UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

DANIELLE BEZERRA CABRAL

**Atividade antimicrobiana e antibiofilme de antissépticos bucais e
óleo de melaleuca sobre *Candida* spp. com aplicabilidade em tubos
traqueais**

Ribeirão Preto

2014

DANIELLE BEZERRA CABRAL

Atividade antimicrobiana e antibiofilme de antissépticos bucais e óleo de melaleuca sobre *Candida* spp. com aplicabilidade em tubos traqueais

Tese apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem Fundamental.

Linha de Pesquisa: Doenças Infecciosas: Problemática e Estratégias de Enfrentamento

Orientadora: Profa. Dra. Denise de Andrade

Ribeirão Preto

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Cabral, Danielle Bezerra

Atividade antimicrobiana e antibiofilme de antissépticos bucais e óleo de melaleuca sobre *Candida* spp. com aplicabilidade em tubos traqueais, Ribeirão Preto, 2014.
142 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Enfermagem Fundamental.

Orientadora: Profa. Dra. Denise de Andrade

1. Antissépticos bucais. 2. Biofilmes. 3. *Candida albicans*. 4. *Candida glabrata* 5. Intubação Intraqueal. 6. Higiene bucal.

CABRAL, Danielle Bezerra

Atividade antimicrobiana e antibiofilme de antissépticos bucais e óleo de melaleuca sobre *Candida* spp. com aplicabilidade em tubos traqueais.

Tese apresentada à Escola de Enfermagem de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa
de Pós-Graduação Enfermagem Fundamental.

Aprovado em: de junho de 2014.

Comissão Julgadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a:

Ao meu pai, Bartolomeu (in memorian), que foi exemplo de amor e dedicação incondicional, educação salutar, tolerância, fé e um zelo físico, mental e espiritual aos filhos e esposa. Sinto falta de seu amparo nos momentos difíceis, bem como o compartilhar de felicitações, como esta. Obrigada por me ensinar o caminho do saber e, me inspirar a buscá-lo incansavelmente.

À minha mãe, Regina Stella: tu és realmente uma estrela divina, uma mulher e mãe sábia, prudente, companheira e singular. Agradeço a Deus todos os dias por ter sido gerada em teu ventre cheio de amor de Deus, amor aos filhos e ao próximo. Não tenho palavras para expressar o quanto és e foi importante nestes seis anos aqui em Ribeirão Preto. Todavia, obrigada por aconselhar-me nas decisões tomadas e a serem tomadas a partir deste doutorado e, perdão pelas ausências e preocupações que te afligi.

Amo-te e amar-te-ei eternamente!

*“Cuide para que não queiras receber mais do que tens a oferecer, porque há coisas que exigem extrema reciprocidade para que sejam possíveis.
Para que um litro de água preencha um vaso, é preciso que este vaso tenha espaço para aquele um litro de água ou mais, pois se ele não tiver espaço suficiente, ele transbordará e a água sofrerá.
De modo semelhante, a água precisa estar na medida certa que o vaso comporta ou deixará espaço vazio e aí será o vaso que sofrerá. Com teu próximo é preciso proceder da mesma forma: se você quer viver um imenso amor, é preciso que cultives um espaço imenso em teu coração.
E, se mais que isso, você deseja um amor incondicional, o teu amor precisa ser incondicional primeiro – sempre, e sobre todas as coisas, ou ele deixará de ser incondicional”.*

(Augusto Branco)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora Profª. Dra. Denise de Andrade, pelas oportunidades concedidas desde a época do mestrado; por conduzir-me nas reflexões interpessoais, bem como incentivar-me no crescimento pessoal e profissional. Obrigada pela credibilidade, parcimônia ao ensinar e orientar, carinho e, sobretudo pela seriedade na condução deste trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Evandro Watanabe (o senhor legalizou-se no meu coração) que foste além de uma simples complementação de orientação, pois norteste, ensinaste, orientaste e repreendeste com sabedoria e parcimônia o que estava destoante da “padronização” profissional e pessoal. Obrigada por ensinar-me, cautelosamente, as técnicas laboratoriais, tanto da DIM como da formação de biofilme; obrigada pelas correções da tese e obrigada, sobretudo pelas limitações enfrentadas no decorrer desta pesquisa. Tu és ético, humano, competente, inteligente, sábio e um educador nato. Muito obrigada por tudo!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À Deus, por me apresentar com o dom da vida, pela família que me destes, pelas graças alcançadas, pelo livramento de males, ofensas e agruras, pelas oportunidades concedidas no decorrer deste trabalho e, por ter me concedido teu Espírito Santo para concluir este trabalho.

A minha mãe que ouviu pacientemente as minhas preocupações e aflições e, com sua doçura e espiritualidade ímpar orientou-me seguramente nas decisões pessoais e profissionais (oportunamente acatadas).

À Profa. Dra. Denise de Andrade que compartilhou conhecimentos e ensinamentos de vida no mestrado e doutorado. Muito obrigada!!

Aos Professores Dr. Evandro Watanabe e Dra. Ana Maria Razaboni que foram membros da banca do Exame de Qualificação de Doutorado. Obrigada pelas sugestões, correções e contribuições que resultaram na concretização deste estudo.

Ao estatístico Jonas Bodini que contribuiu significativamente com as inúmeras assessorias estatísticas, agendadas ou não. Sua parceria foi estatisticamente comprovada. Obrigada!!

Ao Leonardo Melo Bezerra por compartilhar nos momentos difíceis para concretização deste sonho. Sou muito grata e desejo que Jesus Cristo derrame suas bênçãos e graças em sua vida e família. Obrigada!!

Aos professores (Prof. Dr. Adriano Menis Ferreira, Profa. Dra. Paula Regina de Souza, Profa. Dra. Annecy Tojeiro Giordani, Prof. Dr. Vanderlei José Haas) e colegas do grupo de pesquisa (Marcela Padilha, Carol Beraldo, Milena, Marta Inês, Fernanda Rossini,

Marcelo Rigotti) do Núcleo de Estudos em Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde - NEPECISS, pela amizade e convivência nestes seis anos de USP.

Aos meus irmãos Eduardo Bezerra e Pedro Henrique Bezerra, pelo carinho recebido e apoio constante, mesmo a distância (3.500km).

À minha sobrinha Sarah Sidney Cabral que com sua inocência e amor fez-me perseverar a cada amanhecer. Perdoe-me pela ausência dos seus seis anos de vida, no entanto, poderei acompanhar-te incansavelmente a partir deste sonho concretizado.

À minha cunhada, amiga e irmã Karla Maria Sidney que és um exemplo de mãe carinhosa, atenciosa e uma educadora infantil exemplar. Obrigada pela amizade e carinho!!

À minha cunhada Amanda Cabral por ter gerado mais um membro da família (Júlia Maria) e deixar meu irmãozinho tão feliz a cada dia.

As minhas tias de Teresina (Socorro, Graça e Teresinha), as quais compartilhei as alegrias vividas e inquietudes expressivas, apenas pela voz, e com seu amor e aconselhamento fortalecia-me a cada dia.

Aos meus primos maravilhosos (Carol Nunes e Rafael Felipe Nunes) que me fortaleceram com amor e carinho nesta trajetória. Nossas conversas e risadas de madrugada foram salutares para os meus momentos de descontração. Amo vocês!!

Aos meus amigos (famoso galinheiro): Luigi, Emiliana e Camila Abrahão, eu só tenho a agradecer por tê-los como meus verdadeiros amigos. Em Ribeirão Preto encontrei-os, chorei, sofri, discuti, orei, redimi e amei. E, com o passar dos meses e anos aproximamos e moramos na mesma rua e, no mesmo bairro e, assim nossas mães, um dia, se encontraram e disseram aquilo que já sabíamos: seremos amigos por incansáveis e longos anos. Amo vocês.

À minha amiga, em especial, Camila Megumi: tu foste o elo que uniu, para sempre, o amor de Jesus Cristo em meu coração e espírito. Agradeço a oportunidade que Jesus me deu

em te conhecer, pois com seu amor benevolente, paciência e aconselhamento constante fez-me uma pessoa melhor. Obrigada amiga por tudo e, quero estar ao teu lado nas constantes orações, bem como na alegria e dificuldades da vida.

À Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto (EERP/USP) e a todos os docentes que me ensinaram, seja pelas disciplinas de pós-graduação ou PAE, funcionários e colegas que tive a oportunidade de conhecê-los no mestrado e doutorado.

À Edilaine Castania Amadio, secretária do Programa de Enfermagem Fundamental, pelas orientações regimentais ou não, pela paciência em atender-me para dirimir dúvidas na compra de materiais, auxílio e/ou bolsas e, sobretudo pelos momentos descontraídos (pegar manga na árvore da USP ou abraços confiantes). Obrigada Di!!

À Ritinha (Maria Rita Santana) do Anexo Cecília Puntel (EERP/USP), pelo zelo e carinho todas as tardes e, por deixar o laboratório tão limpo e agradável a cada dia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível - CAPES, pela viabilização desta pesquisa por meio do suporte financeiro.

“Disse Davi a Salomão, seu filho: esforça-te e tem bom ânimo, e faze a obra; não temas, nem te apavores; porque o Senhor Deus, meu Deus, há de ser contigo; não te deixará, nem te desampará, até que acabes toda a obra do serviço da casa do Senhor”.

1 CRÔNICAS 28:20

*“Depois da morte de Moisés, servo do Senhor, disse o Senhor a Josué, filho de Num, auxiliar de Moisés: “Meu servo Moisés está morto. Agora, pois, você e todo este povo preparem-se para atravessar o rio Jordão e entrar na terra que eu estou para dar aos israelitas. Como prometi a Moisés, todo lugar onde puserem os pés eu darei a vocês. Seu território se estenderá do deserto ao Líbano, e do grande rio, o Eufrates, toda a terra dos hititas até o mar Grande, no oeste. Ninguém conseguirá resistir a você todos os dias da sua vida. Assim como estive com Moisés, estarei com você; nunca o deixarei, nunca o abandonarei. **“Seja forte e corajoso, porque você conduzirá este povo para herdar a terra que prometi sob juramento aos seus antepassados. Somente seja forte e muito corajoso!** Tenha o cuidado de obedecer a toda a lei que o meu servo Moisés ordenou a você; não se desvie dela, nem para a direita nem para a esquerda, para que você seja bem-sucedido por onde quer que andar. Não deixe de falar as palavras deste Livro da Lei e de meditar nelas de dia e de noite, para que você cumpra fielmente tudo o que nele está escrito. Só então os seus caminhos prosperarão e você será bem-sucedido. Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.*

JOSUÉ 1: 1-9

RESUMO

CABRAL, D. B. **Atividade antimicrobiana e antibiofilme de antissépticos bucais e óleo de melaleuca sobre *Candida* spp. com aplicabilidade em tubos traqueais.** 2014. 129f. Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O uso de antissépticos complementa a higienização bucal reduzindo a microbiota e, consequentemente minimizando a colonização, a formação de biofilme e, assim promovendo a saúde bucal. Diante das opções de antissépticos bucais e produtos naturais, faz-se necessária a análise microbiológica da eficácia desses produtos e suas implicações no controle do biofilme. Neste sentido, têm-se como objetivos: determinar a diluição inibitória máxima (DIMax) de antissépticos bucais (Listerine®, Colgate Plax® Tea Fresh, Periogard®) e o óleo de melaleuca sobre as cepas de *Candida albicans* e *Candida glabrata*, clínicas e padrão; quantificar as unidades formadoras de colônias por tubo traqueal (UFC/TT) das leveduras em TTs revestidos com os respectivos produtos e, analisar a formação de biofilme em fragmentos de tubos revestidos ou não com antissépticos e óleo de melaleuca por *C. glabrata*. Trata-se de um estudo de natureza laboratorial, in vitro, realizado com cepas clínicas e padrão e subsidiado em métodos clássicos da microbiologia para o processamento das avaliações propostas. Para determinar a DIMax, realizou-se a diluição dupla seriada (1/4 a 1/4096) dos antissépticos e óleo de melaleuca respectivamente, sendo as placas incubadas a 37°C por 24 horas. Considerou-se DIMax a maior diluição capaz de inibir o crescimento de todas as cepas avaliadas. Na formação de biofilme foram empregadas duas técnicas: determinação das UFC/TT e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na aleatorização das cepas *C. glabrata* utilizou-se a análise estatística pelo modelo de regressão logístico multinomial. A partir da análise dos resultados observou-se que o Listerine® apresentou a menor ação inibitória na DIMax de 1/4, óleo de melaleuca (1/16), Colgate Plax® Tea Fresh (1/64) e o Periogard® (1/128). Em termos de formação de biofilme, o tubo revestido com Colgate Plax® Tea Fresh apresentou diferença no teste de comparações múltiplas ($p=0,0031$), com atividade antibiofilme em todas as cepas de *C. glabrata*, com exceção de um isolado clínico. As fotomicrografias revelaram reprodução por brotamento presente no TT revestido com óleo de melaleuca, lise celular na ação do Periogard® e, os TTs revestidos com Colgate Plax® Tea Fresh não apresentaram biofilme, exceto na cepa 33. A formação de biofilme por células leveduriformes foi significativa apresentando-se de forma diversificada nos diferentes tubos revestidos. Estudos adicionais sobre *Candida* spp. em tubos traqueais são recomendáveis em pacientes, com e sem pneumonia, submetidos à ventilação mecânica.

Palavras chave: Antissépticos bucais, biofilmes, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, Intubação Intratraqueal, Higiene bucal.

ABSTRACT

CABRAL, D. B. **Antibiofilm and antimicrobial activity of oral antiseptics and tea tree oil against *Candida* spp. applicability in tracheostomy tubes.** 2014. 129f. Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Introduction: The use of oral antiseptics is increasingly common, as a complement to the regular oral hygiene by reducing the oral microbiota, biofilm formation and thereby promoting oral health. Facing of several oral antiseptics and natural products, it is necessary microbiological analysis of the effectiveness of these antiseptics and in its implications in the control of biofilm. **Objective:** The aims of the study were to determine the maximum inhibitory dilution (MID) oral antiseptics (Listerine®, Colgate® Plax, Fresh Tea and Periogard®) and tea tree oil of clinical and standard strains of *Candida* spp. and *Candida glabrata*; colony forming units assay (CFU/TT) of yeast in tracheostomy tubes (TT) coated with some products; and analyze the biofilm formed in fragments of tubes coated or not with oral antiseptics and tea tree oil for *Candida glabrata*. **Methods:** This is a laboratory investigation, in vitro study performed with clinical and standard strains and subsidized of classical microbiology methods for processing the proposals reviews. To determine the MID, serial dilution was carried out (1/4 a 1/2048) of oral antiseptics and tea tree oil respectively, and the plates were incubated at 37°C for 24h. The MID was considered the highest dilution capable of inhibiting the growth of all strains tested. In biofilm formation two techniques were employed: determination of colony forming units (CFU/TT) and scanning electron microscopy (SEM). The statistical analysis by multinomial logistic regression model was used to randomization strains of *C. glabrata*. **Results:** Listerine® showed the worst performance, MID (1/4), tea tree oil (1/16), Colgate Plax® Fresh Tea (1/64) and Periogard® (1/128). In terms of biofilm formation, the multiple comparisons test presented differences ($p=0.0031$) for tube coated Colgate Plax® Tea Fresh with antibiofilm activity in all strains of *C. glabrata*, except for one clinical isolate. The photomicrographs revealed reproduction by budding in the TT coated with tea tree oil, cell lysis in action of Periogard®, and the Colgate Plax® Fresh Tea coated tube produced no visible colony, except with strain 33. **Conclusion:** Biofilm formation by yeast was significant presenting diverse in different coated tubes. Additional studies of *Candida* spp. in tracheostomy tubes are recommended in patients with and without pneumonia, undergoing mechanical ventilation.

Keywords: Mouthwashes. Biofilms. *Candida albicans*. *Candida glabrata*. Intubation, Intratracheal. Oral hygiene.

RESUMEN

CABRAL, D. B. **Antibiofilme y la actividad antimicrobiana de los enjuagues bucales y aceite del árbol del té contra la *Candida* spp. con aplicabilidad en tubos traqueales.** 2014. 129f. Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Introducción: El uso de antisépticos complementa la higiene bucal mediante la reducción de la microbiota, y por lo tanto minimizar la colonización, la formación de biofilm y de este modo la promoción de la salud oral. Ante el enjuague bucal y opciones de productos naturales, es necesario el análisis microbiológico de la eficacia de estos productos y sus implicaciones en el control del biofilm. **Objetivos:** En este sentido, contamos con los siguientes objetivos: determinar la máxima dilución inhibitoria (MDI) de enjuague bucal (Listerine®, Colgate Plax Fresh Tea®, Periogard®) y té del aceite del árbol de las cepas clínicas y estándar del *Candida albicans* y *Candida glabrata*; cuantificar las unidades formadoras de colonias por (UFC/cm²) levaduras en los tubos traqueales revestido con sus productos y analizar la formación de *C. glabrata* en los fragmentos de biofilm en tubos recubiertos o no con un antiséptico aceite del árbol del té. **Método:** Se trata de un estudio de laboratorio de la naturaleza, *in vitro*, realizados con las cepas clínicas y estándar y subsidiado en los métodos clásicos de microbiología para el procesamiento de las evaluaciones propuestas. Para determinar la MDI se llevó a cabo una dilución en serie doble (1/ 4 a 1/2048) de los antisépticos y el aceite del árbol del té, respectivamente, y se incubó a 37°C por 24 horas. MID se consideró la mayor dilución capaz de inhibir el crecimiento de todas las cepas ensayadas. Determinación de unidades formadoras de colonias por ubos traqueales (UFC/TT) y microscopía electrónica de barrido (MEB) en la formación de biofilms se emplearon dos técnicas de conformación. En la aleatorización de las cepas *C. glabrata* utilizó el análisis estadístico mediante el modelo de regresión logística multinomial. **Resultados:** el Listerine® mostró la acción inhibitoria más bajo en MDI de 1/1, el aceite del árbol del té (1/16), Colgate Plax Fresh Tea® (1/64) y Periogard® (1/128). La formación de biofiles, el tubo recubierto con Colgate Plax Fresh Tea® presenta diferencias de múltiple ($p=0,0031$) comparaciones prueban con la actividad antibiofilms en todas las cepas de *C. glabrata*, con la excepción de un aislamiento clínico. Las microfotografías mostradas en esta reproducción de tubos traqueales en ciernes cubierto con aceite del árbol del té, la lisis celular en la acción Periogard® y los tubos traqueales recubiertos con Colgate Plax Fresh Tea® mostraron ninguna colonia visible, excepto la cepa 33. **Conclusión:** La formación de biofilm por la levadura mostró significativa en los diferentes tubos recubiertos. Estudios adicionales de *Candida* spp. en tubos traqueales se recomiendan en pacientes con y sin neumonía, sometidos a ventilación mecánica.

Palabras clave: Antisépticos bucales. Biofilms. *Candida albicans*. *Candida glabrata*. Intubación intratraqueal. Higiene bucal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Candida albicans</i>	28
Figura 2	<i>Candida glabrata</i>	31
Figura 3	Formação de biofilme por <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> ; A: 0-11 h; B: 12-30 h; C: 38-72 h. Y- célula de levedura; superfície plana; EPS: matriz exopolissacarídeo; H: hifa.....	35
Figura 4	Vista panorâmica dos frascos de antissépticos bucais e óleo de melaleuca utilizados no estudo.....	47
Figura 5	Vista panorâmica da placa de microdiluição de 96 poços com os respectivos antissépticos bucais e óleo de melaleuca em diluição dupla seriada (1/4 a 1/2048 e 1/32 a 1/16.384).....	53
Figura 6	Fluxograma da padronização do inóculo microbiano e das diluições dos antissépticos bucais e do óleo de melaleuca sobre as cepas clínicas de <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i>	55
Figura 7	Tubo traqueal com balão estéril de 7mm.....	56
Figura 8	Fluxograma da formação de biofilme em tubos traqueais estéreis...	57
Figura 9	Fluxograma da determinação do número de unidades formadoras de colônias das cepas 22, 26, 33 e 34 por tubo traqueal (UFC/TT) do biofilme formado nos fragmentos de tubos traqueais estéreis.....	58
Figura 10	Corpos de prova montados em “stubs” metálicos sobre a base de isopropanol (a) e submetidos ao processo de metalização em ouro (b).....	60
Figura 11	Vista panorâmica do (a) Bal Tec CPD 030 (Critical Point Dryer – Fürstentum – Liechtenstein) para processamento dos corpos de prova e (b) do microscópio eletrônico de varredura JSM – 6610LV (Jeol Ltd.- Tokyo) para visualização das colônias de <i>C. glabrata</i>	60
Figura 12	Fotomicrografia da face interna e externa do tubo traqueal estéril sem a formação de biofilme.....	61
Figura 13	Frequência de ocorrência de Diluição Inibitória Máxima (DIMax) de <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i> . Ribeirão Preto, 2014.....	69
Figura 14	Frequência de ocorrência de Diluição Inibitória Máxima (DIMax) pelo perfil de sensibilidade de <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i> , Ribeirão Preto, 2014.....	70

Figura 15	Probabilidade da Diluição Inibitória Máxima sobre <i>Candida</i> spp. em diferentes antissépticos e óleo de melaleuca, Ribeirão Preto, 2014.	73
Figura 16	Probabilidade acumulada da Diluição Inibitória Máxima sobre <i>Candida</i> spp. em diferentes antissépticos e óleo de melaleuca, Ribeirão Preto, 2014.....	74
Figura 17	Vista panorâmica dos tubos de ensaio (25x150mm) da cepa 26 de <i>C. glabrata</i> com fragmentos de tubos traqueais após formação de biofilme.....	77
Figura 18	Vista panorâmica dos tubos de ensaio (25x150mm) da cepa 34 de <i>C. glabrata</i> com fragmentos de tubos traqueais após formação de biofilme.....	78
Figura 19	Quantificação da carga de <i>C. glabrata</i> em tubos traqueais estéreis revestidos com antissépticos bucais e óleo de melaleuca. As letras minúsculas iguais indicam atividades antibiofilmes similares e as letras minúsculas diferentes indicam atividades antibiofilmes diferentes.....	80
Figura 20	Blox plot da contagem microbiana do biofilme formado em tubos traqueais estéreis revestidos ou não com antissépticos bucais e óleo de melaleuca, Ribeirão Preto, 2014.....	81
Figura 21	Fotomicrografia da camada de superfície irregular de transição entre as faces internas e externas do tubo traqueal estéril, sem a formação de biofilme.....	82
Figura 22	Fotomicrografia do biofilme de <i>C. glabrata</i> (cepa 22) formado em TT revestido com Listerine®, Ribeirão Preto, 2014.....	83
Figura 23	Fotomicrografia do biofilme de <i>C. glabrata</i> (cepa 22) formado, Ribeirão Preto, 2014.....	84
Figura 24	Fotomicrografia do biofilme de <i>C. glabrata</i> (cepa 22) formado em TT revestido com Listerine®, Ribeirão Preto, 2014.....	85
Figura 25	Fotomicrografia do biofilme de <i>C. glabrata</i> (cepa 26) formado em TTs revestidos com controle e Periogard®, Ribeirão Preto, 2014.....	86
Figura 26	Fotomicrografia do biofilme de <i>C. glabrata</i> (cepa 26) formado em TTs revestidos com óleo de melaleuca e Colgate Plax® Toda Plax, Ribeirão Preto, 2014.....	87
Figura 27	Fotomicrografia do biofilme de <i>C. glabrata</i> (cepa 33) formado em TT revestido com Listerine®, Ribeirão Preto, 2014.....	88

Figura 28	Fotomicrografia do biofilme de <i>C. glabrata</i> (cepa 33) formado em TTs revestidos com controle e Periogard®, Ribeirão Preto, 2014.....	89
Figura 29	Fotomicrografia do biofilme de <i>C. glabrata</i> (cepa 33) formado em TTs revestidos com óleo de melaleuca e Colgate Plax® Toda Plax, Ribeirão Preto, 2014.....	90
Figura 30	Fotomicrografia do biofilme de <i>C. glabrata</i> (cepa 34) formado em TT revestido com Listerine®, controle e Periogard®, Ribeirão Preto, 2014.....	91
Figura 31	Fotomicrografia do biofilme de <i>C. glabrata</i> (cepa 34) formado em TTs revestidos com óleo de melaleuca e Colgate Plax® Toda Plax, Ribeirão Preto, 2014.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Diluição Inibitória Máxima (DIMax) de antissépticos bucais e óleo de melaleuca sobre as cepas de <i>Candida</i> spp. Ribeirão Preto, 2014.....	66
Tabela 2	Diluição Inibitória Máxima (DIMax) dos três antissépticos bucais e óleo de melaleuca sobre as cepas de <i>Candida</i> spp. clínicas e padrão. Ribeirão Preto, 2014.....	68
Tabela 3	Determinação do número de unidades formadoras de colônias por tubo traqueal (UFC/TT) de <i>C. glabrata</i> em tubos traqueais revestidos com antissépticos bucais e óleo de melaleuca. Ribeirão Preto, 2014.....	76
Tabela 4	Análise do crescimento fúngico de tubos traqueais estéreis revestidos ou não com antissépticos bucais e óleo de melaleuca e, submetidos à formação de biofilme por <i>Candida glabrata</i> . Ribeirão Preto, 2014.....	77
Tabela 5	Médias, medianas, mínimos, máximos e desvios padrão do número de unidades formadoras de colônias por tubos traqueais dos diferentes antissépticos e óleo de melaleuca obtidos a partir do teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($p < 0,0001$). Ribeirão Preto, 2014.....	79
Tabela 6	Médias, mínimos, máximos e desvios padrão do número de unidades formadoras de colônias por tubos traqueais dos diferentes antissépticos e óleo de melaleuca obtidos a partir do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$). Ribeirão Preto, 2014.....	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Distribuição das cepas de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida glabrata</i> , clínicas e padrão, utilizadas no estudo. Ribeirão Preto, SP, 2014.....	50
Quadro 2	Cálculo do p-valor para o teste da razão de verossimilhança da variável antisséptico.....	71
Quadro 3	Cálculo do p-valor das variáveis para o teste da razão de verossimilhança das demais antissépticos.....	71
Quadro 4	Cálculo dos critérios de seleção do modelo.....	71
Quadro 5	Estimativas dos parâmetros do modelo logístico multinomial ordinal.....	72
Quadro 6	Exemplos de probabilidades calculadas pelo modelo ajustado.....	73
Quadro 7	Quadro de probabilidade de DIMax associadas com os diferentes antissépticos e óleo de melaleuca e <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i>	129
Quadro 8	Quadro de probabilidade acumulada de DIMax associadas com os diferentes antissépticos e óleo de melaleuca e <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i>	129

LISTA DE SIGLAS

ASS	Aspiração de secreções subglóticas
ATCC	American Type Culture Collection
CO ₂	Gás carbônico
CPC	Cloreto de cetilpiridínio
CXH	Clorexidina
DIMax	Diluição Inibitória Máxima
DP	Desvio padrão
ECZ	Econazol
EPS	Matriz de Exopolissacarídeos
EUA	Estados Unidos da América
F(a)	Frequência acumulada
FCZ	Fluconazol
FDA	Food and Drug Administration
H _A	Hipótese alternativa
H ₀	Hipótese nula
KTZ	Cetoconazol
L	Listerine®
MCZ	Miconazol
Me	Óleo de melaleuca
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMR	Microrganismos multidrogas resistentes
NEPECISS	Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde
PAVM	Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica
Pg	Periogard®
Px	Colgate Plax® Tea Fresh
TET	Tubo endotraqueal
TT	Tubo traqueal
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
	1.1. <i>Candida spp.</i> na cavidade bucal.....	24
	1.2. Formação de biofilme por <i>Candida spp.</i>	33
	1.2.1 Formação de biofilme e o risco de <i>Pneumonia Associada à Ventilação mecânica (PAVM)</i>	37
	1.3 Justificativa e relevância do estudo.....	40
2	OBJETIVOS.....	44
3	MATERIAL E MÉTODO.....	46
	3.1 <i>Natureza e local de estudo.</i>	46
	3.2 <i>Materiais e cepas utilizadas.</i>	46
	3.2.1 Antissépticos bucais e o óleo de melaleuca.....	46
	3.2.2 Cepas clínicas e padrão.....	49
	3.2.3. Meios de cultura.....	51
	3.3 Processamento microbiológico.....	52
	3.3.1 Padronização do inóculo fúngico.....	52
	3.3.2 Determinação da Diluição Inibitória Máxima (DIMax) dos antissépticos bucais e do óleo de melaleuca.....	53
	3.3.3 Formação de biofilme, in vitro, em tubos traqueais estéreis revestidos com antissépticos e óleo de melaleuca.....	55
	3.3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	59
	3.4 Análise estatística dos dados.....	61
4	RESULTADOS.....	65
	4.1 Determinação da Diluição Inibitória Máxima (DIMax) de antissépticos bucais e óleo de melaleuca sobre as cepas de <i>Candida spp.</i>	65
	4.2 Quantificação da carga de <i>C. glabrata</i> em tubos traqueais estéreis revestidos com antissépticos bucais e óleo de melaleuca....	75

4.3	Análise do biofilme de <i>C. glabrata</i> em tubos traqueais estéreis revestidos por antissépticos bucais e óleo de melaleuca por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	82
5	DISCUSSÃO.....	94
5.1	Determinação da Diluição Inibitória Máxima (DIMax) de antissépticos bucais e óleo de melaleuca sobre as cepas de <i>Candida</i> spp.....	94
5.2	Quantificação da carga de <i>C. glabrata</i> em tubos traqueais estéreis revestidos com antisséptos bucais e óleo de melaleuca....	97
5.3	Análise do biofilme de <i>C. glabrata</i> em tubos traqueais estéreis revestidos por antissépticos bucais e óleo de melaleuca por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	108
	CONCLUSÃO.....	114
	REFERÊNCIAS.....	116
	ANEXOS.....	142

INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas se destacam na área odontológica apresentando elevada incidência e variabilidade de manifestações clínicas o que dificulta, muitas vezes, o seu diagnóstico e eficácia na terapêutica. Ademais nas duas últimas décadas, observam-se mudanças significativas na epidemiologia das infecções fúngicas, devido à diversificação das espécies, aumento da resistência aos antifúngicos sendo frequentemente causas notórias de morbimortalidade.

Como fatores de risco para as infecções fúngicas destacam-se os pacientes imunodeprimidos (PFALLER; DIEKEMA, 2007), as neoplasias (DE LA ROSA-GARCÍA et al., 2013), os receptores de transplante de órgãos ou de células tronco hematopoiéticas (ALI et al., 2014) e indivíduos submetidos à quimioterapia e a procedimentos invasivos (ATABEK; AKYÜREK; EKLIOGIU, 2013; HAMMAD; DARWAZEH; IDREES, 2013). Entre os pacientes previamente hígidos, porém gravemente enfermos (traumatizados ou grandes queimados) tem-se como fatores de risco o uso: de cateter venoso central (DEVIRIM et al., 2014), nutrição parenteral total, antibióticos de largo espectro (MASON et al., 2012), respiração assistida ou ventilação mecânica, entre outras vulnerabilidades clínicas (GLÖCKNER; CORNELLY, 2013). Também, acrescem-se para os riscos de infecção fúngica, escore em *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*, pacientes em hemodiálise e procedimento cirúrgico abdominal com perfuração gastrointestinal (GORDON et al., 2001; SOBEL, VÁZQUEZ; 2010; TUAN, DENNISON, WEISDORF, 1992). As infecções fúngicas oportunistas representam, geralmente, as infecções associadas aos cuidados de saúde (KOLLEF et al., 2008; PERLROTH et al., 2007; PROCOP; ROBERTS, 2004).

As infecções fúngicas enfrentam dificuldades terapêuticas mesmo diante do arsenal de opções antifúngicos disponíveis no mercado, tais drogas têm limitações em sua utilização, por apresentarem toxicidade ao hospedeiro e, também pela possibilidade de ocorrer a resistência por diferentes espécies e subespécies de fungos (POWDERLY et al., 1993), principalmente pela capacidade de formar biofilmes. Portanto, todos estes aspectos têm contribuído, conjuntamente, para aumentar o interesse no estudo desses microrganismos (DE BACKER et al., 2001).

Nesse sentido, a redução dos riscos de infecção e a promoção da saúde bucal representam um desafio para assistência à saúde individual e coletiva.

Nos anos sessenta, a *Candida spp.* passa a representar uma preocupação significativa dada a sua elevada ocorrência dentre as infecções fúngicas. A *Candida albicans* representava 85% a 90% dos episódios de infecções por fungos. No entanto, um estudo realizado entre 1988 e 1992, identificou que a incidência de *Candida* não-*albicans* havia ultrapassado a de *C. albicans* e, apenas 42% dos casos foram causados por *C. albicans* tendo-se como destaque: *C. tropicalis* (18%), *C. parapsilosis* (17%), *C. glabrata* (11%), *C. krusei* (4%), entre outras (ABI-SAID et al., 1997; PAPPAS, 2009; PRICE, LAROCCO, GENTRY, 1994). As diversas espécies de *Candida* são responsáveis pelas recorrentes infecções de corrente sanguínea, constituindo de 8 a 15% das infecções hospitalares (WISPLINGHOFF, 2004). *Candida albicans* é o microrganismo frequente nos Estados Unidos, seguido pela *C. parapsilosis* ou *C. glabrata* (SINGARAVELU; GÁCSE; NOSANCHUK, 2014).

1.1. *Candida spp.* na cavidade bucal

A cavidade bucal oferece uma variedade de nichos ecológicos à colonização microbiana, permitindo a sobrevivência de uma diversidade de microrganismos, destacando-se os fungos (JABRA-RIZK et al., 2001; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1994; SWEENEY; DOBSON, 1998). Desta forma, a microbiota bucal alberga uma diversidade de microrganismos e, portanto um sistema ecológico complexo, constituída de *habitats* heterogêneos e exposta a diferentes fatores ambientais, bióticos e abióticos (MADEIRA, 2006). Calcula-se, em torno de 800 espécies diferentes de microrganismos que buscam por um nicho e nutrição, sendo as mais comuns o *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrius*, *Lactobacillus spp.*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces spp.*, *Porphyromonas gingivallis*, *Porphyromonas intermedia*, *Wolinella recta*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eubacterium corrodens*, *Jannerella forsythensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema spp.* (AMARAL, 2001; SANTOS; JORGE, 1998; SCANNAPIECO; BUSH; PAJU, 2003). Todavia, alterações nos nichos podem ocasionar afecções bucais, sendo umas das mais frequentes a estomatite e a candidíase. Estas infecções são favorecidas por alterações do epitélio bucal e

frequentemente estão relacionadas à idade avançada, ao uso de drogas antineoplásicas, a deficiência de vitamina C, assim como o uso de antibióticos sistêmicos (JORGE, 2008; SILVERMAN; EVERSOLE; TRUELOVE, 2004).

Acresce-se que o uso de aparelhos protéticos e ortodônticos e implantes potencializa o risco para infecção, uma vez que são colonizados pela microbiota bucal exigindo atenção e práticas de higiene e limpeza frequentes (JORGE, 1986).

O equilíbrio das condições ecológicas da boca não é estável por longos períodos sofrendo, assim influência da dentição primária até a permanente. Outros fatores, também estão relacionados com esse desequilíbrio como a existência: de lesões, de cáries, de restaurações, de extração de dentes, de próteses ou aparelhos ortodônticos. Todavia, as mudanças transitórias na estabilidade deste ecossistema podem ser ocasionadas pela frequência e o tipo de alimentos ingeridos, variação no fluxo salivar, o uso de medicamentos, entre outros (MARSH; MARTIN, 1992).

A boca apresenta ainda, superfícies mucosas que contribuem para a diversidade microbiana. As papilas do dorso da língua favorecem a colonização de microrganismos que geralmente seriam removidos pela estimulação do ato de mastigação e liberação do fluxo salivar. O baixo potencial de óxido-redução nos espaços interpapilares da língua propicia o desenvolvimento de uma microbiota bacteriana anaeróbia em detrimento às leveduras de *Candida* (MARSH; MARTIN, 1992; PARDI; CARDOSO, 2002). Entretanto, a maior colonização bucal de *Candida* é presenciada no dorso da língua, o que sugere ser o reservatório primário de *C. albicans*, seguido pela agregação fúngica ao biofilme dentário (ALKUMRU; BEYDEMIR, 1992; CARVALHO et al., 2007; PARDI; CARDOSO, 2002).

Os microrganismos bucais têm como fonte endógena de nutrientes a saliva, a qual fornece aminoácidos, peptídeos, vitaminas, gases e glicopeptídeos e estabelecem cadeias alimentares com propósito de aproveitar melhor os nutrientes presentes na boca. A fonte exógena de nutrientes é a dieta, tendo os carboidratos como substâncias orgânicas que influenciam diretamente na composição dessa microbiota. Os carboidratos são convertidos em polímeros (glucanos e frutanos) que consolidam a aderência ou são metabolizados em ácidos como os ácidos carboxílicos, além de outras substâncias tóxicas (HANNULA, 2001).

Várias substâncias antimicrobianas são detectadas na saliva, as quais atuam no controle da colonização da boca. Estes fatores compreendem a lisozima, lactoferrina e o sistema da sialoperoxidase, polipeptídeos ricos em histidina entre outros. No que se referem à *Candida* spp., importantes enzimas salivares, lactoferrina, lisozima e outras, exercem ação inibidora sobre a sua multiplicação (URIZAR, 2002). Verificou-se que a lactoferrina existente na saliva parotídica é capaz de inibir a *C. albicans*, *in vitro*, por exercer ação quelante sobre o ferro, elemento essencial para a sua multiplicação (LACAZ, 1980).

O controle microbiano bucal, também é exercido pelo fluido do sulco gengival tanto no processo de manutenção da microbiota, como nas infecções. O fluido, também pode remover células microbianas não aderidas, atuar como fonte primária de nutrientes e conter componentes de defesa do hospedeiro (TENOVUO, 1992). O fluxo e a composição salivar exercem papel relevante quanto à manutenção das propriedades físicas e químicas da boca, além de interferir na composição da microbiota bucal. Há ainda, a presença de fosfatos, peptídeos, compostos nitrogenados (uréia e aminoácidos), além de bicarbonato atuando como o principal sistema tampão. Apresenta uma acentuada concentração de proteínas e glicoproteínas, por exemplo, as mucinas, as quais influenciam diretamente na agregação e aderência microbiana, inclusive atuando com receptores das manoproteínas de superfície de *C. albicans*. Ademais, interagem com componentes de defesa do hospedeiro e funcionam como fonte primária de nutrientes para a microbiota autóctone (MARSH; MARTIN, 1992; PARDI; CARDOZO, 2002; SIMMONDS; TOMPKINS; GEORGE, 2002).

Outros fatores como o potencial de óxido-redução (Eh) e o pH, além dos nutrientes, afetam o desenvolvimento microbiano da boca. Embora a cavidade bucal tenha fácil acesso ao oxigênio, a maioria dos microrganismos bucais é facultativa e anaeróbia. Leveduras do gênero *Candida* são detectáveis mesmo com a diminuição do potencial de óxido-redução bucal, na superfície do esmalte do dente (MARSH; MARTIN, 1992; DOUGLAS, 2002).

O pH da boca, regulado pela saliva, oscila entre 6,75 a 7,25. O consumo frequente de carboidratos leva a uma diminuição do pH da boca devido à produção

de ácidos e, posteriormente, retorna aos valores fisiológicos (capacidade tampão da saliva). Essas constantes oscilações do pH da boca podem induzir a uma seletividade de microrganismos acidúricos como: *Candida*, *Streptococcus* do grupo *mutans* e *Lactobacillus* (SIMMONDS; TOMPKINS; GEORGE, 2002).

Em suma, diversos fatores mecânicos, físicos, químicos e iatrogênicos contribuem para a ruptura do equilíbrio da microbiota bucal entre *Candida* e os demais microrganismos. Mastigação, redução do fluxo salivar, trauma local com perda da integridade tecidual, debilidade orgânica generalizada, dietas ricas em carboidratos, deficiência de ferro, ácido fólico ou vitamina B12, desordens endócrinas (hipotireoidismo, insuficiência adrenocortical e diabetes mellitus), infecção por HIV, alterações de taxas sanguíneas (leucemia aguda e agranulocitose), antibioticoterapia, quimioterapia, radioterapia, xerostomia e comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro constituem fatores de risco relacionados à infecção bucal por *Candida* (DE REPENTIGNY et al., 2000; ELLEPOLA et al., 2014; LEUNG et al., 2000; MARUKUTIRA et al., 2014; PARDI; CARDOSO, 2002; SAHA et al., 2013; SCHRAM et al., 2014; WANG et al., 2014).

Como já mencionado, a proliferação e o aguçamento dos fatores de virulência da *Candida* spp. é potencializado na presença de alterações orgânicas, principalmente dos aspectos físico-químicos e biológico da pele ou mucosa e do sistema imunológico (CARVALHO et al., 2003; MARCANTONI, 1999; TYC et al., 2014).

Candida albicans é a espécie mais relacionada com os processos de colonização e patogenicidade na boca humana, frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas e, em diferentes sítios anatômicos (BARBEDO; SGARBI, 2010). Esta habilidade é decorrente da acentuada capacidade de dimorfismo morfológico e da produção de exoenzimas, mecanismos facilitadores da interação do fungo às células do hospedeiro, propiciando a aderência e a penetração no tecido afetado, etapas consideradas relevantes na patogênese de candidíase em mucosa (CARVALHO et al., 2007; MARTINS et al., 2002; MENEZES et al., 2006; PANIZO et al., 2002; RIBEIRO et al., 2006; XU et al., 2000). Posto isto, o seu dimorfismo com produção de estruturas filamentosas auxilia a invasão tissular,

a termotolerância significativa e a capacidade da produção de enzimas como proteinases e fosfolipases (DIGNANI; SOLOMKIN; ANAISSE, 2003) (Figura 1).

Figura 1- *Candida albicans*

Fonte: MORENO et al. Infecciones causadas por *Candida* spp. resistente al fluconazol en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Reporte de un caso. Rev Med Hered, v.6 n.3, p. 134-139, 1995.

Cabe ressaltar que sendo um fungo ubíquo na mucosa bucal, trato gastrointestinal e sistema reprodutor (QUIMBY et al., 2012; SUZUKI, 2009; THOMPSON et al., 2010; VASQUEZ, 2010), os indivíduos saudáveis apresentam imunidade específica para infecções fúngicas, sendo estas frequentemente isoladas da cavidade bucal (31% a 60%) (VASQUEZ, 2010).

As infecções por *Candida* spp. são denominadas candidose ou candidíase, termos sinônimos na literatura científica (HANNULA, 2001). Várias condições predisponentes estão associadas tanto à colonização assintomática quanto à manifestação clínica de candidose, incluindo desde deficiências imunes específicas (FIDEL, 2002; RODRIGUEZ-GALAN et al., 2002), até o uso de próteses totais (PIRES et al. 2002; DAVIES et al., 2002), além de desordens endócrinas, lesões de tecidos moles e medicamentos como antibióticos e corticosteróides (MOREIRA et al., 2001), ou mesmo o tabagismo (ARENDORF; WALKER, 1980; KAMMA; NAKOU; BAEHNI, 1999; WILLIS et al. 1999).

A incidência de colonização orofaríngea por *Candida* em adultos saudáveis apresenta resultados entre 3 a 48%, sendo estas taxas mais elevadas em crianças variando de 5,4% a 71,3%. A presença de leveduras na cavidade bucal, entretanto,

não implica em doença. O gênero *Candida* é composto por cerca de 200 espécies de leveduras, das quais algumas apresentam importância na área médica, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. dubliniensis* (CANNON et al., 1995; GROSSI, et al.; 2000; JORGE, 1997; SAMARANAYAKE, SAMARANAYAKE, 2001).

Salienta-se que o primeiro caso de candidíase bucal ocorreu em 1842, na França, em que David Gruby classificou a *Candida* no gênero *Sporotrichum* e, em 1846, Berg definiu o agente etiológico demonstrando a presença de *Candida* na boca de crianças saudáveis. Em 1853, este fungo foi denominado de *Oidium albicans* e, anos depois (1861), na Alemanha, houve o primeiro relato de infecção cerebral por disseminação hematogênica por *Candida*. Um estudioso Berkhout, em 1923, classificou este microrganismo para o gênero *Candida*, conceituando a espécie *C. albicans* (HAZEN, 1995; RIBEIRO et al., 2002).

A maioria dos estudos sugere que os casos de candidemia adquirida por via endógena seja pela translocação da levedura do trato gastrointestinal, local de colonização por *Candida* em até 70% da população humana normal. A presença de uma predisposição local e/ou generalizada que provoque desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal pode ser um agente facilitador de translocação da levedura até os capilares mesentéricos (BOW et al., 2010; COLOMBO et al., 1999; GIOLO, SVIDZINSKI, 2010; RIBEIRO et al., 2004)

Essas infecções podem também ser adquiridas por via exógena, a exemplo da veiculação microbiana por meio das mãos contaminadas dos profissionais de saúde. Nesse sentido, a literatura mostra evidências da transmissibilidade de *Candida* spp. nas UTIs em que os profissionais são potenciais reservatórios destes agentes (BOW et al., 2010; COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; PFALLER, 1995; PFALLER; DIEKEMA, 2007; RIBEIRO et al., 2004).

A candidíase é considerada a infecção fúngica mais frequente da cavidade bucal humana e *C. albicans* é a principal espécie relacionada, embora *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. Krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, além de outras espécies, também estejam se tornando comuns em certas populações (HAYNES, 2001; MARTINEZ et al., 2002). Diferentes tipos de candidíase orofaríngea têm sido

relatados, incluindo as formas atróficas, pseudomembranosa aguda, candidíase hiperplásica crônica, a glossite rombóide mediana e a queilite angular (AKPA; MORGAN, 2002).

Complementarmente, *C. albicans* é o microrganismo mais prevalente de infecções periodontais entre as demais espécies, sendo o dorso da língua a principal via infecciosa, no entanto as superfícies de mucosas e placa dental podem também, albergá-lo (GIULIANA et al., 1997; PRABHU et al., 1992). Igualmente, os fatores precipitantes para infecções fúngicas bucais são extremos de idade, ineficácia da resposta imunológica do hospedeiro, depressão, distúrbios endócrinos, hereditariedade, má fixação de próteses dentais e o uso prolongado de antibióticos, corticosteroides ou citostáticos (BARKVOLL; ATTRAMADAL, 1989).

Acresce-se ainda que Flemming (1999) relacionou os sinais clínicos da periodontite como sendo: perda de inserção clínica, perda óssea alveolar, profundidade de bolsa e sangramento a sondagem, aumento da mobilidade dental e com características histopatológicas (formação de bolsa periodontal, migração do epitélio juncional para apical, perda de fibras colágenas, infiltrados de células inflamatórias no epitélio juncional e na bolsa periodontal).

Em relação a outras espécies de *Candida*, responsáveis por agravos infecciosos em humanos, tem-se a *C. glabrata* como um patógeno em ascensão nas últimas décadas. Adiciona-se que estudos longitudinais apresentam dados epidemiológicos de infecções relacionadas às espécies de *Candida* não-*albicans*, particularmente a *C. glabrata* (CHOW et al., 2008; PLAYFORD et al., 2008; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; FRIDKIN; JARVIS, 1996; PFALLER; DIEKEMA, 2002).

Candida glabrata apresenta-se micromorfológicamente como blastoconídio tanto no ambiente como quando patógeno e, especialmente, não forma pseudo-hifas em temperaturas acima de 37°C (ARRAES, 2012). Este microrganismo emerge como um notável agente patogênico de mucosa bucal e pode promover infecção concomitante a *C. albicans* e, em paciente com câncer ou HIV-positivo, associada à infecção orofaríngea, pode ser mais severa e mais difícil de ser tratada que infecções por *C. albicans* (BARCHIESI et al., 2005; LI et al., 2007; PFALLER;

DIEKEMA, 2004). As colônias de *C. glabrata* (Figura 2) são menores que as de *C. albicans*, porém quando em meio de *Sabouraud*, apresentam-se homogêneas, brilhantes, de coloração creme, como qualquer outra espécie de *Candida* (FIDEL-JR et al., 1999).

Figura 2- *Candida glabrata*

Fonte: MORENO et al. Infecciones causadas por *Candida* spp. resistente al fluconazol en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Reporte de un caso. Rev Med Hered, v.6 n.3, p. 134-139, 1995.

É considerado um fungo saprófita e não patogênico na microbiota normal de indivíduos saudáveis, porém nas duas últimas décadas, com advento de drogas imunodepressoras e da aids, *C. glabrata* aumentou significativamente, chegando a ser o segundo ou terceiro microrganismo em casos de candidíases (BARBEDO; SGARBI, 2010). Apesar de uma relativa taxa de mortalidade (50% em pacientes com câncer e 100% em complicações de transplante de medula óssea), *C. glabrata* possui baixa virulência em modelos de infecções com animais.

Embora a resistência a medicamentos antifúngicos entre *C. albicans* permaneça baixa (LOCKHART et al, 2012), *C. glabrata* e *C. krusei* surgiram como importante problema no manejo da candidemia devido ao envelhecimento da população, uso disseminado dos antifúngicos, crescentes casos de imunossupressão, além do surgimento de resistência a equinocandina (CLEVELAND et al, 2012; MATSUMOTO, 2014; MAGER et al., 2003).

Estudos demonstraram que a incidência de *C. glabrata* tem aumentado como causa de candidemia em UTIs nos EUA desde 1993, entretanto em outras partes do mundo, pesquisadores sugerem que as taxas de infecção por *C. glabrata* não aumentaram na mesma proporção como observado nos Estados Unidos da América (EUA). Além disso, a taxa de mortalidade é relativamente alta, comparando com as outras espécies de *Candida* não-*albicans* e, é apontada como causa de sepse neonatal e infecção em pacientes idosos. Isolados clínicos de *C. glabrata* demonstram sensibilidade intrinsecamente reduzida aos compostos azólicos e, com isso, aumento nas taxas de colonização e infecção tem sido observadas em diferentes grupos de pacientes com exposição prolongada ao fluconazol (COLOMBO et al., 1999; FIDEL-JR et al., 1999; MALANI et al., 2005; PANACKAL et al., 2006; COLOMBO et al., 2013).

Adiciona-se uma preocupação científica crescente na resistência de *C. glabrata* a múltiplas drogas, particularmente a atual resistência as equinocandinas (ALEXANDER et al., 2013; CLEVELAND et al., 2012; OSTROSKY-ZEICHNER, 2013; PFALLER; DIEKEMA, 2012).

Com o intuito de monitorar as espécies de *Candida* e a susceptibilidade aos antifúngicos em Iowa (EUA), no período de 2011 a 2012, bem como repassar estes achados às instituições participantes. Matsumoto (2014) verificou que 69 (42%) isolados de *C. albicans* e 58 (36%) de *C. glabrata* foram os mais comuns de candidemia. Ademais, o fluconazol foi utilizado em 53% das candidemias, principalmente aquelas causadas por *C. glabrata* e, metade dos agravos por *C. glabrata* utilizou-se uma equinocandina. Assim, 96% de todos os isolados foram susceptíveis ou dose dependente susceptível ao fluconazol e 95-99% suscetíveis as equinocandinas. E, utilizando pontos de corte do CLSI, 9% de isolados de *C. glabrata* foram resistentes ao fluconazol e 5% foram intermediários ou resistentes a uma ou mais equinocandinas.

Isolados clínicos deste fungo apresentam menor sensibilidade ao fluconazol, consequentemente, um aumento nos índices de colonização e infecção são observados em pacientes com exposição prolongada a este antifúngico (RAY et al., 2007). Ademais das possíveis falhas terapêuticas com os azólicos, estudos revelam

uma menor sensibilidade deste fungo com anfotericina *B* (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; PÉMAN et al., 2011; RAY et al., 2007; TORTORANO et al., 2004).

Há de se considerar que a flexibilidade morfológica de *C. albicans* desempenha um papel fundamental na infecção (SUDBERY, 2011), em contraste da *C. glabrata*, pois sua patogenicidade independe de morfologia (SHINOZAKI et al., 2012). Estudos reportam a candidíase sistêmica (15%) por *C. glabrata* e, também em amostras clínicas, sendo esta a segunda espécie mais frequente (BORG-VON ZEPPELIN; GRUNES, 1993; CORMACK et al., 1999). Vennewald et al. (1998) apontaram infecções por este fungo, de 0,5% para 22,2% em pacientes imunocomprometidos. No entanto, existem poucos estudos que reportem a patogenicidade de *C. glabrata* na mucosa bucal o que se faz necessário uma identificação precoce das espécies para instituir a terapêutica correta e adequada (FLANAGAN et al., 2000; SHINOZAKI et al., 2012). Cabe destacar que os métodos convencionais utilizados para identificá-los são morosos e, às vezes, inconclusivos.

1.2. Formação de biofilme por *Candida* spp.

Os biofilmes são comunidades universais, interdependentes e complexas de microrganismos associados a um substrato. Os biofilmes podem ser encontrados em superfícies bióticas e abióticas e constituídos por uma população (única espécie) ou comunidades (múltiplas espécies) (DAVEY E O'TOOLE, 2000; DONLAN, 2002; O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000). Estes microrganismos estão envolvidos em uma matriz de exopolissacarídeo crescendo em biofilmes estruturados exibindo, assim alguns fenótipos nesta gama de substratos (DOUGLAS, 2002). Proteção do meio ambiente, disponibilidade de nutrientes, cooperação metabólica são especulações das vantagens ecológicas de um biofilme formado (DAVEY E O'TOOLE, 2000). Os biofilmes são notoriamente difíceis de remover o que tornam uma fonte de infecções recalcitrantes (DONLAN, 2002; LEWIS, 2001).

Neste sentido, os biofilmes são expressivos nas pautas de discussão da saúde pública no que se refere à resistência antimicrobiana e, assim sua compreensão tem evoluído ao longo de anos. Uma destas questões foi descrita em 1971 por Marshall et al. que sugeriu o processo de adesão em apenas duas etapas. Na primeira fase, o processo é ainda reversível e a adesão de microrganismos às

superfícies ocorre devido às forças de Van der Waals e pela atração eletrostática. Na segunda ocorre uma interação da célula com a superfície por meio de material extracelular produzido pelo microrganismo. Poucos anos depois, surgiu outra compreensão acerca da presença de polissacarídeos na matriz de células aderidas, em sistemas aquáticos, e que esse polímero de cadeia longa participava na mediação da adesão microbiana a diferentes substratos (COSTERTON et al., 1978, 1999; SILLANKORVA, 2004). A partir de 80, o entendimento foi significativamente alterado e a formação do biofilme ocorre em cinco etapas (CHARACKLIS; COOKSEY, 1983; CHARACKLIS, 1990; DUDDRIDGE; PRITCHARD, 1983):

- i. condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico;
- ii. transporte de células e nutrientes para o local de adesão;
- iii. início do processo de adesão bacteriana, ainda reversível, devido a atração electrostática;
- iv. crescimento celular, colonização e adesão irreversível;
- v. desenvolvimento do biofilme com elevada atividade metabólica.

Os biofilmes bacterianos e a repercussão nos agravos humanos foram investigados em detalhe ao longo de anos, não obstante pouco se sabe sobre os biofilmes fúngicos, principalmente, de *Candida não albicans* (DOUGLAS, 2002; RAMAGE et al., 2001; 2002). *Candida* spp. adere e forma biofilme em superfícies dentais, pois as condições da boca favorecem (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990; COCO et al., 2008; SÁNCHEZ-VARGAS et al., 2002).

Nas infecções bucais ou faríngeas, as leveduras aderem primeiro às células hospedeiras e os materiais de prótese dentro da cavidade bucal ou atrelam-se a outros microrganismos (RAMAGE et al., 2001; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006). A formação de biofilme por *C. albicans* procede em três fases distintas: início do desenvolvimento (0-11 h), intermediário (12-30 h) e maduro (38-72h) (Figura 3).

Figura 3- Formação de biofilme por *C. albicans* e *C. dubliniensis*; A: 0-11 h; B: 12-30 h; C: 38-72 h. Y- célula de levedura; superfície plana; EPS: matriz exopolissacarídica; H: hifa. Fonte: JABRA-RIZK, M. A; FALKLER, W. A; MEILLER, T. F. Fungal Biofilms and Drug Resistance. Emerging Infectious Diseases, v. 10, n. 1, p.14-19, 2004.

A estrutura detalhada de um biofilme maduro de *C. albicans* produzido, *in vitro*, após 48 horas de incubação consistia em uma rede densa de leveduras, hifas e pseudohifas. Esta mistura de morfologia com a matriz de EPS não é visto quando este fungo é cultivado em cultura líquida ou ágar o que sugere que a morfogênese é desencadeada quando este microrganismo adere a uma superfície e as camadas de células basais ancoram o biofilme formado no substrato (CHANDRA et al., 2001b; DONLAN, 2002; RAMAGE et al., 2001). Destarte, as bactérias são encontradas juntamente as espécies de *Candida* em biofilmes *in vivo* indicando, assim que as interações entre espécies provavelmente ocorrem (ADAM et al., 2002; DONLAN, 2002; DONLAN; COSTERTON, 2002).

Em linhas gerais, Notermans et al. (1991) propuseram a formação de biofilme pela fixação do microrganismo e, em seguida este adere na superfície ocorrendo, assim a colonização e crescimento do microrganismo. Ressalta-se que a produção do material extracelular facilita a sua fixação e impossibilita a remoção das células aderidas. A partir da década de 2000 sugeriu-se que o biofilme é formado pela adesão dos microrganismos à superfície seguida pelo crescimento celular,

formando-se uma estrutura complexa. Após a adesão e maturação do biofilme há libertação de células para o fluído (STEWART; COSTERTON, 2001; STOODLEY et al., 2002).

Neste sentido, o maior desafio para estudiosos da área da periodontia é a remoção mecânica do biofilme bucal para a prevenção de doenças e agravos bucais. Com o desenvolvimento de escovas motorizadas com rotação, oscilação e sonoridade (HEERSINK, 2003; LEA et al., 2007) e com diferentes movimentos de cerdas e, também o uso de palitos ou fios dentais (SAMBUNJAK et al., 2011), a remoção completa do biofilme bucal se mantém, ainda inatingível. Após a escovação, áreas interproximais, fissuras, bolsas gengivais e aparelhos ortodônticos são regiões propícias para a formação de biofilme (HE et al., 2014).

A resistência dos biofilmes aos antissépticos e antimicrobianos foi confirmada e demonstrada em alguns estudos. Entretanto, observa-se que a formação de biofilme por fungos tem recebido pouca atenção e, no que concerne a atividade antimicrobiana de antissépticos e seu mecanismo de ação pouco se sabe. Assim, as evidências sobre uso de antissépticos no controle da colonização microbiana bucal é expressivo sendo o gluconato de clorexidina amplamente indicado e utilizado. Topicamente, no controle desta colonização bucal, e ainda como parte da terapia de candidíase outros produtos são indicados (EPSTEIN et al. 2003; HANNULA, 2001; RUSSELL, 2002).

Os estudos *in vitro* têm investigado a atividade antimicrobiana do cloreto de cetilpiridínio (CPC) sobre as bactérias relacionadas à cárie, periodontite e halitose, bem como leveduras associadas à mucosites (SREENIVASAN et al., 2013). Ademais, este antisséptico inibe glicosiltransferases e síntese de glucano insolúvel de *S. mutans* e, também contém nano emulsão, fatores imprescindíveis para a prevenção da cárie dentária (FURIGA; LONVAUD- FUNEL; BADET, 2009; LEE et al., 2010). A FDA (agência que regula medicamentos nos Estados Unidos da América) considera o CPC um agente antiplaca e antigengivite sendo incorporado a uma variedade de produtos de higiene bucal como enxaguatórios, cremes dentais, adesivos ortodônticos e revestimento para cimento dental (BOTELHO, 2005).

E, a partir da década de 90, pesquisadores concluíram que o gluconato de clorexidina a 0,12%, 0,2%, 1% e 2% foi eficaz sobre a *Escherichia coli* (VAHDATY et al., 1993), *Streptococcus mutans*, *Pepstostreptococcus micros*, *Prevotella intermedius*, *Porphyromonas gingivalis* (YESILSOY, 1995), *Peptococcus magnus*, *Propionibacterium acnes*, *Veillonella parvula*, *Lactobacillus fermentum*, *Fusobacterium nucleatum* (OHARA et al., 1993), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis*, bem como sua empregabilidade em pacientes alérgicos ao hipoclorito de sódio ou em casos de dentes com ápices abertos devido sua relativa ausência de toxicidade (TEIXEIRA et al., 2008).

Secularmente, os produtos naturais são utilizados na produção farmacêutica com ação antimicrobiana e anti-inflamatória e, cerca da metade dos medicamentos, em uso, são derivados destes produtos. Princípios bioativos de óleos essenciais extraídos de ervas e especiarias tornaram-se cada vez mais conhecidos por conterem propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anticancerígenas.

Paralelamente, assim, fármacos antimicóticos como antibióticos polienos (nistatina e anfotericina B) são recomendados para candidíase bucal (BARKVOLL; ATTRAMADAL, 1989), porém enxaguatórios bucais exercem efeitos clínicos benéficos quando associados ao tratamento a doença periodontal (SHRESTHA et al., 2011).

Em síntese, vários estudos clínicos demonstraram a eficácia, *in vivo*, dos antissépticos frente aos microrganismos supragengival reduzindo, assim a inflamação gengival, placa bacteriana e parecem prevenindo até infecção sistêmica (BOTELHO, 2005; SCULLY; GREENMAN, 2012; SREENIVASAN et al., 2013).

1.2.1. Formação de biofilme e o risco de *Pneumonia* associada à ventilação mecânica (PAVM)

As barreiras anatômicas do trato respiratório humano como glote, laringe, reflexos da tosse, secreções traqueobrônquicos, imunidade celular e humoral, sistema fagocitário (macrófagos alveolares e neutrófilos) protegem o pulmão contra infecções oportunistas (STRAUSBAUGH, 2000). Quando há

coordenação adequada entre estes componentes, os microrganismos invasores são eliminados e a doença clínica é evitada. No entanto, o comprometimento imunológico pode ocasionar na inoculação microbiana ou uma virulência incomum resultando assim em uma pneumonite (CHASTRE; FAGON, 2002). Adiciona-se que a colonização do trato respiratório superior é um fator predisponente para a Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAVM), pois a microbiota das vias aéreas orofaríngeas pode ser substituída por gram-negativos endógenos (PARK, 2005).

Sabendo que a partir de uma infecção bacteriana no parênquima pulmonar sucede a PAVM, pacientes com intubação traqueal translocam bactérias exógenas ou endógenas para o trato respiratório inferior (BOOKER et al., 2013). Embora esta translocação sobrevenha da inalação de bactérias de materiais contaminados, colonização gástrica, semeadura hemática ou propagação contígua, a PAVM resulta, frequentemente, da aspiração de microrganismos orofaríngeos (CHASTRE; FAGON, 2002). Acresce-se que a PAVM pode manar de 48 a 96 horas após a intubação respiratória (COFFIN et al., 2008; HORAN et al., 2008).

A microbiota bucal em pacientes intubados forma biofilme ao redor do tubo endotraqueal, enquanto as vias respiratórias inferiores de indivíduos saudáveis são protegidas pelas barreiras anatômicas. Não obstante, o cuidado bucal não só reduz a carga microbiana, mas estimula o fluxo salivar com suas imunoglobulinas protetoras para remover a placa bacteriana, bem como limitar a colonização secundária a xerostomia (MUNRO; GRAP, 2004; STONECYPHER, 2010).

Como estratégia efetiva de prevenção da PAVM, estudos prospectivos e de meta-análise sinalizam a aspiração de secreções subglóticas (ASS), pois esta reduz o tempo de permanência hospitalar, desmame precoce e custos com antimicrobianos, principalmente em cirurgias em pacientes cardíacos com VM ≥ 48 h (PÉREZ GRANDA et al., 2013; MUSCEDERE et al., 2011; HORTAL et al., 2009).

Destarte, as diretrizes brasileiras sinalizam que o risco de PAVM associada ao uso de intubação endotraqueal é 6 a 21 vezes. Faz-se imprescindível que se adote um tubo endotraqueal com lúmen dorsal acima do balonete para permitir drenagem por sucção contínua, mantenha balonete do tubo traqueal ≥ 20

cmH₂, reduza tempo de exposição à ventilação mecânica, desmame precoce, não realize trocas periódicas de circuitos respiratórios durante o uso no mesmo paciente e, entre outras medidas de prevenção e controle dos fatores de risco (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2005).

Este agravo ocasiona aumento das taxas de mortalidade além de custos onerosos para a instituição e fracassos terapêuticos. Ainda, a inanidade de esforços de acurácia microbiológica está articulada com a imprecisão na identificação microbiana, generalização clínica dos pacientes, condições estas que levam ao aparecimento de microrganismos multidrogas resistentes (MMR) (JOSEPH et al., 2009; VISSCHER et al., 2008; CHASTRE; FAGON, 2002; ALP; VOSS, 2006).

A colonização bucal acarretada por microrganismos respiratórios, devido à má higiene bucal e doenças periodontais, é associada à pneumonia hospitalar. Entre os pacientes ventilados de unidades intensivas, a placa dental favorece a colonização microbiana respiratória. Ressalta-se que *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp e *Candida albicans* recuperados da placa dental foram indistinguíveis dos isolados de sítios traqueobrônquicas do mesmo paciente, uma vez que as espécies de diferentes pacientes são, geralmente, de genótipos diferentes (HEO et al., 2008, 2011).

Vale salientar que microrganismos e microbiomas bucais são fatores primordiais para o processo saúde e doença. Assim, estudos propõem que o rompimento deste microbioma indica, dispara ou influencia o curso das doenças bucais, principalmente em pacientes imunocomprometidos (AVILA et al., 2009; JENKINSON; LAMONT, 2005). Embora os fungos, em particular a *Candida*, são importantes na microbiota bucal e induzidas pelo sistema imune humano, estudos apontam uma colonização bacteriana na microbiota bucal (GHANNOUM et al., 2010). Até o momento, o único estudo de microbioma bucal incluiu alguns perfis fúngicos, Ghannoum et al. (2010) relataram a presença de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* na microbiota placa subgengival de pacientes infectados pelo HIV.

Um estudo prospectivo (2009-2011) acerca da incidência e fatores de risco para pneumonia associada à ventilação, os pesquisadores identificaram *P.*

aeruginosa (8-33%), *K. pneumoniae* (5-20,8%), *E. coli* (2-8.3%) além de *C. albicans* (2-8.3%) (CHARLES et al., 2013).

Há presença na literatura de resultados contundentes na relação entre precariedade de higiene bucal e aumenta da incidência da Pneumonia associada à ventilação mecânica (PAVM) (BERRY et al, 2007; CUTLER; DAVIS, 2005; HUTCHINS et al., 2009). Uma meticulosa higiene bucal, realizada por enfermeiros, demonstrou redução no risco de PAVM, porém esta prática em cuidados críticos permanece ainda inconsistente. O cuidado bucal, às vezes, é percebido como uma ação de conforto e, não como um componente crítico de controle de infecção (AMES et al., 2011; FEIDER et al., 2010; HUTCHINS et al., 2009).

Os fungos, em sua maioria, são homopolissacarídeos, ou seja, compostos por um único tipo de monômero, reunidas por ligações glicosídicas do tipo β ou α . No caso das glucanas, por exemplo, as ligações entre suas unidades de glucose podem ser do tipo α -(1 $\rightarrow$ 3), α -(1 $\rightarrow$ 6), α -(1 $\rightarrow$ 4); β -(1 $\rightarrow$ 3) ou β -(1 $\rightarrow$ 6), podendo conter ramificações ao longo da cadeia principal (BARBOSA et al., 2004; MORADALI et al., 2007).

Os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias, os quais são encontrados ligados à superfície das células ou são excretados para o meio de cultivo na forma de material viscoso (BONGIOVANI, 2008; MIRANDA et al, 2011). Nos fungos, as β -glucanas ocorrem como polímeros de glicose ligados por ligações lineares do tipo β (1-6) D-Glucana ou por ligações β (1-3) D-Glucana com cadeias laterais ligadas por ligações β (1-6) (TSONI, BROWN, 2008). Essas diferenças estruturais como, por exemplo, diferenças no comprimento da cadeia polissacarídica, extensão da ramificação e o comprimento dessas ramificações, podem ter grandes implicações para a atividade biológica da β -glucana (BAGGIO, 2010).

1.3 Justificativa e relevância do estudo

Sabe-se que os fungos podem colonizar substratos de compostos poliméricos, cerâmicos, madeira, vidro entre outros. Associado a isto, há fatores

físico-químicos destes materiais que podem facilitar ou dificultar a adesão e proliferação microbiana, o que caracterizamos de biofilme.

Destarte, parece oportuno aprofundar-se no conhecimento dos dispositivos e tecnologias invasivas e, assim produzir evidências que possam colaborar para com as práticas de prevenção e controle da infecção. Os principais aspectos que justificam este estudo são:

- Preocupação constante sobre os fatores contributivos dos dispositivos invasivos ou cirúrgicos, rompimento de barreiras naturais, múltiplos procedimentos invasivos e antibioticoterapia prolongada no aumento da taxa de infecções fúngicas em cuidados intensivos (DAROUICHE, 2009; BLOT et al., 2008).
- A gravidade de infecções fúngicas não é amplamente reconhecida até recentemente, uma vez que as infecções bacterianas são facilmente diagnosticadas (COAD et al, 2014).
- Os biofilmes bacterianos e repercussão nos agravos humanos foram investigados em detalhe ao longo de anos, não obstante pouco se sabe sobre os biofilmes fúngicos, principalmente, de *Candida não albicans* (CUSTODIO, 2012; RODRIGUES; SILVA; HENRIQUES, 2014).
- Na literatura observa-se uma diversidade de processamentos microbiológicos e a inexistência de padronização teste padrão ouro para as diversas condições de avaliações antimicrobianas e antibiofilme. Assim, existe a dificuldade de reprodutibilidade e de comparação inter e intralaboratoriais.
- Incidência elevada de infecções fúngicas nas últimas décadas. Crescente resistência a antifúngicos resultando na limitação de um arsenal terapêutico (RODRIGUES; SILVA; HENRIQUES, 2014). Combinações dos novos e tradicionais antifúngicos revelam sinergismo ou redução na atividade aditiva frente às cepas clínicas de *Candida* (RIBEIRO et al., 2004).
- Custos de cuidados à saúde associados ao uso de antifúngicos, cirurgias e extensa internação hospitalares são elevados (WILSON et al., 2002).
- A utilização da biodiversidade como novas opções de valor agregado terapêutico para infecções por *Candida* representa um campo promissor em âmbito nacional.

- A enfermagem no contexto da saúde bucal tem sua relevância no que concerne a manutenção das condições da higiene e aplicação dos princípios de assepsia, da prevenção e controle da infecção local e sistêmica subsidiada nos recursos tecnológicos e fundamentos da microbiologia.

OBJETIVOS

- Determinar a Diluição Inibitória Máxima (DIMax) de antissépticos bucais comercialmente disponíveis (Listerine®, Colgate Plax® Tea Fresh, Periogard®) e o óleo de melaleuca sobre as cepas de *Candida albicans* e *Candida glabrata*, clínicas e padrão, com a finalidade de investir na inovação de produtos alternativos.
- Quantificar o número de unidades formadoras de colônia por tubo traqueal (UFC/TT) de *Candida glabrata* em tubos traqueais (TTs) estéreis revestidos com antissépticos bucais e óleo de melaleuca.
- Analisar o biofilme de *Candida glabrata* formado em TTs estéreis revestidos com antissépticos bucais e óleo de melaleuca por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

MATERIAL E MÉTODO

3.1. Natureza e local de estudo

Estudo de natureza laboratorial, *in vitro*, com utilização de cepas clínicas e padrão de *Candida albicans* e *Candida glabrata* isoladas da microbiota bucal e oriundas de banco de cepas.

As análises microbiológicas foram realizadas no laboratório do Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – EERP/USP.

O processamento e análise microscópica da formação de biofilme em corpos de prova (fragmentos de tubos traqueais estéreis revestidos com antissépticos bucais e óleo de melaleuca) foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

3.2. Materiais e cepas utilizadas

3.2.1. Antissépticos bucais e o óleo de melaleuca

Os antissépticos avaliados foram: Listerine®, Colgate Plax® Tea Fresh, e Periogard®, bem como o óleo de melaleuca (Oficina de Ervas - Farmácia de Manipulação – Ribeirão Preto, SP) com DMSO (6/4) - Figura 4.

Figura 4. Vista panorâmica dos frascos de antissépticos bucais e óleo de melaleuca utilizados no estudo.

Os antissépticos bucais e o óleo de melaleuca apresentam as seguintes propriedades químicas e microbiológicas:

Timol (2-isopropil-5-metilfenol), utilizado no estudo como Listerine®, é um fenol monoterpeneo natural presente em óleos essenciais de tomilho e orégano, com propriedades antimicrobianas contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e leveduras como a *Candida albicans*, sendo estas mais sensíveis (SOKOVIC; Van GRIENSVEN, 2006; WATTANASATCHA et al., 2012). Ademais, timol tem demonstrado eficácia contra estafilococos resistentes à meticilina com concentração inibitória mínima (CIM) de 0,03 a 0,06 % pelo método de diluição em ágar (NOSTRO et al., 2004). Ademais, este composto fenólico demonstrou influxo de leucócitos, redução de edema e melhora na cicatrização de feridas (RIELLA et al., 2012). Esses agentes lesam a parede celular, inibem os sistemas enzimáticos, diminuem os lipopolissacarídeos e o conteúdo protéico, apresentam baixa substantividade e, devido à veiculação associada a elevados níveis alcoólicos (cerca de 22 a 27%, de acordo com o fabricante), apresentam efeitos colaterais de sensação de queimação, injúria ao tecido bucal e mancha nos dentes (MOREIRA et al., 2009).

Cloreto de cetilpiridínio (CPC) é um composto de quaternário de amônio, um dos princípios ativos contidos no Colgate Plax® Tea Fresh, com ligações catiônicas semelhantes às da clorexidina. É efetivo e seguro na higiene bucal porque reduz a placa dental (SREENIVASAN et al., 2013). O CPC exibe um

amplo espectro antimicrobiano, pois este se liga a uma proteína não específica que altera a tensão de superfície da parede celular bacteriana ocasionando, assim a desintegração desta estrutura (LIM; MUSTAPHA, 2007). O seu mecanismo de ação está relacionado com o aumento da permeabilidade da parede celular microbiana, que favorece a lise e reduz o metabolismo celular e a aderência de microrganismos em superfície. O produto age sobre bactérias gram-positivas e leveduras (LIM; MUSTAPHA, 2007; MARINHO; ARAÚJO, 2007).

A clorexidina (CHX), contida no Periogard®, é uma biguanida catiônica, sintetizada pela primeira vez em 1950 (DAVIES et al., 1954; MCDONNELL; RUSSEL, 1999). Esse composto possui atividade antimicrobiana, baixa toxicidade e alta afinidade de ligação com membranas da pele e mucosas (DENTON, 2001). É efetivo contra bactérias gram-positivas e negativas, fungos e alguns vírus, apresentando alta penetrabilidade em tecidos (pele e mucosas), pois age na presença de pus e tecido necrótico (DENTON, 2001; GILBERT; MOORE, 2005; LIM; KAM, 2008). Sua ação antimicrobiana reside em modificações da permeabilidade da membrana celular, causando desorganização dessa estrutura e extravasamento do conteúdo citoplasmático, seguida de morte microbiana e, também causa precipitação de proteínas citoplasmáticas (DENTON, 2001; LIM; KAM, 2008). É um dos agentes antimicrobianos mais utilizados em formulações antissépticas, entre elas o Periogard®. Apresenta baixa toxicidade contra células de mamíferos e efeito de substância quando em contato com mucosas. Seu mecanismo de ação inclui danos diretos à membrana citoplasmática do microrganismo, apresentando atividades bacteriostáticas e bactericidas, em baixas e altas concentrações, respectivamente (GEBRAN; GEBERT, 2002). Posto isto, é um agente antimicrobiano de alta efetividade no controle do biofilme dental (TEIXEIRA, 2008).

O óleo essencial da *Melaleuca alternifolia*¹ é um notório agente medicinal tópico utilizado na Austrália (HAMMER et al., 2000; 2002). Os usos medicinais deste óleo relacionam-se à suas atividades anti-inflamatória e antimicrobiana (CARSON et al., 2002; MARTELO et al., 2002). Sua propriedade antimicrobiana tópica é embasada cientificamente por dados clínicos, seja na terapêutica de infecções ou condições como herpes herpéticas (CARSON et al., 2001), acne (BASSETT et al., 1990), micose (TONG et al., 1992), dermatite seborréica (SATCHELL et al., 2002) e candidíase bucal (VAZQUEZ; ZAWAWI, 2002). O óleo de melaleuca contém derivados alcoólicos como 4-ol-terpinen, yterpineno, aterpineno, aterpineol, aterpinoleno e 1-8 cineol. A norma internacional ISO 4730 requer que este óleo tenha, no mínimo, 30% de 4-ol-terpinen e, no máximo de 15% de 1-8 cineol, conhecido como eucaliptol, presente no *Eucalyptus polybractea* (INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 1996). No entanto, a maioria dos consumidores compram o óleo de melaleuca com maior concentração de 4-ol-terpinen devido sua atividade antimicrobiana (CARSON et al., 2006; COX et al., 2001; MAY et al., 2000) e anti-inflamatória (Hart et al., 2000). Assim, uma menor concentração de 1,8-cineol por ser um alérgeno e indesejável (CARSON; RILEY, 2001). O óleo de melaleuca causa a expansão da bicamada celular microbiana e inibe as enzimas ligadas a membrana aumentando, assim sua fluidez, com subsequente extravasamento de componentes celulares que a lesionam (COX; MARKHAM, 2007; NIKAIDO, 2001).

3.2.2. Cepas clínicas e padrão

Um total de 42 cepas, sendo 20 *C. albicans*, 20 *C. glabrata* e duas padrão (*C. albicans* - ATCC 10231 e *C. glabrata* - ATCC 2001), foram utilizados no estudo (Quadro 1).

¹ A árvore do chá australiano é extraída principalmente por destilação a vapor de *Melaleuca alternifolia* e que não há nenhuma semelhança com o gosto ou odor do chá de verdade como a *Camellia sinensis*, *Camelliaceae*. Este chá é composto por cerca de 100 substâncias, como monoterpênos, sesquiterpênos e derivados alcóolicos, entre os quais incluem 4-ol-terpinen, yterpineno, aterpineno, aterpineol, aterpinoleno, 1-8cineol, entre outros (KIM et al., 2004).

Quadro 1. Distribuição das cepas de *Candida albicans* e *Candida glabrata* clínicas e padrão utilizado no estudo, Ribeirão Preto, 2014.

N.	Banco de Cepas
1	<i>Candida albicans</i> sensível
2	<i>Candida albicans</i> sensível
3	<i>Candida albicans</i> sensível
4	<i>Candida albicans</i> sensível
5	<i>Candida albicans</i> sensível
6	<i>Candida albicans</i> sensível
7	<i>Candida albicans</i> sensível
8	<i>Candida albicans</i> sensível
9	<i>Candida albicans</i> sensível
10	<i>Candida albicans</i> sensível
11	<i>Candida albicans</i> resistente a MCZ* e FCZ**
12	<i>Candida albicans</i> resistente a FCZ
13	<i>Candida albicans</i> resistente a MCZ
14	<i>Candida albicans</i> resistente a ECZ***, KTZ****, MCZ e FCZ
15	<i>Candida albicans</i> resistente a ECZ, KTZ, MCZ e FCZ
16	<i>Candida albicans</i> resistente a ECZ, KTZ, MCZ e FCZ
17	<i>Candida albicans</i> resistente a MCZ
18	<i>Candida albicans</i> resistente a FCZ
19	<i>Candida albicans</i> resistente a MCZ e FCZ
20	<i>Candida albicans</i> resistente a MCZ e FCZ
21	<i>Candida glabrata</i> sensível
22	<i>Candida glabrata</i> sensível
23	<i>Candida glabrata</i> sensível
24	<i>Candida glabrata</i> sensível
25	<i>Candida glabrata</i> sensível
26	<i>Candida glabrata</i> sensível
27	<i>Candida glabrata</i> sensível
28	<i>Candida glabrata</i> sensível
29	<i>Candida glabrata</i> sensível
30	<i>Candida glabrata</i> sensível
31	<i>Candida glabrata</i> resistente a MCZ
32	<i>Candida glabrata</i> resistente a ECZ e MCZ
33	<i>Candida glabrata</i> resistente a FCZ
34	<i>Candida glabrata</i> resistente a KTZ, MCZ, FCZ
35	<i>Candida glabrata</i> resistente a MCZ e FCZ
36	<i>Candida glabrata</i> resistente a MCZ e FCZ
37	<i>Candida glabrata</i> resistente a KTZ, MCZ e FCZ
38	<i>Candida glabrata</i> resistente a MCZ e FCZ
39	<i>Candida glabrata</i> resistente a ECZ, KTZ, MCZ e FCZ
40	<i>Candida glabrata</i> resistente a MCZ e FCZ
41	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)
42	<i>Candida glabrata</i> (ATCC 2001)

Legenda: *MCZ: miconazol; **FCZ: fluconazol; ***ECZ: econazol; ****KTZ: cetoconazol.

3.2.3. Meios de cultura

*Sabourand dextrose Ágar (Oxoid®, Hampshire, Inglaterra)

Composição:

Peptona micológica	10,0g
Glicose	40,0g
Ágar	15,0g
Água purificada	1000,0ml

Preparação:

De acordo com as instruções do fabricante, 65g do meio de cultura foram pesadas em cálice graduado de 1000,0ml com auxílio da balança eletrônica (Shimadzu®, São Paulo, Brasil). Após este processo, adicionou-se 1000,0ml de água purificada. O meio de cultura homogeneizado foi esterilizado em autoclave vertical (Phoenix, Brasil) a 121°C por 15 minutos e, alíquotas de 5ml foram distribuídas em placas de Petri (15x60mm), sob condições assépticas e acondicionadas sob refrigeração a 2°C. Este meio foi utilizado para o cultivo das cepas de *Candida* spp. clínicas e padrão.

*Caldo dextrose de Sabourand (BD Difco™, Sparks, EUA) com 2,0% de glicose e 4,0% de sacarose²

Composição:

Digestão péptica de tecido animal.....	5,0g
Digestão pancreática de caseína.....	5,0g
Dextrose	20,0g
Glicose.....Dinâmica Química.....	20,0g
Sacarose.....Dinâmica Química.....	40,0g
Água purificada.....	1000,0ml

Preparação:

Alíquotas de 30g do meio de cultura, 20,0g de glicose, e 40,0g de sacarose foram pesados em cálice graduado de 1000,0ml com auxílio da balança eletrônica

² Extraído de: RODRIGUES, A. P. N. ***Candida* spp. em escovas dentais e eficácia de antimicrobianos na sua desinfecção.** Ribeirão Preto. 2009. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

(Shimadzu®, São Paulo, Brasil). Após este processo, adicionou-se 1000,0ml de água purificada. O meio de cultura foi homogeneizado e alíquotas de 10,0ml transferidas para tubos de ensaio (25x150mm) que foram tamponados com tampão de algodão. Em seguida, os tubos foram esterilizados em autoclave vertical (Phoenix, Brasil) a 121°C por 15 minutos. Este meio foi utilizado para formação de biofilme, *in vitro*, em tubos traqueais estéreis.

* Caldo Letheen (BD Difco™, Sparks, EUA)

Composição:

Peptona proteose nº 3	10,0g
Extrato de carne	5,0g
Lecitina	0,7g
Polisorbato 80	5,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Água purificada.....	1000,0ml

Preparação:

Segundo as especificações do fabricante, 25,7g do meio de cultura foram pesadas em cálice graduado de 1000,0ml com auxílio da balança eletrônica (Shimadzu®, São Paulo, Brasil). Após este processo, adicionou-se 1000,0ml de água purificada. O meio de cultura foi homogeneizado e alíquotas de 10,0ml transferidas para tubos de ensaio (25x150mm), com pérolas, que foram tamponados com tampão de algodão. Em seguida, os tubos foram esterilizados em autoclave vertical (Phoenix, Brasil), a 121°C por 15 minutos. Este meio foi utilizado para formação de biofilme, *in vitro*, em tubos traqueais estéreis.

3.3. Processamento Microbiológico

3.3.1. Padronização do inóculo fúngico

As cepas clínicas de *Candida albicans* e *Candida glabrata* (sensíveis e resistentes aos antifúngicos), bem como as padrão de *C. albicans* (ATCC 10231) e *C. glabrata* (ATCC 2001) foram semeadas, separadamente, em placas de Petri (15x60mm) contendo Ágar Sabourand Dextrose, pela técnica de esgotamento.

As placas foram incubadas invertidas a 37°C por 24 horas. Após o crescimento das *Candida* spp., aproximadamente duas a três colônias foram transferidas para tubos de ensaio (25x150mm) contendo pérolas e solução salina a 0,85%. Os tubos foram homogeneizados em agitador orbital de soluções AP-59 (Phoenix Luferco®, Araraquara, Brasil), sob agitação de 4-5 rpm por 1min. Após este procedimento, realizou-se a padronização do inóculo fúngico (10^6 UFC/ml) em espectrofotômetro (Spectrumlab, modelo 22PC) com comprimento de onda de 625nm e absorbância de 0,080 a 0,100.

3.3.2. Determinação da Diluição Inibitória Máxima (DIMax) dos antissépticos bucais e do óleo de melaleuca

Para determinar a DIMax, *in vitro*, dos antissépticos bucais e do óleo de melaleuca sobre as cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* clínicas e padrão utilizou-se placas de microtitulação com 96 poços, estéreis e com tampa (Biofilm®, Nova York, EUA) (Figura 5).

Figura 5. Vista panorâmica da placa de microdiluição de 96 poços com os respectivos antissépticos bucais e óleo de melaleuca em diluição dupla seriada ($1/4$ a $1/2048$ e $1/32$ a $1/16.384$). Nas colunas de 1 a 10 são as diluições duplas seriadas, a 11 é o controle-negativo (sem crescimento fúngico) e a 12 é o controle-positivo (com crescimento fúngico).

Inicialmente, transferiu-se 100µl do meio de cultura de caldo dextrose de Sabourand em cada um dos poços da placa de microtitulação. Após esta etapa, 100µl de antissépticos bucais e óleo de melaleuca foram transferidos para cada primeira coluna da placa e, submetidos à diluição dupla seriada (1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 e 1/1024 e 1/2048), com auxílio de pipeta multicanal (8 canais), com exceção do Colgate Plax® Tea Fresh e Periogard® que teve a diluição de 1/32 a 1/16.384. A seguir, 10µl do inóculo padronizado (10^6 UFC/ml) foi transferido para tubo de ensaio (25x150mm) contendo 10ml de caldo dextrose de Sabourand e homogeneizado por 1min. (Figura 6). E, em seguida 100µl do inóculo foi distribuído em cada poço das placas de microtitulação com auxílio da pipeta multicanal (8 canais), iniciando das colunas 1 até 12, com exceção da 11.

Na coluna 11 foi adicionada apenas o meio de cultura (controle-negativo) enquanto na coluna 12 acrescentou 100µl do inóculo fúngico padronizado com meio de cultura acrescido de 100µl de antissépticos bucais e óleo de melaleuca.

Figura 6. Fluxograma da padronização do inóculo microbiano e das diluições dos antissépticos bucais e do óleo de melaleuca sobre as cepas clínicas de *C. albicans* e *C. glabrata*.

As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e, posteriormente realizou-se a leitura considerando DIMax a maior diluição do antisséptico e óleo de melaleuca capaz de inibir o crescimento de todas as cepas avaliadas, de acordo com Wade e Addy (1992).

3.3.3. Formação de biofilme, in vitro, em tubos traqueais estéreis revestidos com antissépticos e óleo de melaleuca

Para formar biofilme, inicialmente utilizaram-se tubos traqueais (TTs) estéreis, descartáveis, translúcidos, radiopacos, atóxicos, graduados, com balão em PVC de 7mm e curvatura anatômica, da marca Rusch® (Uruguai) (Figura 7).

Figura 7. Tubo traqueal com balão estéril de 7mm

Em cabine de segurança biológica modelo 12 Tipo A1 (Veco®, Campinas, Brasil), os fragmentos de 2cm foram seccionados em placas de Petri (15x90mm), com auxílio da lâmina de bisturi.

Para formar biofilme em TTs estéreis, utilizou-se a análise estatística pelo modelo de regressão logístico multinomial ordinal sobre a variável resposta (DIMax dos antissépticos bucais e óleo de melaleuca sobre as *C. albicans* e *C. glabrata*), a partir do programa estatístico R versão 3.0.1³ com o sorteio das cepas de *C. glabrata*. Após a aleatorização, realizou-se a formação de biofilme, em duplicata, em tubos traqueais estéreis das cepas clínicas 22, 26, 33 e 34 (Figuras 8 e 9).

Vale ressaltar que houve mascaramento na técnica de revestimento de antissépticos bucais e óleo de melaleuca em tubos traqueais estéreis para a formação do biofilme. Os fragmentos de 2cm de TTs foram transferidos para tubos de ensaio (25x150mm) com volume de 10 ml de cada antisséptico (Listerine®, Colgate Plax® Tea Fresh e Periogard®) e óleo de melaleuca e, após homogeneizados por 10 segundos em agitador orbital de soluções AP-59 (Phoenix Luferco®, Araraquara, Brasil). A utilização destes fragmentos para formar biofilme ocorreu, somente após 24 horas do processo de revestimento.

³ R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.

Figura 8. Fluxograma da formação de biofilme em tubos traqueais estéreis.

Figura 9. Fluxograma da determinação do número de unidades formadoras de colônias das cepas 22, 26, 33 e 34 por tubo traqueal (UFC/TT) do biofilme formado nos fragmentos de tubos traqueais estéreis.

Após a formação do biofilme, observa-se na Figura 9 que os fragmentos de TTs foram enxaguados com solução salina a 0,85%, com volume de 10ml e transferidos para tubos de ensaio (25x150mm), com pérolas, contendo 10,0ml de caldo Letheen. Em seguida, a solução foi homogeneizada por 1min. Após esta etapa, 50µl de cada tubo foi transferido para eppendorfs com 450µl de solução

salina a 0,85%. Após este procedimento, realizou-se a diluição decimal seriada (0 a - 4) transferindo 50µl das alíquotas para as placas de Petri (15x60mm).

As placas de petri (15x60mm) foram incubadas à 37°C por 48h e, após o período de incubação a leitura dos resultados foi expressa em número de unidades formadoras de colônias por tubo traqueal (UFC/tt).

3.3.3.1. *Microscopia eletrônica de varredura*

O corpo de prova (fragmento de 1cm do tubo traqueal (TT) revestido com antissépticos bucais e óleo de melaleuca) foi submetido a formação de biofilme por *C. glabrata* para o processamento em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Após a formação de biofilme, os corpos de prova foram lavados com 10ml de solução salina a 0,85% e imersos em frascos contendo 5,0ml de solução de glutaraldeído a 2,0% a 37°C. Posteriormente, transferiu-se 5,0ml de tampão fosfato (pH=7,2) para fixação, em condições assépticas. Após 30 minutos, acondicionaram-se os corpos de prova na geladeira a 4°C e, posteriormente transportados em isopor, sob refrigeração, ao laboratório de microscopia eletrônica para processamento e análise em MEV.

Colocaram-se cerca de seis corpos de prova, com auxílio de pinça, em solução de tetróxido de ósmio a 2,0% (1ml) e tampão cacodilato de sódio 0,2M (1ml) por duas horas. Após a lavagem em cacodilato de sódio 0,1M (três trocas de 15 minutos cada), imergiram-se os fragmentos em álcool, nas concentrações de 50, 70, 70, 95, 100 e 100%, sequencialmente, por um período de 15 minutos em cada uma das concentrações de álcool.

Após esta etapa, os corpos de prova foram colocados em um suporte para secagem com CO₂, no ponto crítico, em aparelho Bal-Tec CPD 030 (Critical Point Dryer – Fürstentum – Liechtenstein) (Figura 11a). Por fim, os corpos de prova foram montados em “stubs” metálicos sobre um adesivo condutor à base de isopropanol (Colloidal Grafite Isopropanol Base) com auxílio de pinça e, submetidos ao processo de metalização em ouro (Figura 10a-b) e analisados em microscópio eletrônico de varredura JSM – 6610LV (Jeol Ltd.- Tokyo) (Figura 11b), a 25kV para comprovar a presença ou ausência de biofilme de *C. glabrata* por meio do programa

SEM Control User Interface v. 3.06 (JEOL TECHNICS, 2011) que processou as imagens digitais.

Figura 10- Corpos de prova montados em “stubs” metálicos sobre a base de isopropanol (a) e submetidos ao processo de metalização em ouro (b).

Figura 11- Vista panorâmica do (a) Bal Tec CPD 030 (Critical Point Dryer – Fürstentum – Liechtenstein) para processamento dos corpos de prova e (b) do microscópio eletrônico de varredura JSM – 6610LV (Jeol Ltd.-Tokyo) para visualização das colônias de *C. glabrata*.

A aquisição das imagens foi realizada de maneira padronizada em seis diferentes campos (SMITH; HUNTER, 2008) para não haver repetição de campos. Para a localização de cada campo, utilizou-se um aumento de 300 vezes. Aumentos maiores de até 5.000 vezes foram utilizados para exploração dos detalhes da superfície do tubo endotraqueal e da morfologia das células de *C. glabrata*.

Como parâmetro para avaliar o biofilme no estudo, utilizou-se a imagem da MEV do fragmento do tubo traqueal, sendo preservada sua esterilidade e sem qualquer manipulação, para fins de controle (Figura 12).

Figura 12- Fotomicrografia da face interna e externa do tubo traqueal estéril sem a formação de biofilme.

3.4. Análise estatística dos dados

Para a análise estatística dos dados foi assumido que a variável eficácia da atividade antimicrobiana (DIMax) segue uma distribuição multinomial com parâmetros $(p_1, \dots, p_{11})$ onde p_1 é a probabilidade de a variável DIMax ser classificada como $\frac{1}{2}$, p_2 é a probabilidade de a variável DIM ser classificada como $\frac{1}{4}$, ... , até p_{11} como a probabilidade de a variável DIMax ser classificada como $\frac{1}{4096}$ com a condição de que a soma de $p_1 + p_2 + \dots + p_{11} = 1$.

Devido a razão de existência de uma ordem entre as classificações foi assumido também um modelo com logitos cumulativos. Nesse tipo de modelo tem-se que a probabilidade acumulada é dada por:

$$P(Y \leq j) = p_1 + p_2 + \dots + p_j$$

Para $j = 1, \dots, J$. Esses logitos representam a ordem, com $P(Y \leq 1) \leq P(Y \leq 2) \leq \dots \leq P(Y \leq J) = 1$.

O logito das probabilidades acumuladas é calculada por:

$$\text{logito}(P(Y \leq j)) = \log\left(\frac{P(Y \leq j)}{1 - P(Y \leq j)}\right) = \log\left(\frac{p_1 + \dots + p_j}{p_{j+1} + \dots + p_J}\right)$$

Para $j = 1, \dots, J - 1$. Para $J = 11$ (o número de categorias de DIMax) são calculados 10 logitos acumulados. Em cada logito são utilizadas todas as categorias de respostas.

A relação da variável resposta com as variáveis independentes é dada por:

$$\text{logito}(P(Y \leq j)) = \alpha_j + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_p x_p$$

Onde as variáveis independentes não dependem de j (apenas o intercepto). O parâmetro β representa o efeito de x sobre o logaritmo da chance (odds) na categoria j ou abaixo. O fato de β não possuir um subscrito j indica que o efeito de x é o mesmo para todos os $J-1$ logitos cumulativos.

Como variáveis independentes para o Modelo de Regressão Logística Multinomial Ordinal foram utilizadas as variáveis antissépticos bucais (Listerine®, Colgate Plax® Tea Fresh, Periogard®, bem como óleo de melaleuca), tipos de Cepas, Perfil de Sensibilidade (Resistente e Sensível) e a Espécie de bactéria (Glabrata e Albicans).

As probabilidades acumuladas (ou seja, a probabilidade do DIMax) podem ser calculadas através da expressão

$$P(Y \leq j) = \frac{e^{\alpha_j + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_p x_p}}{1 + e^{\alpha_j + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_p x_p}}$$

E a probabilidade de ocorrência de uma determinada fração pode ser calculada através de

$$P(Y = j) = P(Y \leq j) - P(Y \leq j - 1)$$

Para testar a inclusão e exclusão de variáveis no modelo foi utilizado o teste da Razão de Verossimilhança. Primeiro ajustou-se um modelo sem a presença de variáveis independentes e, depois testou-se a inclusão (manual) de cada uma das variáveis no modelo e aplicou-se o teste. Se a variável tinha significância estatística entrava no modelo. O processo foi feito até a última variável. Interações entre as variáveis também foram testadas.

Por fim, para efetuar uma seleção dentre todos os modelos candidatos (pode ter mais de 1), foram utilizados os critérios de Informação de Akaike (AIC) e o critério de Informação Bayesiana (BIC). Quanto menores os valores desses critérios melhor o modelo. Para a análise estatística dos dados obtidos empregou-se o programa estatístico R versão 3.0.2 (R Core Team, 2013).

A análise estatística da formação de biofilme de *C. glabrata* em tubos traqueais revestidos com diferentes antissépticos e óleo de melaleuca, primeiramente, utilizou-se o teste de normalidade de Shapiro-Wilk que constatou a rejeição da normalidade. Para avaliar se ocorreu a diferença ou não entre as variáveis qualitativas dos antissépticos Listerine®; controle, Periogard® e Colgate Plax® Tea Fresh, bem como o óleo de melaleuca utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Assim, as hipóteses do estudo foram:

- * Hipóteses: H_0 : não há diferença entre a atividade dos antissépticos antibiofilme dos TTs revestidos com antissépticos e óleo de melaleuca.

H_A : há diferença entre a atividade antibiofilme dos TTs revestidos com antissépticos e óleo de melaleuca.

Este teste não paramétrico consiste, inicialmente, em realizar a comparação simultaneamente da atividade antibiofilme dos antissépticos e o óleo de melaleuca, e em caso de rejeição da hipótese nula aplicam-se as comparações múltiplas, 2 a 2, para verificar se ocorreu ou não diferença.

RESULTADOS

A apresentação dos resultados das avaliações antimicrobiana e antibiofilme dos antissépticos bucais e óleo de melaleuca sobre as cepas de *Candida albicans* e *Candida glabrata*, clínicas e padrão, subdividir-se-á em três etapas:

- Determinação da Diluição Inibitória Máxima (DIMax) dos antissépticos bucais e óleo de melaleuca sobre as cepas de *Candida* spp.
- Quantificação da carga de *C. glabrata* em tubos traqueias estéreis revestidos com antissépticos bucais e óleo de melaleuca.
- Análise do biofilme de *C. glabrata* em tubos traqueais revestidos ou não de antissépticos bucais e óleo de melaleuca por meio de MEV.

4.1. Determinação da Diluição Inibitória Máxima (DIMax) de antissépticos bucais e óleo de melaleuca sobre as cepas de *Candida* spp.

Os resultados de DIMax, frequência e probabilidade de ocorrência de DIMax dos antissépticos bucais e óleo de melaleuca sobre as cepas de *Candida* spp. são expressos nas Tabelas 1 e 2 e Figuras 13 a 16.

Tabela 1 – Diluição Inibitória Máxima (DIMax) de antissépticos bucais e óleo de melaleuca sobre as cepas de *Candida* spp. Ribeirão Preto, 2014.

Cepas	Listerine®	Colgate Plax®	Periogard®	Óleo de melaleuca Tea Fresh
	DIMax.	DIMax.	DIMax.	DIMax.
1	1/8	1/1024	1/1024	1/64
2	1/16	1/512	1/256	1/32
3	1/8	1/1024	1/256	1/32
4	1/8	1/512	1/256	1/64
5	1/16	1/1024	1/256	1/64
6	1/8	1/512	1/1024	1/32
7	1/8	1/512	1/256	1/64
8	1/8	1/512	1/128	1/64
9	1/8	1/512	1/256	1/32
10	1/16	1/1024	1/256	1/32
11	1/8	1/256	1/512	1/32
12	1/8	1/512	1/512	1/64
13	1/8	1/1024	1/128	1/16
14	1/8	1/1024	1/256	1/32
15	1/16	1/1024	1/256	1/32
16	1/8	1/1024	1/256	1/32
17	1/8	1/1024	1/512	1/64
18	1/8	1/256	1/512	1/32
19	1/8	1/1024	1/256	1/32
20	1/8	1/512	1/128	1/32
21	1/4	1/2048	1/512	1/16
22	1/4	1/2048	1/256	1/16
23	1/8	1/2048	1/512	1/32
24	1/4	1/64	1/512	1/32
25	1/8	1/128	1/512	1/16
26	1/8	1/128	1/512	1/32
27	1/8	1/128	1/512	1/32

28	1/8	1/1024	1/512	1/32
29	1/8	1/1024	1/256	1/32
30	1/8	1/1024	1/256	1/16
31	1/8	1/512	1/512	1/32
32	1/4	1/1024	1/256	1/32
33	1/8	1/1024	1/128	1/64
34	1/16	1/2048	1/128	1/128
35	1/4	1/2048	1/256	1/64
36	1/4	1/2048	1/256	1/16
37	1/8	1/2048	1/256	1/16
38	1/8	1/2048	1/256	1/64
39	1/4	1/2048	1/128	1/32
40	1/4	1/2048	1/512	1/64
41	1/16	1/512	1/512	1/128
42	1/32	1/4096	1/1024	1/256

Legenda: Cepas clínicas de 1 a 10: *Candida albicans* sensível; 11 a 20: *Candida albicans* resistente; 21 a 30: *Candida glabrata* sensível; 31 a 40: *Candida glabrata* resistente; 41: *Candida albicans* (ATCC 10231); 42: *Candida glabrata* (ATCC 2001).

Na Tabela 1, dentre as 168 DIMax analisadas sobre as 42 *Candida* spp., 8 encontram-se na diluição 1/4 (4,8%); 27 na diluição 1/8 (16,1%); 13 na diluição 1/16 (7,7%); 22 na diluição 1/32 (13,1%); 12 na diluição 1/64 (7,1%); 11 na diluição 1/128 (6,5%); 22 na diluição 1/256 (13,1%); 24 na diluição 1/512 (14,3%); 18 na diluição na 1/1024 (10,7%); 10 na diluição 1/2048 (6,0%) e apenas uma cepa na diluição 1/4096 (0,6%).

Ressalta-se ainda, que a DIMax analisada sobre as 42 *Candida* spp. para Colgate Plax® Tea Fresh apresentou uma diluição, na cepa 24, de 1/64, diferindo das demais.

Tabela 2 – Diluição Inibitória Máxima (DIMax) dos antissépticos bucais e óleo de melaleuca sobre as cepas de *Candida* spp. clínicas e padrão. Ribeirão Preto, 2014.

DIMax	Listerine®			Colgate Plax® Tea Fresh			Periogard®			Óleo de Melaleuca		
	No.	%	F(a)	No.	%	F(a)	No.	%	F(a)	No.	%	F(a)
1/4096	0	0,0	0,0	1	2,4	2,4	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0
1/2048	0	0,0	0,0	10	23,8	26,2	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0
1/1024	0	0,0	0,0	15	35,7	61,9	3	7,2	7,2	0	0,0	0,0
1/512	0	0,0	0,0	10	23,8	85,7	14	33,3	40,5	0	0,0	0,0
1/256	0	0,0	0,0	2	4,8	90,5	19	45,2	85,7	1	2,4	2,4
1/128	0	0,0	0,0	3	7,1	97,6	6	14,3	100,0	2	4,8	7,2
1/64	0	0,0	0,0	1	2,4	100,0	-	-	-	11	26,2	33,4
1/32	1	2,4	2,4	-	-	-	-	-	-	21	50,0	83,4
1/16	6	14,3	16,7	-	-	-	-	-	-	7	16,6	100,0
1/8	27	64,3	81,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/4	8	19,0	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	42	100,0	100,0	42	100,0	100,0	42	100,0	100,0	42	100,0	100,0

Legenda: F(a): frequência acumulada

Comparando a distribuição dos resultados na Tabela 2, foi possível verificar que a maior frequência absoluta (64,3%) ocorreu para o Listerine® a uma diluição de 1/8, porém seu DIMax foi de 1/4.

Na diluição de 1/16, o óleo de melaleuca inibiu todas as cepas de *Candida* spp. e obteve, também a menor frequência (2,4%) entre os demais produtos na diluição 1/256.

Analisando ainda a frequência absoluta, o Colgate Plax® Tea Fresh apresentou a menor frequência (2,4%) em relação aos demais produtos tanto na diluição 1/64 como na 1/4096. Ademais, sua DIMax foi de 1/64.

Destarte, o Periogard® inibiu todas as cepas de *Candida* spp. na diluição de 1/128.

A partir da análise dos resultados, percebe-se que os quatro produtos tiveram valores de DIMax distintos, sendo que o Listerine® dispôs de menor ação inibitória em relação aos demais produtos analisados, ou seja, apresentou o pior resultado em termos de DIMax. No entanto, a solução de Periogard® obteve a melhor ação inibitória neste estudo.

Após análise de dados pelo teste da Razão de Verossimilhança calcularam-se as probabilidades absolutas e acumuladas da DIMax das 42 cepas em relação a natureza dos antissépticos e óleo de melaleuca, tipos de cepas e perfil de sensibilidade, observadas nas Figuras 13 a 16.

Figura 13- Frequência de ocorrência de Diluição Inibitória Máxima (DIMax) de *C. albicans* e *C. glabrata*. Ribeirão Preto, 2014.

A Figura 13 indica que nas diluições 1/4, 1/2048 e 1/4096 não houve a presença de *C. albicans*, e nas diluições 1/16 e 1/128 a frequência de *C. glabrata* é maior que a de *C. albicans*, contrapondo com as demais diluições.

Figura 14- Frequência de ocorrência de Diluição Inibitória Máxima (DIMax) pelo perfil de sensibilidade de *C. albicans* e *C. glabrata*. Ribeirão Preto, 2014.

A Figura 14 sinaliza as frequências dos perfis de sensibilidade das cepas de *Candida* spp. Nas diluições 1/4, 1/128 e 1/2048 a frequência das cepas resistentes aos antifúngicos foi maior que das cepas sensíveis. Evidencia-se ainda, que na diluição de 1/4096 não houve a presença de cepas resistentes, visto que a única cepa presente foi a *C. glabrata* padrão.

Acresce-se que nas diluições 1/64 e 1/256 as frequências das cepas sensíveis e resistentes foram similares.

Os Quadros 2 e 3 mostram os resultados dos testes da razão de Verossimilhança. O Quadro 2 compara um modelo reduzido, no qual são estimados apenas os interceptos (1,2,..., 10) contra um modelo com os interceptos mais a variável de interesse. Cada variável do quadro foi inserida individualmente. Nesta etapa, constatou-se que apenas a variável antisséptico bucal e óleo de melaleuca teve significância, então ela foi inserida no modelo.

Quadro 2- Cálculo do p-valor para o teste da razão de verossimilhança da variável antisséptico.

Variáveis	p-valor
Tipos	1
Espécie	0.8824
Classe	0.9962
Antisséptico	< 2.2e-16 ***

Legenda: Tipos: são as 42 cepas; espécie: *C. albicans* e *C. glabrata*, Classe: perfil de sensibilidade; Antisséptico: antissépticos bucais e óleo de melaleuca.

Outrora, no Quadro 3 testou-se a inserção das demais variáveis dada que a variável antisséptico encontra-se no modelo. O efeito de interação destas variáveis com a variável antisséptico foi, também testada. Não foi possível estimar a interação de antisséptico com os tipos de cepas devido ao elevado número de parâmetros resultantes, que não permitiu uma estimativa consistente dos mesmos.

Quadro 3- Cálculo do p-valor para o teste da razão de verossimilhança das demais variáveis.

Variáveis	p-valor
Tipos	0.00731 **
Espécie	0.637
Classe	0.8886
Espécie*Antisséptico	0.001621 **
Classe*Antisséptico	0.2748

Em seguida, efetuou-se a seleção do melhor modelo por meio dos critérios AIC e BIC. O Quadro 4 tem-se o modelo com as variáveis espécie e antissépticos com efeito de interação apresentando, assim os melhores resultados e, por esta razão foi escolhido.

Quadro 4- Cálculo dos critérios de seleção do modelo

Seleção de Modelos	AIC	BIC
Espécies e Antissépticos com interação	449,40	502,51
Tipos e Antissépticos sem interação	474,42	643,12

No Quadro 5, tem-se o resultado das estimativas dos parâmetros do modelo obtido. Como a variável dependente DIMax tem 11 categorias de respostas, o

modelo tem 10 interceptos. O intercepto 1 representa a estimativa do parâmetro para o antisséptico Listerine® e a *C. albicans* para o logito da probabilidade de $\text{DIMax} \leq 1/4$, o intercepto 2 representa a estimativa do parâmetro para o Listerine® e a *C. albicans* para o logito da probabilidade de $\text{DIMax} \leq 1/8$ e, assim sucessivamente, até o intercepto 10 que representa a estimativa do parâmetro para o Listerine® e a *C. albicans* para o logito da probabilidade de $\text{DIM} \leq 1/2024$. As estimativas dos parâmetros relacionados à *C. glabrata*, os antissépticos e a interação entre a espécie e os antissépticos bucais e óleo de melaleuca são as mesmas para todos os DIMax's. E no quadro 6, estão os exemplos de probabilidades calculadas pelo modelo ajustado.

Quadro 5- Estimativas dos parâmetros do modelo logístico multinomial ordinal.

Parâmetros do Modelo	Estimativas	EP	Estatística	p-valor
(Intercept):1	-2,8360	0,7728	-3,6700	0,0001
(Intercept):2	0,9681	0,4745	2,0401	0,0228
(Intercept):3	3,8310	1,0740	3,5671	0,0207
(Intercept):4	6,2533	1,1586	5,3972	0,0002
(Intercept):5	8,1873	1,2728	6,4327	<0.0001
(Intercept):6	10,1617	1,4403	7,0555	<0.0001
(Intercept):7	11,8826	1,4761	8,0498	<0.0001
(Intercept):8	13,6720	1,5079	9,0668	<0.0001
(Intercept):9	15,4508	1,5503	9,9665	<0.0001
(Intercept):10	18,3489	1,8318	10,0170	<0.0001
Espécie <i>C. glabrata</i>	2,1817	0,8371	2,6063	0,0046
Antissépticos Me	-5,8810	1,1960	-4,9172	<0.0001
Antissépticos Pg	-11,4673	1,5000	-7,6446	<0.0001
Antissépticos Px	-13,4946	1,5438	-8,7410	<0.0001
Espécie <i>C. glabrata</i> :Antisséptico Me	-1,4076	1,0277	-1,3697	0,0854
Espécie <i>C. glabrata</i> :Antisséptico Pg	-2,4231	1,0080	-2,4038	0,0081
Espécie <i>C. glabrata</i> :Antisséptico Px	-3,8010	1,0325	-3,6812	0,0001

Quadro 6- Exemplos de probabilidades calculadas pelo modelo ajustado.

probabilidade estimada de DIM = 1/4 para Espécie Albicans, tratamento Lx			
$P(Y \leq 1/4)$	=	$\exp(-2.836044)/(1+\exp(-2.836044))$	= 0,0554
probabilidade estimada de DIM = 1/4 para Espécie Albicans, tratamento Me			
$P(Y \leq 1/4)$	=	$\exp(-2.836044-5.880995)/(1+\exp(-2.836044-5.880995))$	= 0,0002
probabilidade estimada de DIM = 1/4 para Espécie Glabrata, tratamento Me			
$P(Y \leq 1/4)$	=	$\exp(-2.836044+2.181715-5.880995-1.407553)/(1+\exp(-2.836044+2.181715-5.880995-1.407553))$	= 0,0004
probabilidade estimada de DIM = 1/8 para Espécie Glabrata, tratamento Me			
$P(Y \leq 1/8)$	=	$\exp(0.96812+2.181715-5.880995-1.407553)/(1+\exp(0.96812+2.181715-5.880995-1.407553))$	= 0,0157
probabilidade estimada de DIM = 1/32 para Espécie Albicans, tratamento Me

Figura 15- Probabilidade da Diluição Inibitória Máxima sobre *Candida* spp. em diferentes antissépticos e óleo de melaleuca, Ribeirão Preto, 2014.

Na Figura 15 observa-se que na diluição de 1/8 há a probabilidade de 66,9% de ocorrer DIMax do Listerine® sobre a *C. albicans* e 61,7% do Listerine® sobre a *C. glabrata*.

Para a atividade antifúngica do Colgate Plax® Tea Fresh sobre a *C. glabrata* há uma probabilidade de 39,2% na diluição de 1/1024.

Salienta-se que na diluição de 1/32, encontra-se uma probabilidade de 47,8% de ocorrer DIMax do óleo de melaleuca com *C. albicans* e de 54,0% do óleo de melaleuca com *C. glabrata*.

Evidencia-se ainda que na diluição de 1/256 há 39% de probabilidade de ocorrência da DIMax do Periogard® sobre a *C. albicans* e de 37% do Periogard® sobre a *C. glabrata*, inferindo percentuais muito similares.

Figura 16- Probabilidade acumulada da Diluição Inibitória Máxima sobre *Candida* spp. em diferentes antissépticos e óleo de melaleuca, Ribeirão Preto, 2014.

Na Figura 16 observa-se a probabilidade acumulada de 100% de ocorrer a DIMax de 1/256 do Listerine® sobre a *C. glabrata* e *C. albicans*.

Na diluição 1/1024 há a probabilidade acumulada de 100% da DIMax do óleo de melaleuca sobre *C. albicans* e *C. glabrata*.

Evidencia-se ainda, uma probabilidade acumulada de 100% na DIMax de 1/4096 do Periogard® sobre a *C. albicans* e *C. glabrata*, bem como do Colgate Plax® Tea Fresh sobre a *C. albicans* e *C. glabrata*.

Ressalta-se que as tabelas das probabilidades e probabilidades acumuladas de DIMax dos diferentes antissépticos e óleo de melaleuca sobre a *C. albicans* e *C. glabrata* estão anexadas (ANEXO I e II).

4.2• Quantificação da carga de *C. glabrata* em tubos traqueiais estéreis revestidos com antissépticos bucais e óleo de melaleuca.

Para a análise estatística dos resultados da formação de biofilme de *C. glabrata* em tubos traqueiais (TTs) estéreis revestidos com diferentes antissépticos e óleo de melaleuca utilizou-se o teste de normalidade de Shapiro-Wilk que constatou a rejeição da normalidade. Ainda, para verificar a diferença ou não entre as variáveis qualitativas (Listerine®, controle, Periogard®, Colgate Plax® Tea Fresh e óleo de melaleuca) utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Considerando que a hipótese investigada no estudo era de que a atividade antibiofilme dos antissépticos bucais e óleo de melaleuca diferiam entre si sendo, portanto corroborada.

Neste sentido, nossos achados mostraram a formação de biofilme por todas as *C. glabrata*, com exceção dos TTs revestidos com Colgate Plax® Tea Fresh. Por outro lado, o TT revestido com Colgate Plax® Tea Fresh inibiram a detecção da UFC/TT pelas cepas 22, 26 e 34, mas obteve uma média de contagem da cepa 33 de $1,2 \times 10^4$ UFC/TT (Tabela 3).

Ressalta-se ainda, que dentre os diferentes produtos, o Listerine®, sobre a *C. glabrata* obteve as maiores médias de UFC/TT. Assim, os maiores valores da média de UFC/TT foram evidenciados para as cepas 22 e 33 ($5,8 \times 10^5$ ufc/TT) e o menor valor do óleo de melaleuca sobre a cepa 34 ($5,4 \times 10^3$ ufc/TT).

Tabela 3- Determinação do número de unidades formadoras de colônias por tubo traqueal (UFC/TT) de *C. glabrata* em tubos traqueais revestidos com antissépticos bucais e óleo de melaleuca. Ribeirão Preto, 2014.

Cepas		1ª duplicata	2ª duplicata	Média (UFC/TT)
22	A	$5,7 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$
	B	$6,5 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$
	C	$7,6 \times 10^4$	$7,8 \times 10^4$	$7,7 \times 10^4$
	D	$4,4 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$
	E	0	0	0
26	A	$8,5 \times 10^4$	$7,3 \times 10^4$	$7,9 \times 10^4$
	B	$4,9 \times 10^4$	$8,5 \times 10^4$	$6,7 \times 10^4$
	C	$3,5 \times 10^4$	$5,8 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$
	D	$1,2 \times 10^4$	$4,8 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$
	E	0	0	0
33	A	$5,6 \times 10^5$	$6,1 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$
	B	$3,5 \times 10^5$	$6,2 \times 10^5$	$4,8 \times 10^5$
	C	$2,9 \times 10^4$	$7,8 \times 10^4$	$5,3 \times 10^4$
	D	$7,2 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$
	E	$1,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$
34	A	$2,8 \times 10^4$	$5,2 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$
	B	$7,7 \times 10^4$	$4,7 \times 10^4$	$6,2 \times 10^4$
	C	$1,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
	D	$4,8 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$	$5,4 \times 10^3$
	E	0	0	0

Legenda: (A): Listerine®; (B): controle; (C): Periogard®; (D): óleo de melaleuca; (E): Colgate Plax® Tea Fresh.

Os resultados da análise de crescimento fúngico dos TTs revestidos ou não com antissépticos bucais e óleo de melaleuca e, submetidos à formação de biofilme por *C. glabrata* estão expostos na Tabela 4 e Figuras 17 e 18.

Tabela 4- Análise do crescimento fúngico de tubos traqueais estéreis revestidos ou não com antissépticos bucais e óleo de melaleuca e, submetidos à formação de biofilme por *Candida glabrata*, Ribeirão Preto, 2014.

Produtos	Cepa 22	Cepa 26	Cepa 33	Cepa 34
<i>Listerine®</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>Controle</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>Periogard®</i>	(+)	(+)	(+)	(+)
Óleo de melaleuca	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>Colgate Plax® Tea Fresh</i>	(-)	(-)	(+)	(-)

Legenda: (+): com crescimento fúngico; (-): sem crescimento fúngico.

Na Tabela 4, evidencia-se que apenas a cepa 33 apresentou crescimento fúngico em tubo traqueal revestido com Colgate Plax® Tea Fresh.

Figura 17- Vista panorâmica dos tubos de ensaio (25x150mm) com fragmentos de tubos traqueais após formação de biofilme pela cepa 26 de *C. glabrata*. Legenda: (A): Listerine®; (B): controle; (C): Periogard®; (D): óleo de melaleuca; (E): Colgate Plax® Tea Fresh.

Figura 18- Vista panorâmica dos tubos de ensaio (25x150mm) com fragmentos de tubos traqueais após formação de biofilme pela cepa 34 de *C. glabrata*. Legenda: (A): Listerine®; (B): controle; (C): Periogard®; (D): óleo de melaleuca; (E): Colgate Plax® Tea Fresh.

Nas Figuras 17 e 18, observam-se que os tubos traqueais revestidos com Colgate Plax® Tea Fresh não apresentaram crescimento fúngico pelas cepas 26 e 34.

Após a análise do teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($p < 0,0001$), efetuaram-se as comparações múltiplas, 2 a 2, dos antissépticos bucais e óleo de melaleuca, para verificar a ocorrência ou não de diferença.

As Tabelas 5 e 6 apresentam os valores das médias, medianas, mínimos, máximos e desvios padrão do número de UFC/TT dos diferentes antissépticos bucais e óleo de melaleuca a partir do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Tabela 5- Médias, medianas, mínimos, máximos e desvio padrão do número de unidades formadoras de colônias por tubos traqueais dos diferentes antissépticos e óleo de melaleuca obtidos a partir do teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($p < 0,0001$), Ribeirão Preto, 2014.

Produtos	UFC/TT				
	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	DP
<i>Listerine®</i>	$3,2 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	$2,7 \times 10^4$	$6,1 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$
<i>Controle</i>	$1,6 \times 10^5$	$7,1 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$6,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
<i>Periogard®</i>	$4,0 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$7,8 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$
<i>Óleo de melaleuca</i>	$1,0 \times 10^5$	$3,8 \times 10^4$	$4,8 \times 10^3$	$4,4 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$
<i>Colgate Plax® Tea Fresh</i>	$3,0 \times 10^3$	0	0	$1,2 \times 10^4$	$5,5 \times 10^3$

Legenda: UFC/TT: Unidades Formadoras de Colônias por tubo traqueal. DP: desvio padrão

Tabela 1- Médias, medianas, mínimos, máximos e desvio padrão do número de unidades formadoras de colônias por tubos traqueais dos diferentes antissépticos e óleo de melaleuca obtidos a partir do teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($p < 0,0001$).

Na Tabela 5 evidencia-se que os maiores valores de UFC/TT obtidos pela média, mediana e desvio padrão são encontrados em tubos traqueais revestidos com Listerine®.

Destaca-se ainda que os valores da mediana e do mínimo da contagem fúngica dos tubos traqueais revestidos com Colgate Plax® Tea Fresh foram zero.

Tabela 6- Médias, mínimos, máximos e desvios padrão do número de unidades formadoras de colônias por tubos traqueais dos diferentes antissépticos e óleo de melaleuca obtidos a partir do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$). Ribeirão Preto, 2014.

Produtos	UFC/TT			
	Média	Mínimo	Máximo	DP
<i>Listerine®</i>	$3,2 \times 10^5$	$2,7 \times 10^4$	$6,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$
<i>Controle</i>	$1,6 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$	$6,2 \times 10^5$	$7,4 \times 10^4$
<i>Periogard®</i>	$4,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$7,8 \times 10^4$	$9,5 \times 10^3$
<i>Óleo de melaleuca</i>	$1,0 \times 10^5$	$4,8 \times 10^3$	$4,4 \times 10^5$	$5,6 \times 10^4$
<i>Colgate Plax® Tea Fresh</i>	$3,0 \times 10^3$	0	$1,2 \times 10^4$	$1,9 \times 10^3$

Legenda: DP: desvio padrão

Na Tabela 6 percebe-se que o maior valor de desvio padrão ($1,0 \times 10^5$ UFC/TT) encontra-se no tubo traqueal revestido com Listerine® e o menor ($1,9 \times 10^3$ UFC/TT) no tubo traqueal revestido com Colgate Plax® Tea Fresh.

Neste sentido, os resultados evidenciaram que o Listerine®, controle, Periogard® e óleo de melaleuca apresentaram similaridades quanto as atividades antibiofilmes sobre *C. glabrata*, no entanto o Colgate Plax® Tea Fresh mostrou ação diferente dos demais ($p=0,031$). (Figura 19).

Figura 19- Quantificação da carga de *C. glabrata* em tubos traqueais estéreis revestidos com antissépticos bucais e óleo de melaleuca. As letras minúsculas iguais indicam atividades antibiofilmes similares e as letras minúsculas diferentes indicam atividades antibiofilmes diferentes. Legenda: (A): Listerine®; (B): controle; (C): Periogard®; (D): óleo de melaleuca; (E): Colgate Plax® Tea Fresh.

Figura 20- Blox plot da contagem do biofilme formado em tubos traqueais estéreis revestidos ou não com antissépticos bucais e óleo de melaleuca, Ribeirão Preto, 2014.

No bloxplot (Figura 20) observou-se que o Listerine® apresentou uma maior dispersão nos valores das unidades formadoras de colônias por tubo traqueal (UFC/TT), entretanto para o Colgate Plax® Tea Fresh evidenciou-se valores mais próximos uns dos outros, isto porque a mediana do Listerine® foi $3,2 \times 10^5$ UFC/TT e a mediana do Colgate Plax® Tea Fresh foi zero.

Adiciona-se também a presença de “*outliers*” (valores discrepantes do total de dados) no controle ($6,2 \times 10^5$ UFC/TT) e no óleo de melaleuca ($4,4 \times 10^5$ UFC/TT).

4.3 Análise do biofilme de *C. glabrata* em tubos traqueais estéreis revestidos por antissépticos bucais e óleo de melaleuca por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Como parâmetro para avaliar o biofilme no estudo, as imagens de MEV dos tubos traqueais estéreis, novo e sem uso, foram utilizados (Figura 21 a 30).

Figura 21- Fotomicrografia da camada de superfície irregular de transição entre as faces internas e externas do tubo traqueal estéril sem a formação de biofilme.

A estrutura do tubo traqueal estéril mostra diferentes camadas, sendo a face interna e externa constituída de material com superfície regular. Entretanto, após o corte longitudinal dos tubos, a fotomicrografia revela uma camada de superfície irregular entre as faces interna e externa semelhante à estrutura de um “biofilme”.

Figura 22- Fotomicrografia do biofilme de *C. glabrata* (cepa clínica 22) formado em TT revestido com Listerine®. Ribeirão Preto, 2014. Legenda: (a): Listerine®.

Na figura 22 evidencia-se células leveduriformes agrupadas formando biofilme na superfície de TTs revestidos com Listerine®.

Figura 23- Fotomicrografia do biofilme de *C. glabrata* (cepa clínica 22) formado em TTs revestidos com Periogard®, óleo de melaleuca e Colgate Plax® Tea Fresh. Ribeirão Preto, 2014. Legenda: (c): Periogard®; (d): Óleo de melaleuca; (e): Colgate Plax® Tea Fresh.

Observa-se na Figura 23 uma menor quantidade de biofilme formando nos TTs revestidos com Periogard® e Colgate Plax® Tea Fresh, quando comparado com o óleo de melaleuca.

Figura 24- Fotomicrografia do biofilme de *C. glabrata* (cepa clínica 26) formado em TT revestido com Listerine®. Ribeirão Preto, 2014. Legenda: (a): Listerine®.

Na figura 24 observa-se várias células leveduriformes, entretanto a maioria apresenta-se individualizada formando biofilme em TT revestido com Listerine®.

Figura 25- Fotomicrografia do biofilme de *C. glabrata* (cepa clínica 26) formado em TTs revestidos com controle e Periogard®. Ribeirão Preto, 2014. Legenda: (b): Controle; (c): Periogard®.

Na Figura 25, o grupo controle (b) mostra a presença de biofilme em maior quantidade que o TT revestido com Periogard®. Em adição, a seta aponta o diâmetro da célula leveduriforme com 2,079 a 2,526µm.

Figura 26- Fotomicrografia de biofilme de *C. glabrata* (cepa clínica 26) formado em TTs revestidos com óleo de melaleuca e Colgate Plax® Tea Fresh. Ribeirão Preto, 2014. Legenda: (d): Óleo de melaleuca; (e): Colgate Plax® Tea Fresh.

O retângulo da Figura 26 (d) evidencia a reprodução por brotamento da célula leveduriforme no TT revestido com óleo de melaleuca. Acresce-se que no TT revestido não houve formação de colônias.

Figura 27- Fotomicrografia do biofilme de *C. glabrata* (cepa clínica 33) formado em TTs revestidos com Listerine®. Ribeirão Preto, 2014. Legenda: (a): Listerine®.

A formação do biofilme repleto de células leveduriformes agrupadas e isoladas no TT revestido com Listerine® é notório na Figura 27.

Figura 28- Fotomicrografia do biofilme de *C. glabrata* (cepa clínica 33) formado em TTs revestidos com controle e Periogard®. Ribeirão Preto, 2014. Legenda: (b): Controle; (c): Periogard®.

Na Figura 28 observou-se uma menor quantidade de biofilme nos TTs controle e os revestidos com Periogard® do que aqueles revestidos com Listerine®.

Figura 29- Fotomicrografia do biofilme de *C. glabrata* (cepa clínica 33) formado em TTs revestidos com óleo de melaleuca e Colgate Plax® Tea Fresh. Ribeirão Preto, 2014. Legenda: (d): Óleo de melaleuca; (e): Colgate Plax® Tea Fresh.

Na Figura 29 há duas importantes análises: primeiramente, observa-se a reprodução por brotamento da célula presente no TT revestido com óleo de melaleuca. Em seguida, o tubo revestido com Colgate Plax® Tea Fresh apresentou um biofilme repleto de células confrontando com os achados fitomicrográficos das demais cepas.

Figura 30- Fotomicrografia do biofilme de *C. glabrata* (cepa clínica 34) formado em TTs revestidos com Listerine®, controle e Periogard®. Ribeirão Preto, 2014. Legenda: (a): Listerine®; (b): Controle; (c): Periogard®.

A Figura 30 evidencia uma lise celular, nas setas indicadas nos TTs controle e revestidos com Periogard®. Há de se considerar que há poucas células formando biofilme no tubo traquel revestido com Listerine® (a), controle (b) e Periogard® (c).

Figura 31- Fotomicrografia do biofilme de *C. glabrata* formado em TTs revestidos com óleo de melaleuca e Colgate Plax® Tea Fresh (cepa 34), Ribeirão Preto, 2014. Legenda: (d): Óleo de melaleuca; (e): Colgate Plax® Tea Fresh.

É notório ressaltar que na fotomicrografia 31, o TT revestido com óleo de melaleuca apresentou uma quantidade reduzida de biofilme. Adiciona-se que o TT revestido com Colgate Plax® Tea Fresh inibiu completamente a formação de biofilme.

DISCUSSÃO

5.1. Diluição Inibitória Máxima (DIMax) de antissépticos bucais e óleo de melaleuca sobre as cepas de *Candida* spp.

O presente estudo envolveu a determinação da diluição inibitória máxima (DIMax) de antissépticos bucais (Listerine®, Colgate Plax® Tea Fresh, Periogard®) e o óleo de melaleuca sobre as cepas de *Candida albicans* e *Candida glabrata* (clínicas e padrão); bem como a análise de biofilme por meio da quantificação das unidades formadoras de colônia por tubo traqueal (UFC/TT) estéreis revestidos com antissépticos bucais e óleo de melaleuca e da utilização de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A ocorrência de infecções por *Candida albicans* e não-*albicans* é particularmente importante considerando aspectos epidemiológicos exigindo suporte laboratorial para sua identificação e perfil de sensibilidade aos antifúngicos. Cabe mencionar que a maioria dos serviços de microbiologia fornecem resultados apenas de identificação como "leveduras", "*Candida* spp." ou no máximo "*Candida não-albicans*".

Shrestha et al. (2011) investigaram, *in vitro*, a atividade antimicrobiana de antissépticos bucais à base de clorexidina a 0,2% e timol de isolados de pacientes com candidíase bucal por meio da concentração inibitória mínima (CIM) e mostraram que o tempo de morte de *C. albicans* para solução de Listerine® foi de 1/8 a 60min e de 1/32 com tempo de 30min. Os resultados indicaram que o antisséptico bucal contendo clorexidina a 0,2% apresentou melhor ação fungicida que o timol. Os autores sugerem que ambos as soluções podem ser utilizadas como agentes antimicrobianos tópicos e recomendam estudos *in vivo*, com mais espécies de *Candida*, bem como o uso de outros antissépticos.

Os nossos achados, *in vitro*, revelaram que o Listerine® apresentou a pior ação inibitória sobre *Candida* spp., em especial a *C. glabrata*, com uma DIMax = 1/4 entretanto, o Periogard® a base de gluconato de clorexidina a 0,12% teve DIMax = 1/128.

Ainda, Rodrigues (2008) analisou ações fungistáticas (CIM) e fungicidas de sete antissépticos bucais, entre eles o Listerine®, contra cinco cepas ATCC do gênero *Candida* e observou que o timol apresentou ação fungistática entre cinco e

50% e fungicida entre 10 e 100%, ou seja, em concentrações maiores que os antissépticos avaliados em nosso estudo. Estas observações corroboram com as de Meiller et al. (2001) que obtiveram os valores mais altos de CIM e para o Listerine® quando frente às espécies de *Candida*.

Acresce-se que Maekawa et al. (2010) realizaram um estudo para avaliar a eficácia de antissépticos à base de clorexidina (CHX) com e sem álcool contra *C. albicans*, por meio do teste em microdiluições para determinação da Diluição Inibitória Máxima (DIM). Como resultado, observou-se que o grupo de CHX a 0,12% com fluoreto de sódio 0,05% não apresentou ação fungicida, apenas fungistática, com DIM entre 0,39 a 0,78%. No grupo da CHX a 0,06%, com fluoreto de sódio 0,05% e acetato de zinco 0,34% a DIM ficou entre 0,78 e 0,19% sem efeito fungicida. O grupo CHX a 0,12% com álcool, a DIM ficou entre 0,39 e 0,19% com ação fungicida em 50% da amostra. Os autores concluíram que as soluções à base de CHX a 0,12% são eficazes no controle da *C. albicans* e que os produtos livres de álcool devem ser usados com cautela, apenas nos pacientes em que uso do álcool seja contraindicado.

Analisando os princípios ativos dos antissépticos no nosso estudo, verificou-se que o Periogard® sem álcool contendo gluconato de clorexidina a 0,12% obteve a DIMax de 1/128 (0,78%) para *C. albicans*, corroborando os achados de Maekawa et al. (2010) quanto a concentração utilizada e a ação fungistática.

Tendo em vista a alta prevalência de leveduras não-albicans e a resistência destes aos azólicos (VAZQUEZ; ZAWAWI 2002) há um interesse clínico-científico no uso do óleo de melaleuca em infecções bucais por *Candida* spp. (MONDELLO et al., 2003). Ademais, as preparações com este óleo, nos cuidados paliativos, previnem infecções fúngicas bucais e reduzem o processo inflamatório (BAGG et al., 2006).

Bagg e colaboradores (2006) analisaram, *in vitro*, a atividade antimicrobiana do óleo de melaleuca sobre leveduras isoladas da mucosa bucal de pacientes com carcinomas de mama, brônquios, próstata e mucosa intestinal, bem como o perfil de sensibilidade aos azólicos. Dos 301 isolados identificados, 159 (52,8%) foram *C. albicans*, 71 (23,6%) foram *C. glabrata* e os demais 71 (23,6%) para outras espécies. A uma Concentração Inibitória Mínima (CIM₅₀) do óleo de melaleuca

verificou-se a 0,5% para *C. albicans* e 0,25% para *C. glabrata*. Em relação ao perfil de sensibilidade ao fluconazol e itraconazol, 41 (13,6%) dos 301 isolados clínicos foram resistentes a ambos antifúngicos e 10 *C. glabrata* tiveram CIM $\geq 2\mu\text{g/ml}$ para o voriconazol. Acresce-se que os valores de CIM₉₀ foi 1% para *C. albicans* e *C. glabrata*. Neste sentido, não há nenhuma evidência destes achados que sugerem que as leveduras resistentes aos azólicos reduzem a susceptibilidade ao óleo de melaleuca.

Com o objetivo de reduzir as complicações bucais sobre quimioterapia e o transplante de medula óssea, Epstein et al. (1992) realizaram um estudo com 86 pacientes de leucemia com quimioterapia ou transplante de medula óssea. Assim, determinaram o potencial dos enxaguatórios bucais com clorexidina, nistatina e, solução salina na redução de infecções bucais e subsequente infecção sistêmica, de mucosite e de gengivite. *Candida* na boca foi relatada em 30% dos pacientes. Após o uso dos enxaguatórios bucais, a *Candida* spp. foi isolada de 35% dos pacientes que usaram clorexidina, 21% dos que usaram clorexidina associada a nistatina, 37% da nistatina e 28% da solução salina. Os resultados deste estudo demonstraram que os pacientes tiveram aceitação da clorexidina, porém não houve redução significativa das ulcerações e das mucosites bucais. Dessa forma, a combinação de agentes tópicos e sistêmicos, requer estudos futuros para determinar o protocolo mais efetivo na redução de colonização por *Candida* spp. na prevenção de candidíase orofaríngea e sistêmica e no controle de colonização e infecção fúngica.

Segundo Candido et al. (1996), a clorexidina é mais efetiva que outros produtos, em especial sobre a *C.albicans*. Este estudo determinou a CIM do Cepacol®, Malvona e Periogard®, contra 30 cepas de *C.albicans* isoladas da boca pela metodologia de diluição em meio sólido. O Periogard inibiu 100% das cepas a uma concentração de 6,4mg/ml; Malvona® e Cepacol® inibiram 30% e 0%, respectivamente. O Cepacol e a Malvona inibiram todas as cepas a 25,6mg/ml.

Giuliana et al. (1997) investigaram as propriedades antifúngicas *in vitro* de antissépticos bucais contendo cloreto de cetilpiridínio, digluconato de clorexidina, hexetina, sanguinarina e triclosan, por meio da macrodiluição em caldo. Verificaram que os produtos contendo cloreto de cetilpiridínio foram mais efetivos e os

antissépticos contendo triclosan e hexetina não apresentaram ação fungicida sobre *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*.

Azevedo et al. (1999) determinaram a diluição inibitória máxima (DIM) do Periogard® e Própolis sobre cepas de *Candida* spp. isoladas de bocas de pacientes com e sem lesões. Foram avaliados 50 indivíduos de ambos os sexos e faixa etária média de 42,5 anos. A espécie prevalente das amostras foi a *C. albicans* (48% das amostras de saliva, 28% em língua normal, 14.3% em língua fissurada e 67.8% de lesões). O maior número de cepas inibidas foi alcançado com uma diluição de Própolis de 1/20 e com uma diluição de Periogard de 1/160. Com relação a *C. albicans*, a DIM variou de 1/100 a 1/160 para o Periogard e, 1/20 a 1/40 para Própolis. Os achados indicam que as espécies de *Candida* foram inibidas pela aplicação de Periogard® e Própolis havendo indícios de êxito terapêutico e/ou preventivo contra candidíase bucal.

A literatura sobre a atividade antimicrobiana *in vitro* de antissépticos bucais comerciais e de seus princípios ativos é frequente na área da saúde (AZEVEDO et al., 1999, BAGG et al., 2006; CANDIDO et al., 1996; DUMOND et al., 2004; HAMMER et al., 2004; MASADEH et al., 2013; MEILLER et al., 2001). No entanto, na maioria dos casos, as metodologias empregadas não são as mesmas utilizadas neste estudo para avaliar a ação antimicrobiana sobre *Candida* spp, em especial a *C. glabrata*. Assim, a avaliação destas metodologias para antissépticos bucais contra *C. albicans* e, em especial a *C. glabrata* ainda é pouco explorada.

5.2. Quantificação da carga de *C. glabrata* em tubos traqueiais estéreis revestidos com antissépticos bucais e óleo de melaleuca

Os estudos acerca das interações das espécies de *Candida* em biomateriais são limitados, especialmente envolvendo a saúde bucal. Acresce-se que o biofilme bacteriano é amplamente estudado, porém estudos têm abordado superficialmente as interações entre leveduras e entre as leveduras e bactérias em substratos de mucosa bucal (PEREIRA-CENCI et al., 2008).

O desenvolvimento e a utilização segura de artigos médico-odontológicos acarretam um aumento significativo da preocupação com o processo de

esterilização, o tempo médio de vida, a manutenção, o funcionamento, e, principalmente o risco de formação de biofilme. Em geral, os biomateriais são materiais sintéticos ou naturais, sólidos ou líquidos utilizados em dispositivos que realizam contato com sistemas biológicos. Entretanto, de acordo com a definição clássica, biomaterial é parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo (HELMUS; TWEDEN, 1995). No Brasil, biomateriais utilizados na confecção de próteses, lentes, enxertos, *stents*, cateteres, tubos e arcabouços (*scaffolds*) empregados na engenharia de tecidos (*tissue engineering*) são enquadrados como produtos para saúde (BRASIL, 2010).

A escolha de um material ou produto para ser utilizado como biomaterial exige um conjunto de requisitos. O efeito do ambiente orgânico no biomaterial e vice-versa são fenômenos que devem ser estudados com extremo cuidado, pois a eles está associado a chamada biocompatibilidade. Os tipos de interação entre tecido implante são fundamentalmente dependentes do tipo de material e podem ser reunidos nos seguintes grupos: tóxica, não-tóxica (muitas vezes chamada de bioinerte), bioativa e biodegradável (HENCH, 1991; PEREIRA et al., 1999).

Ultimamente, o desenvolvimento de materiais considerados bioativos e biodegradáveis é enfatizado, uma vez que além de substituir áreas traumatizadas, estes materiais também podem propiciar a recuperação dos tecidos danificados por meio da atuação em metabolismos intra e extracelulares responsáveis pela reprodução celular e propagação dos tecidos em crescimento (PEREIRA et al., 1999).

É espargido que as células de *C. glabrata* colonizam esôfago, intestino e mucosa bucal e vaginal, porém pouco se sabe sobre sua interação com os mecanismos imunológicos e genéticos do hospedeiro (RODRIGUES et al., 2014). A resposta primária do sistema imune do colonizador é mediada pelas células fagocíticas (neutrófilos, células dendríticas e macrófagos) contra infecções fúngicas. Uma vez formado o fagolisossoma, devido à internalização do fungo nas células fagocíticas, ocorre uma tentativa de destruir e eliminar o microrganismo (KRAMER et al., 2006). No entanto, os fungos aprisionados nestas estruturas, desenvolveram estratégias de sobrevivência à explosão oxidativa mediada por inúmeras enzimas antioxidantes como a catalase, redutase, superóxido dismutase e peroxidases dependentes de glutathione e tioredoxina (NICOLA et al., 2008; COX et al., 2003).

Destarte, a relativa não patogenicidade de *C. glabrata*, relacionada à morbimortalidade e rápida disseminação para superfícies bióticas, faz este microrganismo aderir e formar estruturas de múltiplas camadas de biofilme (SILVA et al., 2009; IRAQUI et al., 2005). Assim, a presença de adesinas, na parede celular da *C. glabrata*, codificadas pela família do gene Epa (adesina epitelial), é responsável por sua adesão em superfícies bióticas e abióticas (DE LAS PENÑAS et al., 2003). Embora haja escassez de estudos sobre estas proteínas Epa, sabe-se que Epa1p é a lectina dependente Ca^{+2} que se liga a N-acetil-lactosamina que contém glicoconjugados responsável pela adesão e formação de biofilme (CORMACK et al., 1999).

Esta variedade de condições ambientais como pH, temperatura, osmolaridade, presença de bactérias, fluxo do meio circundante (urina, sangue, saliva e muco), terapêutica antimicrobiana e resposta imune do hospedeiro contribui para a adesão inicial das células fúngicas, principalmente de *Candida* spp. (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2004; BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006; CHANDRA et al., 2001b). Assim, biofilmes fúngicos são formados a partir da adesão do substrato adequado, colonização de matriz extracelular, produção, a maturação e dispersão do biofilme (CHANDRA et al., 2001a; HAWSER, 1996; HAWSER et al., 1998; RAMAGE et al., 2001).

Nossos achados corroboram a de Estivill et al. (2011) em que das 17 (100%) cepas de *C. glabrata* formaram biofilmes em materiais sintéticos poliméricos contendo cloreto de polivinil (PVC), poliuretano e teflon. Os achados de Silva e colaboradores (2009; 2011) verificaram que a *C. glabrata* produziu o maior número de UFC por área. No entanto, quando se trata de quantificar a atividade metabólica do biofilme seus resultados são contrários. Outro estudo realizado por Hasan e colaboradores (2009), utilizando dois métodos de determinação do biofilme indicaram que não houve formação de biofilme por esta espécie.

Vale destacar que o estudo de nossa autoria analisou tubos traqueais na perspectiva de contribuir para com as práticas de prevenção e controle da Pneumonia Associada à Ventilação (PAV). É importante mencionar que este agravo clínico representa a principal causa de morbimortalidade em pacientes críticos

submetidos à intubação endotraqueal (RELLO et al., 2002). A intubação endotraqueal aumenta o risco de pneumonia em 6 a 20 vezes mais, bem como conduz microrganismos da orofaringe contaminada para a área broncoalveolar estéril (RAAD et al., 2011). Assim, o risco de VAP, em pacientes entubados, aumenta em 3% por dia durante os primeiros cinco dias e, em 2% entre o 5^o e 10^o dias de intubação (RELLO et al., 1994). Dado o papel do tubo traqueal (TT) nas infecções pulmonares, pesquisas envolvendo a composição do material associada a antimicrobiano, para verificar a ação antibiofilme, têm sido realizadas (BALAZS et al., 2004; BERRA et al., 2004; CATEAU et al., 2008; LI BASSI et al., 2007; INGLIS et al., 1989). Assim, as superfícies de dispositivos médicos invasivos são substratos que permitem a adesão de vários microrganismos, resultando na formação de biofilme (MAKI; TAMBYAH, 2001).

Há de se considerar que o desenvolvimento do biofilme de *Candida* spp. em dispositivos médicos dá-se pela fixação inicial seguida pela divisão celular, proliferação e maturação do biofilme (RAMAGE et al., 2006). Os biofilmes são comunidades de microrganismos associados a substratos embutidos a uma matriz extracelular (SILVA et al., 2009) e, é um fator de virulência para as espécies de *Candida*, uma vez que confere tolerância aos antifúngicos devido sua penetrabilidade limitada a matriz exopolissacarídeo (SILVA et al., 2011). Destarte, isolados clínicos de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* são hábeis para formar biofilme e, sua ocorrência está associada a altos índices de mortalidade (KUMAMOTO, 2002). Acredita-se, também que biofilmes maduros e a matriz extracelular estão intrinsecamente associados ao tipo de espécie, cepa e condições ambientais como pH, a composição do meio e oxigênio (JAIN et al., 2007; RAMAGE et al., 2006).

Pneumonia associada à ventilação mecânica (PAVM) é uma complicação clínica de pacientes críticos e tem uma repercussão nos custos das unidades de saúde devido a permanência prolongada dos pacientes. PAVM ocorre em 9 a 27% dos pacientes com a intubação endotraqueal, principalmente aqueles submetidos a cirurgias cardiovasculares (CHASTRE; FAGON, 2002; RELLO et al., 2002), sendo imprescindível a identificação e prevenção precoce dos fatores de risco (HORTAL et al., 2009).

A fisiopatologia da PAVM tem contribuído para a colonização da orofaringe por meio da aspiração e deslocamento de microrganismos para esta região. A descontaminação bucal por meio do uso de antissépticos é umas das diversas estratégias adotadas para reduzir a carga microbiana. A exemplo, utiliza-se a clorexidina devido sua capacidade de adsorver as superfícies como a hidroxiapatita, proteínas salivares e polissacarídeos extracelulares bacterianos, retidos aos tecidos bucais onde desencadeiam uma ação prolongada da atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica do antisséptico (SEGUIN et al. 2006; DENTON, 2001). Esta característica conceitua-se como susbtantividade e está fortemente ligada ao grupo OH^- (TROMBELLI et al., 1994; KOMOROWSKI et al., 2000). Destarte, enquanto o trato respiratório inferior de indivíduos saudáveis é protegido por barreiras anatômicas (glote e laringe) e pelo reflexo da tosse, fatores estes que reduzem o risco de aspiração, defesas essas que estão prejudicadas em pacientes entubados o que favorece substancialmente a formação de biofilme ao redor do tudo endotraqueal (BOOKER et al., 2013).

A correlação entre pneumonia associada à ventilação (PAV) e higiene bucal está bem estabelecida na prática clínica (BERRY et al., 2007; CUTLER; DAVIS, 2005; HUTCHINS et al., 2009). Em pacientes hígidos, a mucosa bucal é o habitat normal de microrganismos que albergam esta microbiota, todavia em pacientes críticos, a boca torna-se um reservatório de microrganismos e, assim higiene bucal torna-se inadequada apoiada a um suporte ventilatório invasivo que eleva substancialmente o risco de PAV. Assim, o cuidado bucal não apenas reduz a carga microbiana, mas também estimula o fluxo salivar que auxilia a remoção da placa por conter imunoglobulinas protetoras, bem como reduz a colonização microbiana secundária a xerostomia (MUNRO; GRAP, 2004; STONECYPHER, 2010).

Há interesse da comunidade científica, população e políticas públicas na prevenção de PAVM e evidências sugerem intervenções como o uso de clorexidina como antisséptico bucal (CHAN et al., 2007), bem como a remoção de secreções orofaríngeas (CHAO et al., 2008). O Instituto Nacional de Saúde e Excelência Clínica da Inglaterra estabeleceu um conjunto de cuidados (*bundle*) preventivos para PVAM em que o uso de clorexidina a 1%, 4 vezes por dia, antes de cada reposicionamento do paciente crítico (NICE, 2008). E, em 2010 o Instituto de

Melhoria do Cuidado a Saúde do Reino Unido adicionou neste *bundle* a escovação dos dentes com clorexidina a 1% (4x por dia) na prevenção de VAP em pacientes com cuidados críticos, porém a eficácia desta ainda não está totalmente confirmada em estudos clínicos “padrão ouro”.

Os métodos químicos de eliminação da placa dental envolvem a utilização de antissépticos bucais. E, entre os disponíveis, a clorexidina reduz o biofilme dental formado por *Streptococcus mutans* (ANDERSON et al., 1997; ROSIN et al., 2001). No entanto, o uso da clorexidina ocasiona efeitos adversos como alteração na coloração dental, sabor desagradável, xerostomia e sensação de queimação (LEYES BORRAJO et al., 2002). Recentemente, o uso de antissépticos à base de plantas como o extrato *miswak* da *Salvadora persica*, encontrada na África, América do Sul, Ásia e Oriente Médio, incluindo a Arábia Saudita tem sido investigado (AL-BAYATY et al., 2008; MOEINTAGHAVI et al., 2012; TARAGHI et al., 2011). Dispositivos de mastigação a base desta planta são amplamente utilizados como escovas de dentes.

Posto isto, os antissépticos bucais são preparações líquidas com a função de exercer uma ação antisséptica, adstringente e sedativa na cavidade bucal. Assim, são utilizados no tratamento sintomático de úlceras aftosas e, também na terapêutica de infecções de *Candida* spp., aliviando a dor e desconforto da inflamação (ZEGARELLI, 1993).

A composição básica de um antisséptico bucal não é complexa a qual apresenta um veículo (água, álcool ou glicerina), agentes flavorizantes, agentes surfactantes e corantes. A característica que diferencia estes produtos é a incorporação de agentes antimicrobianos, associados ou não a compostos fluoretados (ADAMS; ADDY, 1994; BUGNO et al., 2007). Os antissépticos bucais são utilizados no controle químico do biofilme bucal como substitutos ou adjuntos aos procedimentos mecânicos, além de serem facilitadores para a veiculação de compostos ativos para o tratamento de afecções específicas (BONADEO, 1988).

Os antissépticos bucais agem rompendo a parede celular e impedindo a atividade enzimática da célula microbiana e, agem adicionalmente prevenindo a agregação dos microrganismos e diminuindo sua multiplicação (ADAMS & ADDY,

1994). A clorexidina, o cloreto de cetilpiridínio, o triclosan, os óleos essenciais e o xilitol estão entre os compostos ativos mais utilizados em antissépticos bucais (MC DONNELL, RUSSEL, 1999).

São espargidos acerca da eficácia de sulfadiazina de prata e clorexidina revestidos em tubos traqueais (TTs) na formação de biofilme bacteriano após 24h ou mais de ventilação mecânica (VM) (JONES et al., 2003. OLSON et al., 2002). O gluconato de clorexidina reduz a incidência de pneumonia hospitalar quando utilizado como enxaguatório bucal em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca (DERISO et al., 1996). Além disso, a sulfadiazina age sinergicamente com a clorexidina (QUESNEL et al., 1978) e, ambos são utilizados no tratamento de queimaduras (GEORGE et al., 1997) e em revestimentos de cateteres venosos centrais (DAROUICHE et al., 2009).

Berra et al., 2004, realizaram um estudo randomizado e controlado, *in vivo*, em ovelhas que estavam sob VM por 24h, utilizando um material de poliuretano revestido com clorexidina e TTs com sulfadiazina de prata para redução ou eliminação da colonização bacteriana. O grupo controle foi composto por oito ovelhas entubadas com TTs não revestidos sob VM por 24h, outrora o grupo experimental consistiu de oito ovelhas entubadas com tubos revestidos internamente com sulfadiazina de prata e clorexidina sob VM por 24h. Os achados mostraram que ambos os grupos tiveram colonização multibacteriana (média do controle = $1,0 \times 10^6$ e a média do experimental = $2,8 \times 10^6$), não havendo diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,21$). Após 8h de VM, o tubo do grupo experimental não foi colonizado ($p<0,001$), o mesmo ocorrendo após 16h de VM ($p<0,001$). Na visualização por microscopia eletrônica de varredura (MEV) os TTs do grupo controle continham muco com agregados bacterianos ou isolados, com células epiteliais e polimorfonucleares. No grupo experimental havia células epiteliais e polimorfonucleares e bactérias isoladas apenas na ponta de três TTs ($p= 0,026$) e agregados bacterianos em apenas um TT ($p=0,01$). Nas seções médias dos TETs e áreas adjacentes ao conector do tubo, observaram-se apenas muco sem bactérias ou células epiteliais (BERRA et al., 2004a).

Em unidades de cuidados críticos, amostras de TTs de pacientes entubados até 24h foram coletadas e analisadas em até 12h de extubação. Assim, cortou-se 5cm da parte distal do tubo e transferiu-se para 10 ml de 0,9% de NaCl. Quando formado o biofilme no tubo, removeram-se as células planctônicas por ciclos repetidos (três vezes) por vórtex e sonicação. Para a coleta e extração de DNA, utilizou-se imediatamente 1 ml das suspensões de células. No total, analisaram-se 55 biofilmes em tubos traqueais de 51 pacientes ventilados por meio da técnica de cultura dependente. Para identificação de levedura utilizou-se o meio cromogênico CHROMAgar (*C. albicans* produziu colônias verdes). Assim, 65 isolados apresentaram morfologia leveduriforme, sendo 60 identificados como *C. albicans* (10 TTs) e, apenas 5 isolados de *Candida* spp. (5 TTs) e posto que *C. albicans* foi recuperado em tubos traqueais com biofilme. (VANDECANDELAERE et al., 2012).

Destaca-se que estudos anteriores vincularam suas análises na cultura das células planctônicas de pacientes entubados com a visualização do biofilme formado pela microscopia eletrônica de varredura em função do tempo e localização (ADAIR et al., 1999; INGLIS et al., 1989, 1995; SOTTILE et al., 1986; ZUR et al., 2004). Cada um destes estudos utilizou técnicas de cultura para determinar os microrganismos presentes, porém alguns estudiosos identificaram vieses significativos no método da coleta (AMANN et al., 1995; EDWARDS, 2000; PACE, 1997).

Outro aspecto deve-se a resistência aos antifúngicos que é uma característica chave na formação de biofilme por *Candida* spp. (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2004; 2006; RAMAGE et al., 2002; PERUMAL et al., 2007). A terapêutica para infecções bucais são, em geral, os azólicos como o fluconazol e itraconazol e, a resistência a estes antifúngicos é prevalente a *Candida* não *albicans*, principalmente *C. glabrata* (CROSS et al., 2004). Os mecanismos de resistência induzidas pelos azólicos são descritos por meio da elevada expressão de mRNA dos genes envolvidos na via de biossíntese de ergosterol ou pelo efluxo das multidrogas (WHITE, 1997).

Ramage et al. (2011) analisou, *in vitro*, os perfis de susceptibilidade antifúngica de isolados planctônicos e sésseis de *C. albicans* advindos de pacientes

com candidíase bucal submetidos a uma terapêutica à base de fluconazol, voriconazol; itraconazol; caspofungina, anfotericina B e nistatina, bem como o perfil de sensibilidade dos antissépticos bucais (Listerine®, Colgate Peroxyl®, Corsodyl® e Oraldene®). Isolados (n=34) de *C. albicans* clínicos e padrão (ATCC 90028). Para a formação de biofilme, inóculos padronizados de 34 *C. albicans* foram pipetados em poços de placas de microtitulação de 96 poços e incubados a 37°C por 48h. Após a formação do biofilme, o meio foi aspirado e as células não aderentes foram removidas por lavagem (três vezes) com solução salina estéril de tampão fosfato (PBS). Após esta etapa, os enxaguatórios bucais foram adicionados diretamente a cada isolado, incluindo o controle nas placas de 96 poços. Os biofilmes com antissépticos foram tratados à temperatura ambiente de acordo com o tempo recomendado de enxague (30-60s). Após o tratamento definido, os antissépticos foram substituídos com solução de neutralização (1% de tampão fosfato, 0,1% de L - histidina, 0,5% de tiosulfato de sódio, 0,3 de lecitina de soja refinado e 10% de Tween-80) por 5 minutos. Os biofilmes foram então, lavados com PBS estéril, antes da quantificação da atividade metabólica do biofilme. O teste destes isolados foi realizado em triplicata.

Assim, os achados de Ramage et al. (2011) demonstraram que a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Corsodyl foi o mais eficaz (0,15 a 3%) para as células planctônicas, seguido pelo Colgate Peroxyl (0,6 a 3,27%), Oraldene (0,6-6,75%), e Listerine (6,75 a 25%). A avaliação da atividade antibiofilme dos quatro antissépticos bucais ocorreu por meio do tempo recomendado pelos fabricantes. Assim, o Corsodyl, Listerine e Oraldene foram os mais eficazes, com redução de 75% a 80% do biofilme formado por *C. albicans*. Estes três antissépticos foram estatisticamente mais significativos que o Colgate Peroxyl ($p < 0,001$), que reduziu apenas 40% do biofilme formado.

Sabe-se que em poucas horas após a intubação traqueal, o lúmen de tubo endotraqueal (TET) é colonizado por microrganismos e, isto favorece a deposição de material biológico (biofilme) que constitui um meio favorável para a adesão de microrganismos (SINGH et al., 2002). Uma vez formado o biofilme, agregados microbianos podem ser retirados do trato respiratório inferior por meio da aspiração,

broncoscopia ou simplesmente pela gravidade, favorecida pelas forças de cisalhamento do fluxo de ar inspiratório (BASSI et al, 2008).

Ressalta-se ainda que microrganismos presentes na superfície do TET estão associados a infecções respiratórias e, dentre elas 70% são de PAV com culturas de identificação microbiana idênticas tanto no biofilme formado em TET como em secreção traqueal (ADAIR et al., 1999).

Neste sentido, tubos endotraqueais revestidos com antimicrobianos ou antissépticos limita a aderência microbiana e, em alguns casos remove-os do substrato, destruindo-os (HARTMANN et al., 1999). No lúmen ou na parte externa do TET aplica-se o revestimento, no entanto ele deve conter as seguintes características ideais:

- Efetivo, atividade antimicrobiana de amplo espectro;
- Prevenção de aderência de “*debris*” no revestimento, pois pode causar resistência nas vias aéreas e um fator protetor aos microrganismos;
- Ação antimicrobiana penetrante, ou seja, matar em toda a extensão do lúmen em que as secreções são depositadas ou acumuladas;
- Segurança, conforme recomendações do FDA;
- Atividade a longo prazo.

Diferentes revestimentos foram testados *in vitro* e em modelos animais (BALAZS et al., 2004; BERRA et al., 2004a), porém apenas dois TETs revestidos com antimicrobianos utilizaram-se em ensaios clínicos (BERRA et al., 2008; KOLLEF et al., 2008).

Berra et al. (2008) realizaram ensaios clínicos (fase I e II) para testar a segurança e eficácia da sulfadiazina de prata revestida em poliuretano de TET em pacientes com cirurgia cardíaca (BERRA et al., 2008). A sulfadiazina de prata dissocia-se, quando exposta à superfície do microrganismo. O íon Ag^+ penetra na parede celular e lesiona o DNA impedindo, assim a sua reprodução, enquanto a sulfadiazina interfere no metabolismo do ácido fólico, matando-o. Neste estudo, os TETs sem revestimento foram colonizados com *Pseudomonas aeruginosa* (10^4 a 10^6 UFC/ml), com 24 a 36h após intubação e os resultados fotomicrográficos

evidenciaram adesão bacteriana e formação de microcolônias em 24h. Entretanto, nos TETS revestidos não houve formação de biofilme bacteriano, bem como secreções, com uma taxa de colonização reduzida nas vias aéreas distais.

Um estudo multicêntrico, randomizado, com 1.500 pacientes entubados por 24h ou mais, avaliou o efeito do tubo endotraqueal, comercialmente disponível, revestido com íons de prata dispersos no polímero. Os TETs revestidos reduziu a incidência de PAV com 10 dias de intubação (redução do risco relativo de 47%, $p=0,005$) e, em qualquer momento do estudo (redução do risco relativo de 36 %, $p=0,03$). No entanto, quando associava o TET revestido com a duração da ventilação mecânica, dias de internação, incidência de falência de órgãos e sobrevivência, nenhuma relevância foi encontrada (KOLLEF et al., 2008). Ademais, pesquisadores avaliam que houve vieses metodológicos, como a randomização, que pode ter contribuído para esta pequena diferença no número de PAV, com significância estatística (COPPADORO et al., 2011).

Diante deste contexto, vários protótipos de TETs modificados têm sido confeccionados com o intuito de remover secreções e prevenir lesões glóticas (BERRA et al., 2004b). Há dispositivo de sucção traqueal inserido na parede do tubo (*Muco Slurper* ou *Muco Shaver*) ou aqueles baseados sem nenhuma vedação por pressão (discos de poliuretano em forma de anel, anexados apenas na área da glote permite a vedação mecânica adequada das vias respiratórias, sem a necessidade de um *cuff* (BERRA et al., 2006; KOLOBOW et al., 2006; LI BASSI et al., 2007; REALI-FORSTER et al., 1996).

5.3. Análise do biofilme de *C. glabrata* em tubos traqueais estéreis revestidos por antissépticos bucais e óleo de melaleuca por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Candida spp. apresenta crescimento sob duas formas: planctônica e biofilme. Esta, por sua vez confere a levedura condições de sobrevivência em condições adversas e resistência antimicrobiana em relação aos homólogos de células planctônicas. Para a formação do biofilme é necessário, inicialmente, uma aderência do microrganismo a uma superfície biótica ou abiótica para formar colônias discretas e organizar células, e, em seguida secretar uma matriz de polissacarídeo extracelular (PES) e maturar em uma estrutura tridimensional disposta espacialmente e, assim disseminar a progênie do biofilme.

A formação do biofilme sobre uma superfície é observada a partir do crescimento de ensaios cinéticos e visualizações microscópicas ao longo de um tempo. Portanto, a avaliação da cinética de crescimento é fundamental para a compreensão da natureza e as propriedades de biofilmes como a sua resistência antimicrobiana. Várias técnicas têm sido utilizadas para elucidar a cinética do crescimento dos biofilmes de *Candida*, tanto por visualização microscópica direta como ensaios indiretos.

Acresce-se que ao longo da história têm surgido descrições diferentes de estrutura dos biofilmes. O aparecimento de novas tecnologias, incluindo a microscopia Confocal (CLSM – Confocal Laser Scanning Microscopy), a microscopia de contraste diferencial (DIC- Differential Interference Contrast), microelétrodos:

- * *estrutura tradicional do biofilme* (NYVAD; FEJERSKOV, 1997);
- * *modelo homogêneo em mosaico*
- * *forma em cogumelo ou tulipa* (DE BEER et al., 1994; STOODLEY et al., 2002).

C. glabrata confere uma vantagem ecológica surpreendente na formação de biofilme, pois possui mecanismos de defesa contra a explosão oxidativa e fagolisossoma do hospedeiro, resistência à terapêutica antifúngica e boa adaptabilidade ao meio quando compete com outros microrganismos (SILVA, 2011).

A formação de biofilme por esta levedura, além de ser um fator chave para a sobrevivência destas espécies é, também adaptada a colonizar tecidos e dispositivos médicos. Comparado com as outras espécies, esta levedura apresenta a menor atividade metabólica de biofilme, apesar de ter o maior número de células cultiváveis.

Do mesmo modo, as células planctônicas do biofilme são em menores quantidades que as outras espécies (RODRIGUES et al, 2014; SILVA et al., 2011). Em síntese, a formação de biofilme por *C. glabrata* tem o total de biomassa menor e seus isolados mostram-se semelhante nesta formação, em oposição a *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Os biofilmes formados por esta levedura exibem, em predomínio, uma estrutura de múltiplas camadas de blastoconídios intimamente compactados ou constituídos por aglomerados de células e, com a ausência total de pseudo-hifas corroborando a nossos achados microscópicos (Figura 18-21). Notavelmente, as matrizes de biofilme de *C. glabrata* têm quantidades relativas de proteínas e carboidratos (em alguns casos, cinco vezes mais elevado) em comparação a outras espécies não-albicans (JAYATILAKE et al. 2006; SILVA et al., 2011; 2012).

A imagem de análise do biofilme, por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), oferece vantagens como a alta resolução e grande profundidade de campo permitindo, assim uma descrição detalhada da topografia e estrutura dos biofilmes formados (BALDASSO et al., 2012; INGLIS, 1989, INGLIS et al., 1995; SCHAUDINN et al, 2007).

Neste sentido, De Souza et al. (2014) avaliaram 30 fragmentos de tubos endotraqueais (superfícies internas e externas), utilizados em pacientes sob ventilação mecânica em unidades de terapia intensiva. Ressalta-se que um TET esterilizado foi usado como controle negativo. Posto isto, todas as moléculas e microrganismos foram identificados morfolologicamente e estruturas da matriz de exopolissacarídeo (EPS) foram observadas e classificadas como descrito por Donlan e Costerton (2002) e Schaudinn et al. (2007). Os resultados revelaram que o tubo estéril (controle) apresentou irregularidades nas superfícies internas e externas que são características próprias do material, o qual pode favorecer o desenvolvimento de

biofilme. Este achado corrobora ao nosso estudo, pois o nosso fragmento de tubo traqueal estéril, após o corte de 1cm, revelou duas camadas (interna e externa) de materiais de superfície irregular semelhante à estrutura de um “biofilme”.

Ainda, no estudo de De Souza et al. (2014), todas as amostras (112 fotomicrografias) apresentaram biofilme e presença de matriz EPS, compactada e fragmentada, nas superfícies internas e externas dos tubos endotraqueais, respectivamente. Assim, as superfícies internas mostraram menor atrito mecânico que a externa porque esta entra em contato direto com a traquéia do paciente. Observou-se que o biofilme sobre as superfícies distais (interna e externa) dos TETs tinham estruturas diversificadas em termos de características morfológicas da microbiota bucal e elementos como a fibrina, eritrócitos e leucócitos. Além disso, uma estrutura semelhante a um "favo de mel" sobre as superfícies externas e internas. Os autores concluem que a presença do TET permite a colonização microbiana contribuindo, sobretudo para o desenvolvimento de biofilme e a ocorrência de pneumonia.

Em relação aos antissépticos, Jandourek et al. (1998), em seus achados clínicos sobre *Candida* spp., apontaram uma eficácia do óleo de melaleuca no tratamento da candidíase oral. Hammer et al. (2004) investigou os mecanismos de ação deste óleo contra a *Candida* spp. padrão, sendo uma delas a *C. glabrata* e, constaram que esta substância e seus componentes aumentaram a permeabilidade celular, fluidez da membrana e inibiram a acidificação do meio. Os autores concluíram que o óleo de melaleuca e seus componentes parecem afetar a integridade da membrana por meio de outros agentes ativos lipofílicos como os terpenos timol e geraniol. No entanto, há várias inconsistências neste estudo, a exemplo tem-se que o 1,8- cineol e terpinoleno causaram grandes alterações na fluidez da membrana, mas não aumentaram a permeabilidade quando na coloração do azul de metileno. Por outro lado, a 0,25% de 4-ol-terpinol houve um aumento considerável na permeabilidade com o azul de metileno, porém um acréscimo razoável na fluidez da membrana. Estas discrepâncias são ainda incompreendidas, todavia os achados deste estudo sugerem que os diferentes componentes do óleo de melaleuca diferem no modo de ação contra a *Candida* spp. e, também nos mecanismos de ação antifúngica.

Há de se considerar que os terpenos induzem alterações na permeabilidade celular por meio da sua inserção entre as cadeias de acilo que constituem as camadas duplas de lípidios da membrana rompendo, assim a barreira lipídica e alterando as propriedades e funções celulares (SIKKEMA et al., 1995). Esta teoria é apoiada por outros estudiosos que demonstraram alterações na permeabilidade e fluidez da membrana após o tratamento com terpenos (BARD et al., 1988; URIBE et al., 1985). Acresce-se que os componentes deste óleo também induzem alterações na fluidez em graus variados, dependendo da posição de cada terpeno na bicamada lipídica da membrana. Esta posição representa a hidrofobicidade do composto; no entanto não se evidenciou correlação entre as alterações na fluidez e a solubilidade em água ou a partição do coeficiente octanol-água de cada composto (HAMER et al., 2004).

Adiciona-se que ao investigar se os derivados terpênicos reduzem a formação de biofilme, *in vitro*, de quatro isolados clínicos bucais de *C. albicans*, incluindo uma padrão de *C. glabrata* (IHEM 9556), Dalleau et al. (2008) observou atividade antifúngica nos terpenos testados (CIM entre 0,01% e 2%, exceto o farnesol e o 1,8-cineol (CIM $\geq$ 8%)). Os achados mostraram, também que o timol, geraniol e carvacrol possuem forte atividade sobre *Candida* spp. corroborando, assim a outros autores (CHAMI et al., 2004; BARD et al., 1988). Braga e colaboradores (2008) demonstraram, por meio da microscopia eletrônica que o timol age nas células planctônicas de *C. albicans* e os terpenos alteram a permeabilidade celular penetrando entre as cadeias de acilo que compõem as bicamadas lipídicas da membrana. Em relação a atividade antibiofilme, o carvacrol, geraniol e timol inibiram mais de 80% do biofilme contra a *C. albicans* (ATCC 3153) a uma concentração de 0,06% e, também aos outros isolados clínicos. Em relação a *C. glabrata*, os resultados demonstraram que o carvacrol inibiu mais de 75% do biofilme formado a uma concentração de 0,125%. Neste caso, o efeito de geraniol e timol em *C. glabrata* tem relação com o tempo de formação do biofilme. O geraniol e timol (0,06% e 0,125%) inibiu 75% com os biofilmes formando com menos de 5 dias e 44% quando tratados com 5 dias ou mais. Em suma, estes achados apontaram, *in vitro*, uma atividade antibiofilme de três terpenos, porém o carvacrol foi especialmente interessante porque inibiu o biofilme de *Candida* independentemente das espécies testadas e o estado de maturação do biofilme. Há de se considerar

neste estudo que a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada com 10 derivados terpênicos sendo, estes os principais componentes do óleo de melaleuca como: carvacrol; 1,8-cineol, citral, eugenol, farnesol, geraniol, linalol, mentol; α -terpineno e timol.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no estudo, ora apresentados, conclui-se que:

O Listerine apresentou o pior resultado de DIMax (1/4) sobre a *Candida* spp., clínicas e padrão, enquanto que para o óleo de melaleuca foi de 1/16; Colgate Plax® Tea Fresh (1/64) e Periogard (1/128). Por outro lado, apesar da DIMax do Periogard® ter sido maior, o Colgate Plax® Tea Fresh em termos gerais, evidenciou melhores resultados de atividade antifúngica (1/64 a 1/4096).

Com relação à quantificação de *Candida glabrata* por meio do número de unidades formadoras de colônia por tubo traqueal (UFC/TT) revestidos ou não com antissépticos bucais e óleo de melaleuca, observou-se crescimento nos fragmentos, com exceção daqueles revestidos com Colgate Plax® Tea Fresh. Acresce-se que na cepa 33 observou-se crescimento fúngico no tubo.

Pela análise por MEV, observou-se a formação de biofilme repleto de células leveduriformes agrupadas e isoladas em TTs revestidos com Listerine, no entanto aquele revestido com Colgate Plax® Tea Fresh não houve presença de biofilme, exceto na cepa 33.

REFERÊNCIAS⁴

⁴ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

ABI-SAID, D. et al. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clin Infect Dis.**, Chicago, v. 25, n. 2, p. 1122-1128, 1997.

ADAIR, C. G. et al. Implications of endotracheal tube biofilm for ventilator-associated pneumonia. **Intensive Care Med.**, Berlin, v. 25, n. 10, p. 1072–1076, 1999.

ADAMS, D.; ADDY, M. Mouthrinses. **Adv Dent Res.**, Washington, DC, v. 8, n. 2, p. 291-301, 1994.

ADAM, B.; BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. **J Med Microbiol.**, Reading, v. 51, n. 4, p. 344-349., 2002.

AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgrad Med J.**, Bombay, v. 78, n. 922, p. 455-459, 2002.

AL-BAYATI, F. A.; SULAIMAN, K. D. *In vitro* antimicrobial activity of *Salvadora persica* L. extracts against some isolated oral pathogens in Iraq. **Turk. J. Biol.**, Ankara, v. 32, p. 57–62, 2008.

ALEXANDER, B. D. et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. **Clin Infect Dis.**, Chicago, v. 56, n. 12, p. 1724-1732, 2013.

AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 48, n. 9, p. 3291-3297, 2004.

ALI, N.; ADIL, S. N.; SHAIKH, M. U. Bloodstream and central line isolates from hematopoietic stem cell transplant recipients: data from a developing country. **Transpl Infect Dis.**, Copenhagen, v. 16, n. 1, p. 98-105, 2014.

ALKUMRU, H. N.; BEYDEMIR, K. The prevalence of *Candida albicans* in complete denture and removable partial denture wearers: a comparative study. **J Marmara Univ Dent Fac.**, Istanbul, v. 1, n. 3, p. 218-222, 1992.

ALP, E.; VOSS, A. Ventilator-associated pneumonia and infection control. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, London, v. 5, n. 7, p. 1-11, 2006.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, DC, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.

AMARAL, C. F. S. **Infecção Hospitalar**. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 235 p.

AMERICAN THORACIC SOCIETY; INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.**, New York, v. 171, n. 4, p. 388-416, 2005.

AMES, N. J. et al. Effects of systematic oral care in critically ill patients: a multicenter study. **Am. J. Crit. Care**, Aliso Viejo, v. 20, n. 5, p. e103-e114, 2011.

ANDERSON, R. M.; ZIMPRICH, C. A.; RUST, L. A second operator is involved in *Pseudomonas aeruginosa* elastase (lasB) activation. **J Bacteriol.**, Washington, D.C., v. 181, n. 20, p. 6264-6270, 1999.

ARENDORF, T. M.; WALKER, D. M. *Candida albicans*: its association with dentures, plaque and the oral mucosa. **J Dent Assoc S Afr.**, Cape Town, v. 35, p. 563-569, 1980.

ARRAES, A. C. P. Detecção da diversidade molecular de *Candida* spp. isoladas de uti neonatal. 2012, 109f. **Dissertação** (Mestrado) - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

AVILA, M.; OJCIUS, D. M.; YILMAZ, O. The oral microbiota: living with a permanent guest. **DNA Cell Biol.**, New York, v. 28, n. 8, p. 405-411, 2009.

ATABEK, M. E.; AKYÜREK, N.; EKLIOGLU, B. S. Frequency of vaginal candida colonization and relationship between metabolic parameters in children with type 1 diabetes mellitus. **J Pediatr Adolesc Gynecol.**, Philadelphia, v. 26, n. 5, p. 257-260, 2013.

BAGG, J. et al. Susceptibility to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil of yeasts isolated from the mouths of patients with advanced cancer. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 42, n. 5, 487-492, 2006.

BAGGIO, C. H. Mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva e antiinflamatória da (1→3), (1→6) b-glucana isolada do *Pleurotus pulmonarius*. 2010. **Tese** (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BALAZS, D. J. et al. Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments. **Biomaterials**, Guilford, v. 25, n. 11, p. 2139-2151, 2004.

BALDASSO, F. E. R. et al. Microflora associated with primary endodontic infections: Correlations among SEM evaluation, clinical features, and radiographic findings. **Microsc. Res. Tech.**, New York, v. 75, n. 11, p. 1557-1563, 2012.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de DST**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BARBOSA, A. M. et al. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina**, Londrina, v. 25, p. 29-42, 2004.

BARCHIEESI, F. et al. Comparison of the fungicidal activities of caspofungin and amphotericin B against *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 49, n. 12, p. 4989-4992, 2005.

BARD, M. et al. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. **Lipids**, v. 23, n. 6, p. 534-538, 1988.

BARKVOLL, P.; ATTRAMADAL, A. Effect of nystatin and chlorhexidine digluconate on *Candida albicans*. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 67, n. 3, p. 279-281, 1989.

BASSETT, I. B.; PANNOWITZ, D. L.; BARNETSON, R. S. A comparative study of tea-tree oil versus benzoylperoxide in the treatment of acne. **Med. J. Aust.**, Sydney, v. 153, n. 8, p. 455-458, 1990.

BASSI, G. L. et al. Following tracheal intubation, mucus flow is reversed in the semirecumbent position: possible role in the pathogenesis of ventilator-associated pneumonia. **Crit. Care. Med.**, New York, v. 36, n. 2, p. 518-525, 2008.

BERGMAN, J. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. **Curr. Opin. Microbiol.**, London, v. 9, n. 6, p. 595-601, 2006.

BERRA, L. et al. Antibacterial-coated tracheal tubes cleaned with the *Mucus Shaver*: a novel method to retain long-term bactericidal activity of coated tracheal tubes. **Intensive Care Med.**, Berlin, v. 32, n. 9, p. 888-893, 2006.

BERRA, L. et al. Endotracheal tubes coated with antiseptics decrease bacterial colonization of the ventilator circuits, lungs, and endotracheal tube. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 100, n. 6, p. 1446-1456, 2004a.

BERRA, L. et al. Evaluation of continuous aspiration of subglottic secretion *in an in vivo* study. **Crit. Care. Med.**, New York, v. 32, n. 10, p. 2071-2078, 2004b.

BERRA, L. et al. Internally coated endotracheal tubes with silver sulfadiazine in polyurethane to prevent bacterial colonization: a clinical trial. **Intensive Care Med.**, Berlin, v. 34, n. 6, p. 1030-1037, 2008.

BERRY, A. M. et al. Systematic literature review of oral hygiene practices for intensive care patients receiving mechanical ventilation. **Am. J. Crit. Care**, Aliso Viejo, v. 16, n. 6, p. 552-562, 2007.

BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Curr. Opin. Microbiol.**, London, v. 9, n. 6, p. 588-594, 2006.

BLOT, S. et al. Is *Candida* really a threat in the ICU? **Curr. Opin. Crit. Care**, Philadelphia, v. 14, n. 5, p. 600-604, 2008.

BONADEO, I. **Cosmética**. Ciência y Tecnología. Madrid: Ed Ciência, 1988.

BONGIOVANI, R. A. M. Características reológicas do exopolissacarídeo botriosferano produzido pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em três fontes de carbono: glicose, frutose e sacarose. 2008. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Engenharia e Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de São Paulo, UNESP, SP, 2008.

BOOKER, S. et al. Mouth care to reduce ventilator-associated pneumonia. **Am. J. Nurs.**, New York, v. 113, n. 10, p. 24-30, 2013.

BORG-VON-ZEPELIN, M.; GRUNES, V. Characterization of two monoclonal antibodies against secretory proteinase of *Candida tropicalis* DSM 4238. **J Med Vet Mycol.**, Abingdon, v. 31, n. 1, p. 1-15, 1993.

BOTELHO, L. Isolamento e identificação de lactobacilos e bifidobacterias em alimentos probióticos disponíveis no mercado brasileiro. 2005. 244f. **Tese** (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2005.

BOW, E. J. et al. Canadian clinical practice guidelines for invasive candidiasis in adults. **Can J Infect Dis Med Microbiol.**, Oakville, v. 21, n. 4, p. 22-50, 2010.

BRAGA, P. C. et al. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. **Int J Antimicrob Agents.**, Amsterdam, v. 31, n. 5, p. 472-477, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Produtos para a Saúde.** Brasília, 2010. Disponível em: [<http://www.anvisa.gov.br/produtosaude/index.htm>]. Acesso em: 04 jan 2014.

BUCK, D. S.; NIDORF, D. M.; ADDINO, J. G. Comparison of two topical preparations for the treatment of onychomycosis: *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and clotrimazole. **J. Fam. Pract.**, New York, v. 38, n. 6, p. 601-605, 1994.

BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. **Acta Odontol. Scand.**, Stockholm, v. 48, n. 1, p. 61-69, 1990.

BUGNO, A. et al. Antimicrobial efficacy of *Curcuma zedoaria* extract as assessed by linear regression compared with commercial mouthrinses. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 440-445, 2007.

CANDIDO et al. Determinação da concentração inibitória mínima de Cepacol, Malvona e Periogard, ante a *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal. **Rev Odontol UNESP**, Marília, v. 25, n. 1, p. 79-84, 1996.

CANNON, R. D. et al. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? **J. Dent. Res.**, v. 74, n. 5, Chicago, 1995.

CARSON, C. F. et al. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil gel (6%) for the treatment of recurrent herpes labialis. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 48, n. 3, p. 450-451, 2001.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington DC, v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Safety, efficacy and provenance of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 45, n. 2, p. 65-67, 2001.

CARVALHO, F. G. et al. Presence of *Candida* spp. in infants oral cavity and its association with early childhood caries. **Braz J Oral Sci.**, Piracicaba, v. 6, n. 20, p. 1249-1253, 2007.

CARVALHO, L. P. et al. Avaliação da resposta imune celular em pacientes com candidíase recorrente. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 5, p. 571-576, 2003.

CATEAU, E. et al. Fungal biofilm inhibition by a component naturally produced by *Candida albicans* yeasts growing as a biofilm. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, Amsterdam, v. 31, n. 2, p. 166-170, 2008.

CHAMI, N. et al. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. **Braz J Infect Dis.**, Salvador, v. 8, n. 3, 2004.

CHANDRA, J. et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 80, n. 3, p. 903-908, 2001a.

CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, 2001b.

CHAO, Y. F. C., et al. Removal of oral secretion prior to position change can reduce the incidence of ventilator-associated pneumonia for adult ICU patients: A clinical controlled trial study. **J Clin Nurs.**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 22-28, 2008.

CHARACKLIS, W. G. Microbial fouling. In: CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. editors. **Biofilms**. New York: John Wiley & Sons, p. 523-84, 1990.

CHARACKLIS, W. G.; COOKSEY, K. E. **Biofilms and microbial fouling**. In: LASKIN, A. L. (org). Applied microbiology. New York: Academic Press, p 93-138, 1983.

CHARLES, M. P. et al. A etiological agents of ventilator-associated pneumonia and its resistance pattern - a threat for treatment. **Australas Med. J.**, Sorrento, v. 6, n. 9, p. 430-434, 2013.

CHASTRE, J.; FAGON, J. Y. Ventilator associated pneumonia. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, New York, v. 165, n. 7, p. 867-903, 2002.

CHOW, J. K. et al. Factors associated with candidemia caused by non-albicans *Candida* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit. **Clin. Infect Dis.**, Chicago, v. 46, n. 8, p. 1206-1213, 2008.

CLEVELAND, A. A. et al. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008–2011. **Clin Infect. Dis.**, Chicago, v. 55, p. 1352–1361, 2012.

COAD, B. R. et al. Biomaterials surfaces capable of resisting fungal attachment and biofilm formation. **Biotechnol. Adv.**, New York, v. 32, n. 2, p. 296-307, 2014.

COCO, B. J. et al. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 23, n. 5, p. 377-383, 2008.

COFFIN, S. E. et al. Strategies to prevent ventilator-associated pneumonia in acute care hospitals. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, Thorofare, v. 29, p. S31-S40, 2008. Supplement 1.

COLOMBO, A. L. et al. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. **Med Mycol.**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 38-44, 2013.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COLOMBO, A. L. et al. High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, New York, v. 34, n. 4, p. 281-286, 1999.

COOKSEY, K. E.; WIGGLESWORTH-COOKSEY, B. Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea – a review. *Aquat Microb Ecol.* 9:87–96, 1995.

COPPADORO, A.; BERRA, L.; BIGATELLO, L. M. Modifying endotracheal tubes to prevent ventilator-associated pneumonia. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, London, v. 24, n. 2, p. 157-162, 2011.

CORMACK, B. P.; GHORI, N.; FALKOW, S. An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. **Science**, Washington DC, v. 285, n. 5427, p. 578-582, 1999.

COSTERTON, J. W.; DEMEO, P. Discussion. The role of biofilms: are we hitting the right target? **Plast Reconstr Surg.**, v. 127, (Suppl 1) p: 36S-37S, 2011.

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K-J. How bacteria stick. **Sci Am.**, v. 238, n. 1, p. 86-95, 1978.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

COX, G. M. et al. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. **Infect. Immun.**, Washington DC, v. 71, n. 1, p. 173-180, 2003.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 492-497, 2001.

COX, S. D.; MARKHAM, J. L. Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 103, n. 4, p. 930-936, 2007.

CROSS, L. et al. 2004. Evaluation of the recurrence of denture stomatitis and *Candida* colonization in a small group of patients who received itraconazole. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, St. Louis, v. 97, n. 3, p. 351-358, 2004.

CUSTODIO, W. Influência das proteínas salivares e plasmáticas no desenvolvimento de biofilmes de *Candida albicans*. 2012. **Tese** (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

CUTLER, C. J.; DAVIS, N. Improving oral care in patients receiving mechanical ventilation. **Am. J. Crit. Care**, Aliso Viejo, v. 14, n. 5, p. 389-394, 2005.

DALLEAU S. et al. *In vitro* activity of terpenes against *Candida* biofilms. **Int J Antimicrob Agents**, Amsterdam, v. 31, n. 6, p. 572-576, 2008.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetic. **Microbiol Mol Biol Rev.**, Washington, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

DAVIES, G. E. 1:6-Di- 4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. **Br J Pharmacol Chemother.**, London, v. 9, n. 2, p. 192-196, 1954.

DAVIES, A. N. et al. Oral yeast carriage in patients with advanced cancer. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 17, n. 2, p. 79-84, 2002.

DAROUICHE, R. O. *Candida* in the ICU. **Clin. Chest. Med.**, Philadelphia, v. 30, n. 2, p. 287-293, 2009.

DE BACKER, M. D. An antisense-based functional genomics approach for identification of genes critical for growth of *Candida albicans*. **Nat Biotechnol.**, v. 19, p. 235-241, 2001.

DE BEER, D.; SRINIVASAN, R.; STEWAR, P. S. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. **Appl Environ Microbiol.**, Washington, v. 60, n. 12, p. 4339-4344, 1994.

DE LA ROSA-GARCÍA, E. et al. Oral colonisation and infection by *Candida sp.* in diabetic and non-diabetic patients with chronic kidney disease on dialysis. **Nefrologia**, Madrid, v. 33, n. 6, p. 764-70, 2013.

DE LAS PEÑAS, A. et al. Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. **Genes Dev.**, New York, v. 17, n. 18, p. 2245-2258, 2003.

DE REPENTIGNY L. et al. Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 68, n.6, p.3172-3179, 2000.

DERISO, A. J. et al. Chlorhexidine gluconate 0.12% oral rinse reduces the incidence of total nosocomial respiratory infection and nonprophylactic systemic antibiotic use in patients undergoing heart surgery. **Chest**, Chicago, v. 109, n. 6, p. 1556-1561, 1996.

DE SOUZA, P. R. et al. Endotracheal tube biofilm and ventilator-associated pneumonia with mechanical ventilation. **Microsc. Res. Tech.**, New York, v. 77, n. 4, p. 305-312, 2014.

DENTON, G. W. Chlorhexidine. In: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection, sterilization, and preservation**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 321-326.

DEVIRIM, I. et al. Single Center's Experience with *Candida parapsilosis* Related Long-Term Central Venous Access Device Infections: The Port Removal Decision and Its Outcomes. **Pediatr. Hematol. Oncol.**, Washington DC, 2014 Jan 2, 2014. In press.

DIGNANI, M. C.; SOLOMKIN, J. S.; ANAISSIE, E. Candida. In: Anaissie E, McGinnis MR, Pfaller MA (eds). **Medical Mycology**. 1. ed. Filadélfia: Churchill Livingstone, p. 195-239, 2003.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis.**, Atlanta, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev.**, Washington DC, v. 15, n. 2, p. 167-93, 2002.

DOUGLAS, L. J. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. **Rev Iberoam Micol.**, Barcelona, v.19, n. 3, p. 139-143, 2002.

DRUMOND, M. R. S. et al. Estudo comparativo in vitro da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr.**, João Pessoa, v. 4, n. 1, p. 33-38, 2004.

DUDDRIDGE, J. E., PRITCHARD, A. M. **Factors affecting the adhesion of bacteria to surfaces**. Proceeding of the Conference on Microbial Corrosion. Teddington, 1983, p.28-35.

EDWARDS, C. Problems posed by natural environments for monitoring microorganisms. **Mol. Biotechnol.**, Totowa, v. 15, p. 211–223, 2000.

ELLEPOLA, A. N. et al. The postantifungal effect of nystatin and its impact on adhesion attributes of oral *Candida dubliniensis* isolates. **Mycoses**, Copenhagen, v. 57, n. 1, p. 56-63, 2014.

EPSTEIN, J. R. et al. High-density, microsphere-based fibre optic DNA microarrays. **Biosens Bioelectron.**, Oxford, v. 18, n. 5-6, p. 541–546, 2003.

ESTIVILL D. et al. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. **J Microbiol Methods.**, Amsterdam, v. 86, n. 2, p. 238-242, 2011.

FEIDER, L. L. et al. Oral care practices for orally intubated critically ill adults. **Am. J. Crit. Care**, Aliso Viejo, v. 19, n. 2, p. 175-183, 2010.

FIDEL-JR, P. L.; VAZQUEZ. J. A.; SOBEL. J. D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clin Microbiol Rev.**, Washington, DC, v. 12, n. 1, p. 80-96, 1999.

FIDEL, P. L. Immunity to *Candida*. **Oral Dis.**, Houndmills, v. 8, n. 2(Suppl), p. 69-75, 2002.

FLANAGAN, M.A. et al. Prevalence of oral soft tissue lesions in HIV-infected minority children treated with highly active antiretroviral therapies. **Pediatr. Dent.**, Chicago, v.22, n.4, p. 287-291, 2000.

FRIDKIN, S. K.; JARVIS, W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington DC, v. 9, n. 4, p. 499-511, 1996.

FURIGA, A.; LONVAUD- FUNEL, A.; BADET, C. *In vitro* study of antioxidant capacity and antibacterial activity on oral anaerobes of a grape seed extract. **Food Chem.** Barking, v. 113, n. 4, p. 1037-1040, 2009.

GEBRAN, M. P; GEBERT, A. P. O. Controle químico e mecânico de placa bacteriana. **Tuiuti: Ciência e Cultura**, Curitiba, n. 26, p. 45-58, 2002.

GEORGE, N.; FAOAGALI, J.; MULLER, M. Silvazine (silver sulfadiazine and chlorhexidine) activity against 200 clinical isolates. **Burns**, v. 23, n. 6, p. 493-495, 1997.

GHANNOUM, M. A. et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. **PLoS Pathog.**, San Francisco, v. 6, n. 1, p. e1000713, 2010.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GIULIANA, G. et al. *In vitro* antifungal properties of mouthrinses containing antimicrobial agents. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 68, n. 8, p. 729e33, 1997.

GLÖCKNER, A.; CORNELLY, O. A. Invasive candidiasis in non-neutropenic adults: Guideline-based management in the intensive care unit. **Anaesthesist.**, Berlin, v. 62, n. 12, p. 1003-1009, 2013.

GORDON, S. M. et al. Nosocomial bloodstream infections in patients with implantable left ventricular assist devices. **Ann. Thorac. Surg.**, Boston, v. 72, n. 3, p. 725-730, 2001.

GROSSI, P. et al. Prevalence and outcome of invasive fungal infections in 1,963 thoracic organ transplant recipients. A multicenter retrospective study. **Transplantation.**, Chicago, v. 70, n. 1, p. 112-116, 2000.

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontol. 2000.**, Copenhagen, v. 5, p. 78-111, 1994.

HAMMAD, M. M.; DARWAZEH, A. M.; IDREES, M. M. The effect of glycemic control on *Candida* colonization of the tongue and the subgingival plaque in patients with type II diabetes and periodontitis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, St. Louis, v. 116, n. 3, p. 321-326, 2013.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **J Antimicrob Chemother.**, London, v. 53, n. 5, p. 1081-1085, 2004.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 50, n. 2, p. 195-199, 2002.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 355-362, 2000.

HANNULA J., et al. Subgingival strains of *Candida albicans* in relation to geographical origin and occurrence of periodontal pathogenic bacteria. **Oral Microbiol Immunol.**, Copenhagen, v. 16, n. 2, p.113-118, 2001.

HART, P. H. et al. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflammation Res.**, Basel, v. 49, n. 11, p. 619-626, 2000.

HARTMANN, M. et al. Reduction of the bacterial load by the silver-coated endotracheal tube (SCET), a laboratory investigation. **Technol Health Care.**, Amsterdam, v. 7, n. 5, p. 359–370, 1999.

HASAN, F. et al. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. **Microbes Infect.**, Paris, v. 11, n. 8-9, p. 753-761, 2009.

HAWSER, S. Adhesion of different *Candida* spp. to plastic: XTT formazan determinations. **J. Med. Vet. Mycol.**, Abigdon, v. 34, n. 6, p. 407-410, 1996.

HAWSER, S. P.; BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v. 47, n. 3, p. 253-256, 1998.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **Trends Microbiol.**, Cambridge, v. 9, n. 12, p. 591-596, 2001.

HAZEN, K. C. New and emerging yeast pathogens. **Clin Microbiol Rev.**, Washington, DC, v. 8, n. 4, p. 462-78, 1995.

HE, X. et al. The social structure of microbial community involved in colonization resistance. **ISME J.**, London, v. 8, n. 3, p. 564–574, 2014.

HEERSINK, J. Basic biofilm analytical methods. **In the biofilm laboratory**: step-by-step protocols for experimental design, analysis, and data interpretation. In: HAMILTON, M.; HEERSINK, J.; BUCKINGHAM-MEYER, K.; GOERES, D. Bozeman: Cytergy Publishing, p. 16–23, 2003.

HELMUS, M. N.; TWEDEN, K. **Materials Selection**. Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, v.1, p.27-59, 1995.

HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. **J Am Ceram Soc.**, v.74, p: 1487-510, 1991.

HEO, S. M. et al. Genetic relationships between *Candida albicans* strains isolated from dental plaque, trachea, and bronchoalveolar lavage fluid from mechanically ventilated intensive care unit patients. **J. Oral Microbiol.**, Jarfalla, v. 3, p. 6362-6371, 2011.

HEO, S. M. et al. Genetic relationships between respiratory pathogens isolated from dental plaque and bronchoalveolar lavage fluid from patients in the intensive care unit undergoing mechanical ventilation. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 47, n. 12, p. 1562-1570, 2008.

HORAN, T. C. et al. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. **Am. J. Infect. Control.**, St. Louis, v. 36, n. 5, p. 309-332, 2008.

HORTAL, J. et al. Incidence and risk factors for ventilator associated pneumonia after major heart surgery. **Intensive Care Med.**, Berlin, v. 35, n. 9, p. 1518-1525, 2009.

HUTCHINS, K. et al. Ventilator-associated pneumonia and oral care: a successful quality improvement project. **Am. J. Infect. Control**, St. Louis, v. 37, n. 7, p. 590-597, 2009.

INGLISS, T. J. J. et al. Tracheal tube biofilm as a source of bacterial colonization of the lung. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 27, n. 9, p. 2014–2018, 1989.

INGLISS, T. J. J. New insights into the pathogenesis of ventilator associated pneumonia. **J. Hosp. Infect.**, London, v. 30, p. 409–413, 1995. Supplement 1.

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION (ISO). **ISO 4730**. Oil of Melaleuca, terpinen-4-ol type (tea tree oil). 1996.

IRAQUI, et al. The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. **Mol. Microbiol.**, Boston, v. 55, n. 4, p. 1259-1271, 2005.

JABRA-RIZK, M. A. et al. New Assay for Measuring Cell Surface Hydrophobicities of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **Clin Diagn Lab Immunol.**, Washington, v. 8, n. 3, p. 585-587, 2001.

JAIN, N. et al. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 73, n. 6, p. 1697-1703, 2007.

JANDOUREK, A.; VAISHAMPAYAN, J. K.; VAZQUEZ, J. A. Efficacy of melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole refractory oral candidiasis in AIDS patients. **AIDS**, New York, v. 12, n. 9, p. 1033-1037., 1998.

JAYATILAKE, J. A. et al. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-albicans *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 35, n. 8, p. 484-491, 2006.

JENKINSON, H. F.; LAMONT, R. J. Oral microbial communities in sickness and in health. **Trends Microbiol.**, Cambridge, v. 13, n. 12, p. 589-595, 2005.

JEOL TECHNICS.

http://www.jeol.co.jp/en/corporate/ir/download/annualreport/global_complete_annualreport_2011.pdf. Acesso em: 10 maio de 2014.

JONES, D. S. et al. Characterisation and evaluation of novel surfactant bacterial anti-adherent coatings for endotracheal tubes designed for the prevention of ventilator-associated pneumonia. **J Pharm Pharm Sci.**, Edmonton, v. 55, n. 1, p. 43–52, 2003.

JORGE, A. O. C, et al. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. **Rev Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 279-285, 1997.

JORGE, O. C. **Microbiologia** – atividades práticas. 2. ed. São Paulo: Santos Editora, 2008.

JOSEPH, N. M. et al. Ventilator-associated pneumonia in a tertiary care hospital in India: incidence and risk factors. **J. Infect. Dev. Ctries.**, Milão, v. 3, n. 10, p. 771-777, 2009.

KAMMA, J. J.; NAKOU, M.; BAEHNI, P. C. Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis. **J Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 34, n. 1, p.25-33, 1999.

KIM, H. J. et al. Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. **J Agric Food Chem.**, Washington, v. 52, n. 10, p. 2849-2854, 2004.

KIRKPATRICK, C. H. Chronic mucocutaneous candidiasis. **Pediatr Infect Dis J.**, Baltimore, v. 20, n. 2, p.197–206, 2001.

KOLLEF, M. H. et al. Health care-associated infection (HAI): a critical appraisal of the emerging threat-proceedings of the HAI Summit. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 47, p. S55-99, 2008. Supplement 2.

KOLOBOW, T. et al. The Mucus Slurper: a novel tracheal tube that requires no tracheal tube suctioning. A preliminary report. **Intensive Care Med.**, Berlin, v. 32, n. 9, p. 1414–1418, 2006.

KOMOROWSKI, R. et al. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentine. **J Endod.**, Chicago, v. 26, n. 6, p. 315-317, 2000.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BMC Infect. Dis.**, London, v. 6, p. 130, 2006.

KUMAMOTO, C. A. *Candida* biofilms. **Curr. Opin. Microbiol.**, London, v. 5, n. 6, p. 608-611, 2002.

LACAZ, C. S. (Coord.). **Candidiases**. São Paulo: EPU, 1980. 190p

LEE, B. Y. The economic effect of screening orthopedic surgery patients preoperatively for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, Chicago, v. 31, n. 11, p.1130–1138, 2010.

LEYES BORRAJO, J. L, et al. Efficacy of chlorhexidine mouthrinses with and without alcohol: a clinical study. **J Periodontol.**, Chicago, v. 73, n. 3, p. 317-321, 2002.

LEUNG, W. K. et al. Oral colonization, Phenotypic, and Genotypic Profiles of *Candida* Species in Irradiated, Dentate, Xerostomic Nasopharyngeal Carcinoma Survivors. **J Clin Microbiol.**, Washington, v. 38, n. 6, p. 2219-2226, 2000.

LEWIS, K. Riddle of Biofilm Resistance. **Antimicrob Agents Chemother.**, Washington, v. 45, n. 4, p. 999-1007, 2001.

LI BASSI, G. et al. A 72-h study to test the efficacy and safety of the '*Mucus Slurper*' in mechanically ventilated sheep. **Crit. Care. Med.**, New York, v. 35, n. 3, p. 906–911, 2007.

LI, L.; REDDING, S.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 86, n. 3, p. 125-204, 2007.

LIM, K. S.; KAM, P. C. Chlorhexidine--pharmacology and clinical applications. **Anaesth Intensive Care.**, Sydney, v. 36, n. 4, p. 502-512, 2008.

LIM, K.; MUSTAPHA, A. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on sliced roast beef by cetylpyridinium chloride and acidified sodium chlorite. **Food Microbiol.**, London, v. 24, n. 1, p. 89-94, 2007.

LOCKHART, S. R. et al. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. **J Clin Microbiol.**, Washington, v. 50, n. 11, p. 3435-3442, 2012.

MCDONNELL, G.; RUSSEL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clin Microbiol Rev.**, Washington, DC, v. 12, n. 1, p. 147–179, 1999.

MADEIRA, A. R. et al. Análise clínica de restaurações estéticas e suas correlações com a placa bacteriana. **Periodontia**, v. 16, n. 3, p. 37-42, 2006.

MAEKAWA, L. E. et al. Atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais sem álcool à base de clorexidina sobre *Candida albicans*. **Rev Odontol UNESP**, Araraquara, v. 39, n. 1, p. 15-19, 2010.

MAGER, D. L. et al. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. **J Clin Periodontol.**, Copenhagen, v. 30, n. 7, p. 644-654, 2003.

MAKI, D. G.; TAMBYAH, P. A. Engineering out the risk for infection with urinary catheters. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 7, n. 2, p. 342-347, 2001.

MALANI, A. et al. *Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center. **Clin Infect Dis.**, Chicago, v. 41, n. 7, p. 975-981, 2005.

MARCANTONI, M. Ecología de la cavidad bucal In: NEGRONI, M. **Microbiología estomatológica**. Madrid: Panamericana, 1999. p. 189-217.

MARINHO, B. V. S.; ARAÚJO, A. C. S. O uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. **Int. J. Dent.**, Recife, v. 6, n. 4, p. 124-131, 2007.

MARSH, P. D.; MARTIN, M. V. **Oral Microbiology**. 3ed. New York: Chapman and Hall, 1992. 249p.

MARTINEZ, M. et al. Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. **J Clin Microbiol.**, Washington, v. 40, n. 9, p. 3135-3139, 2002.

MARTINS, C. A. P. et al. Presença *Candida* spp. em pacientes com periodontite crônica. **Cienc Odontol Bras.**, v.5, n.3, p. 75-83, 2002.

MARUKUTIRA, T. et al. Clinical characteristics and outcomes in 303 HIV-infected patients with invasive fungal infections: data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance registry, a multicenter, observational study. **HIV AIDS.**, Auckland, v. 6, p. 39-47, 2014.

MASADEH, M. M. et al. Antimicrobial activity of common mouthwash solutions on multidrug-resistance bacterial biofilms. **J Clin Med Res.**, Cadiac, v. 5, n. 5, p. 389–394, 2013.

MASON, K. L. et al. *Candida albicans* and bacterial microbiota interactions in the cecum during recolonization following broad-spectrum antibiotic therapy. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 80, n. 10, p. 3371-3380, 2012.

MATSUMOTO, E. et al. Candidemia surveillance in Iowa: emergence of echinocandin resistance. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, New York, v. 79, n. 2, p. 205-208, 2014.

MAY, J. et al. Time–kill studies of tea tree oils on clinical isolates. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 45, n. 5, p. 639-643, 2000.

MEILLER, T. F. et al. *In vitro* studies of the efficacy of antimicrobials against fungi. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 91, n. 6, p. 663-670, 2001.

MENEZES, E. A. et al. Frequency and enzymatic activity of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of HIV-positive patients at Fortaleza, Ceará. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 4, p.253-256, 2006.

MIRANDA, C.C.B.; et al. Botryosphaeran: A new fungal exopolysaccharide presenting antimutagenic, hypoglycaemic and hypocholesterolaemic activities in mice and rats. **Journal of Biotechnology**, v.131, n. 2, p. S58–S64, 2011.

MOEINTAGHAVI, A. Non-surgical periodontal therapy affects metabolic control in diabetics: a randomized controlled clinical trial. **Aust Dent J.**, Sydney, v. 57, n. 1, p. 31-37, 2012.

- MONDELLO, F. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and—resistant human pathogenic yeasts. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 51, n. 5, p. 1223-1229, 2003.
- MORADALI, M. F. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **Int Immunopharmacol.**, Amsterdam, v. 7, n. 6, p. 701-724, 2007.
- MOREIRA, D. et al. *Candida* spp. biotypes in the oral cavity of school children from different socioeconomic categories in Piracicaba - SP, Brazil. **Pesqui Odontol Bras.**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 187-195, 2001.
- MOREIRA, R. D. A. S.; NICO, L. S.; TOMITA, N. E. Oral health conditions among the elderly in Southeastern São Paulo State. **J Appl Oral Sci.**, Bauru, v. 17, n. 3, p. 170-178, 2009.
- MUNRO, C. L.; GRAP, M. J. Oral health and care in the intensive care unit: state of the science. **Am. J. Crit. Care**, Aliso Viejo, v. 13, n. 1, p. 25-33, 2004.
- MUSCEDERE, J. et al. Subglottic secretion drainage for the prevention of ventilator-associated pneumonia: a systematic review and meta-analysis. **Crit. Care Med.**, Philadelphia, v. 39, n. 8, p. 1985-1991, 2011.
- NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CLINICAL EXCELLENCE (NICE). Technical Patient Safety Solutions for Ventilator-Associated Pneumonia in Adults. NICE, London. 2008. Disponível em: <http://www.nice.org.uk/nicemedia/live/12053/41684/41684>. Acesso em: 13 de junho 2014.
- NICOLA, A. M.; CASADEVALL, A.; GOLDMAN, D. L. Fungal killing by mammalian phagocytic cells. **Curr. Opin. Microbiol.**, London, v. 11, n. 4, p. 313-317, 2008.
- NIKAIDO, H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. **Semin. Cell. Dev. Biol.**, London, v. 12, n. 3, p. 215-223, 2001.
- NYVAD, B.; FEJERSKOV, O. Assessing the stage of caries lesion activity on the basis of clinical and microbiological examination. **Community Dent Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 25, n. 1, p. 69-75, 1997.
- NOTERMANS, S.; DORMANS, J. A. M. A.; MEAD, G. C. Contribution of surface attachment to the establishment of micro-organisms in food processing in plants: a review. **Biofouling**, London, v.5, p.21-36, 1991.
- NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oreganoessential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 230, n. 2, p. 191-195, 2004.

OHARA, P. K.; TORABINEJAD, M.; KETTERING, J. D. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. **Endod Dent Traumatol.**, Copenhagen, v. 9, p. 95–100, 1993.

OLSON, M. E.; HARMON, B. G.; KOLLEF, M. H. Silver-coated endotracheal tubes associated with reduced bacterial burden in the lungs of mechanically ventilated dogs. **Chest**, Chicago, v. 121, n. 3, p. 863-870, 2002.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. *Candida glabrata* and FKS Mutations: Witnessing the Emergence of the True Multidrug-Resistant *Candida*. **Clin Infect Dis.**, Chicago, v. 56, n. 15, p. 1733-1734, 2013.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annu Rev Microbiol.**, Palo Alto, v. 54, p. 49-79, 2000.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, n. 5313, p. 734-740, 1997.

PANACKAL, A. A. et al. Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*. **J Clin Microbiol.**, Washington, v. 44, n. 5, p. 1740-1743, 2006.

PANIZO, M. M. et al. Aislamiento de levaduras en muestras clínicas. Casuística del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (1996-2001). **Rev. Soc. Ven. Microbiol.**, Caracas, v. 22 n. 1, p. 57-63, 2002.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis.**, Chicago, v. 48, n. 5, p. 503-535, 2009.

PARDI, G.; CARDOSO, E. I. Algunas consideraciones sobre candida albicans como agente etiológico de candidiasis oral. **Acta Odontol Venez.**, Caracas, v. 40, n. 1, p. 9-17, 2002.

PARK, D. R. The microbiology of ventilator-associated pneumonia. **Respir. Care**, Philadelphia, v. 50, n. 7, p. 742-763, 2005.

PEMÁN, J. et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in pediatric patients: a Spanish multicenter prospective survey. **J Clin Microbiol.**, Washington, v. 49, n. 12, p. 4158–4163, 2011.

PEREIRA-CENCI, T. et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. **Arch Oral Biol.**, Oxford, v. 53, n. 8, p. 755–764, 2008.

PEREIRA, A. P. V., et al. Novos biomateriais: híbridos orgânico-inorgânicos. Bioativos Polímeros: **Ciência e Tecnologia**, p. 104-109, 1999.

PÉREZ GRANDA, M. J. et al. Routine aspiration of subglottic secretions after major heart surgery: impact on the incidence of ventilator-associated pneumonia. **J. Hosp. Infect.**, New York, v. 85, n. 4, p. 312-315, 2013.

PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 45, n. 4, p. 321-346, 2007.

PERUMAL, P.; MEKALA, S.; CHAFFIN, W. L. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother.**, Washington, v. 51, n. 7, p. 2454–2463, 2007.

PFALLER, M. A. Epidemiology of candidiasis. **J Hosp Infect.**, New York, v. 30 p.329-338, 1995.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. **J Clin Microbiol.**, Washington, v. 50, n. 9, p. 2846-2856, 2012.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington DC, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Rare and Emerging Opportunistic Fungal Pathogens: Concern for Resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **J Clin Microbiol.**, Washington, v. 42, n. 10, p. 4419-4431, 2004.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 40, n. 10, p. 3551-3557, 2002.

PIRES, F. R. et al. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. **J Oral Rehabil.**, Oxford, v. 29, n. 11, p.1115–1119, 2002.

PLAYFORD, E. G. et al. Candidemia in non-neutropenic critically ill patients: risk factors for non-albicans *Candida* spp. **Crit. Care Med.**, Philadelphia, v. 36, n. 7, p. 2034-2039, 2008.

POWDERLY, W. G. Cryptococcal meningitis and AIDS. **Clin Inf Dis.**, v.17, n. 5, p. 837-842, 1993.

PRABHU, S. R.; WILSON, D. F.; DAFTARY, D. K.; JOHNSON, N. W. (Eds.). **Oral diseases in the tropics**. Oxford: Oxford University Press, 1992.

PRICE, M. F.; LAROCCO, M. T.; GENTRY, L. O. Fluconazole susceptibilities of *Candida* species and distribution of species recovered from blood cultures over a 5-year period. **Antimicrob Agents Chemother.**, Washington, v. 38, n. 6, p.1422–1424, 1994.

PROCOP, G. W.; ROBERTS, G. D. Emerging fungal diseases: the importance of the host. **Clin. Lab. Med.**, Philadelphia, v. 24, n. 3, p. 691-719, 2004.

QUESNEL, L. B.; AL-NAJJAR, A. R.; BUDDHAVUDHIKRAI, P. Synergism between chlorhexidine and sulphadiazine. **J Appl Bacteriol.**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 397-405, 1978.

QUIMBY, K. et al. CD8 T cells and E-cadherin in host responses against oropharyngeal candidiasis. **Oral Dis.**, Houndmills, v. 18, n. 2, p.153-161, 2012.

R CORE TEAM. R: **a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 20 Nov. 2013.

RAAD, I. I. et al. The prevention of biofilm colonization by multidrug-resistant pathogens that cause ventilator-associated pneumonia with antimicrobial-coated endotracheal tubes. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 2689-2694, 2011.

RAMAGE, G. et al. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 45, n. 9, p. 2475-2479, 2001.

RAMAGE, G. et al. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. **Appl Environ Microbiol.**, Washington, v. 68, n. 11, p. 5459-5463, 2002.

RAMAGE, G.; MARTÍNEZ, J. P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS Yeast Res.**, Amsterdam, v. 6, n. 7, p. 979-986, 2006.

RAMAGE, G. et al. Commercial mouthwashes are more effective than azole antifungals against *Candida albicans* biofilms *in vitro*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, St. Louis, v. 111, n. 4, p. 456-460, 2011.

RAY, D. et al. Prevalence of *Candida glabrata* and its response to boric acid vaginal suppositories in comparison with oral fluconazole in patients with diabetes and vulvovaginal candidiasis. **Diabetes Care.**, New York, v. 30, n. 2, p. 312-317, 2007.

REALI-FORSTER, C. et al. New ultrathin-walled endotracheal tube with a novel laryngeal seal design. Long-term evaluation in sheep. **Anesthesiology.**, Philadelphia, v. 84, n. 1, p. 162-172, 1996.

RELLO, J. et al. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. **Chest.**, Chicago, v. 122, n. 6, p. 2115-2121, 2002.

RELLO, J. et al. Ventilator associated pneumonia by *Staphylococcus aureus*. Comparison of methicillin-resistant and methicillin-sensitive episodes. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.**, New York, v. 150, n. (6 Pt 1), p. 1545-1549, 1994.

RIBEIRO, E. L. et al. 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, p. 1-7, 2006.

RIBEIRO, E. L. et al. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções nosocomiais. **NewsLab.**, São Paulo, v. 64, p. 106-128, 2004.

RIBEIRO, M. A. **Exoenzimas e mecanismos moleculares de resistência fluconazol de *C. albicans* isoladas de mulheres HIV positivas.** 2002. 156 f. Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

RIELLA, K. R. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **J Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 143, n. 2, p. 656-663, 2012.

RODRIGUES, A. P. N. *Candida* spp. em escovas dentais e eficácia de antimicrobianos na sua desinfecção. 2009. 114f. **Tese** (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

RODRIGUES, M. L. T. Avaliação de métodos para testes de suscetibilidade in vitro de enxaguantes bucais frente a espécies do gênero *Candida*. 2008. 92f. **Dissertação** (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

RODRIGUES, C. F.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Wiesbaden, v. 33, n. 5, p. 673-688, 2014.

RODRIGUEZ-GALAN, M. C. et al. Phenotypic and functional changes on phagocytic cells recruited at the site of *Candida albicans* infection after chronic varied stress exposure. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 485-492, 2002.

ROSIN, M. et al. Effect of a polyhexamethylene biquanide mouthrinse on bacterial counts and plaque. **J Clin Periodontol.**, Copenhagen, v. 28, n. 12, p. 1121-1126, 2001.

ROSING, C., LOESCHE, W. Halitosis: an overview of epidemiology, etiology and clinical management, *Braz J Oral Res*, 25(5), pp. 466-71, 2011.

RUSSELL, A. D. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: comments and conclusions. **J Appl Microbiol.**, Oxford, v. 92, n. S1, p. 171S–173S, 2002.

SAHA, K. et al. Recovery of fluconazole sensitive *Candida ciferrii* in a diabetic chronic obstructive pulmonary disease patient presenting with pneumonia. **Lung India.**, Bombay, v. 30, n. 4, p. 338-340, 2013.

SAMARANAYAKE, Y. U.; SAMARANAYAKE, L. P. Experimental oral candidiasis in animal models. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington DC v. 14, n. 2, p. 398-429, 2001.

SAMBUNJAK, D. Flossing for the management of periodontal diseases and dental caries in adults. **Cochrane Database Syst Rev.**, Oxford, v. 7, n. 12, 2011.

SÁNCHEZ-VARGAS, L. O. et al. Salivary pH and culture determinations in HIV infected and non-HIV infected patients with oral candidosis. **Rev. Iberoam. Micol.**, Barcelona, v. 19, n. 3, p. 155-160, 2002.

SANTOS, S. S. F.; JORGE, A. O. C. Presença de enterobacteriaceae e pseudomonadaceae na cavidade bucal humana. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 473-484, 1998.

SATCHELL, A. C. et al. Treatment of dandruff with 5% tea tree oil shampoo. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, v. 47, n. 6, p. 852-855, 2002.

SCANNAPIECO, F. A.; BUSH, R. B.; PAJU, S. Associations between periodontal disease and risk for nosocomial bacterial pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease. A systematic review. **Ann Periodontol.**, Chicago, v. 8, n. 1, p. 54-69, 2003.

SCHAUDINN, C. et al. Bacterial biofilms, other structures seen as mainstream concepts. **Microbe Magazine.**, Washington DC, v. 2, n. 5, p. 231-237, 2007.

SCULLY, C.; GREENMAN, J. Halitology (breath odour: aetiopathogenesis and management). **Oral Dis.**, Houndmills, v. 18, n. 4, p. 333-45, 2012.

SEGUIN, P.; TANGUY, M.; LAVIOLLE, B.; TIREL, O.; MALLÉDANT, Y. Effect of oropharyngeal decontamination by povidone-iodine on ventilator-associated pneumonia in patients with head trauma. **Crit. Care Med.**, Philadelphia, v. 34, n. 5, p. 1514-1519, 2006.

SCHRAM, A. M. et al. Primary cutaneous *Candida tropicalis* infection in a patient with B-cell lymphoma. **Cutis**, New York, v. 93, n. 4, p. 204-206, 2014.

SHINOZAKI, S. Close association between oral *Candida* species and oral mucosal disorders in patients with xerostomia. **Oral Dis.**, Houndmills, v. 18, n. 7, p. 667-672, 2012.

SHRESTHA, A. et al. *In vitro* antifungal effect of mouth rinses containing chlorhexidine and thymol. **J Dent Sci.**, Taipei, v. 6, p. 1-5, 2011.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiol Rev.**, Washington DC, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

SILLANKORVA, S. et al. Bacteriophage phiS1 infection of *Pseudomonas fluorescens* planktonic cells versus biofilms. **Biofouling**, London, v. 20, p. 133-138, 2004.

SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiol Rev.**, Amsterdam, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

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

SILVA, S. et al. Biofilms of non-Candida albicans species: quantification, structure and matrix composition. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 47, n. 7, p. 681-689, 2009.

SILVERMAN, S.; EVERSOLE, L.R.; TRUELOVE, E.L. **Fundamentos de Medicina Oral**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SIMMONDS, R. S.; TOMPKINS, G. R.; GEORGE, R. J. Dental caries and the microbial ecology of dental plaque: a review of recent advances. **N Z Dent J.**, Dunedin, v. 96, n. 424, p.44-49, 2000.

SINGARAVELU, K.; GÁCSE, A.; NOSANCHUK, J. D. Genetic determinants of virulence - Candida parapsilosis. **Rev. Iberoam. Micol.**, Barcelona, v. 31, n. 1, p. 16-21, 2014.

SINGH, P. K. et al. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. **Nature.**, London, v. 417, n. 6888, p. 552-555, 2002.

SMITH, K.; HUNTER, I. S. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. **J Med Microbiol.**, Edinburgh, v. 57, n. 8, p. 966-973, 2008.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. **Periodontol 2000**, Copenhagen, v. 5, p. 7-25, 1994.

SOKOVIC, M.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, Agaricus bisporus. **Eur. J. Plant Path.**, Dordrecht, v. 116, p. 211-224, 2006.

SOTTILE, F. D. et al. Nosocomial pulmonary infection: possible etiologic significance of bacterial adhesion to endotracheal tubes. **Crit. Care Med.**, Philadelphia v. 14, n. 4, p. 265-270, 1986.

SREENIVASAN, P. K.; HARASZTHY, V. I.; ZAMBON, J. J. Antimicrobial efficacy of 0.05% cetylpyridinium chloride mouthrinses. **Lett Appl Microbiol.**, Oxford, v. 56, n. 1, p. 14-20, 2013.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, London, v. 358, n. 9276, p. 135-138, 2001.

STONECYPHER, K. Ventilator-associated pneumonia: the importance of oral care in intubated adults. **Crit. Care Nurs. Q.**, Cambridge, v. 33, n. 4, p. 339-347, 2010.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu Rev Microbiol.**, Palo Alto, v. 56, p. 187-209, 2002.

STRAUSBAUGH, L. Nosocomial respiratory infections. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. (Eds.). **Principles and practice of infectious diseases**. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. p. 3020-3027.

SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nat Rev Microbiol.**, London, v. 9, p. 737–748, 2011.

SUZUKI, L. C. Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans in vitro* para estudo da terapia fotodinâmica. 2009. 49f. **Dissertação** (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **Int J Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p.141–158, 1998.

TARAGHI, Z. et al. Evaluation of the Antibacterial Effect of Persica® Mouthwash in Mechanically Ventilated ICU Patients: A Double Blind Randomized Clinical Trial. **Middle East J Sci Res.**, Faisalabad, v. 10, n. 5, p. 631-637, 2011.

TEIXEIRA, C. S. et al. Medidas de prevenção pré e pós-exposição a acidentes pérfuro-cortantes na prática odontológica. **Rev. odonto ciênc.**, v. 23, n. 1, p. 10-14, 2008.

TENOVUO, J. Oral defense factors in the elderly. **Endod Dent Traumatol.**, Copenhagen, v. 8, n. 3, p. 93-98, 1992.

THOMPSON, G. R. et al. Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, St. Louis, v. 109, n. 4, p. 488-495, 2010.

TONG, M. M.; ALTMAN, P. M.; BARNETSON, R. S. Tea tree oil in the treatment of tinea pedis. **Aust. J. Dermatol.**, Sydney, v. 33, n. 3, p. 145-149, 1992.

TORTORANO, A. M. et al. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, Wiesbaden, v.23, n. 4, p. 317–322, 2004.

TROMBELLI, L. et al. Nondiseased cementum and dentin root surface following tetracycline hydrochloride conditioning: SEM study of effects of solution concentration and application time. **Int J Periodontics Restorative Dent.**, Chicago, v. 14, n. 5, p. 460-469, 1994.

TSONI, S. V.; BROWN, G. D. beta-Glucans and dectin-1. **Ann N Y Acad Sci.**, New York, v. 1143, p. 45-60, 2008.

TUAN, I. Z.; DENNISON, D.; WEISDORF, D. J. Pneumocystis carinii pneumonitis following bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant.**, v. 10, n. 3, p. 267-272, 1992.

TYC, K. M. et al. Assessing the advantage of morphological changes in *Candida albicans*: a game theoretical study. **Front. Microbiol.**, Lausanne, v. 5, n. 41, 2014.

URIBE, S.; RAMIREZ, J.; PENA, A. Effect of β -pinene on yeast membrane functions. **J Bacteriol.**, Washington, DC, v. 161, n. 3, p. 1195-1200, 1985.

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

VAHDATY, A.; PITT FORD, T. R.; WILSON, R. F. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules *in vitro*. **Endod Dent Traumatol.**, Copenhagen, v. 9, n. 6, p. 243-248, 1993.

VANDECANDELAERE, I. et al. Assessment of microbial diversity in biofilms recovered from endotracheal tubes using culture dependent and independent approaches. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 6, p. e38401, 2012.

VAZQUEZ, J. A. Optimal management of oropharyngeal and esophageal candidiasis in patients living with HIV infection. **HIV AIDS (Auckl)**, Auckland, v. 2, p. 89-101, 2010.

VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. Candidiasis. In: KAUFFMAN, C; DISMUKES, W. E.; PAPPAS, P. G.; SOBEL, J. D. **Clinical Mycology**. Nova York: Oxford University Press, 2 ed., cap. 11, 2010.

VAZQUEZ, J. A.; ZAWAWI, A. A. Efficacy of alcohol-based and alcohol-free melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole refractory oral candidiasis in patients with AIDS. **HIV Clin. Trials.**, St. Louis, v. 3, n. 5, p. 379-385, 2002.

VISSCHER, S. et al. Predicting pathogens causing ventilator-associated pneumonia using a Bayesian network model. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 62, n. 1, p. 184-188, 2008.

XU, J. et al. Clonal and spontaneous origins of fluconazole resistance in *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.**, Washingto, v. 38, n. 3, p. 1214-1220, 2000.

WADE, W. G.; ADDY, M. Antibacterial activity of some triclosan-containing toothpaste and their ingredients. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 63, n. 4, p. 280-282, 1992.

WANG, Y-C. et al. Essential functional modules for pathogenic and defensive mechanisms in *Candida albicans* infections. **Biomed Res Int.**, New York, 2014.

WATTANASATCHA, A.; RENGPIPAT, S.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. Thymolnanospheres as an effective anti-bacterial agent. **Int. J. Pharm.**, Dordrecht, v. 434, n. 1-2, p. 360-365, 2012.

WILLIS, A. M. et al. Oral candidal carriage and infection in insulin-treated diabetic patients. **Diabet. Med.**, Chichester, v. 16, n. 8, p. 675-679, 1999.

WILSON, L. S, et al. The direct cost and incidence of systemic fungal infections. **Value Health**, Malden, v. 5, n. 2, p. 26–34, 2002.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 39, n. 3, p. 309-317, 2004.

WHITE, T. C. Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. **Antimicrob Agents Chemother.**, Washington, v. 41, n. 7, p. 1482–1487, 1997.

YESILSOY, C. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. **J Endod.**, New York, v. 21, n. 10, p. 513-515, 1995.

ZEGARELLI, D. J. Fungal infections in the oral cavity. **Otolaryngol Clin North Am.**, v. 26, n. 6, p.1069–1089, 1993.

ZUR, K. B. Electron microscopic analysis of biofilm on endotracheal tubes removed from intubated neonates. **Otolaryngol Head Neck Surg.**, Rochester, v. 130, n. 4, p. 407-414, 2004.

Anexo I –

Quadro 7. *Quadro de probabilidade de DIMax associadas com os diferentes antissépticos e óleo de melaleuca e C. albicans e C. glabrata.*

fração	albicans L	glabrata L	albicans Me	glabrata Me	albicans Pg	glabrata Pg	albicans Px	glabrata Px
1/4	0,0554	0,3420	0,0002	0,0004	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1/8	0,6693	0,6169	0,0071	0,0153	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1/16	0,2540	0,0387	0,1068	0,2026	0,0005	0,0004	0,0001	0,0000
1/32	0,0193	0,0022	0,4780	0,5406	0,0049	0,0039	0,0007	0,0001
1/64	0,0016	0,0002	0,3174	0,1972	0,0309	0,0245	0,0042	0,0008
1/128	0,0002	0,0000	0,0770	0,0376	0,1770	0,1468	0,0295	0,0060
1/256	0,0000	0,0000	0,0112	0,0052	0,3891	0,3678	0,1319	0,0310
1/512	0,0000	0,0000	0,0021	0,0009	0,2983	0,3335	0,3779	0,1532
1/1024	0,0000	0,0000	0,0003	0,0002	0,0811	0,1000	0,3319	0,3922
1/2048	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0173	0,0218	0,1161	0,3787
1/4096	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0013	0,0077	0,0379

Legenda: L: Listerine®; Me: óleo de melaleuca; Pg: Periogard®; Px: Colgate Plax® Tea Fresh.

Anexo II –

Quadro 8. *Quadro de probabilidade acumulada de DIMax associadas com os diferentes antissépticos e óleo de melaleuca e C. albicans e C. glabrata.*

DIMax	albicans L	glabrata L	albicans Me	glabrata Me	albicans Pg	glabrata Pg	albicans Px	glabrata Px
1/4	0,0554	0,3420	0,0002	0,0004	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1/8	0,7247	0,9589	0,0073	0,0157	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1/16	0,9787	0,9976	0,1141	0,2183	0,0005	0,0004	0,0001	0,0000
1/32	0,9980	0,9998	0,5921	0,7589	0,0054	0,0043	0,0008	0,0001
1/64	0,9996	1,0000	0,9095	0,9561	0,0363	0,0288	0,0050	0,0009
1/128	0,9998	1,0000	0,9865	0,9937	0,2133	0,1756	0,0345	0,0069
1/256	1,0000	1,0000	0,9977	0,9989	0,6024	0,5434	0,1664	0,0379
1/512	1,0000	1,0000	0,9998	0,9998	0,9007	0,8769	0,5443	0,1911
1/1024	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9818	0,9769	0,8762	0,5833
1/2048	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9991	0,9987	0,9923	0,9620
1/4096	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

Legenda: L: Listerine®; Me: óleo de melaleuca; Pg: Periogard®; Px: Colgate Plax® Tea Fresh.