 2006.

MARTINS, C.A.P.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. Presence of *Staphylococcus* spp and *Candida* spp in the human oral cavity. **Braz. J. Microb.**, 33: 236-240, 2002.

MATOS, B. M. et al. Atividade antifúngica do extrato alcoólico de *Mentha piperita*. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 38, n. 4, p. 244-48, jun./ago, 2009.

MENEZES, C.H.P. & NEUFELD, P.M. **Bacteriologia e Micologia**: Para o Laboratório Clínico. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006, 387p.

NEUFELD, P. M. **Manual de Micologia Médica**: Técnicas de Básicas de Diagnóstico. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Programa Nacional de Qualidade, 1999. p.1,214.

ORPHANET. Doenças raras. **Homocistinúria por Deficiência de Cistationina Beta-Sintetase**. São Paulo. 2005. Disponível em: <<http://www.orphanet.com.br>>. Acesso em 30 agosto 2010.

PHONGPAICHIT, S., MACKENZIE, D.W.R., FRASER, C. Strain differentiation of *C. albicans* by morphotyping. **Epiderm. Inf.**, 99: 421-428, 1987.

PRINCE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate methods for detection of phospholipase activity in *C. albicans*. **Sabouraudia**, 20: 15-20, 1982.
a Tropical, v.40, n3, p. 272-276, 2007.

RIBEIRO, E.L. et al., Phenotypic aspects of oral strains of *C. albicans* in children with Down's syndrome. **Braz. J. Biol.**, 66(3): 939-944, 2006

ROZONE, G.; MUSTACCHI, Z. **Síndrome de Down Aspectos Clínicos e Odontológicos**, São Paulo: CID. 1990. p. 248.

RUCHEL, R.; TESELLER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *C. albicans*. **Sabouraudia**, 20: 233-244, 1982.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. p. 388.

SUZUKI, L. C. Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans* in vitro para estudo da terapia fotodinâmica. 2009. 48f. **Tese (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Materias)**- Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TOMMASO, A.M.A. Glicogenose. **Hepcentro Laboratório**. São Paulo. 2004. Disponível em: <<http://www.hepcentro.com.br/glicogenoses.htm>>. Acesso em 30 agosto 2010.

TRABULSI, L.R., ALTERTHUM F. **Microbiologia**. 4ª ed. São Paulo. Ed. Ateneu. p. 495 – 500, 2005.

VIDOTTO, V.; PONTÓN, J.; AOKI, S.; QUINDÓS, G.; MANTOAN, B.; PUGLIESE, A.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K. Differences in extracellular enzymatic activity between *C. dubliniensis* and *C. albicans*. **Rev. Iberoam. Micol.**, 21: 70-74, 2002.

WILLIS, A. M. et al., Identificação microbiológica e sensibilidade in vitro de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n3, p. 272-276, 2007.

FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Candida albicans* ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL

Diorgenes Pinto Santana¹ (UEG)
Thagiane Rodrigues Campos² (UEG)
Sílvia Oliveira de Souza² (UEG)
Evandro Leão Ribeiro³ (UFG)
Plínio Lázaro Faleiro Neves⁴ (UEG)
plinionaves@ueg.br

INTRODUÇÃO

A capacidade da levedura *Candida albicans* em aderir, infectar e causar a doença é definida como potencial de virulência ou patogenicidade. Um dos principais mecanismos de virulência deste fungo é a sua versatilidade de adaptação e capacidade de adesão em sítios variados ocasionando a formação de comunidades microbianas denominadas biofilmes (SUZUKI, 2009).

Os biofilmes microbianos são definidos como comunidades de micro-organismos irreversivelmente aderidos a uma superfície que produzem substância polimérica extracelular e que exibem um estado metabólico distinto ao do crescimento planctônico correspondente, especialmente com respeito à transcrição e interações entre as células (LINDSAY; HOLY, 2008).

A composição do biofilme de *C. albicans* consiste em uma mistura de células hospedeiras, células em forma de leveduras, pseudo-hifas e hifas, além de matriz extracelular composta de proteínas e polissacarídeos (MUKHERJEE, P.K., et al, 2005).

Biofilmes bacterianos e fúngicos compartilham muitas características. Em ambos os casos, são frequentemente formados pela adesão inicial de micro-colônias fundadoras que em seguida são protegidas do sistema imune pela síntese de exopolímeros e que possuem um lento ritmo de crescimento (LAFLEUR, 2008).

As vantagens dos micro-organismos se organizarem em comunidades consistem na maior capacidade de captação de nutrientes, favorecendo um crescimento mais ordenado da comunidade e maior proteção contra radiações UV, fagocitose, desidratação e resistência a antimicrobianos (SUZUKI, 2009).

Além disso, mecanismos responsáveis pela resistência a antifúngicos podem estar relacionados a fatores como limitações difusionais dos antimicrobianos pela matriz extracelular, alterações fenotípicas das células no biofilme e ainda com o desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células. (CARDOSO, 2004; CHANDRA *et al.*, 2001).

¹ Bolsista CAPES, mestrando em Ciências Moleculares, Universidade Estadual de Goiás, Brasil.

² Bolsistas PIBIC/CNPq, graduandas do curso de Farmácia, Universidade Estadual de Goiás, Brasil

³ Professor colaborador, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Brasil.

⁴ Professor orientador, Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Brasil.

Estima-se que cerca de 80% das infecções fúngicas são de origem hospitalar e a quarta causa de infecção da corrente sanguínea, conduzindo ao óbito em torno de 25 a 38% dos pacientes que desenvolvem candidemia (TAMURA *et al.*, 2007; EGGIMANN, 2003).

Tendo em vista a relevância do biofilme para resistência do micro-organismo e colonização tanto de tecidos como de superfícies inertes, o objetivo deste trabalho foi avaliar a formação de biofilme por *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças no intuito de subsidiar futuros estudos sobre inibição da formação de biofilme, utilizando ensaios de susceptibilidade das formas planctônicas e sésseis.

OBJETIVOS

- Avaliar a formação de biofilme de cepas de *C. albicans* isoladas de cavidade bucal;
- Classificar as cepas estudadas quanto à habilidade em formar biofilmes e
- Fornecer informações preliminares para os ensaios de inibição da formação de biofilme

MATERIAL E MÉTODOS

Foram processadas 37 cepas de *C. albicans*, 36 obtidas a partir de amostras bucais de pacientes atendidos na Unidade da Clínica de Odontologia Infantil da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, na cidade de Goiânia- GO e a cepa ATCC 10231.

As cepas foram incubadas em ágar Sabouraud dextrose a 37°C por 48 horas. Após este período, foram transferidas três colônias para tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo Sabouraud dextrose. Os tubos foram incubados em estufa a 37°C por 24 horas. Depois alíquotas de 20µL do caldo crescido foram transferidas para poços com 180µL de saliva artificial em placas microtiter de poliestireno não tratadas que foram incubadas a 37°C por 48 horas (JAIN *et al.*, 2007).

O meio de saliva artificial foi utilizado para mimetizar as condições fisiológicas do sítio anatômico de isolamento das leveduras. A composição deste meio foi obtida de acordo com Henriques *et al.* (2005) por meio da dissolução de 5g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona e 2g/L de glicose em uma solução contendo: 125,6mg/L de NaCl, 963,9mg/L KCl, 189,2mg/L KSCN, 654,5mg/L KH₂PO₄, 200mg/L uréia, 763,2mg/L Na₂SO₄.10H₂O, 178mg/L NH₄Cl, 227,8mg/L CaCl₂.2H₂O e 630,8mg/L NaHCO₃. O pH do meio foi ajustado a 6.8 e posteriormente filtrado com uma membrana de porosidade de 0.22 µm.

As placas foram posteriormente tratadas segundo metodologia descrita por Naves *et al.* (2008), com a determinação do crescimento total (CT) pela medida da densidade óptica a 630nm, seguida da remoção do caldo crescido com as formas planctônicas e lavagem dos poços com solução fisiológica e secagem a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente as amostras foram coradas com 200µL de cristal violeta a 1% por 5 minutos, o corante será desprezado e as placas lavadas três vezes com 250µL de água destilada. As placas foram secadas a 37°C por 20 minutos, posteriormente se adicionarão 200µL de etanol absoluto em cada poço e se incubará a placa durante 5 minutos. Após esse período as densidades ópticas foram lidas a 492nm dos poços com leveduras aderidas (LA) e poços

controle (PC).

As densidades ópticas obtidas propiciaram o cálculo do índice de Formação Específica de Biofilme (FEB) por meio da fórmula $FEB = LA - PC/CT$, aonde LA = leveduras aderidas, PC = poço controle e CT = crescimento total. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em experimentos independentes e controles positivos e negativos foram incluídos. A cepa *C. albicans* ATCC 10231 foi utilizada como controle em todos os testes realizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação de biofilme ocorreu de maneira variável, mas em nossas condições experimentais, todas as cepas foram consideradas como formadoras. A cepa *C. albicans* ATCC 10231 foi a maior formadora de biofilme.

A partir da média dos índices de Formação Específica de Biofilme as cepas foram divididas em dois grupos, a mediana entre eles foi calculada e por meio do teste t Student confirmou-se que a diferença entre os dois grupos é significativa. Desta forma, a habilidade para formação de biofilme foi classificada como forte e fraca. Assim as cepas foram classificadas em fortes formadoras de biofilme 53% (19 cepas) e fracas formadoras 47% (18 cepas).

Segundo Cardoso (2004) a susceptibilidade dos biofilmes é muito menor aos antifúngicos como anfotericina B e fluconazol, do que quando comparada a sensibilidade das mesmas cepas crescendo de forma planctônica. O que permite concluir que informações sobre a formação do biofilme tornam-se necessárias para os estudos de inibição desta estrutura microbiana.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da formação de biofilme de *C. albicans* visa uma melhor compreensão desse fator de virulência nas cepas analisadas, para posteriores estudos na inibição do biofilme.

A utilização do meio saliva artificial torna as condições do estudo mais próximas as condições fisiológicas do organismo humano, permitindo a obtenção de resultados mais próximos a condições naturais de sua ocorrência.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Pessoal) pela concessão das bolsas e incentivo à pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CHANDRA, J. *et al.* Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. **Journal of Bacteriology**, v.183, n. 18, p. 5385-5394, 2001.

EGGIMANN, P. J. GARBINO, P. D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosupressed patients. **Lancet Infect Dis**, v. 3, n. 11, p. 685-702, 2003.

HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: comparasion of biofilms in terms of biomass and activity. **British Journal of Biomedical Science**. v. 63, n. 1, 2005.

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

LAFLEUR, M.D. **Characterization and eradication of persists in *Candida albicans* biofilms**. 2008. 90f Dissertation of Doctor of Philosophy. Northeastern University. Department of Biology. 2008.

LINDSAY, D.; HOLY. V. A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what ealthcare professionals should know. **J Hosp Infect** . V. 64, P. 313-325, 2008.

MUKHERJEE, P.K., et al., *Candida* Biofilm; a well-designed protected environment. **Med Mycol**, 2005. 43(3): p.191 – 208.

NAVES, P.; PRADO, G.; HUELVES, L.; GRACIA, M.; RUIZ, V.; BLANCO, J.; DHABI, G.; BLANCO, M.; PONTE, M. C.; SORIANO, F. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microb. Pathogen**, v. 45, p. 86-91, 2008.

SUZUKI, L. C. **Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans* in vitro para estudo da terapia fotodinâmica**. 2009. 48f. Tese (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Materias) Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TAMURA, N. K. et al. Virulence factor for *Candida ssp* recovered from intravascular catheters and hospital workers hands. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 1, p. 91-3. 2007.

CORRELAÇÃO ENTRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME E FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Candida albicans* ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE CRIANÇAS PORTADORAS DA SÍNDROME DE DOWN

Thagiane Rodrigues Campos¹ (UEG)
Silvia Oliveira de Souza² (UEG)
Diorgenes Pinto Santana³ (UEG)
Evandro Leão Ribeiro⁴ (UFG)
Plínio Lázaro Faleiro Neves⁵ (UEG)
plinionaves@ueg.br

INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* são consideradas micro-organismos oportunistas presentes na microbiota normal da cavidade oral e trato gastrointestinal e urogenitais de seres humanos. Entretanto quando ocorre ruptura do equilíbrio biológico, geralmente resultante de fatores predisponentes - patológicos, fisiológicos, imunológicos e mecânicos - há um aumento na multiplicação e invasão destes micro-organismos nos tecidos, ocasionando infecções denominadas candidíases (SUZUKI, 2009; MATOS et al., 2009).

Candida albicans é a mais patogênica dentre estas leveduras e frequentemente está associada às formas clínicas de candidíase oral: pseudomembranosa, hiperplásica crônica, eritematosa e queilite angular (LUIZ et al., 2008). Esta levedura é dimórfica e pode se apresentar sob a forma leveduriforme de blastósporo (comensal) ou sob a forma micelial de hifa ou pseudo-hifa (patogênica) (DINIZ et al., 2010).

A candidíase oral é a infecção fúngica endógena que mais acomete seres humanos e geralmente é secundária a algum outro fator local ou sistêmico (DINIZ et al., 2010). A candidíase geralmente não causa grandes complicações, mas deve ser tratada para evitar uma infecção longa e crônica. Ela interfere na alimentação, gerando perda do apetite e comprometendo as necessidades de hidratação e nutrientes (MENEZES et al., 2005).

Além de características inerentes ao paciente, fatores de virulência desta levedura têm um papel essencial na gênese do processo infeccioso. Aderência, formação de biofilme, dimorfismo (formação de micélio), variabilidade fenotípica (*switching*), produção de enzimas extracelulares e toxinas constituem os principais fatores relacionados a esta levedura (RIBEIRO, 2008).

O biofilme é uma comunidade microbiana onde as células dos organismos estão irreversivelmente aderidas a uma superfície e embebidas em uma matriz extracelular de substâncias poliméricas, que as próprias células produzem. A espécie *C. albicans* é considerada atualmente o patógeno humano com maior capacidade de crescer em biofilme. A capacidade de formar biofilmes permite a persistência da levedura e facilita a colonização, invasão e disseminação da infecção (RUIZ, 2006). Células em biofilme possuem fenótipo alterado e uma resistência extraordinária a muitos antifúngicos, tornando sua erradicação um

¹ Bolsistas PIBIC/CNPq, graduandas do curso de Farmácia, Universidade Estadual de Goiás, Brasil.

² Bolsista CAPES, mestrando em Ciências Moleculares, Universidade Estadual de Goiás, Brasil.

³ Professor colaborador, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Brasil.

⁴ Professor orientador, Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Brasil.

difícil processo (NETT et al., 2007).

Nas crianças com síndrome de Down, além das alterações anátomo-fisiológicas bucais, macroglossia, estagnação salivar decorrente de incompetência muscular da boca, dificuldade motora, constantes doenças respiratórias e comprometimento simultâneo da resposta imunológica inata e adquirida fazem com que estes fatores adicionais, as tornem mais suscetíveis a processos infecciosos, inclusive fúngicos, onde as espécies de *Candida* são os agentes etiológicos predominantes. (VIEIRA et al., 2005).

A elevada detecção de *C. albicans* na mucosa oral de crianças portadoras de síndrome de Down demonstrou uma predisposição significativa que estas crianças apresentam a esta patologia (DINIZ et al., 2010). A ocorrência de *Candida* na boca destas crianças tem sido descrita em aproximadamente 70% dos casos, estando vinculada a candidíase oral em 40% dos casos (RIBEIRO et al., 2006). O monitoramento dos indivíduos portadores desta síndrome é importante, não só para que se entenda o seu mecanismo fisiológico, mas também para que se possa garantir uma melhor qualidade de vida aos pacientes (RIBEIRO, 2008).

Na atualidade há uma crescente consideração de que a formação de biofilme contribui para a patogenicidade de determinados micro-organismos e que a persistência destas estruturas no corpo humano seria a principal causa da recorrência ou cronificação de diversas infecções (REISNER et al., 2006).

São escassos os trabalhos na literatura investigando a relação entre a síndrome de Down e a formação de biofilme por *Candida*. Sendo assim, objetivou-se correlacionar a coexistência de fatores de virulência e a formação de biofilme por *C. albicans* isoladas de crianças portadoras da síndrome de Down.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 35 amostras de saliva de crianças com síndrome de Down. As amostras foram obtidas de pacientes atendidos na Unidade da Clínica de Odontologia Infantil da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, na cidade de Goiânia- GO.

A morfotipagem foi realizada segundo Phongpaichit et al., (1987) e Hunter et al., (1989). As amostras de *Candida*, obtidas de culturas de 24-48 horas em ágar Sabouraud dextrose, foram semeadas em placa de Petri com alça de platina em pontos equidistantes no meio de albumina e incubadas a 37°C durante 24-48 horas para a detecção de produção de aspartil proteinases (Rüchel et al., 1982) e no meio enriquecido com gemas de ovo e incubadas por 72-96 horas a 37°C para verificação da produção de fosfolipases (Prince et al., 1982).

A leitura de cada atividade enzimática (Pz) das amostras-teste decorreu da detecção de um halo opaco de precipitação ao redor do ponto de inoculação das amostras de levedura, medida através da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (dcp), ou seja, $Pz = dc/dcp$ e utilizada como unidade de medida o centímetro (cm). Os resultados foram agrupados em dois níveis, $Pz > 0,5$, correspondentes às cepas com baixa atividade enzimática e $Pz \leq 0,5$, correspondentes às cepas com alta atividade enzimática.

As cepas de *Candida* estudadas, bem como as leveduras produtoras de toxinas killer (K1 a K9), foram previamente incubadas em meio de ágar Sabouraud dextrose modificado, sem azul de metileno, a 25°C por 48 horas antes dos testes. Das amostras-teste, foi preparada

uma suspensão em tubos de ensaio contendo 1,0mL de água destilada e esterilizada, propiciando a formação de inóculo correspondente a 5 na escala McFarland e esta foi adicionada e homogeneizada em placa de Petri com 20mL do meio de Sabouraud modificado previamente fundido e resfriado a 45°C. Após a homogeneização, foi semeada com alça de platina no meio solidificado, em pontos equidistantes, as amostras de leveduras killer (K1 a K9). As placas foram incubadas a 25°C por 72 horas. Foram considerados sensíveis (+), os cultivos que produziram halo incolor e/ou zona de inibição com colônias azuis, ao redor do cultivo padrão, e resistentes (-), crescimento ao redor das leveduras killer.

As cepas foram incubadas em ágar Sabouraud dextrose a 37°C por 48 horas. Após este período, foram transferidas 3 colônias para tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo Sabouraud dextrose. Os tubos foram incubados em estufa a 37°C por 24 horas. Depois alíquotas de 20µL do caldo crescido foram transferidas para poços com 180µL de saliva artificial preparada segundo Henriques et al. (2005) em placas microtiter de poliestireno não tratadas que foram incubadas a 37°C por 48 horas (JAIN et al., 2007).

As placas foram posteriormente tratadas segundo metodologia descrita por Naves et al. (2008), com a determinação do crescimento total (CT) pela medida da densidade óptica a 630nm. Posteriormente as densidades ópticas foram lidas a 492 nm dos poços com leveduras aderidas (LA) e poços controle (PC). As densidades ópticas obtidas permitiram o cálculo do Índice de Formação Específica de Biofilme (FEB) por meio da fórmula $FEB = LA - PC / CT$, aonde LA = levedura aderida, PC = poço controle e CT = crescimento total. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em experimentos independentes e controles negativos foram incluídos. A cepa *C. albicans* ATCC 10231 foi utilizada como controle em todos os testes realizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A morfotipagem de 36 cepas de *C. albicans*, permitiu caracterizar 11 morfotipos. Observou-se o predomínio do morfotipo 5530 - colônia fúngica com franja contínua em leque, igual ou maior a 6mm, de textura intermediária e superfície lisa.

Todas as cepas de *C. albicans* analisadas induziram a formação de tubos germinativos dentro de duas horas, sendo que houve maior número de cepas capazes de formá-lo em uma hora.

Trinta e seis cepas de *C. albicans* isoladas do grupo CCSD apresentaram com alta atividade enzimática de fosfolipases. A biotipagem de *C. albicans* da boca de CCSD, frente às leveduras produtoras de toxinas killer, permitiu a detecção de cinco killer-tipos. O killer-tipo 111 predominou no grupo em estudo.

As *Candida albicans* isoladas da boca de CCSD formaram predominantemente colônias com periferia de franjas contínuas em leque, com comprimento de 6mm, textura intermediária e topografia lisa. Todas as cepas de *C. albicans* induziram a formação de tubos germinativos dentro de duas horas. A atividade enzimática de aspartil proteinases e fosfolipases mostraram zona de precipitação alta na maioria das colônias de *C. albicans* em CCSD.

Todas as cepas analisadas foram consideradas formadoras de biofilme em nossas condições experimentais e por meio do agrupamento dos resultados e aplicação do teste de Fisher, verificamos que a formação de biofilme e a ocorrência dos outros fatores de virulência foram independentes em nosso estudo.

A expressão dos fatores de virulência das cepas de *C. albicans* não se correlacionou com a formação de biofilme.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados mostraram que o processo de formação de biofilme ocorreu de forma independente dos demais fatores de virulência das cepas de *C. albicans* analisadas em nosso estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão das bolsas e incentivo à pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DINIZ, D. N. et al. Efeito antifúngico in vitro do extrato da folha e do caule de *Myrciaria cauliflora* berg. sobre microrganismos orais. **Rev Odontol UNESP**, Araraquara, v. 39, n.3, p. 151-156, maio/jun., 2010.

HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: comparasion of biofilms in terms of biomass and activity. **British Journal of Biomedical Science**. v. 63, n. 1, 2005.

HUNTER, P.R.; FRASER, C.A.M.; MACKENZE, D.W.R. Morphotype markers of virulence in human candidal infections. **J. Med. Microbiol.**, 28: 85-89, 1989.

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

LUIZ, A.C. et al., 2008. Alterações bucais e cuidados orais no paciente transplantado de medula óssea. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*.v. 30, n. 6, p. 480-487, 2008.

MENEZES, E. A. *et al.* Frequência e atividade enzimática de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de crianças de uma creche da prefeitura de Fortaleza. V. 41, n. 1, p. 9-13, 2005.

MATOS, B. M. *et al.* Atividade antifúngica do extrato alcoólico de *Mentha piperita*. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 38, n. 4, p. 244-48, jun./ago, 2009.

NAVES, P.; PRADO, G.; HUELVES, L.; GRACIA, M.; RUIZ, V.; BLANCO, J.; DHABI, G.; BLANCO, M.; PONTE, M. C.; SORIANO, F. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. *Microb. Pathogen*, v. 45, p. 86-91, 2008.

NETT, J. et al. Putative Role of β -1,3 Glucans in *Candida albicans* Biofilme Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 2, p. 510-520, Feb. 2007.

PHONGPAICHIT, S., MACKENZIE, D.W.R., FRASER, C. Strain differentiation of *C. albicans* by morphotyping. *Epiderm. Inf.*, 99: 421-428, 1987.

PRINCE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate methods for detection of phospholipase activity in *C. albicans*. *Sabouraudia*, 20: 15-20, 1982.

a Tropical, v.40, n3, p. 272-276, 2007.

REINSER, A. *et al.* In vivo biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: Impact of environmental and genetic factors. **J. Bacteriol**, v. 188, p. 3572-3581, 2006.

RIBEIRO *et al.*, 2006. Cepas gigantes de *Candida albicans* y su potencial de expresión/fenotípica en niños portadores del Síndrome de Down. **Acta Odontol. Venezol.**, Caracas, v. 44, n. 1, 2006.

RIBEIRO, E. L. Leveduras de *Candida* isoladas da boca de crianças com Síndrome de Down: aspectos feno-genotípicos, relação intrafamiliar e perfil de imunoglobulinas. 2008. 129 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

RUCHEL, R.; TESELLER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *C. albicans*. *Sabouraudia*, 20: 233-244, 1982.

RUIZ, F. J. G. Estudo Retrospectivo Correlacionando a Frequência de Isolamento de Leveduras do Gênero *Candida* ao Estado Imunológico de Pacientes em Hospital Geral: Análise de Cinco Anos. 2006. 76f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, 2006.

SUZUKI, L. C. Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans in vitro* para estudo da terapia fotodinâmica. 2009. 48f. Tese (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Materias) Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

VIEIRA, J. D. G. *et al.* *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças com síndrome de Down: ocorrência e inibição do crescimento por *Streptomyces sp.* *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 38, n. 5, p. 383-386, set/out. 2005.