UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação de fatores de virulência e sensibilidade a antissépticos
bucais de espécies de *Candida* isoladas da saliva de pacientes com
próteses bucais**

Amir Horiquini Barbosa

Ribeirão Preto

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação de fatores de virulência e sensibilidade a antissépticos
buciais de espécies de *Candida* isoladas da saliva de pacientes com
próteses bucais**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título
de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientado: Amir Horiqini Barbosa

Orientador: Prof^a. Dra. Regina Celia Candido

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Biociências Aplicada à Farmácia em 07/08/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2015

BARBOSA, A. H.	<p>Avaliação de fatores de virulência e sensibilidade a antissépticos bucais de espécies de <i>Candida</i> isoladas da saliva de pacientes com próteses bucais</p>		<p>MESTRADO FCFRP- USP 2015</p>
-------------------	--	--	---

FICHA CATALOGRÁFICA

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 A FONTE.

Barbosa, Amir Horiqini.

Avaliação de fatores de virulência e sensibilidade a antissépticos bucais de espécies de *Candida* isoladas da saliva de pacientes com próteses bucais. Ribeirão Preto, 2015.

88 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Regina Celia Candido.

1. *Candida*. 2. Antissépticos bucais 3. Biofilme. 4. Proteinase. 5. Genes ALS2, ALS3, SAP1, SAP3.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Amir Horiqini Barbosa

Título: Avaliação de fatores de virulência e sensibilidade a antissépticos bucais de espécies de *Candida* isoladas da saliva de pacientes com próteses bucais.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicada à Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Regina Celia Candido

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico meu trabalho...

Dedico este trabalho a vocês que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e trabalharam muito para que eu pudesse realizá-los, meus pais, **Maria José Horiquni Barbosa** e **Amir Soares Barbosa**, que me incentivaram em todos os momentos, com o máximo de amor e carinho.

Ao meu irmão, **Everton Horiquni Barbosa**, grande amigo e que sempre torceu por mim, e me auxiliou em todos os momentos que mais tive dificuldade.

À minha irmã, **Tamiris Horiquni Barbosa**, que sempre esteve ao meu lado, nunca me deixando sozinho mesmo longe de casa.

E à minha namorada **Carla Carvalho**, pelo incentivo e amor. Obrigado pela paciência nos momentos que faltei.

Graças ao esforço paciência incentivo e amor de cada um deles, eu pude chegar até aqui, e não foi fácil.

Obrigado.

AGRADECIMENTOS

Início os agradecimentos por meus pais, que sempre primaram pela minha educação. Obrigado Maria José e Amir, por além de me oferecer a oportunidade de estudar, sempre foram presentes na minha vida, iluminando meus sonhos e guiando meus passos, sou muito feliz por isso.

Ao meu irmão e amigo Everton Horiquini Barbosa um exemplo de pessoa que sempre admirei, pela objetividade e foco.

Uma vez dentro da Universidade de Franca, algumas pessoas me convenceram a continuar os estudos após a graduação, mostrando-me a nobre função da pesquisa: Produzir novos conhecimentos. Os pesquisadores Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins e a Prof^a. Dra. Luciana Assirati Casemiro foram uma dessas pessoas, os pesquisadores personificados, sempre me induzindo a pensar criticamente. Obrigado pelas constantes demonstrações de sabedoria e humildade.

A minha orientadora Prof^a. Dra. Regina Celia Candido, por me receber em seu laboratório e pela confiança depositada em mim e no meu trabalho, pela paciência e principalmente pelos ensinamentos.

A Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira de Martinis e o Prof. Dr. Marco Aurélio Lavrador pelo apoio durante as aulas, me guiando na elaboração e expressão dos dados deste trabalho. Meu muito obrigado.

Estendo meus agradecimentos aos funcionários da FCFRP- USP, em especial: Joseane Cristina Ferreira, Henrique Theodoro e Solange Aparecida Fernandes Bocardo. Obrigado pela prontidão e ensinamento.

A todos os colegas de mestrado que conviveram comigo durante as disciplinas e principalmente aqueles que se tornaram, acima de tudo verdadeiro amigo: Ferdinando de Paula, Rafael Bonutti, Mariana Ducatti e Silvio Morato.

A CAPES pela bolsa concedida durante esse trabalho.

Agradeço também a USP, FCFRP e ao programa de Pós-graduação “Biociências Aplicadas à Farmácia”.

E a todos aqueles que contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

“Aquele que tiver paciência terá o que deseja. ”

Benjamin Franklin

RESUMO

BARBOSA, A. H. Avaliação de fatores de virulência e sensibilidade a antissépticos bucais de espécies de *Candida* isoladas da saliva de pacientes com próteses bucais 2015. 90f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

As espécies de *Candida* são patógenos oportunistas e as infecções nas cavidades bucais causadas por este gênero são comuns em pacientes com fatores predisponentes, entre eles imunossuprimidos, diabéticos e usuários de próteses dentais. No Brasil o índice de edentados é elevado sendo necessária a utilização de próteses bucais, que são locais favoráveis à colonização de microrganismos e o desenvolvimento de biofilme. A utilização de antissépticos como medida complementar na higiene oral é cada vez mais difundida. O objetivo deste trabalho foi detectar em amostras de *C. albicans* e *C. não-albicans*, isoladas da saliva de portadores de próteses bucais, os fatores de virulência, proteinase e biofilme e genes relacionados à proteinase (SAP1, SAP3) e à adesão (ALS1 e ALS3) e avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de três formulações comerciais à base de clorexidina 0,12%, cetilpiridínio 0,07% e 0,075% frente aos isolados de *Candida* e biofilmes. Foram coletadas amostras de saliva de 70 pacientes usuários de próteses bucais. As leveduras foram isoladas em meio de CHROMagar® *Candida* e identificadas pela metodologia clássica e a confirmação de *C. albicans* por biologia molecular (PCR). Leveduras do gênero *Candida* foram isoladas de 32 (45,7%) amostras. Destas foram identificadas: *C. albicans* (29), *C. krusei* (5), *C. glabrata* (4), *C. tropicalis* (3) e *C. parapsilosis* (2), totalizando 43 leveduras entre monoculturas e culturas mistas. Os genes pesquisados foram detectados somente em amostras de *C. albicans*, os genes ALS2, ALS3 e SAP3 foram identificados em 86% dos isolados e o SAP1 em 93%. A atividade de proteinase entre os dos isolados de *C. albicans* foi de 72,4% e entre das espécies de *C. não-albicans* 35,7%. A de formação de biofilme sobre placas de 96 poços, e após coloração com XTT, demonstrou que a maioria dos isolados de *Candida* e todas as culturas mistas desenvolveram biofilmes em 24 horas. A atividade de três antissépticos frente as leveduras foi de $\leq 1,25\%$, equivalente a uma diluição de 1:80 do antisséptico. Concluímos os três antissépticos também foram eficazes frente aos biofilmes de monoculturas e culturas mistas, as cepas de *C. albicans* continua sendo a espécie prevalente na cavidade bucal, os genes SAP1, SAP3, ALS2 e ALS3 estão presentes na maioria dos isolados de *C. albicans*, nestas amostras a maioria foram proteinase e biofilme positivos. A atividade de proteinase foi superior nas espécies de *C. albicans* em comparação com *C. não-albicans*. Os biofilmes das espécies de *Candida* quando formados em culturas mistas se desenvolvem mais em comparação com a formação de biofilme em monocultura. As três formulações de antissépticos foram eficazes contra todos isolados de leveduras em forma planctônica e na maioria dos biofilmes.

Palavras chave: *Candida*, antissépticos bucais, biofilme, proteinase, genes ALS2, ALS3, SAP1, SAP3.

ABSTRACT

BARBOSA, A. H. Evaluation of virulence factors and susceptibility to mouthwashes of *Candida* species isolated from saliva of patients with oral prostheses 2015. 90f. Dissertation (Master's Degree) - Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Candida species are opportunistic pathogens and infections in the oral cavity caused by these yeasts are common in patients with predisposing factors, such as diabetic or immunocompromised individuals with dental prosthesis. In Brazil, the number of toothless patients is high and the use of dental prosthesis is common, which represents a niche for colonization and formation of microbial biofilms in the oral cavity. The use of mouthwashes to aid in the oral hygiene has increased. The objective of this research was to isolate *C. albicans* and *C. non-albicans* from saliva of dental prosthesis users and to evaluate the isolates for the presence of virulence factors, proteinase production, biofilm formation and to search for genes encoding for proteinases (SAP1, SAP3) and adhesion factors (ALS1 and ALS3). Another objective was to evaluate *in vitro* the antifungal activity of three commercial mouthwashes containing 0.12% chlorhexidine and 0.07% or 0.075% cetylpyridinium, against planktonic *Candida* sp. cultures and in biofilms. Saliva samples of 70 patients with dental prosthesis were collected, the yeasts were isolated on CHOMagar® *Candida* and identified by classical biochemical tests combined with molecular test (PCR) for confirmation of *C. albicans*. Yeasts of *Candida* genus were isolated from 32 samples (45.7%) and were identified as *C. albicans* (29), *C. krusei* (5), *C. glabrata* (4), *C. tropicalis* (3) and *C. parapsilosis* (2), with a total of 43 yeasts, including mono and mixed cultures. The genes studied were detected only in *C. albicans*: ALS2, ALS3 and SAP3 genes were detected in 86% of the isolates and SAP1 in 93%. The proteinase activity among the isolates of *C. albicans* was 72.4% and among the species of *C. non-albicans* it was 35.7%. Assay done with cultivation in 96-wells microplates and staining with XTT, showed the majority of *Candida* isolates and all the mixed cultures were able to form biofilms within 24h. The activity of the three mouthwashes towards the yeasts was $\leq 1.25\%$, equivalent to a dilution of 1:80 of the formulation. The three mouthwashes tested were also active against mono or multispecies biofilms. In conclusion, it was shown *C. albicans* is the most prevalent species. The genes SAP1, SAP3, ALS2 and ALS3 are present in the majority of *C. albicans* isolates, which were also positive for proteinase and biofilm formation. There was more proteinase activity in *C. albicans* in comparison with *C. non-albicans*. The biofilms of *Candida* species grew better in mixed cultures than in monoculture. The three commercial mouthwashes formulations were effective against all the yeast isolates in planktonic growth and they also inhibited the majority of yeasts in biofilm. Future work is needed to completely elucidate the role of *Candida* species in biofilms of oral cavity. It is also interesting to propose studies to standardize sensitivity tests for mono and multi-species biofilms.

Keywords: *Candida*, mouthwashes, biofilm, proteinase, genes SAP1, SAP3, ALS2, ALS3,

BARBOSA, A. H. Avaliação de los factores de virulência y sensibilidad a los antisépticos bucales de las especies de *Candida* aisladas de la saliva de pacientes con prótesis bucales 2015. 90f. Disertación (Maestría) – Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Las especies de *Candida* son patógenos oportunistas y las infecciones en las cavidades bucales causadas por este género, son comunes en pacientes con factores predisponentes, entre ellos inmunosuprimidos y diabéticos, usuarios de las prótesis dentales. En Brasil el índice de desdentados es elevado siendo necesaria la utilización de prótesis bucales, que son locales favorables a la colonización de microorganismos y el desarrollo de biofilmes. La utilización de antisépticos como medida complementaria de higiene oral es cada vez más difundida. El objetivo de este trabajo fue detectar en las muestras de *C. albicans* y *C. no-albicans*, aisladas de la saliva de los portadores de prótesis bucales, los factores de virulencia, proteinasa y biofilme y genes relacionados a la proteinasa (SAP1, SAP3) y a la adhesión (ALS1 y ALS3) y evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de tres formulaciones comerciales a base de clorexidina 0,12%, cloruro de cetilperidinio 0,07% y 0,075% frente a los aislados de *Candida* y los biofilmes. Fueron colectadas muestras de saliva de 70 pacientes usuarios de prótesis bucales. Las levaduras fueron aislados en medio de CHROMagar® *Candida* e identificadas por la metodología clásica de confirmación de *C. albicans* por biología molecular (PCR). Levaduras del género *Candida* fueron aislados de 32 (45,7%) muestras. De estas fueron identificadas: *C. albicans* (29), *C. krusei* (5), *C. tropicalis* (5), *C. parapsilosis* (2), totalizando 43 levaduras entre monocultivos y cultivos mixtos. Los genes investigados fueron detectados solamente en muestras de *C. albicans*, los genes ALS2, ALS3 y SAP3 fueron identificados en 86% de los aislados y el SAP1 en 93%. La actividad de la proteinasa entre los aislados de *C. albicans* fue de 72,4% y entre las especies de *C. no-albicans* 35,7%. La formación de biofilme sobre las placas de 96 pozos, y después de la coloración con XTT, demostró que la mayoría de los aislados de *Candida* y todos los cultivos mixtos desarrollaron biofilmes en 24 horas. La actividad de tres antisépticos frente las levaduras fue de $\leq 1,25\%$, equivalente a una dilución de 1:80 de antiséptico. Los tres antisépticos también fueron eficaces frente a los biofilmes de monocultivos y cultivos mixtos. Concluimos que *C. albicans* continúa siendo la especie prevalente. Los genes SAP1, SAP3, ALS2 y ALS3 están presente en la mayoría de los aislados de *C. albicans*, en estas muestras la mayoría fueron proteinasa y biofilme positivos. La actividad de proteinasa fue superior en las especies de *C. albicans* en comparación con *C. no-albicans*. Los biofilmes de las especies de *Candida* cuando formados en cultivos mixtos se disuelven más en comparación con la formación de biofilme en monocultivo. Las tres formulaciones de antiséptico fueron eficaces contra todos los aislados de levaduras en forma planctónica y en la mayoría de los biofilmes. Trabajos futuros son necesarios para elucidar completamente cómo todas las especies de *Candida* pueden actuar dentro de los biofilmes en la cavidad oral. También son necesarios estudios de estandarización de las pruebas de sensibilidad frente al biofilme en monocultivos y cultivos mixtos.

Palabras clave: *Candida*, antisépticos bucales, biofilme, proteinasa, genes, SAP1 SAP2, ALS2, ALS3.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Fluxograma da metodologia de formação de biofilme.....	40
FIGURA 2.	Confirmação dos isolados de <i>C. albicans</i> por reação da cadeia de polimerase (PCR).....	43
FIGURA 3.	Fragmento do gene ALS2 isolados de <i>Candida</i> obtidos após eletroforese em gel de agarose dos produtos por reação da cadeia de polimerase (PCR) com <i>primers</i> específicos. O primeiro poço da extremidade esquerda mostra o marcador de peso molecular (M) – 100pb.....	44
FIGURA 4.	Fragmento do gene ALS3 isolados de <i>Candida</i> obtidos após eletroforese em gel de agarose dos produtos por reação da cadeia de polimerase (PCR) com <i>primers</i> específicos O primeiro poço da extremidade esquerda mostra o marcador de peso molecular (M) – 100pb.....	44
FIGURA 5.	Fragmento do gene SAP1 isolados de <i>Candida</i> obtidos após eletroforese em gel de agarose dos produtos por reação da cadeia de polimerase (PCR) com <i>primers</i> específicos O primeiro poço da extremidade esquerda mostra o marcador de peso molecular (M) – 100pb	45
FIGURA 6.	Fragmento do gene SAP3 isolados de <i>Candida</i> obtidos após eletroforese em gel de agarose dos produtos por reação da cadeia de polimerase (PCR) com <i>primers</i> específicos O primeiro poço da extremidade esquerda mostra o marcador de peso molecular (M) – 100pb	45
FIGURA 7.	Formação de biofilme de 24h de monoculturas e culturas mistas isoladas do mesmo paciente.....	47
FIGURA 8.	Ação dos antissépticos sobre biofilmes de <i>C. albicans</i>	49
FIGURA 9.	Ação dos antissépticos sobre biofilmes de <i>C. não-albicans</i>	49
FIGURA 10.	Ação dos antissépticos sobre biofilmes de cultura mistas.....	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Espécies de <i>Candida</i> isoladas de saliva de pacientes usuários de próteses bucais.....	43
TABELA 2.	Atividade da enzima proteinase entre as espécies de <i>Candida</i> isoladas de saliva de pacientes usuários de próteses bucais.....	46
TABELA 3	Atividade metabólica do biofilme de 24h de monoculturas de <i>Candida</i> ssp. isoladas da saliva de portadores de próteses bucais.....	46
TABELA 4.	Desenvolvimento de biofilme de 24h entre as espécies de <i>Candida</i> isoladas de saliva de paciente usuários de próteses bucais.....	46
TABELA 5.	Perfil de sensibilidade dos antissépticos bucais frente as espécies de <i>Candida</i> isoladas de saliva de pacientes usuários de próteses bucais.....	48

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1.	<i>Primers</i> utilizados para confirmação molecular das amostras.....	38
QUADRO 2.	Condições de PCR para amplificação dos fragmentos de DNA para identificação de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>	38
QUADRO 3.	<i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR para pesquisa dos genes SAP1, SAP3, ALS2 e ALS3.....	38
QUADRO 4.	Condições de PCR para amplificação dos fragmentos dos genes relacionados a adesão e atividade enzimática.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ALS	<i>Agglutinin-Like Sequence</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CCP	Cloreto de cetilpiridínio
CHX	Gluconato de clorexidina
CIM	Concentração inibitória mínima
DIM	Diluição inibitória máxima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
D.O.	Densidade Ótica
EDTA	<i>Ethylene diamine tetraacetic/</i> Ácido etileno diamino tetracético
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
LaPeMA	Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada
LSD	<i>Least Significant Difference</i>
M	Molar
Meio C	Meio para assimilação de fontes de carbono
Meio N	Meio para assimilação de fontes de nitrogênio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mmol	Milimol
MOPS	Acido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standarts</i>
Nm	Nanômetro
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polymerase
pH	Potencial hidrogeniônico

RNAase	Enzima que catalisa hidrolise de RNA
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAP	Aspartil proteases
SDA	Sabouraud dextrose ágar
TBE	Tris-Borato-EDTA
UFC	Unidade formadora de colônia
UNIFRAN	Universidade de Franca
USP	Universidade de São Paulo
YPD	Meio de cultura a base de extrato de levedura, peptona e dextrose.
XTT	<i>2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide</i>
µL	Micro litro

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
RESUMEN	III
Lista de Figuras	IV
Lista de Tabelas	V
Lista de Quadros	VI
Lista de Abreviaturas e Siglas	VII
1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	32
2.1. Objetivo Geral	33
2.2. Objetivos Específicos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Amostras clínicas	35
3.2. Isolamento de Leveduras.....	35
3.3. Identificação Clássica das Leveduras	35
3.3.1. Micromorfologia em Ágar Tween-80	35
3.3.2. Assimilação de Fontes de Carbono (Auxanograma)	36
3.3.3. Fermentação de Carboidratos (Zimograma)	36
3.4. Identificação Molecular e Pesquisa dos Genes Relacionados a Proteinase e Aderência.....	36
3.4.1. Extração de DNA	36
3.4.2. Reação da Cadeia de Polimerase.....	37
3.4.2.1. Confirmação Molecular.....	37
3.4.2.2. Pesquisa de Genes Relacionados à Proteinase e Aderência	38
3.5. Avaliação de Proteinase	39
3.6. Formação de Biofilme	39
3.7. Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM).....	40
3.8. Atividade dos Antissépticos sobre biofilmes	41
4. RESULTADOS	42
4.1. Espécies isoladas	43

4.2. Confirmação Molecular.....	43
4.3. Genes Relacionados à Aderência e Atividade Enzimática.....	44
4.4. Atividade da Enzima Proteinase.....	45
4.5. Formação de Biofilme	46
4.6. Avaliação de Antissépticos Bucais Frente às Espécies de <i>Candida</i>	48
4.6.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	48
4.6.2. Ação de Antissépticos Bucais em Biofilme de <i>Candida</i> spp.	48
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
APÊNDICES	73

Estimativas indicam que existem cerca de 8,7 milhões de espécies eucarióticas no planeta e o reino *Fungi* é constituído por aproximadamente 611.000 espécies, e destas espécies cerca de 600 são patógenos humanos (MORA et al., 2011). Pertencente a estes se destaca o gênero *Candida*, composto por leveduras com capacidade de adaptar e resistir em diversos ambientes biológicos, fazendo parte da microbiota normal humana (WILLIAMS et al., 2013). Dentre as regiões anatômicas do corpo humano colonizadas, a cavidade bucal é a que possui maior índice de colonização por microrganismos (TAKAHASHI, 2005).

As espécies de *Candida* são classificadas e definidas como patógenos oportunistas, estão bem adaptados ao corpo humano e são capazes de colonizá-lo sem produzir sinais de doenças. Habitam a cavidade bucal humana como comensais entre 40% a 60% da população dependendo do grupo estudado (SAMARANAYAKE et al., 2009). Estas espécies também estão presentes em outros habitats, tais como da mucosa vaginal e o sistema digestório (BERMAN; SUDBERY, 2002; FERRAZZA et al., 2005).

O gênero *Candida* é composto por um grupo heterogêneo de aproximadamente 200 espécies e em torno de 20 estão associadas com candidíase em humanos sendo prevalentes *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (REES et al., 1988; WILLIAMS et al., 2013; KAUSTZKY; STAUDINGER; PRESTEL, 2014).

As infecções causadas pelo gênero *Candida* na cavidade bucal, são definidas como Candidíase bucal. São reconhecidas quatro variações clinicamente distintas: candidíase aguda eritematosa, pseudomembranosa, eritematosa crônica e candidíase hiperplásica crônica (WILLIAMS et al., 2013).

O Brasil ainda é um país com elevado índice de edentados, segundo o levantamento nacional realizado em 2010 pelo Ministério de Saúde, estima que entre os adolescentes, 13,7% necessitam de próteses em um ou nos dois maxilares, enquanto que entre os adultos este percentual é de aproximadamente 5 vezes mais alto e entre os idosos 23,9% necessitam de prótese total em pelo menos um maxilar (BRASIL, 2011).

As próteses são constituídas principalmente de resina acrílica e elas são locais favoráveis a colonização de microrganismos. Traumatismos ocasionados por próteses mal adaptadas, higiene bucal inadequada, dimensões verticais impróprias, são fatores que associam a processos patológicos na cavidade bucal. Dentre os microrganismos que habitam a boca, *C. albicans*, merece especial atenção pela sua relativa prevalência, com forte representatividade associada a próteses dentárias, principalmente próteses totais (FALCÃO; SANTOS; SAMPAIO, 2004).

Candido; Azevedo; Ito, (1995), analisando material biológico de pacientes usuários de próteses dentárias, verificaram que 72% das amostras de dentaduras e 68% das amostras de saliva foram positivas para espécies de *Candida*.

Teixeira e Mezzari (2005) avaliaram a presença de espécies de *Candida* em amostras coletadas de próteses dentárias, observaram que 84% das amostras albergavam *Candida*, sendo que em 58% dos pacientes foi isolada *C. albicans* e 26% *Candida* spp.

Melo et al. (2013), avaliaram a incidência de *Candida* spp. em usuários de prótese total ou parcial. Dos pacientes avaliados 92,3% apresentaram lesões da mucosa associado ao uso de prótese, verificaram que 36% dos pacientes apresentavam associação de *C. albicans* e *C. tropicalis*, 32% foram positivos para *C. albicans*, 28% para *C. tropicalis* e em 4% observaram colonização mista com *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

A virulência de leveduras do gênero *Candida*, é uma propriedade de vários fatores como: aderência em células da mucosa, dimorfismo, formação de biofilme e produção de enzimas, principalmente proteinase aspártica e fosfolípase (FOOTEDAR; AL-HEDAITHY, 2005; ABACI, 2011).

Para se desenvolver com sucesso no hospedeiro, como comensal ou como agente patogênico, as espécies de *Candida* têm que aderir e em seguida colonizar a superfície. Estas superfícies podem ser de biomateriais, como por exemplo, o acrílico de uma prótese, ou superfície da mucosa (WILLIAMS et al., 2013).

Vários estudos clínicos têm sugerido a correlação entre colonização e aderência *in vitro*, consequentemente a invasão de espécies de *Candida* parece ser refletido na capacidade de aderir que cada espécie tem no tecido do hospedeiro (HOSTETTER, 1994), sendo a aderência considerada como o primeiro passo do estabelecimento da colonização e parece ser modulada por uma série de adesinas que são expressas na superfície da parede celular (MENDES-GIANINNI et al., 2005; TRONCHIN et al., 2008).

Os patógenos fúngicos exibem uma grande variedade de adesinas que são expressos na sua superfície celular. Quando integrado no hospedeiro, são capazes de aderir a uma grande variedade de tipos de células, e de interagir com diversos ligantes presentes em diferentes sítios do hospedeiro, como fluidos biológicos, matriz extracelular ou membranas basais (TRONCHIN et al., 2008).

A parede celular fúngica é uma organela dinâmica que funciona em inúmeros processos importantes, além de manter a forma e a integridade celular frente ao estresse ambiental,

permite interagir com o seu ambiente. É constituída de polissacáridos e glicoproteínas, principalmente glicano e quitina. Componentes adicionais menores da parede celular estão presentes e variam entre espécies fúngicas (BOWMAN; FREE, 2006). Cada espécie tem polímeros únicos de glicano e proteínas, interligados uns aos outros dentro da parede celular. As proteínas da parede celular são altamente glicosiladas e carregadas negativamente, afetando fortemente a carga eletrostática, também contribuindo para a hidrofobicidade da superfície celular, o que é importante para a aderência aos biomateriais (TRONCHIN et al., 2008).

A composição da parede celular está sujeita a modificações e pode variar dentro de um único isolado de fungo, dependendo das condições e da fase de crescimento. As glicoproteínas, glicanos e quitinas são componentes extensivamente reticulados em conjunto para formar uma rede complexa, que constitui a base estrutural da parede celular (BOWMAN; FREE, 2006).

As duas principais classes de proteínas da parede celular são as proteínas GPI (glicosilfosfatidilinositol) entre elas as adesinas Als1p e Als3p, que estão localizados na camada externa da parede celular e ligadas a outros componentes como os β -glicanos, as proteínas codificadas por membros da família dos genes PIR (proteínas com repetições internas), que estão distribuídas uniformemente ao longo da camada interna da parede celular e ligado de forma covalente a β -1,3-glicanos (TRONCHIN et al., 2008).

Há potencialmente 16 diferentes proteínas Als que podem ser expressas em algumas células em diferentes *locus* sob diferentes condições (KLOTZ; LIPKE, 2010), segundo Garcia; Lipke; Klotz, 2013, existem 8 diferentes proteínas Als localizadas na superfície das células leveduriformes e hifas de *C. albicans*.

A aderência é uma propriedade intrínseca de todas as proteínas Als. No entanto, os diferentes membros da família de proteínas Als, promovem vários modos de aderência como, aderência por si só, tanto a aderência e agregação, ou somente agregação (KLOTZ; LIPKE, 2010).

Estas propriedades são importantes para a sobrevivência da *C. albicans* como comensal, incluindo a formação de biofilme, resistindo a lise celular, e também na patogênese da candidíase, essas múltiplas atividades fazem estas proteínas (Als) verdadeiros adesivos biológicos (KLOTZ; LIPKE, 2010).

Lyon e Resende (2007), observaram a capacidade de aderência de isolados de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* obtidos da cavidade bucal de pacientes usuários de próteses dental com e sem sinais de candidíase. Concluíram que as espécies isoladas dos pacientes com sinais

clínicos de candidíase aderiram mais intensamente nos ensaios com células epiteliais que aqueles provenientes de pacientes sem sinais de candidíase.

As enzimas representam um dos fatores de virulência dos fungos, possivelmente por facilitar sua penetração nos tecidos. As principais enzimas secretadas por espécies de *Candida* são proteinases aspárticas, fosfolípase, lipase entre outras.

As aspartil proteinases de *C. albicans* são codificadas por dez genes (SAP1-SAP10) (NAGLIK, 2004; SILVA; NERY; DIAS, 2014). A presença dos genes da família SAP na *C. albicans* fornece claramente a levedura um sistema proteolítico eficiente e flexível que pode ser fundamental para o seu desenvolvimento como comensal ou patogênico. Além disso, a produção de SAP é um processo altamente regulado e interligado a complexa co-regulação da transcrição com outros fatores de virulência de *Candida* e com múltiplas funções das proteases *in vivo*, isso parece ser um fator central em muitos aspectos da virulência de *C. albicans*, sendo indicativo das múltiplas funções que esta família de genes possui. Entre eles destaca a digestão de moléculas para aquisição de nutrientes, a contribuição para realização da invasão tecidual por danos nas membranas das células do hospedeiro, degradação de moléculas da superfície do hospedeiro para aumentar a aderência, e a digestão de células e moléculas do sistema imunológico para evitar ou resistir ao ataque de antimicrobianos (HUBE; NAGLIK, 2001). Também a produção de SAP está associada a outros atributos de virulência incluindo a formação de hifas e mudança fenotípica, formação de biofilme que evidenciam a complexidade da interação de *C. albicans* com o hospedeiro (NAGLIK et al., 2004).

A secreção de proteinase aspártica (Sap) é considerado um dos fatores mais importantes por estarem associados a aderência, invasão e danos nos tecidos (SILVA; NERY; DIAS, 2014).

As proteases são classificadas com base em seu mecanismo catalítico sendo distinguido em quatro classes de proteinases: serina, cisteína, metalo e aspartil proteinases (NAGLIK, et al., 2004).

In vitro, a produção de protease é observada em meios de cultura contendo proteína exógena como única fonte de nitrogênio, a albumina bovina (BSA) é mais utilizada, outras proteínas ou misturas de peptídios como peptona e triptona também são indicadas (DOSTAL; HAMAL; PAVLIKOWA, 2003). A produção de protease é analisada através da formação de um halo translúcido ao redor da colônia.

As proteinases foram descritas por Staib, o qual formulou um meio nutritivo sólido contendo albumina humana e pH 4,2 para observar a ação proteolítica de cultivos de *C. albicans* (STAIB, 1966).

Remold, Fasold e Staib (1968), purificaram e caracterizaram uma enzima proteolítica de *C. albicans*, cujo pH ótimo de atividade era de 3,2. Atribuíram importância a essa enzima, afirmando que apenas as amostras proteolíticas dessa levedura provocavam infecções extensas quando inoculadas em camundongos.

Candido (2000), observou a presença da enzima proteinase em meio BSA na maioria dos isolados de *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.glabrata* e *C.parapsilosis* isoladas de biofilmes de próteses dentais bucais, tendo detectado pelo menos em uma cepa altamente produtora da enzima.

Kumar et al. (2006), avaliaram a presença de protease em meio de BSA em isolados de *C. albicans* e *C. não-albicans* presentes da cavidade bucal de pacientes imunocomprometidos (HIV e câncer), e constaram que 94,1% de *C. albicans* apresentaram atividade e as *C. não-albicans* demonstraram atividade em 70,3% para proteinase.

Costa et al. (2009), analisaram proteinase de leveduras isoladas de salivas de pacientes, com evidência clínica de candidíase bucal, e de indivíduos sem qualquer lesão bucal. Concluíram que todos os isolados de *C. albicans* dos dois grupos mostraram atividade para aspartil proteinase em contraste, somente a metade (8) dos isolados de *C. tropicalis* apresentou atividade. A atividade de aspartil proteinase secretada foi fortemente positiva na maioria dos isolados de *C. albicans* e na minoria dos isolados de *C. tropicalis*.

Costa et al. (2010), avaliaram a atividade de proteinase, em meio de BSA, de espécies de *Candida* isoladas da cavidade bucal de paciente infectados com HIV. Observaram que 93,5% e 44,4%, respectivamente, dos isolados de *C. albicans* e de outras espécies de *Candida* apresentaram atividade da enzima e dentre as não *albicans*, *C. parapsilosis* apresentou maior percentual de cepas produtoras desta enzima.

De isolados de outros sítios anatômicos as espécies de *Candida* têm demonstrado percentuais variados de positividade para proteinase. Riceto et al. (2015), avaliaram a atividade de proteinase de cepas de *C. albicans* (15), *C. tropicalis* (15), *C. parapsilosis* (10), *C. glabrata* (5) e *C. krusei*(5) isoladas de materiais clínicos (sangue, líquido sinovial e líquido peritoneal), utilizando meio BSA, observaram que 38% das cepas demonstram atividade proteolítica, dos 10 isolados da espécie *C. parapsilosis*, 80% apresentaram atividade, seguido de 46% da espécie

C. tropicalis e 26% para *C. albicans*, as outras espécies avaliadas não apresentaram atividade de proteinase.

Biofilmes são comunidades microbianas altamente estruturadas, envolvidas por uma matriz extracelular e aderidas a uma superfície. São encontrados na natureza ou em dispositivos médicos de longa permanência, tecidos vivos, tais como o esmalte dos dentes, válvulas do coração, ou do pulmão e ouvido médio. As vantagens de um microrganismo dentro do biofilme incluem a sua proteção com relação ao meio ambiente, a resistência do estresse físico e químico, a cooperação metabólica, e regulação comunitária da expressão dos genes (COSTERTON, et al., 1995; DONLAN, 2001).

Inicialmente, as observações de biofilmes foram realizadas por Antonie van Leuwenhoek em 1683 usando um microscópio rudimentar e material biológico obtido de raspado do seu próprio dente (COSTERTON; WILSON, 2004). Em 1943 Zobell descreveu a aderência de bactérias marinhas em diferentes tipos de matérias sólidas submersas, incluindo casco de navio, vidros, metais e plásticos. Segundo Donlan (2001), os estudos científicos de biofilme, emergiram gradualmente porém de forma considerável partir dos anos 80.

Nos últimos anos, tem sido evidenciada a relevância que os biofilmes de fungos desempenham nas doenças humanas. São de grande importância para a saúde pública, porque o microrganismo associado ao biofilme diminuiu drasticamente a sensibilidade a agentes antimicrobianos. Muitas infecções da corrente sanguínea e infecções do trato urinário estão associadas a dispositivos médicos de longa permanência e na maioria dos casos associados ao biofilme (DONLAN, 2001). As infecções fúngicas são muitas vezes difíceis de diagnosticar e tratar, e levam a altas taxas de mortalidade, além disso, a capacidade dos fungos em formar biofilmes confunde ainda mais e dificulta o tratamento clínico (RAMAGE, et al., 2009).

A formação de biofilme *in vitro* é comumente utilizada para estudar a estrutura e a sensibilidade de microrganismos a antifúngicos. Chandra et al. (2001), descreve a formação *in vitro* de biofilmes de *C. albicans* em três fases distintas: A fase precoce (0-11h) caracterizada pela aderência e desenvolvimento de blastoconídios em microcolônias distintas, intermediária (12-30h) evidenciada pela presença de material predominantemente não celular constituído por polissacarídeos semelhantes aos da parede celular e a fase de maturação (38-72h) caracterizada pelo aumento do material extracelular, encapsulando completamente a comunidade de *C. albicans*.

Pires et al. (2011), utilizando a metodologia descrita por Pierce et al. (2008), com modificações avaliou a atividade de formação de biofilme de *C. parapsilosis* (53) e *C. ortopsilosis* (47), isoladas de sistemas de águas de aparelhos de hemodiálises. Observaram que 72% destas leveduras produziram biofilme.

Sanchez-Vargas et al. (2013), isolaram espécies de *Candida* da cavidade bucal, de pacientes usuários de dentadura e quantificaram a formação de biofilme em três tempos diferentes (6, 12 e 24 h), observaram que *C. albicans* e *C. tropicalis*, apresentaram formação moderada de biofilme enquanto *C. glabrata* foi altamente produtora de biofilme.

A formação do biofilme dentário pode ser considerada natural, mas a falta de higiene bucal adequada pode acarretar em um acúmulo não compatível com a saúde bucal. Nestes locais susceptíveis podem ocorrer cárie dentária e doença periodontal. Em muitos indivíduos, o método habitual de escovação geralmente é insuficiente. É aceitável que o desenvolvimento do biofilme poderia ser afetado se a aderência e crescimento dos primeiros colonizadores fossem inibidos por agentes antimicrobianos (MARSH, 1992).

Existem quatro mecanismos principais para o controle de placa. Em primeiro lugar, reduzir a taxa de acúmulo de nova placa, mantendo o equilíbrio relativo das espécies individuais compatíveis com aquele associado com a saúde. Em segundo lugar, reduzir ou remover a placa existente. Terceiro, suprimir seletivamente o crescimento das espécies associadas com a doença e em quarto lugar, inibir a produção de fatores de virulência (por exemplo, proteases, citotoxinas). No entanto, também é essencial que estes agentes não desequilibrem a ecologia de forma, a induzir mudanças indesejáveis na composição da microbiota residente bucal. Estas restrições limitam a escolha de agentes antimicrobianos que podem ser consideradas para o uso regular sem prescrição (MARSH, 1992).

Enxaguatórios bucais tem sido usado por séculos para refrescar o hálito (ADAMS; ADDY, 1994). São recomendados para o controle da microbiota bacteriana, controle da placa e da gengivite, mas nem todos os dentistas reconhecem a importância do seu uso (GARROTE et al., 2014).

A composição básica de um antisséptico bucal não é complexa, apresenta um veículo (água, álcool ou glicerina), agentes flavorizantes e 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).

O gluconato de clorexidina (CHX) é um detergente catiônico, um biguanida não tóxica disponível principalmente na forma de sais de digluconato (GEBRAM; GERBERT, 2002). Age principalmente sobre bactérias gram-positivas e leveduras. É absorvida pela parede celular dos microrganismos causando quebra dos componentes intracelulares, e em baixas concentrações tem ação bacteriostática. O uso da clorexidina pode ser fortemente considerado como agente preventivo em indivíduos infectados pelo HIV ou colonizados pelo gênero *Candida* (BEVILACQUA; HABITANTE; CRUZ, 2004, BARASCH et al., 2004). É um dos biocidas mais utilizados em formulações antissépticas, entre elas o Periogard® (Colgate, São Paulo Brasil). É empregada em várias especialidades da odontologia por ser um potente agente antimicrobiano.

O cloreto de cetilpiridínio (CCP), composto de amônia quaternário, é amplamente utilizado em antissépticos bucais entre eles Plax *Soft Mint* (Colgate®) e Oral B® (Pró-saúde). O cloreto de cetilpiridínio é um agente catiônico tensoativo, que favorece sua atração sobre as superfícies dos dentes e da placa e altera a tensão superficial. É efetivo contra bactérias Gram positivas e leveduras, provocando o rompimento da parede celular (GEBRAM; GERBERT, 2002). Sais a base de metais pesados, com fluoreto de sódio, lactato de zinco foram incluídos respectivamente nas duas formulações descritas acima, por possuírem atividade antibacteriana.

Candido; Azevedo e Ito (1996), avaliaram a concentração inibitória mínima (CIM) de três antissépticos comerciais (Cepacol®, Malvona® e Periogard®) frente a cepas de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal. Concluíram que os antissépticos testados foram eficazes *in vitro* em concentrações menores as recomendadas para o uso.

Toti- Rodrigues em 2008 avaliou a suscetibilidade *in vitro* de leveduras do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*) frente a 7 formulações comerciais de antissépticos bucais (Listerine®, Malvatricin® Dentes sensíveis, Noplak® Max, Oral B®, Periogard®, Plax®, Reach® através da metodologia de concentração inibitória mínima (CIM). Concluiu que todos os antissépticos bucais avaliados apresentaram ação fungistática e fungicida satisfatória, frente às espécies de *Candida*, a maioria dos antissépticos apresentou ação *in vitro* em concentrações de 1,25%.

Fathilah et al. (2012), realizaram teste de sensibilidade com amostras de *C. tropicalis* e *C. krusei* isoladas da cavidade bucal, frente a antissépticos contendo digluconato de clorexidina, cloreto de cetilpiridínio, e formulações contendo ambos. Concluíram que clorexidina se mostrou mais efetiva *in vitro* sobre *C. tropicalis* e cloreto de cetilpiridínio para *C. krusei*. As formulações mistas, também foram eficazes para ambas as espécies.

As metodologias usadas nos testes de suscetibilidade aos antifúngicos baseiam na utilização de populações planctônicas e não permitem uma previsão da eficácia de drogas contra biofilmes. Os níveis elevados de resistência tipicamente associados a biofilmes em comparação com populações planctônicas, ressaltam a importância do desenvolvimento de ensaios padronizados para analisar susceptibilidades antifúngicas de biofilmes e permitir estudos sistemáticos para determinar a eficácia de diferentes agentes antifúngicos. As bactérias e os fungos foram reportados como sendo até 1000 vezes menos susceptíveis à terapia antimicrobiana em uma ampla variedade de ensaios *in vitro* e *in vivo* em modelos de biofilme. (RAMAGE et al., 2009).

A formação da matriz extracelular associada a biofilmes de *C. albicans* sugere que os genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de hidratos de carbono são diferencialmente regulados durante o desenvolvimento do biofilme. É possível que a expressão de genes de resistência a drogas seja responsável para as concentrações inibitórias mínimas elevadas observadas em biofilmes de *C. albicans* (CHANDRA et al., 2001).

Fu et al. (2014), realizaram um estudo sobre a atividade antimicrobiana *in vitro* de antissépticos com princípio ativo de CHX e CCP frente a biofilmes de isolados clínicos de *Candida*. Os resultados indicam que os antissépticos bucais são eficazes para matar as células planctônicas na saliva e prevenir a formação de biofilmes. No ensaio antibiofilme, após 24h de cultura, todos os antissépticos apresentaram eficácia, enquanto que os biofilmes apresentaram resistência ao fluconazol.

Inúmeros estudos são desenvolvidos sobre o gênero *Candida* na tentativa de encontrar opções terapêuticas que propiciem uma melhora na qualidade de vida dos seres humanos. Embora avanços nas mais variadas áreas já tenham sido obtidos a partir destes estudos, existem ainda vários aspectos a serem desvendados, principalmente quanto a fatores de virulência e à eficácia de antissépticos.

2 _____ **O**BJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar: a presença dos fatores de virulência, em leveduras do gênero *Candida*, e a eficácia de antissépticos bucais comerciais frente as espécies e formação de biofilme, contribuindo para esclarecimentos da patogenidade deste gênero de levedura oportunista.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Isolar e identificar espécies de *Candida* da saliva de pacientes usuários de próteses bucais

2.2.2. Das espécies isoladas:

2.2.2.1. Detectar a presença dos genes relacionados à adesão (ALS2 e ALS3) e proteinase (SAP1 e SAP3).

2.2.2.2. Verificar a produção da enzima proteinase.

2.2.2.3. Verificar a formação de biofilme em monoculturas e culturas mistas.

2.2.2.4. Avaliar a eficácia *in vitro* de três formulações comerciais contendo respectivamente, gluconato de clorexidina, cloreto de cetilpiridínio 0,070% com lactato de zinco, cloreto de cetilpiridínio 0,075% com fluoreto de sódio, em células planctônicas e no crescimento de biofilme monoculturas e culturas mistas.

3.1. Amostras Clínicas

Foram coletadas salivas de 70 pacientes voluntários, atendidos na Clínica de Odontologia da Universidade de Franca, com a supervisão da Prof^a Dra. Luciana Assirati Casemiro. Foram selecionados pacientes aparentemente saudáveis, usuários de próteses bucais há mais de 30 dias, maiores de 18 anos de ambos os sexos, que não fizeram uso de anti-inflamatórios, antibióticos e antissépticos bucais nos últimos 15 dias. De cada paciente, foi coletada uma única amostra de aproximadamente 2mL de saliva, em tubo plástico novo, esterilizado, a seguir a amostra foi encaminhada para processamento.

3.2. Isolamento das Leveduras

No Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca (LaPeMA) sob responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, os tubos contendo saliva foram submetidos à agitação até a obtenção de uma suspensão uniforme. A seguir 100µL da saliva foi diluída (1:10) em 900µL de solução fisiológica. Aliquotas de 100µL de saliva pura e a diluída foram, respectivamente, depositadas no centro de placas com CHROMagar *Candida*[®] e semeadas com auxílio de alça bacteriológica descartável esterilizada. As placas foram embaladas e acondicionadas em caixas de isopor e transportadas para o Laboratório de Micologia da FCFRP-USP e posteriormente, incubadas a 37°C durante três dias com observações diárias.

3.3. Identificação Clássica das Leveduras

A identificação das leveduras e os experimentos executados (itens 3.3 a 3.9) foram feitos no Laboratório de Micologia da FCFRP-USP. Os inóculos para os experimentos foram obtidos a partir de culturas recentes (24-48h), em Sabouraud dextrose ágar (SDA).

A identificação das espécies de *Candida* foi feita de acordo a metodologia clássica (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 1998), empregando as provas de microcultivo, assimilação de diferentes fontes de carbono (auxanograma), fermentação de carboidratos (zimograma), crescimento a 45°C.

3.3.1. Micromorfologia em Ágar Tween-80

O meio de ágar fubá + *tween 80* foi fundido e após resfriamento, a aproximadamente 50°C, cerca de 3,0mL foi depositado sobre lâmina (contida em uma placa de microcultivo devidamente esterilizada), formando uma camada espessa. Após solidificação, a levedura foi semeada na superfície do meio. Em seguida o inóculo foi coberto com lamínula esterilizada e

um rolo de algodão umedecido com água esterilizada, colocado para formar câmara úmida. A placa foi incubada a 30°C durante 72-96h. Decorrido este tempo as lâminas foram observadas em microscópio óptico com intuito de analisar as seguintes estruturas morfológicas: células leveduriformes, pseudomicélio, micélio e clamidósporo.

3.3.2. Assimilações de Fontes de Carbono (Auxanograma)

Foi preparado suspensão das leveduras isoladas, com turvação equivalente ao padrão 2 da escala de McFarland, em 3mL de água destilada e esterilizada. A seguir foi vertido 1mL da suspensão no meio C isento de carbono previamente fundido e resfriado aproximadamente a 60°C. Após agitação, o meio com o inóculo foi vertido em placas de Petri e após a solidificação foi acrescentado em pontos equidistantes os seguintes carboidratos: glicose, maltose, sacarose, lactose, inositol, rafinose, L-ramnose, trealose, D-xilose e melibiose. A leitura foi realizada após incubação de 24/48h a 35°C, observando a formação ou não de halo de crescimento ao redor das fontes de carbono.

3.3.3. Fermentação de Carboidratos (Zimograma)

Para avaliar a fermentação de carboidratos foram utilizadas: glicose, maltose, sacarose e lactose, as leveduras semeadas em tubos contendo o meio básico acrescido do carboidrato em teste e juntamente com um tubo de Durham em posição invertida foram incubados a 35°C por períodos de até 14 dias com leituras diárias. A prova de fermentação foi considerada positiva quando houve a presença de bolhas de gás, retida no tubo de Durham.

3.4. Identificação Molecular e Pesquisa de Genes Relacionados a Proteinase e Adesão

3.4.1. Extração de DNA

A extração do DNA das espécies de *Candida* foi realizada conforme protocolo descrito por Yamada et al. (2002), com algumas modificações. A partir de uma cultura de 24h em ASD, foi efetuado repique em tudo contendo 15mL de caldo (YPD), incubado a 37°C durante 24h após esse período, a cultura foi transferida para o tubo cônico, e centrifugada sob-refrigeração durante 5min a 1157g. O sedimento foi lavado com 5mL de solução-tampão Tris-NaCl, centrifugado sob refrigeração por 5min a 1157g e o sobrenadante descartado. Ao sedimento foram acrescentados 600µL de solução-tampão de extração de DNA (Tris-HCl 200mmol L⁻¹, NaCl 200mmol L⁻¹, EDTA 25mmol L⁻¹, SDS 10%) e aproximadamente 0,6g de pérolas de vidro

de 2mm, previamente tratadas com dietil pirocarbonato 0,1% (Sigma, St. Louis, EUA), seguido de agitação em vórtex por 10min.

A seguir foram transferidos 500µL da suspensão para o eppendorf de 2mL e adicionados 500µL da mistura fenol-clorofórmio (1:1, V/V) refrigerado (4 - 8°C). Após a homogeneização manual por 15s, a emulsão formada foi centrifugada por 15min a 18514g. Quinhentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para outro eppendorf, acrescido de 500µL de isopropanol (Chemco, Campinas, Brasil) refrigerado e armazenado *overnight* a -20°C. A seguir, o tubo foi centrifugado por 10min a 18514g, o sobrenadante desprezado e ao sedimento foi adicionado 1mL de etanol 70% gelado, seguido de homogeneização manual e centrifugação por 10min a 18514 g. e o sobrenadante descartado e o precipitado foi seco em temperatura ambiente, a seguir suspenso em 50µL de água Milli-Q esterilizada, e mantido *overnight* a 4°C.

A solução de DNA foi tratada com 10µmL⁻¹ de RNase (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e incubada por 1h em banho-maria a 37°C. A concentração do DNA extraído foi determinada pela leitura por espectrofotômetro (Nanodrop - Thermo scientific).

3.4.2 Reação da Cadeia de Polimerase

As reações de PCR foram realizadas com volume final de 25µL, contendo 50ng do DNA genômico, 1 U de Taq-polimerase (Fermentas, Glen Burnie, EUA), 0,2mmol L⁻¹ de dNTP (Fermentas), 4 mmol L⁻¹ de MgCl₂ (Fermentas), 1X solução-tampão da Taq-polimerase com (NH₄)₂SO₄ (Fermentas) de 20pmol L⁻¹ de cada *primer* (Invitrogen). O DNA de *C. albicans* ATCC 64548 foi utilizado como controle positivo e como controle negativo foi realizado uma reação sem amostra de DNA genômico. Os ciclos foram feitos em termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e estão descritos no Quadro 3. Após a extensão final, os tubos de reações foram mantidos à temperatura de 4°C. Os produtos de PCR foram analisados após a corrida eletroforética a 90 Volt, 110 miliampère durante 2h em gel de agarose a 1%, TBE 0,5X preparado em paralelo com o padrão de peso molecular 100pb. Ao termino da corrida foram revelados pela imersão em solução de brometo de etídio (0,5 µg mL⁻¹) durante 20min, visualizando transiluminador com luz ultravioleta e fotografado pelo sistema de captação de imagens (AlphaImage).

3.4.2.1. Confirmação Molecular

A confirmação molecular gênero/espécie foi realizada por técnica de PCR utilizando os primers descritos nos quadros abaixo (CARVALHO et. al., 2007).

Espécies	Primers	Sequência (5' -3') Forward/ Reverse
<i>C. albicans</i>	Calb	AGCTGCCGCCAGAGGTCTAA
	UNI1	TTCTTTTCCTCCGCTTATTG
<i>C. dubliniensis</i>	Cdub	CTCAAACCCCTAGGGTTTGG
	UNI1	TTCTTTTCCTCCGCTTATTG

Quadro1. Primers utilizados para confirmação molecular das amostras.

Desnaturação		Hibridização	Extensão	Nº ciclos	Extensão Final
Inicial	Posterior				
10min a 94°C	15s a 94°C	30s a 55°C	45s a 65°C	40	10 min a 72°C

Quadro 2. Condições de PCR para amplificação dos fragmentos de DNA para identificação de *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

3.4.2.2 Pesquisa de genes relacionados à Proteinase e Aderência

A pesquisa dos genes SAP1 e SAP3 relacionados à atividade de proteinase, e dos genes ALS2 e ALS3 relacionados à aderência, foi realizada em todos os isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata* envolvidos no estudo.

As sequências iniciadoras utilizadas na pesquisa dos genes SAP1, SAP3, ALS2 e ALS3 estão relacionadas no Quadro 3.

Genes	Primers	Sequência do primer	Tamanho do fragmento	Referência
SAP1	CaSAP1-F	GCTCTTGCTATTGCTTTATTAG	253 pb	Kalkanci et al., 2005
	CaSAP1-R	CATCAGGAACCCATAAATCAG		
SAP3	SAP3-F	CCTTCTCTAAAATTATCGATTGCAAC	231 pb	Naglik et al., 2003
	SAP3-R	CCTTCTCTAAAATTATGGATTGGAAC		
ALS2	ALS2-F	TCC GAC TCC ATT CCA GTA CTA A	190 pb	Hoyer et al., 2001
	ALS2-R	GTT ACA GCA TCA CTA GAA GCA ATA TC		
ALS3	ALS3-F	ATG ACA CCA TGT CAA GTT CAG A	762 pb	Hoyer et al., 2001
	ALS3-R	GTT GAC TCA ATG TAG TTT GTT G		

Quadro 3. Primers utilizados nas reações em PCR para pesquisa dos genes SAP1, SAP3, ALS2 e ALS3.

Genes	Desnaturação		Hibridização	Extensão	Nº ciclos	Extensão final
	Inicial	Posterior				
SAP1	5 min a 94°C	30s a 94°C	45s a 58°C	1min a 72°C	30	5 min a 72 °C
SAP3	5 min a 94°C	40s a 94°C	50s a 63,5°C	1min 30s a 72°C	35	7 min a 72° C
ALS2	5 min a 94°C	30s a 94°C	30s a 55°C	1min 30s a 72°C	35	7 min a 72° C
ALS3	5 min a 94°C	40s a 94°C	50s a 65,5°C	1min 30s a 72°C	35	7 min a 72° C

Quadro 4. Condições de PCR para amplificação dos fragmentos dos genes relacionados a atividade enzimática e adesão.

3.5. Avaliação de Proteinase

A pesquisa de proteinase em placa foi realizada de acordo com a técnica de Rüchel, Tegeler e Trost (1982). Alíquotas de 5µL de suspensão da levedura em solução fisiológica 0,9% com turbidez padrão 2 da escala de McFarland, foram depositadas em pontos equidistantes no meio ágar proteinase. Em cada placa foram depositadas suspensões de 5 inóculos diferentes. O teste foi realizado em duplicata e as placas incubadas a 37°C durante 7 dias. A presença da enzima foi observada pela formação de halo de hidrólise translúcido ao redor da colônia da levedura. A atividade enzimática foi medida pelo valor de P_{zr} (zona de hidrólise): P_{zr} é a razão entre o diâmetro da colônia (dc) pelo diâmetro da colônia mais a zona de hidrólise (dcp), ou seja: P_{zr} = dc/dcp.

3.6. Formação de Biofilme

Os biofilmes de *Candida* foram formados em placas de microtitulação de 96 poços (Corning Inc, Corning, Nova Iorque, EUA), segundo Pierce et al. (2010), com modificações. Foram preparadas suspensões contendo 1×10^6 células de levedura por mL de RPMI 1640, suplementado com L-glutamina e tamponado com 0,165 M de MOPS (Sigma). Em seguida 100µL de cada suspensão foram depositados em poços selecionados e as placas foram incubadas a 37°C. Os intervalos de tempo foram de 6h para biofilme pré-formado e 24h para biofilme maduro, a análise quantitativa destes biofilmes foi realizada com o ensaio de viabilidade celular, que avalia a atividade metabólica das células dentro do biofilme com base na redução de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT), uma vez que o XTT eficazmente é metabolizado pelas células, esta solução inicialmente clara é transformada em uma cor laranja. As alterações colorimétricas foram mensuradas por espectrofotometria utilizando o comprimento de onda de 490nm (Figura 1).

Este ensaio foi realizado com monoculturas e culturas mistas proveniente do mesmo paciente (SEABRA et al., 2013). Os biofilmes de culturas mistas foram realizados adicionando partes iguais de cada um dos respectivos inóculos e a seguir foi realizado procedimento como descrito acima. Todos os ensaios foram feitos em quadruplicadas.

Candida albicans SC5314 foi utilizada como controle na formação dos biofilmes em todos os ensaios (RAMAGE et al., 2002; PIERCE et al., 2008).

As densidades ópticas (D.O) correspondentes as atividades metabólicas dos biofilmes das espécies de *Candida* foram classificados segundo Sánchez-Vargas et al. (2013), em quatro grupos, de acordo com a absorbância (A): 1 ($A < 0,10$), 2 ($A = 0,11-0,40$), 3 ($A = 0,41-0,74$) e 4 ($A \geq 0,75$). O grupo 1 representa os não produtores de biofilme, o grupo 2 fracos produtores, e o grupo 3 produtores moderados e o grupo 4 incluem os altos produtores de biofilme.

Figura 1. Fluxograma da metodologia de formação de biofilme.

3.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Enxaguatórios Bucais (Método da Microdiluição).

Foram avaliados três enxaguatórios bucais obtidos do comércio brasileiro contendo em suas formulações cloreto de cetilpiridínio 0,07% com lactato de zinco (CCP 0,07%), cloreto de cetilpiridínio 0,075% com fluoreto de sódio (CCP 0,075%) em solução aquosa e gluconato de clorexidina 0,12% (CHX 0,12%) em solução alcoólica. Foram distribuídos, volumes de 1mL do meio de cultura, RPMI 1640, nos tubos de número 2, 3, 4 e 1,6mL no tubo de número 1. A seguir foi adicionado o volume de 400µL do respectivo antisséptico no tubo número 1 e após agitação manual, foi realizada diluição seriada (V/V) a partir do tubo número 1, de forma que as concentrações finais de enxaguatórios bucais variassem de 20% (tubo 1) a 2,5% (tubo 4), em seguida os antissépticos foram distribuídos nas placas de microdiluição. Para as concentrações finais de 100% e 50% um volume de 100µL do antisséptico não diluído (100%) foi adicionado aos poços número 1 e 2, volumes de 100µL do antisséptico diluído nas concentrações 20%,

10%, 5% e 2,5% foram dispensadas em sequência nos poços de número 3 a 6 da placa de microdiluição.

Os inóculos foram preparados em solução fisiológica ($1-5 \times 10^6$ UFC/mL) fazendo uma diluição de 1:1000 (1:50 e 1:20) em meio RPMI 1640 e nos respectivos antissépticos puros, obtendo aproximadamente $1 \text{ a } 5 \times 10^3$ UFC/mL, a seguir 100µL da diluição do inóculo em meio de cultura foi depositado nos poços de número 2 a 6 e 100µL da diluição do inóculo em antissépticos puro no poço de número 1. Como controle positivo foi dispensado 200µL da suspensão de inóculo no poço número 7 e como controle negativo, 200µL do meio de cultura no poço número 8. As placas foram incubadas a 37°C por 48h. Após este período de incubação, foi feita análise visual, quantificando a menor porcentagem do antissépticos capaz de inibir o crescimento da levedura como concentração inibitória mínima – CIM. As cepas utilizadas como controle foram *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 e o fluconazol foi utilizado como antifúngico controle (NCCLS-M27-A2, 2002).

3.8. Atividade dos Antissépticos sobre Biofilmes

A formação do biofilme foi realizada de acordo com o procedimento descrito no item 3.7 com período de incubação de 6h. Em cada placa foi preparado um controle negativo (poço sem formação de biofilme, poço nº12 com solução fisiológica). Depois de formado, o biofilme foi lavado com 70µL de PBS esterilizado por três vezes para remoção das células não aderentes. A seguir, nos poços 1 a 11 foram colocadas 100µL de cada solução pronta para uso do respectivo antissépticos bucal (CCP 0,070%, CCP 0,075% e CHX 0,12%) e incubado a 37°C por mais 18h a fim de completar 24h de incubação (6h de formação do biofilme inicial mais 18h após adição do antisséptico bucal). Os ensaios foram realizados em quadriplicada. Terminado o tempo de incubação, cada poço foi lavado três vezes com 200µL de PBS esterilizado. A seguir foram adicionados em todos os poços 100µL de solução XTT e menadione. Após incubação de 2h no escuro, foram transferidos 80µL de cada poço para uma nova placa e realizado a leitura a 490nm.

4.1. Espécies isoladas

Dos 70 pacientes selecionados para o experimento, de 32 (45,7%) foram isoladas da saliva leveduras do gênero *Candida* (Tabela 1). Destes 32 pacientes foram isoladas o total de 43 leveduras entre monoculturas (22) e culturas mistas (10). *C. albicans*, foi encontrada em 29 amostras de saliva, sendo em 19 monoculturas e em todas (10) culturas mistas (amostras 5, 20, 24, 34, 50, 53, 55, 57, 66 e 70) conforme apêndice D. As espécies *C. tropicalis* e *C. glabrata*, foram isoladas em monoculturas e culturas mistas, enquanto que *C. parapsilosis* e *C. krusei*, somente em culturas mistas (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de *Candida* isoladas de salivas de pacientes usuários de próteses bucais.

Espécies	Pacientes
<i>C. albicans</i>	19
<i>C. tropicalis</i>	2
<i>C. glabrata</i>	1
<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i> + <i>C. glabrata</i>	1
<i>C. albicans</i> + <i>C. krusei</i>	5
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>	2
<i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i>	2
Total	32

4.2. Confirmação Molecular

Todos os isolados com características fenotípicas e bioquímicas de *C. albicans*/ *C. dubliniensis* tiveram suas identificações confirmadas por reação em cadeia da polimerase (PCR). Os 29 isolados avaliados apresentaram amplificação de fragmentos correspondentes ao gênero/espécie *C. albicans* (Figura 2).

Figura 2. Confirmação dos isolados de *C. albicans* por reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.3. Genes relacionados à aderência e atividade enzimática

Foi avaliado que 86% (25/29) dos isolados de *C. albicans* demonstraram a presença de ambos os genes. Com relação ao gene SAP1, 93% (27/29) dos isolados de *C. albicans* apresentaram o gene, enquanto que para o gene SAP3 apenas 86% (25/29) dos isolados de *C. albicans* apresentaram amplificação do fragmento de tamanho esperado.

Nenhum dos isolados de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* avaliados neste estudo apresentaram amplificação para os genes estudados.

Figura 3. Fragmentos do gene ALS2 dos isolados de *Candida* obtidos após eletroforese em gel de agarose dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* específicos. O primeiro poço da extremidade esquerda mostra o marcador de peso molecular (M) – 100 pb (Fermentas).

Figura 4. Fragmentos do gene ALS3 dos isolados de *Candida* obtidos após eletroforese em gel de agarose dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* específicos. O

primeiro poço da extremidade esquerda mostra o marcador de peso molecular (M) – 100 pb (Fermentas).

Figura 5. Fragmentos do gene SAP1 dos isolados de *Candida* obtidos após eletroforese em gel de agarose dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* específicos. O primeiro poço da extremidade esquerda mostra o marcador de peso molecular (M) – 100 pb (Fermentas).

Figura 6. Fragmentos do gene SAP3 dos isolados de *Candida* obtidos após eletroforese em gel de agarose dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* específicos. O primeiro poço da extremidade esquerda mostra o marcador de peso molecular (M) – 100 pb (Fermentas).

4.4. Atividade da enzima proteinase

Os valores de Pzr variaram de 0,53 a 1,00 para as leveduras do gênero *Candida*. Dos 29 isolados de *C. albicans*, 21 (72,4%) das amostras apresentaram atividade enzimática, sendo 18

com atividade moderada e 3 fortemente positiva. Com relação às outras espécies avaliadas, 9 das 14 (64,3%) não apresentaram atividade enzimática com a metodologia empregada e 5 (35,7%) apresentaram atividade moderada (Tabela 2; Apêndice F).

Tabela 2. Atividade da enzima proteinase entre as espécies de *Candida* isoladas de saliva de pacientes usuários de próteses bucais.

Espécies	Nº Isolados	Pzr= 1		Pzr= 0,99-0,64		Pzr ≤0,63	
		N	(%)	N	(%)	N	(%)
<i>C. albicans</i>	29	8	(27,6%)	18	(62,1%)	3	(10,3%)
<i>C. parapsilosis</i>	2	1	(50%)	1	(50%)	0	(0%)
<i>C. krusei</i>	5	3	(60%)	2	(40%)	0	(0%)
<i>C. tropicalis</i>	3	2	(66,7%)	1	(33,3%)	0	(0%)
<i>C. glabrata</i>	4	3	(75%)	1	(25%)	0	(0%)

Pzr= 1: negativo para produção da enzima; $0,64 \leq Pzr \leq 0,99$: isolado produtor de enzima; $Pzr \leq 0,63$: isolados fortemente produtor da enzima.

4.5. Formação de biofilme

Os valores (absorbância) da atividade metabólica após incubação de 24h para todas as 43 leveduras foi de 0,018-1,065. Para *C. albicans* o intervalo foi de 0,038-1,065 e para *C. não albicans* de 0,018-0,478 (Tabela 3, Apêndice G).

Tabela 3. Atividade metabólica do biofilme de 24h de monoculturas de *Candida* spp. isoladas da saliva de portadores de próteses bucais.

Espécies	Intervalo	Média	Mediana
<i>C. albicans</i> (29)	0,038-1,065	0,390	0,269
<i>C. não-albicans</i> (14)	0,018-0,478	0,157	0,065
<i>Candida</i> spp. (43)	0,018-1,065	0,314	0,245

Dos 43 isolados de *Candida* spp., 30 deles (69,8%) foram produtores de biofilme. Das 29 amostras de *C. albicans*, 5 (17,2%) não formaram biofilme, 11 (37,9%) produziram biofilme com grupo 2 (fracamente positivo), 9 (31%) com grupo 3 (biofilme moderado) e 4 (13,8%) foram fortemente produtoras de biofilme (grupo 4). Quanto aos isolados de *C. não-albicans* somente *C. parapsilosis* não formou biofilme, as outras espécies formaram biofilme por pelo menos dois isolados (Tabela 4). A atividade metabólica da cepa padrão *C. albicans* SC5314 foi: valor médio de 0,293 (grupo 2).

Tabela 4. Desenvolvimento de biofilme de 24 h entre as espécies de *Candida* isoladas de saliva de pacientes usuários de próteses bucais.

Grupos*		1		2		3		4	
Espécies	N	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
<i>C. albicans</i>	29	5	17,2%	11	37,9%	9	31%	4	13,8%
<i>C. parapsilosis</i>	2	2	100%	0	0%	0	0%	0	0%
<i>C. tropicalis</i>	3	1	33,3%	1	33,3%	1	33,3%	0	0%
<i>C. glabrata</i>	4	2	50%	2	50%	0	0%	0	0%
<i>C. krusei</i>	5	3	60%	2	40%	0	0%	0	0%

*Grupos de acordo com a absorbância (A): 1 ($A < 0,10$), 2 ($A = 0,11-0,40$), 3 ($A = 0,41-0,74$) e 4 ($A \geq 0,75$).

Quanto à formação de biofilme pelas culturas mistas, observamos que dos 10 conjuntos de culturas mistas representados na figura 7 e apêndice H (5VAR, 20VB, 24VB, 34VR, 50VR, 53VR, 55VB, 57VB, 66VB, 70VB), houve aumento do grupo das respectivas culturas mistas em 7 conjuntos (20VB, 24VB, 34VR, 50VR, 53VR, 55VB e 66VB). No 57VB o grupo da cultura mista foi igual a respectiva monocultura (*C. albicans*) e superior a monocultura da respectiva *C. não-albicans*. Nos conjuntos 5VAR e 70VB os grupos das culturas mistas (2) foram inferiores aos das respectivas monoculturas de *C. albicans* (3) e maior ou igual aos das respectivas *C. não-albicans*.

Figura 7. Formação de biofilme de 24h de monoculturas e culturas mistas isoladas do mesmo paciente. Grupos de acordo com a absorbância (A): 1 ($A < 0,10$), 2 ($A = 0,11-0,40$), 3 ($A = 0,41-0,74$) e 4 ($A \geq 0,75$).

4.6. Avaliação de antissépticos bucais frente às espécies de *Candida*

4.6.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) de todos antissépticos foi igual ou menor que 1,25%, ou DIM 1:80 (dilução inibitória máxima) para todas as espécies. Quanto a CIM em µg/ml, obtida pelo cálculo a partir dos percentuais dos princípios ativos cloreto de cetilpiridínio (CCP) e gluconato de clorexidina (CHX) especificados nos produtos obtidos no comércio, foi de ≤8,75µl/ml para CCP 0,07%, ≤ 9,37µl/ml para CCP 0,075% e ≤ 15µl/ml para CHX 0,12%, (Tabela 5).

Tabela 5. Perfil de sensibilidade dos antissépticos bucais frente as espécies de *Candida* isoladas de salivas de pacientes usuários de próteses bucais.

Espécies	Isolados	CCP 0,070%			CCP 0,075%			CHX 0,12%		
		%	DIM	µl/mL	%	DIM	µl/mL	%	DIM	µl/mL
<i>C. albicans</i>	29	≤1,25	≤1:80	≤8,75	≤1,25	≤1:80	≤9,37	≤1,25	≤1:80	≤15
<i>C. krusei</i>	5	≤1,25	≤1:80	≤8,75	≤1,25	≤1:80	≤9,37	≤1,25	≤1:80	≤15
<i>C. glabrata</i>	4	≤1,25	≤1:80	≤8,75	≤1,25	≤1:80	≤9,37	≤1,25	≤1:80	≤15
<i>C. tropicalis</i>	3	≤1,25	≤1:80	≤8,75	≤1,25	≤1:80	≤9,37	≤1,25	≤1:80	≤15
<i>C. parapsilosis</i>	2	≤1,25	≤1:80	≤8,75	≤1,25	≤1:80	≤9,37	≤1,25	≤1:80	≤15

DIM= diluição inibitória mínima, CCP= cloreto de cetilpiridínio, CHX= gluconato de clorexidina.

4.6.2 Ação de Antissépticos bucais em biofilmes de *Candida* spp.

O antisséptico CCP 0,070% inibiu o biofilme da maioria das amostras de *C. albicans* (Figura 8; Apêndice J) e de todas *C. não-albicans* das monoculturas (Figura 9; Apêndice J), bem como o biofilme das culturas mistas (Figura 10, Apêndice K). O antisséptico CCP 0,075% foi capaz de inibir o desenvolvimento do biofilme nas monoculturas de todas as leveduras (Figuras 8, 9 e Apêndice J) e de todas as culturas mistas (Figura 10 e Apêndice K), em todas as amostras de *Candida*. O antisséptico CHX 0,12% inibiu o biofilme da maioria das cepas de *C.albicans*, de *C. não-albicans* e de todos biofilmes mistos (Figuras 8, 9, 10; Apêndices J, K).

Figura 8. Ação dos antissépticos sobre biofilmes de *C. albicans*.

Figura 9. Ação dos antissépticos sobre biofilmes de *C. não-albicans*.

Figura 10. Ação dos antissépticos sobre biofilmes de culturas mistas.

5_____ **D**ISSCUSSÃO

As espécies do gênero *Candida* são patógenos oportunistas que vivem como comensais em diferentes locais do corpo humano. Estas espécies estão prontas para se desenvolver em cavidades e infectar tecidos quando ocorrem mudanças na fisiologia do hospedeiro, geralmente são as defesas do sistema imunológico que normalmente mantêm esse estado de comensal. No estado comensal, as espécies de *Candida* vivem como membros benignos do microbiota de indivíduos saudáveis sem causa nenhuma doença. Apesar da colonização bucal por *Candida* possa ocorrer normalmente, uma série de fatores podem predispor, o desenvolvimento de candidíase, entre eles devido ao uso de próteses dentárias, estomatite protética, má higiene bucal, ou idade avançada. (SOLL, 2002; CAVALEIRO et al., 2012).

Na presente pesquisa o gênero *Candida* foi isolado em 45,7% das amostras de saliva, provenientes de 32 pacientes. Este percentual é inferior aos de Candido; Azevedo e Ito (1995), e de Teixeira; Mezari (2005), que isolaram *Candida* spp. de próteses bucais, respectivamente de 72% e 84% das amostras.

Nosso percentual de isolamento de leveduras é semelhante à pesquisa mais recente realizada por Melo et al. (2013), que demonstraram a incidência de espécies de *Candida* em 41,7% (25/60) em amostras obtidas de lesões provocadas por próteses bucais, isto sugere que com o passar dos anos a incidência de leveduras têm diminuído devido ao maior acesso a informações e mudanças de hábitos de higiene bucal. Atualmente as indústrias dispõe de grande variedade de produtos de uso de higiene bucal e a população tem mais acesso as clínicas odontológicas populares.

Quanto às leveduras isoladas, a presente pesquisa demonstrou que *C. albicans* foi a espécie prevalente, sendo isolada em 41,4% das amostras de saliva, em menor frequência *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Segundo Kleinegger et al. (1996) *C. parapsilosis* é mais incidente na cavidade bucal de crianças, enquanto que *C. glabrata* segundo Lockhart et al. (1999), é mais frequente em idosos. Os percentuais mais baixos de *C. não-albicans* encontrados em nossa pesquisa estão de acordo com Kleinegger et al. (1996). Outras pesquisas também relataram prevalência de *C. albicans*, bem como a presença de espécies de *C. não-albicans* (CANDIDO; AZEVEDO e ITO, 1995; TEXEIRA; MEZZARI, 2005; MELO et al., 2013).

Apesar de serem encontradas em baixos percentuais convém ressaltar que *C. krusei* e *C. glabrata* são leveduras naturalmente resistentes aos azóis, os quais são amplamente usados no tratamento das candidíases. As próteses na maioria das vezes são usadas por indivíduos idosos sendo, portanto, dois fatores de risco para instalação de uma candidíase bucal.

Quanto à presença de culturas mistas, detectadas em 10 amostras de salivas, houve associação de *C. albicans* em todas. Em apenas uma das salivas foram isoladas 3 espécies diferentes e nas outras, 2 espécies diferentes. Culturas mistas provenientes da cavidade bucal também têm sido relatadas por outros autores (MELLO et al., 2013). Atualmente o uso de meios seletivos para o primo isolamento de leveduras tem favorecido a detecção de culturas mistas, além disso, o meio seletivo de ágar cromogênica utilizado na presente pesquisa também facilitou a identificação das espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, pois 100% de ambas cresceram nas respectivas cores verde e azul, típicas de suas espécies.

A aderência de *C. albicans* a células epiteliais é promovida por 8 genes pertencentes a família ALS (ALS1-ALS7 e ALS9) (MONROY-PEREZ et al., 2012, GARCIA; LIPKE; KLOTZ, 2013).

Neste estudo, entre os isolados de *C. albicans* avaliados, 86% apresentaram os genes ALS2 e ou ALS3. Estes genes não foram encontrados em nenhum isolado de *C. não-albicans*. Costa (2009), também não evidenciou estes genes em isolados de *C. tropicalis*. Monroy-Pérez et al. (2012), avaliaram em isolados de *C. albicans* a presença destes genes. O gene ALS2 foi encontrando 60% dos isolados e ALS3 em 36%, porcentagem menores que evidenciadas no presente estudo. Hoyer et al. (2001), comprovaram a presença de genes ALS em espécies de *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* utilizando a hibridação cruzada em *Southern blot* e PCR com primers degenerados para os genes ALS desenhados com base em isolados de *C. albicans*.

O presente estudo indicou que a maioria dos isolados de *C. albicans* possuem os genes de aspartil protease SAP1 e SAP3. Costa (2009), avaliou a presença dos mesmos genes em isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis*, demonstrando a presença destes em todos os isolados de *C. albicans* e não encontrando ambos os genes em *C. tropicalis*. Vários autores sugerem que *C. não-albicans* também são produtoras de proteinase extracelular e a literatura tem reportado a presença dos genes SAP em *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, e *C. parapsilosis* utilizando a metodologia de *Southern blot* (MONOD et al., 1994; GILFILLAN et al., 1998; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003).

Em *C. albicans* uma das enzimas hidrolíticas mais significativas são as aspartil protease, proteínas codificadas por uma família de 10 genes SAP. Segundo Naglik; Challacombe; HubE, (2003), após avaliação da expressão dos genes SAP dos isolados de *Candida* da cavidade bucal, demonstrou que os genes SAP2, SAP4, SAP5 e SAP6 são expressos tanto em pacientes com candidíase bucal como em portadores de *Candida*. A expressão dos genes SAP1 e SAP3 foram observados somente em pacientes com candidíase bucal. Esse fato reportado vem consolidar os

dados obtidos neste estudo, pois todos os isolados de *Candida* foram provenientes de pacientes que fazem uso de próteses dental, podendo estar mais susceptíveis a candidíase bucal.

A enzima proteinase aspártica desempenha um papel importante na patogenicidade de espécies de *Candida*, ela é capaz de degradar o tecido epitelial e a barreira mucosa e desta forma, invadir superfícies bucais mais facilmente (ABACI, 2011).

Na presente pesquisa a maioria dos isolados de *Candida* apresentou atividade proteolítica (60,5%), somente três isolados destes pertencentes a espécie *C. albicans*, apresentaram forte atividade proteolítica.

A alta atividade proteolítica pode ser estimulada em pH baixo, encontrado em ambientes da cavidade bucal, protegidos da ação lubrificante da saliva, como na superfície da prótese (HOEGL; OLLERT; KORTING, 1996) bem como na ingestão prolongada de carboidratos que leva a diminuição de pH na placa dentária a níveis propícios para a atividade da proteinase (SAMARANAYAKE et al., 1983).

Na presente pesquisa observamos que dos 29 isolados de *C. albicans* 21 (72,4%) apresentaram atividade de proteinase. Pesquisas indicam que a presença da enzima proteinase em isolados de *C. albicans* isoladas de materiais clínicos é muito variável, percentuais entre 26,67% a 100% foram relatados (KANTARCIOĞLU; YÜCEL, 2002; FOTEDAR; AL-HEDAITHY, 2005; KUMAR; MENON, 2006; D'EÇA JÚNIOR et al., 2011; HERNANDEZ et al., 2014; RICETO et al., 2014) mas os autores não observaram valores significativos de proteinase entre as cepas isoladas dos diferentes sítios anatômicos.

Em relação aos isolados de *C. albicans* da cavidade bucal Wu et al. (1996), e Junqueira et al. (2012), observaram que 100% dos cultivos de indivíduos HIV positivos apresentavam proteinase positiva, sendo que Wu et al. (1996), também observaram percentual menor (56%) com diferença estatisticamente significativa entre os isolados de indivíduos saudáveis. Kuriyama; Williams e Lewis (2003), comparando produção de proteinase em *C. albicans* isoladas da cavidade bucal de indivíduos com lesões bucais e indivíduos saudáveis concluíram que *C. albicans* associada com doença bucal tem alta atividade de proteinase. Bacelo et al. (2010), e Costa (2009), detectaram proteinase em 100% dos isolados de *C. albicans* da cavidade bucal de indivíduos saudáveis, sendo que Costa (2009), conclui que mesmo em isolados da referida espécie, de pacientes com diferentes tipos de candidíase bucal, proteinase foi detectada em todos isolados. Candido; Azevedo e Komesu (2000), encontraram percentuais semelhantes de produtores de proteinase em *C. albicans* de ambos grupos de pacientes com lesão (66,7%) e sem lesão (68,7%) da cavidade bucal. Hernandez et al. (2014), observaram que os isolados de pacientes com candidíase bucal 70% deles foram proteinase positiva contra 54% dos isolados

de indivíduos saudáveis. Abaci (2011), avaliou a enzima proteinase entre isolados de *C. albicans* de usuários de dentadura e observou que 93,6% dos isolados foram positivos para a referida enzima.

Quanto às espécies de *C. não-albicans* a proteinase foi observada em pelo menos um dos isolados da respectiva espécie. Observamos que apenas 5 isolados de 14 (35,7%) produziram a respectiva enzima. Este percentual é semelhante ao de 32,14% encontrado por Junqueira et al., (2014) em isolados provenientes da cavidade bucal de pacientes HIV positivo. Bem como nos relatos de Candido; Azevedo e Komesu (2000), de 40% e 31% respectivamente de isolados da cavidade bucal de pacientes com lesão e sem lesão bucal. No entanto nossos resultados são inferiores aos de Abaci (2011), que avaliou espécies de *Candida* na cavidade bucal de usuários de dentadura e observou que 52,6% de *C. não-albicans* foram proteinases positivas. Enquanto que Junqueira et al., (2012) em isolados de *C. não-albicans* da cavidade bucal de indivíduos HIV positivo a presença da enzima foi observada entre 12 dos 22 isolados (45,45%). Para Oksuz et al. (2007), 50% das 22 *Candida* spp. isoladas da cavidade bucal de indivíduos saudáveis foram positivas para proteinase. Nossos percentuais foram menores que os relatados por outros autores (40-70%) a partir de isolados clínicos de diferentes sítios (KANTARCIOĞLU; YÛCEL, 2002, OKSUZ et al., 2007; D'EÇA JÚNIOR et al., 2011; RICETO et al., 2014). Nossos resultados apresentam percentual diferente que os citados acima, provavelmente devido ao fato de que nossa casuística de espécies *C. não-albicans* foi pequena em relação ao das publicações citadas acima. Quanto a metodologia utilizada na presente pesquisa foi a mesma que nas demais citações e segundo Kumar et al. (2006), esta metodologia é rotineiramente usada e apresenta uma análise relativamente sensível e é capaz de detectar baixos níveis da atividade de proteinase.

As informações sobre as características estruturais associadas a biofilmes de *C. albicans* vem de experimentos *in vitro* nos quais umas variedades de modelos de biofilmes foram desenvolvidas por diversos grupos de pesquisadores. Estes modelos compreendem diferentes substratos para o desenvolvimento do biofilme entre eles: discos, cateter, folhas e tubos de diferentes materiais, lâminas de vidro, fermentadores, placas de microtitulação, e frascos de cultura de tecidos. Também incluem biofilmes formados em condições estáticas e dinâmicas, com incubação em aerobiose e anaerobiose, bem como com uso de diferentes corantes entre eles cristal violeta, XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazólio), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), resazurina, diacetato de fluorescência. Existem trabalhos onde os biofilmes foram recuperados diretamente a partir de amostras clínicas e visualizados utilizando diferentes técnicas de microscopia (THEIN;

SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2007; WALKER; SEDLACEK, 2007; PEETERS; NELIS; COENYE, 2008; HASAN et al., 2009; SILVA et al., 2009; MOHANDAS; BALLAL, 2011; ESTIVILL et al., 2011; PIRES et al., 2011; PAIVA et al., 2012; SHIN et al., 2002; SÁNCHEZ-VARGAS et al., 2013, MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014; TREVIÑO-RANGEL et al., 2015). Ramage et al., 2005, sugerem que eventos em *in vitro* reproduzem valores próximos de modelo *in vivo* e por tanto, as observações podem ser clinicamente relevantes.

Em nossa pesquisa, os isolados foram submetidos a formação de biofilme em placa de microtitulação por um período de 24 horas e após foram corados com XTT e mensurados em valores de absorbância (490nm) para quantificar a atividade metabólica/ biomassa viável do biofilme. Nossos resultados mostraram que a maioria (69,8%) dos isolados de *Candida* spp. foram produtores de biofilme, em relação aos isolados de *C. albicans* e *C. não-albicans*, respectivamente, 82,7% e 42,9% sendo a maioria deles baixos produtores (Grupo 2). Dentre os 43 isolados de leveduras apenas 4 *C. albicans* foram fortemente produtoras de biofilme, convém ressaltar que vários autores propuseram valores de *score*/classificação/grupo baseados nos resultados de absorbância ou transmitância da atividade metabólica do biofilme (VILLAR-VIDAL et al., 2011; PAIVA et al., 2012; MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014; TREVIÑO-RANGEL et al., 2015). Em nossa pesquisa optamos pela classificação de Sánchez-Vargas et al. (2013), visto que as cepas utilizadas por estes autores também foram recuperadas da cavidade bucal.

O resultado obtido em nossa pesquisa com a cepa padrão *C. albicans* SC5314, média das absorbâncias 0,202 é próximo aos de Peeters; Nelis e Coenye (2008), com média de 0,185.

Nossos resultados corroboram com os de Hassan et al. (2009) que analisaram a formação de biofilme de espécies de *Candida* em 126 isolados de pacientes com candidemia e AIDS, observaram que *C. albicans*, produziram biofilme em maior quantidade que *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, e isolados de *C. glabrata* não foram produtoras de biofilme. Nossos resultados também indicam que *C. albicans* foram os maiores produtores de biofilme e dos 4 isolados de *C. glabrata* somente 2 foram fracamente positivos e os demais negativos.

Comparando com pesquisas que utilizamos metodologias semelhantes, nossos resultados diferem de Sánchez-Vargas et al. (2013), e de Marcos-Zambrano et al. (2014). Sánchez-Vargas et al., 2013, analisaram biofilmes de 69 leveduras isoladas da cavidade bucal, de pacientes com diabetes e usuários de próteses bucais, observaram que a maioria dos isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* foram produtores moderados de biofilme, que todos os isolados de *Candida glabrata*, 40% de *C. albicans* e 25% de *C. krusei* foram classificados como fortemente

produtores de biofilme. Nossos resultados foram inferiores a estes dados, apesar da escala de avaliações serem as mesmas. Marcos-Zambrano et al. (2014), avaliaram atividade metabólica de espécies de *Candida* e observaram valores médios de atividade de 0,168 para isolados *C. albicans*, nossos resultados foram de 0,390, pelo valor médio sugerimos que nossos isolados foram melhores produtores de biofilme, também na nossa amostragem detectamos 9 isolados de *C. albicans* com leitura maior que 0,561 valor máximo detectado pelo grupo de Marcos-Zambrano, em relação as outras espécies de *Candida* estes autores avaliaram a atividade metabólica e os valores de absorbância foram de 0,004-0,576, das 14 *C. não-albicans* avaliadas em nossa pesquisa nossos resultados foram pouco menores (0,018-0,478).

Outros autores encontraram resultados baixos para formação de biofilme em isolados de *C. albicans*, Shin et al. (2002), analisaram 360 isolados clínicos de *Candida* spp., dos isolados de *C. albicans*, somente 8% foram consideradas formaram de biofilme. Nossos valores foram maiores (82,7%). Entre os isolados de *C. não-albicans* 61% foram formadores de biofilme, nossos resultados foram menores (42,9%). No entanto os critérios adotados para esta classificação diferem dos adotados em nossa pesquisa.

Ferreira et al. (2013), avaliaram a formação da atividade metabólica do biofilme de espécies de *Candida* isoladas de pacientes e do ambiente hospitalar e concluíram que todos os isolados foram produtores de biofilme conforme sua classificação, sendo que os recuperados de pacientes apresentaram valor médio 0,072 (0,033-0,110) para *C. albicans* e 0,152 (0,066-0,238) para *C. não-albicans*. No entanto nossos resultados detectaram valores de média superior para *C. albicans* (0,390) e semelhante para *C. não-albicans* (0,157).

Como pudemos observar pelos dados da literatura existem diversas metodologias e mesmo as mais semelhantes podem trazer resultados conflitantes devidos principalmente aos critérios de classificação da atividade metabólica do biofilme, o que dificulta a comparação dos resultados.

Os resultados do presente estudo demonstraram que os biofilmes das espécies de *Candida* quando formados em culturas mistas se desenvolvem mais em comparação com a formação de biofilme em monocultura. Existe uma limitação do estudo, pois apenas algumas espécies de *Candida* foram avaliadas. Além disso, trabalhos futuros são necessários para elucidar completamente como todas as espécies de *Candida* podem atuar dentro de biofilmes na cavidade bucal. Pesquisas com foco sobre estas questões são cruciais para o desenvolvimento de terapias alternativas que podem prevenir ou controlar a formação de biofilme, o desenvolvimento de candidíase bucal e outras infecções por espécies de *Candida*.

Avaliando o perfil dos isolados de *C. albicans*, identificados na presente pesquisa, (APÊNDICE I) em relação aos fatores de virulência proteinase e formação de biofilme e os genes relacionados a proteinase, SAP1 e SAP3 e aos relacionados a adesão ALS2 e ALS3, observamos que mais da metade dos isolados de *C. albicans* (17/29 = 58,6%) apresentaram todos os fatores e os genes pesquisados. Na maioria (72,4%) dos isolados de *C. albicans* que detectamos os genes SAP1 e ou SAP3 produziram enzima proteinase e a maioria dos isolados (72,4%) que detectamos genes ALS2 e ALS3 foram produtores de biofilme. De modo geral estes dados sugerem que a maioria das amostras de *C. albicans* isoladas em nossa pesquisa, tem genes e fatores de virulência e dependendo dos fatores imunológicos do hospedeiro podem desencadear uma candidíase bucal.

A saúde bucal depende da utilização de medidas preventivas, o controle mecânico representa o método mais eficaz, utilizado na prevenção e remoção do biofilme. Às vezes não é realizado adequadamente, desse modo, diversos antissépticos têm sido utilizados para o controle químico da placa, como adjuvantes aos procedimentos mecânicos. Os antissépticos são soluções constituídas por água, álcool, surfactantes, umectantes, flavorizantes e o princípio ativo. No mercado há uma infinidade de produtos com diferentes princípios ativos, como o gluconato de clorexidina (CHX), cloreto de cetilpiridínio (CCP), triclosan (TR) e óleos essenciais diversos (OE) (GEBRAN; GEBERT, 2002; ADDY, 2005).

Em nosso trabalho as soluções comerciais analisadas (CCP 0,075%, CCP 0,075% e CHX 0,12%) apresentaram ação antifúngica frente aos isolados do gênero *Candida*. As três soluções apresentaram baixos valores de CIM, no entanto os fabricantes recomendam o uso destas formulações puras.

Diversos autores utilizando a metodologia de difusão em ágar observaram que os antissépticos contendo pelo menos um dos princípios ativos como, cloreto de cetilpiridínio, clorexidina, triclosan e óleos essenciais em suas formulações, inibiram leveduras do gênero *Candida* (NAVARRO et al., 1995; CANDIDO; AZEVEDO; ITO, 1996; AZEVEDO et al., 1999 e PEREZ et al., 2011). Após a padronização das metodologias de diluição em caldo (micro e macro diluição) pelo CLSI *Clinical and Laboratory Standards Institute* (antigo NCCLS) a ação inibitória das soluções antissépticas bucais e de princípios ativos tem sido avaliada por estas metodologias (GIULIANA et al., 1999; MEILLER et al., 2001; TRABOULSI; MUKHERJEE; GHANNOUM, 2008; MAEKAWA et al., 2010; FATHILAH et al., 2012 e SALIM et al., 2013).

Os nossos resultados são próximos aos de: Meiller et al. (2001), que analisando soluções contendo CHX a 0,12% encontraram valores de CIM variando entre 0,60 a 9,40 µg/mL para isolados de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* entre outros.

Maekawa et al. (2010), que observaram que soluções contendo CHX 0,12% apresentaram valores baixos de concentração inibitória mínima (menor que 1,0%) frente *C. albicans* isoladas da cavidade bucal. Estes autores também não encontraram diferenças estatísticas entre a atividade fungicida dos antissépticos contendo ou não álcool em sua formulação.

Giuliana et al. (1999), observaram que solução com cloreto de cetilpiridínio (CCP) apresentou valores de CIM entre 0,24 e 0,42 µg/mL para *Candida* spp. isoladas da cavidade bucal de pacientes infectados por HIV. Toti-Rodrigues (2008), analisando diferentes metodologias para testes de suscetibilidade de antissépticos bucais frente a cepas padrão ATCC do gênero *Candida*, encontrou valores de CIM em baixas concentrações (1,25%) para antissépticos com formulações contendo CHX e CCP.

Os nossos resultados também corroboram com os resultados de pesquisa realizada com princípio ativo puro, Traboulsi; Mukherjee e Ghannoum (2008), avaliaram a concentração inibitória mínima (CIM) de cloridrato de clorexidina 98% (Sigma) em 91 isolados clínicos de espécies de *Candida* de pacientes infectados com HIV, os valores de CIM para este sal foram ≤ 16 µg/mL. Salim et al., 2013, avaliaram a eficácia de cloridrato de clorexidina (Sigma) em 79 isolados de *Candida* spp. observaram valores de CIM $\leq 4,05$ µg/mL. Conforme exposto pela literatura, os resultados obtidos nos testes *in vitro* de sensibilidade aos antissépticos bucais contendo clorexidina não diferem dos resultados obtidos dos testes contendo o princípio ativo em forma de sal.

Os nossos resultados diferem de Fathilah et al. (2012), que observaram valores maiores de CIM para CHX de 75,0 e 150,0 µg/mL respectivamente para *C. tropicalis* e *C. krusei* e valores de CIM para CCP de 66,0 e 33,0 µg/mL respectivamente para isolados de *C. tropicalis* e *C. krusei*. Convém ressaltar que em nossa pesquisa os 3 isolados de *C. tropicalis* e os 5 de *C. krusei* todos foram inibidos por concentrações de CHX ≤ 15 µg/mL e de CCP $\leq 9,37$ µg/mL. Nossos resultados demonstraram que todas as espécies avaliadas, (inclusive estas espécies citadas acima), não diferem entre si em relação à atividade dos antissépticos.

Concluimos que as soluções avaliadas contendo princípio ativo de cloreto de cetilpiridínio e gluconato clorexidina apresentaram ação antifúngica *in vitro* frente aos isolados de *Candida*. Com base na metodologia e nos resultados obtidos neste estudo, é possível sugerir que o uso de antissépticos contendo esses princípios ativos podem ser efetivos na prevenção da candidíase bucal e no auxílio de uma melhor higienização da cavidade bucal.

A natureza da estrutura e a característica fisiológica do biofilme conferem resistência inerente aos agentes antimicrobianos tais como antibióticos, desinfetantes germicidas. Os mecanismos associados a resistência são: atrasar a penetração dos agentes antimicrobianos na matriz do biofilme, alterar a taxa de crescimento dos organismos e outras alterações fisiológicas devido ao desenvolvimento do biofilme (DOLAN; COSTERTON, 2002).

A redução de biofilmes *in vitro* por antissépticos bucais têm sido relatadas por outros grupos (MEILLER et al., 2001; SHAPIRO; GIERTSEN; GUGGENHEIM, 2002; LANFOM et al., 2004; REDDING et al., 2009; FU et al., 2014; ANTUNES et al., 2014), no entanto as comparações com nossos dados ficam difíceis devido a diversidade entre as metodologias, as apresentações e interpretações dos resultados. Desta forma estamos de acordo com Ramage, 2009, que evidencia a necessidade de estudos de padronização de metodologias para melhor compreensão da ação dos antissépticos sobre os biofilmes.

Com base no método experimental utilizado e nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- ❖ A frequência de isolados de *Candida* da saliva de pacientes usuários de próteses bucais foi de 45,7% e a espécie *C. albicans* foi a prevalente.
- ❖ Os genes de adesão (ALS2 e ALS3) estão presente em 86% de todos os isolados, e os relacionados a proteinase SAP 1 foi de 93% e para SAP 3 foi 86%.
- ❖ A maioria dos isolados (72,4%) de *C. albicans* apresentou atividade de proteinase a maioria dos isolados (64,3%) de *C. não-albicans* não apresentaram atividade desta enzima.
- ❖ A maioria dos isolados de *Candida* e todas as culturas mistas desenvolveram biofilmes em 24 horas.
- ❖ As três formulações comerciais de antissépticos foram eficazes *in vitro*, apresentando CIM menor ou igual a 1,25%, frente a todos os isolados de *Candida*.
- ❖ As três formulações comerciais foram eficazes *in vitro* na maioria dos biofilmes das monoculturas e em todos os biofilmes de culturas mistas.

7 _____ **R**EFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

*De acordo com as normas da ABNT 6023 – Associação Brasileira de Normas Técnicas.

- ABACI, O. Investigation of extracellular phospholipase and proteinase activities of *Candida* species isolated from individuals denture wearers and genotypic distribution of *Candida albicans* strains. **Current microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1308-1314, 2011.
- ADAMS, D.; ADDY, M. Mouthrinses. **Advances in Dental Research**, v. 8, n. 2, p. 291-301, 1994.
- ADDY, M. O uso de antissépticos na terapia periodontal. In: LINDHE, J. **Tratado de periodontia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.450-477 2005.
- ANTUNES, D. P. et al. Effect of green tea extract and mouthwash without alcohol on *Candida albicans* biofilm on acrylic resin. **Gerodontology**, 2014.
- AZEVEDO, R. V. et al. *Candida* spp in the oral cavity with and without lesions: maximal inhibitory dilution of propolis and periogard. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 335-341, 1999.
- BACELO, K. L. et al. Biotype stability of *Candida albicans* isolates after culture storage determined by randomly amplified polymorphic DNA and phenotypical methods. **Mycoses**, v. 53, n. 6, p. 468-474, 2010.
- BARASCH, A. et al. Efficacy of chlorhexidine gluconate rinse for treatment and prevention of oral candidiasis in HIV-infected children: a pilot study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 97, n. 2, p. 204-207, 2004.
- BERMAN, J.; SUDBERY, P. E. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 12, p. 918-32, 2002.
- BEVILACQUA, I. M.; HABITANTE, S. M.; CRUZ, C. W. A clorexidina como alternativa no tratamento de infecções endodônticas: revisão da literatura. **Revista Biociências**, v. 10, n. 3, 2004.
- BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Projeto SBBRASIL 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal – Resultados Principais. **Brasília: Ministério da Saúde**, p. 92, 2011.
- BUGNO, A. et al. Antimicrobial efficacy of Curcuma zedoaria extract as assessed by linear regression compared with commercial mouthrinses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 440-445, 2007.
- CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V. P.; ITO, I. Y. Leveduras: prevalência na cavidade bucal de portadores e não portadores de prótese total. **Revista de Odontologia da UNICID**, v. 7, n. 1, p. 27-33, 1995.

CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V. P.; ITO, I. Y. Determinação da concentração inibitória mínima de Cepacol, Malvona e Perigard, ante a *Candida albicans* isolada da cavidade bucal. **Revista de Odontologia UNESP**, v. 25, n. 1, 9-84, 1996.

CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V. P.; KOMESU, M. C. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 5, p. 437-42, 2000.

CANDIDO, R. C.; Biofilme dentadura: caracterização fenotípica de amostras de leveduras isoladas em cinco ocasiões no período de um ano. **Tese de Livre Docência**, Universidade São Paulo, 2000

CARVALHO, A. et al. Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. **Medical Mycology**, v. 45, n. 7, p. 619-27, 2007.

CAVALEIRO, I. et al. Prevalence of Yeast Other than *Candida albicans* in Denture Wearers. **Journal of Prosthodontics**, v. 22, n. 5, p. 351-357, 2013.

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

COSTA, K. R. C. et al. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. **Mycopathologia**, v. 167, n. 2, p. 73-79, 2009.

COSTA, K. R. C. Aspecto fenotípico e molecular da adesão e atividade enzimática de *Candida* sp isoladas de pacientes com sinais clínicos de candidíase oral. **Tese de Doutorado** Universidade São Paulo, 2009.

COSTA, C. R. et al. Effects of antifungal agents in sap activity of *Candida albicans* isolates. **Mycopathologia**, v. 169, n. 2, p. 91-98, 2010.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 711-745, 1995.

COSTERTON, J. W.; WILSON, M. Introducing biofilms. **Biofilms**, v. 1, n. 1, p. 1-4, 2004.

D'EÇA JÚNIOR, A. et al. *In vitro* differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 334-338, 2011.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 8, p. 1387-1392, 2001.

DOSTAL, J. et al. Simple method for screening *Candida* spp. isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 712-716, 2003.

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

FALCÃO, A. F. P.; SANTOS, L. B.; SAMPAIO, N. M. Candidíase associada a próteses dentárias. **Sitientibus**, v. 30, p. 135-46, 2004.

FATHILAH, A. R. et al. The antifungal properties of chlorhexidine digluconate and cetylpyrinidinium chloride on oral *Candida*. **Journal of Dentistry**, v. 40, n. 7, p. 609-615, 2012.

FERRAZZA, M. H. S. H. et al. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 2, p. 58-63, 2005.

FERREIRA, A. V. et al. *Candida albicans* and non-*C. albicans* *Candida* species: comparison of biofilm production and metabolic activity in biofilms, and putative virulence properties of isolates from hospital environments and infections. **Mycopathologia**, v. 175, n. 3-4, p. 265-272, 2013.

FOTEDAR, R.; AL-HEDAITHY, S. S. A. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. **Mycoses**, v. 48, n. 1, p. 62-7, 2005.

FU, J. et al. *In vitro* antifungal effect and inhibitory activity on biofilm formation of seven commercial mouthwashes. **Oral Diseases**, v. 20, n. 8, p. 815-820, 2014.

GARROTE, M. S. et al. Antibacterial effect of oral antiseptics on facultative bacteria. **Stomatos**, v. 19, n. 37, 2014

GARCIA, M. C.; LIPKE, P. N.; KLOTZ, S. A. Pathogenic microbial amyloids: Their function and the host response. **OA Microbiology**, v. 1, n. 1, 2013.

GEBRAN, M. P.; GEBERT, A. P. O. Controle químico e mecânico de placa bacteriana. **Tuiuti Ciência e Cultura**, v. 26, n. 3, p. 45-57, 2002.

GILFILLAN, G. D. et al. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. **Microbiology** v. 144, p.829–838, 1998.

GIULIANA, G. et al. *In vitro* activities of antimicrobial agents against *Candida* species. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 87, n. 1, p. 44-49, 1999.

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

HERNÁNDEZ, A. T. et al. Interspecies competition triggers virulence and mutability in *Candida albicans*–*Pseudomonas aeruginosa* mixed biofilms. **The ISME Journal**, v. 8, n. 10, p. 1974-1988, 2014.

HOEGL, L.; OLLERT, M.; KORTING, H. C. The role of *Candida albicans* secreted aspartic proteinase in the development of candidoses. **Journal of Molecular Medicine**, v. 74, n. 3, p. 135-142, 1996

HOYER, L. L. et al. Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-*albicans* *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. **Genetics**, v. 157, n. 4, p. 1555-1567, 2001.

HOSTETTER, E. Adhesin and ligand involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 1, p. 29-42, 1994.

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

JUNQUEIRA, J. C. et al. Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 1, p. 17-24, 2012.

KALKANCI, A. et al. Distribution of secreted aspartyl proteinases using a polymerase chain reaction assay with SAP specific primers in *Candida albicans* isolates. **Folia Microbiologica**, v. 50, n. 5, p. 409-413, 2005.

KANTARCIOĞLU, A. S.; YÜCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. **Mycoses**, v. 45, n. 5, p. 160-165, 2002.

KAUTZKY, S.; STAUDINGER, T.; PRESTERL, E. Invasive *Candida* infections in patients of a medical intensive care unit. **Wiener klinische Wochenschrift**, p. 1-11, 2014.

KLEINEGGER, C. L. et al. Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2246-2254, 1996.

KLOTZ, S. A.; LIPKE, P. N. The perfect adhesive. **Proteins**, v. 16, p. 18, 2010

KUMAR, C. P. G.; KUMAR, S. S.; MENON, T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. **Mycopathologia**, v. 161, n. 4, p. 213-218, 2006.

KUMAR, C. P. G.; MENON, T. Biofilm production by clinical isolates of *Candida* species. **Medical Mycology**, v. 44, n. 1, p. 99-101, 2006.

KURIYAMA, T.; WILLIAMS, D. W.; LEWIS, M. A. O. *In vitro* secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, n. 6, p. 405-407, 2003.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. Definition, classification and nomenclature of the yeasts. **Yeasts, A Taxonomic Study**, v. 4, p. 3-5, 1998.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; **Micologia Médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8^a ed., São Paulo: Savier, 1991

LAMFON, H. et al. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 383-385, 2004.

LOCKHART, S. R. et al. Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. **Journal of Dental Research**, v. 78, n. 4, p. 857-868, 1999.

LORD, T. H. Determinative bacteriology manual. 2^a ed. Mineapolis: **Burgess**, 1960.

LYON. P. J.; RESENDE, M. A. Evaluation of adhesion to buccal epithelial cells in *Candida* species obtained from denture wearers after exposure to fluconazole. **Mycoses**, v. 50, n. 1, p. 21-24, 2007.

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

MARCOS-ZAMBRANO, L. J. et al. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 8, p. 1192-1198, 2014.

MARSH, P. D. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. **Journal of Dental Research**, v. 71, n. 7, p. 1431-38, 1992.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

MEILLER, T. F. et al. *In vitro* studies of the efficacy of antimicrobials against fungi. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 91, n. 6, p. 663-670, 2001.

MELO, I. A. et al. Avaliação da incidência de *Candida* spp. associadas ao uso de prótese parcial ou total e perfil dos pacientes atendidos pela clínica odontológica de uma faculdade em Araguaína-TO. **Revista Científica do ITPAC**, v 6, n 2, 2013

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Interaction of pathogenic fungi with host cells: molecular and cellular approaches. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 383-394, 2005.

MOHANDAS, V; BALLAL, M. Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 4, 2011.

MORA, C. et al. How many species are there on Earth and in the ocean? **PLoS Biology**, v. 9, n. 8, p. 1034-1036, 2011.

MONOD, M. et al. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. **Molecular Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 357-368, 1994.

MONROY-PÉREZ, E. et al. Frequency and expression of ALS and HWP1 genotypes in *Candida albicans* strains isolated from Mexican patients suffering from vaginal candidosis. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. 151-157, 2012.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 3, p. 400-28, 2003.

NAGLIK, J. R. et al. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 915-926, 2004.

NAVARRO, C. C. et al. *Candida albicans*: avaliação da ação antimicrobiana *in vitro* de anti-sépticos bucais sobre as cepas isoladas de próteses superiores. **Revista da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas**, v. 17, p. 56-59, 1995.

NCCLS. **Reference method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility testing of yeast**: Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA. 2002.

OKSUZ, S. et al. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. **Japanese journal of Infectious Diseases**, v. 60, n. 5, p. 280, 2007.

PAIVA, L. C. F. et al. Assessment of *in vitro* biofilm formation by *Candida* species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics. **Micron**, v. 43, n. 2, p. 497-502, 2012.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, n. 2, p. 157-165, 2008.

PÉREZ, A. L. A. L. et al. Atividade Antifúngica de Antissépticos Buciais sobre *Candida* spp. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 1, p. 69-74, 2011.

PIERCE, C. G. et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**, v. 3, n. 9, p. 1494-500, 2008.

PIERCE, C. G. et al. A 96 well microtiter plate-based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 44, 2010.

PIRES, R. H. et al. *Candida parapsilosis* complex water isolates from a haemodialysis unit: biofilm production and *in vitro* evaluation of the use of clinical antifungals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 646-54, 2011.

RAMAGE G. et al. Our current understanding of fungal biofilms fungal biofilms, **Critical Reviews in Microbiology**, vol. 35, no. 4, p. 340–355, 2009.

- RAMAGE, G. et al. *Candida* biofilms: an update. **Eukaryotic cell**, v. 4, n. 4, p. 633-638, 2005.
- RAMAGE, G. et al. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 973-980, 2002.
- REDDING, S. et al. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation on denture material. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 107, n. 5, p. 669-672, 2009.
- REES, J. R. et al. The epidemiological features of invasive mycotic infections in the San Francisco Bay Area, 1992–1993: results of a population-based laboratory active surveillance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. 1138–1147, 1998.
- REMOLD, H.; FASOLD, H.; STAIB, F. Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 167, n. 2, p. 399-406, 1968.
- RICETO, É. et al. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2014.
- RÜCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 20, n. 3, p. 233-44, 1982.
- SALIM, N. et al. Chlorhexidine is a highly effective topical broad-spectrum agent against *Candida* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 1, p. 65-69, 2013.
- SAMARANAYAKE L. P. Commensal oral *Candida* in Asian cohorts. **International Journal of Oral Science** v. 1, p. 2-5, 2009.
- SAMARANAYAKE, L. P. et al. Carboxylic acids and pH of denture plaque in patients with denture stomatitis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 12, n. 2, p. 84-89, 1983.
- SÁNCHEZ-VARGAS, L. O. et al. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 10, p. 1318-1326, 2013.
- SEABRA, C. L. et al. Differential Adherence and Expression of Virulence traits by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* in Mono and dual-species cultures in Artificial Saliva. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1-2, p. 33-40, 2013.
- SHAPIRO, S.; GIERTSEN, E.; GUGGENHEIM, B. An *in vitro* oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. **Caries Research**, v. 36, n. 2, p. 93-100, 2002.
- SHIN, J. H. et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1244-1248, 2002.
- SILVA, S. et al. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v. 47, n. 7, p. 681-689, 2009.
- SILVA, N. C.; NERY, J. M.; DIAS, A. L. T. Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance. **Mycoses**, v. 57, n. 1, p. 1-11, 2014.

SOLL, D. R. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. **Acta Tropica**, v. 81, n. 2, p. 101-110, 2002.

STAIB, F. Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. **Medical Mycology**, v. 4, n. 3, p. 187-193, 1966.

TAKAHASHI, N. Microbial ecosystem in the oral cavity: metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. **International Congress Series**, v. 1284, p.103-12, 2005.

TEIXEIRA, M. L.; MEZZARI, A. Prevalência de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* em Próteses Dentárias. **Revista NewsLab**, v. 70, p. 116-122, 2005.

THEIN, Z. M.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. **Archives of Oral Biology**, v. 52, n. 12, p. 1200-1208, 2007.

TOTI-RODRIGUES, M. L. A. de métodos para testes de suscetibilidade in vitro de enxaguantes bucais frente a espécies do gênero *Candida*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, 2008.

TRABOULSI, R. S.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. *In vitro* activity of inexpensive topical alternatives against *Candida* spp. isolated from the oral cavity of HIV-infected patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. 3, p. 272-276, 2008.

TREVIÑO-RANGEL, R. J. et al. Biofilm formation and genetic variability of BCR1 gene in the *Candida* parapsilosis complex. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2015.

TRONCHIN, G. et al. Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. **Medical Mycology**, v. 46, n. 8, p. 749-772, 2008.

VILLAR-VIDAL, M. et al. Variation in biofilm formation among blood and oral isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, n. 9, p. 660-665, 2011.

WALKER, C.; SEDLACEK, M. J. An *in vitro* biofilm model of subgingival plaque. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 22, n. 3, p. 152-161, 2007.

WILLIAMS, D. W. et al. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. **Journal of Oral Microbiology**, v. 5, 2013.

WU, T. et al. *In vitro* proteinase production by oral *Candida albicans* isolates from individuals with and without HIV infection and its attenuation by antimycotic agents. **Journal of Medical Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 311-316, 1996.

YAMADA, Y. et al. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 55, n. 4, p. 122-25, 2002.

ZOBELL, CLAUDE E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **Journal of Bacteriology**, v. 46, n. 1, p. 39, 1943.

A

PÊNDICE

APÊNDICE A. Procedência dos: meios de cultura, sais, carboidratos, corantes e outros reagentes.

CHROMagar <i>Candida</i> ®	Difco
Sabouraud Dextrose Agar.....	Oxoid
Fubá.....	Carrefuor
Ágar bacteriológico.....	Difco
<i>Tween</i> 80.....	Merck
Peptona.....	Merck
Extrato de levedura.....	Oxoid
Carboidratos.....	Sigma
Sulfato de amônio.....	Synth
Fosfato de potássio monobásico.....	Synth
Fosfato de potássio dibásico.....	Reagen
Sulfato de magnésio heptaidratado.....	Ecibra
<i>Yeast carbon base</i>	Difco
Albumina bovina fração V.....	Sigma
Protovit.....	Roche
D- glicose.....	Synth
RPMI 1640.....	Invitrogen
MOPS.....	J. T. Baker
NaOH 1 molar.....	Merck
CHX 0,12%	Colgate-Palmolive
CCP 0,07%.....	Colgate-Palmolive
CCP 0,075%.....	Procter & Gamble
Cloreto de sódio.....	Reagen
Fosfato de sódio básico heptado.....	Synth
Tris HCl.....	Invitrogen
EDTA.....	Invitrogen
Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	Invitrogen
Tris Base.....	Invitrogen
Fenol.....	Invitrogen
Clorofórmio.....	Merck
Álcool Isoamílico.....	Merck
Glicerol.....	Reagen
Azul de Bromofenol.....	Inlab
Agarose.....	Invitrogen
XTT.....	Sigma
Menadione.....	Sigma
Acetona.....	Synth

APÊNDICE B – Meios de Cultura

CHROMagar *Candida*® (Difco)

CHOMagar <i>Candida</i> ®	47,7g
Água destilada.....	1000mL

Conforme a recomendação do fabricante (Difco), misturar o pó em água destilada esterilizada quente, ferver até a fusão e distribuir 20mL em placas de Petri de 20x 100mm, solidificar e conservar em geladeira.

Sabouraud dextrose ágar

Sabouraud dextrose ágar.....	65g
Água destilada.....	1000mL

Conforme a recomendação do fabricante, misturar o pó em água, aquecer até a fusão e distribuir em tubos. Autoclavar a 121°C por 20 minutos. Solidificar em posição inclinada e conservar em geladeira.

Ágar fubá (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991)

Fubá.....	40g
Ágar.....	20g
<i>Tween</i> 80.....	10mL
Água.....	1000mL

Aquecer o fubá com a água em banho-maria 60°C, durante 1 hora. Filtrar com o auxílio de gaze dobrada e completar o volume até 1000mL. Adicionar o ágar e aquecer até a fusão. Adicionar o *Tween* 80 e homogeneizar o meio. Distribuir em tubos e autoclavar a 121°C durante 20 minutos. Solidificar e conservar em geladeira.

Meio para fermentação dos carboidratos (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991)

Peptona.....	2,5g
Extrato de Levedura.....	2,5g
Carboidrato.....	3,0g
Água destilada.....	100mL

Dissolver a peptona e o extrato de levedura em água destilada. Adicionar um dos seguintes carboidratos: dextrose, lactose, maltose e sacarose. Distribuir aproximadamente 3,5mL do meio em tubos de 13x100mm, contendo de tubo de Durhan. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos, para evitar a caramelização ou hidrólise dos açúcares, retirar os tubos rapidamente da autoclave e resfriar em banho de gelo (LORD, 1960)

Meio para assimilação de fontes de carbono (Meio C – LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991)

Sulfato de amônio.....	5g
Fosfato de potássio monobásico.....	1g
Sulfato de magnésio heptaidratado.....	0,5g
Ágar.....	20g
Água destilada.....	1000mL

Dissolver os componentes em água destilada e aquecer até fusão do ágar. Distribuir 30mL do meio em cada tubo, autoclavar a 121°C durante 20 minutos, solidificar e manter em geladeira.

Ágar proteinase (RÜCHEL; TEGELER; TROST, 1982)

Base - A

Yeast carbono base.....	11,7g
Albumina bovina fração V	2g
Protovit.....	2,5mL
Água destilada	100mL

Dissolver em água destilada e esterilizar por sistema de filtração com membranas Millipore de 0,22µm.

Base - B

Ágar.....	18g
Água destilada.....	900mL

Misturar o ágar em água destilada e autoclavar a 121°C por 20 minutos, resfriar a cerca de 50°C. Misturar com o respectivo componente A. Distribuir em placa de Petri, solidificar e conservados em geladeira.

RPMI 1640 tamponado com MOPS a 0,165 mol/L (CLSI, 2002)

RPMI 1640.....	10,4g
Tampão MOPS.....	34,5g
D- glicose.....	18g
Água destilada.....	1000mL

Dissolver o tampão MOPS (ácido morfolino-propanossulfônico) em 900mL de água destilada com agitação constante. Acrescentar a dextrose e o RPMI 1640 e ajustar pH a $7,0 \pm 0,1$ com hidróxido de sódio 1 molar. Completar volume do meio e esterilizar por filtração a vácuo com membrana Millipore de 0,22 µm. Conservar em geladeira.

APÊNDICE C – Reagentes**Solução-Tampão salina fosfato 50mmol⁻¹ pH 7,4 (PBS 1X)**

Cloreto de sódio.....	8g
Fosfato de sódio básico heptahidratado.....	2,17g
Fosfato de potássio.....	0,2g
Cloreto de potássio	0,2g
Água Milli-Q.....	1000mL

Dissolver os componentes em 500mL de água Milli-Q, ajustar o pH e completar o volume. Armazenar em frascos plásticos e conservar em geladeira.

Solução-tampão Tris HCL 0,5 mol L⁻¹ pH 8,5

Tris HCL.....	12,1g
Água destilada esterilizada	100mL

Dissolver o Tris HCL em 80mL de água destilada esterilizada, acertar o pH para 8,5 com NaOH 10 mol⁻¹. Completar o volume e autoclavar a 121°C por 20 minutos. Conservar na geladeira.

EDTA 0,5 mol L⁻¹ pH 8,0

EDTA.....	18,61g
Água destilada esterilizado.....	100mL

Dissolver o EDTA em 80mL de água destilada esterilizada e acerta o pH para 8,0 com NaOH 1 molar. Completar o volume em balão volumétrico e autoclavar a 121°C por 15 minutos. Conservar na geladeira.

Solução-tampão de extração (TED)

Tris HCL pH 8,5 a 0,5 mol ⁻¹	60mL
Cloreto de sódio.....	2,2g
EDTA pH 8,0 a 0,5 mol L ⁻¹	7,5mL
Dodecil sulfato de sódio (SDS).....	0,75g
Água destilada esterilizada.....	150mL

Dissolver o cloreto de sódio e o SDS em 100mL de água sob agitação, em seguida acrescentar o Tris HCL e o EDTA. Acertar o volume em balão volumétrico e autoclavar a 121°C por 20 minutos. Conservar em geladeira.

Solução-tampão TE – Tris-EDTA

Tris – base 1 mol L ⁻¹ pH 8,0.....	10mL
EDTA 0,5 mol L ⁻¹ pH 8,0.....	2mL
Água destilada esterilizada.....	1000mL

Misturar os componentes em 500mL de água e completar o volume em balão volumétrico. Conservar em geladeira.

Fenol-clorofórmio

Fenol.....	50g
Clorofórmio.....	48mL
Álcool isoamílico.....	2mL
Solução-tampão TE.....	10mL

Dissolver o fenol no clorofórmio sob agitação. Transferir a solução para um frasco âmbar e adicionar o álcool isoamílico e o tampão TE. Conservar em geladeira.

Solução-tampão TBE (Tris – ácido bórico – EDTA, 5x concentrado)

Tris – base.....	54g
EDTA.....	3,725g
Ácido bórico.....	27,83g
Água destilada esterilizada.....	1000mL

Dissolver o tris-base em 500mL de água, sob agitação, acrescentar o EDTA. Após a dissolução, adicionar o ácido bórico. Acertar o volume em balão volumétrico. Conservar a temperatura ambiente.

Solução-tampão Tris-NaCl

Tris pH 8,0.....	5mL
Cloreto de sódio.....	29,2g
Água destilada.....	500mL

Dissolver o cloreto de sódio em 400mL de água destilada esterilizada, sob agitação acrescentar o Tris pH 8,0. Acertar o volume em balão volumétrico. Conservar à temperatura ambiente.

Solução-tampão *Loading*

Glicerol.....	6,6mL
Azul de bromofenol.....	0,01g
TBE 0,5X.....	13,4mL

Dissolver os componentes no TBE 0,5X. Conservar em geladeira.

Gel de agarose 1%

Agarose.....	0,9g
TBE 0,5X.....	90mL

Misturar a agarose em TBE 0,05X. Aquecer em micro-ondas por 1 minuto, agitar e repetir o procedimento. Resfriar em água corrente e verter no suporte da cuba. Aguardar solidificação.

Corante XTT (PIERCE et al. 2010)

XTT.....	0.5g
PBS.....	1000mL
Menadione.....	1 µL

Dissolver o XTT em PBS e esterilizar por filtração ao vácuo com membrana Millipore de 0,22 µm. Distribuir em tubos esterilizados e vedados com folhas de alumínio. Manter a -70°C. Na hora do uso, descongelar e adicionar 1µL de solução de menadione em cada tubo de XTT (10mM em 100% de acetona).

APÊNDICE D: Identificação das espécies de *Candida* isoladas de pacientes usuários de próteses bucais

Amostra	UFC	Pseudohifas	Clamidocondídio	Fermentação				Assimilação										Gênero/espécie	
				Gli	Sac	Mal	Lac	Gli	RF	Tr	Ram	Cel	Mel	Mal	In	Lac	Met		Xi
2V	5	+	+																<i>C.albicans</i>
3V	24	+	+																<i>C.albicans</i>
4V	14	+	+																<i>C.albicans</i>
5V	5	+	+																<i>C. albicans</i>
5A	30	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+					<i>C. tropicalis</i>
5R	70	-	-	+	-	-	-	+	-						-	-	-	-	<i>C. glabrata</i>
7V	20	+	+																<i>C.albicans</i>
9V	40	+	+																<i>C.albicans</i>
13V	4	+	+																<i>C.albicans</i>
14V	2	+	+																<i>C.albicans</i>
20B	2	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+					<i>C. parapsilosis</i>
20V	6	+	+																<i>C.albicans</i>
24V	12	+	+																<i>C.albicans</i>
24B	2	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+					<i>C. krusei</i>
27V	4	+	+																<i>C.albicans</i>
31A	1	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+					<i>C. tropicalis</i>
32V	45	+	+																<i>C.albicans</i>
34V	1	+	+																<i>C.albicans</i>
34R	1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+					<i>C. krusei</i>
35V	1	+	+																<i>C.albicans</i>
40V	4	+	+																<i>C.albicans</i>
42V	3	+	+																<i>C.albicans</i>
45V	3	+	+																<i>C.albicans</i>
49R	1	-	-	+	-	-	-	+	-						-	-	-	-	<i>C. glabrata</i>
50R	9	-	-	+	-	-	-	+	-						-	-	-	-	<i>C. glabrata</i>
50V	4	+	+																<i>C.albicans</i>
51V	2	+	+																<i>C.albicans</i>
53V	54	+	+																<i>C.albicans</i>
53R	42	-	-	+	-	-	-	+	-						-	-	-	-	<i>C. glabrata</i>
55V	10	+	+																<i>C.albicans</i>
55B	10	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-					<i>C. krusei</i>
56V	5	+	+																<i>C.albicans</i>
57V	2	+	+																<i>C.albicans</i>
57B	6	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+					<i>C. krusei</i>
60V	28	+	+																<i>C.albicans</i>
61V	13	+	+																<i>C.albicans</i>
64V	14	+	+																<i>C.albicans</i>
66V	9	+	+																<i>C.albicans</i>
66B	17	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+					<i>C. parapsilosis</i>
67A	4	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+					<i>C. tropicalis</i>
68V	1	+	+																<i>C.albicans</i>
70V	5	+	+																<i>C.albicans</i>
70B	59	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+					<i>C. krusei</i>

Gli = glicose, Sac = sacarose, Mal = maltose, Lac = lactose, Rf = rafinose, Tr = trealose, Ran = ramnose, Cel = celobiose, Me = melibiose, In = inositol, Met = metanol, Xi = xilose .

APÊNDICE E: Genes ALS2, ALS3, SAP1 e SAP3 detectados entre as espécies de *Candida* isoladas de saliva de pacientes usuários de próteses bucais.

Amostra	ALS2	ALS3	SAP1	SAP3
2V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
4V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
5V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
5A	ND	ND	ND	ND
5R	ND	ND	ND	ND
7V	ND	ND	ND	ND
9V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
13V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
14V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
20V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
20B	ND	ND	ND	ND
24V	ND	ND	Positivo	ND
24B	ND	ND	ND	ND
27V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
31A	ND	ND	ND	ND
32V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
34R	ND	ND	ND	ND
34V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
35V	ND	ND	ND	ND
40V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
42V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
45V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
49R	ND	ND	ND	ND
50R	ND	ND	ND	ND
50V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
51V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
53V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
53R	ND	ND	ND	ND
55V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
55B	ND	ND	ND	ND
56V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
57V	ND	ND	Positivo	ND
57B	ND	ND	ND	ND
60V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
61V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
64V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
66V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
66R	ND	ND	ND	ND
67A	ND	ND	ND	ND
68V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
70V	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
70B	ND	ND	ND	ND

ND = não detectado

APÊNDICE F: Valores médios de Pzr entre as espécies de *Candida* isoladas de saliva de pacientes usuários de próteses bucais.

Amostras	Proteinase ($\overline{Pzr}$)	Amostras	Proteinase ($\overline{Pzr}$)
2V	1,00	45V	0,88
3V	0,78	49R	0,83
4V	1,00	50R	1,00
5V	0,57	50V	0,70
5A	0,74	51V	0,76
5R	1,00	53V	1,00
7V	1,00	53R	1,00
9V	0,74	55V	0,53
13V	0,68	55B	1,00
14V	1,00	56V	0,80
20V	0,79	57V	0,89
20B	0,89	57B	0,66
24V	0,78	60V	0,95
24B	1,00	61V	0,89
27V	0,75	64V	0,70
31A	1,00	66V	1,00
32V	0,80	66R	1,00
34V	0,70	67A	1,00
34R	0,68	68V	0,77
35V	1,00	70V	0,95
40V	1,00	70B	1,00
42V	0,61		

Pzr= 1: negativo para produção da enzima; $0,64 \leq Pzr \leq 0,99$: produtor de enzima; $Pzr \leq 0,63$: fortemente produtor da enzima.

APÊNDICE G: Valores de absorvância e classificação da formação de biofilme (24h) e pre-biofilme (6h) entre as monoculturas das espécies de *Candida*.

Amostras	Biofilme 6h	Grupo	Biofilme 24h	Grupo
2V	0,151	2	0,387	2
3V	0,393	2	0,911	4
4V	0,148	2	0,586	3
5V	0,110	2	0,488	3
5A	0,049	1	0,036	1
5R	0,070	1	0,070	1
7V	0,140	2	1,065	4
9V	0,183	2	0,880	4
13V	0,178	2	0,415	3
14V	0,062	1	0,038	1
20V	0,058	1	0,120	2
20B	0,048	1	0,018	1
24V	0,048	1	0,197	2
24B	0,007	1	0,023	1
27V	0,047	1	0,100	2
31A	0,172	2	0,478	3
32V	0,083	1	0,245	2
34V	0,087	1	0,261	2
34R	0,010	1	0,059	1
35V	0,049	1	0,269	2
40V	0,077	1	0,179	2
42V	0,079	1	0,114	2
45V	0,143	2	0,622	3
49R	0,060	1	0,322	2
50R	0,036	1	0,047	1
50V	0,042	1	0,084	1
51V	0,014	1	0,123	2
53V	0,157	2	0,176	2
53R	0,046	1	0,107	2
55V	0,059	1	0,583	3
55B	0,088	1	0,356	2
56V	0,254	2	0,564	3
57V	0,147	2	0,882	4
57B	0,018	1	0,040	1
60V	0,047	1	0,259	2
61V	0,062	1	0,608	3
64V	0,112	2	0,460	3
66V	0,039	1	0,045	1
66R	0,063	1	0,036	1
67A	0,051	1	0,394	2
68V	0,082	1	0,046	1
70V	0,098	1	0,601	3
70B	0,135	2	0,212	2

1=biofilme negativo; 2= baixa produção de biofilme; 3= produção moderada de biofilme, 4= forte produtor de biofilme.

APÊNDICE H: Valores de absorbância e classificação da formação de biofilme de 24h e pré-biofilme (6h) de isolados mistos das espécies de *Candida*.

Amostras	Biofilme 6h	Grupo	Biofilme 24h	Grupo
5V	0,110	2	0,488	3
5A	0,049	1	0,036	1
5R	0,070	1	0,070	1
5VAR	0,362	2	0,339	2
20V	0,058	1	0,120	2
20B	0,048	1	0,018	1
20VB	0,086	1	0,487	3
24V	0,048	1	0,197	2
24B	0,007	1	0,023	1
24VB	0,051	1	0,478	3
34V	0,087	1	0,261	2
34R	0,010	1	0,059	1
34RV	0,222	2	0,688	3
50R	0,036	1	0,047	1
50V	0,042	1	0,084	1
50RV	0,290	2	0,393	2
53V	0,157	2	0,176	2
53R	0,046	1	0,107	2
53RV	0,379	2	0,577	3
55V	0,059	1	0,583	3
55B	0,088	1	0,356	2
55RV	0,268	2	0,770	4
57V	0,147	1	0,882	4
57B	0,018	1	0,040	1
57BV	0,135	2	0,716	3
66V	0,039	1	0,045	1
66R	0,063	1	0,036	1
66VR	0,181	2	0,446	3
70V	0,098	1	0,601	3
70B	0,135	2	0,212	2
70VB	0,105	2	0,199	2

1=biofilme negativo; 2= baixa produção de biofilme; 3= produção moderada de biofilme, 4 = forte produtor de biofilme.

APÊNDICE I: Perfil das espécies *Candida* frente aos fatores de virulência.

Amostras	Proteinase	Biofilme	ALS2	ALS3	SAP1	SAP3
2V	-	+	+	+	+	+
3V	+	+	+	+	+	+
4V	-	+	+	+	+	+
5V	+	+	+	+	+	+
5A	+	-	-	-	-	-
5R	-	-	-	-	-	-
7V	-	+	-	-	-	-
9V	+	+	+	+	+	+
13V	+	+	+	+	+	+
14V	-	-	+	+	+	+
20V	+	+	+	+	+	+
20B	+	-	-	-	-	-
24V	+	+	-	-	+	-
24B	-	-	-	-	-	-
27V	+	+	+	+	+	+
31A	-	+	-	-	-	-
32V	+	+	+	+	+	+
34V	+	+	+	+	+	+
34R	+	-	-	-	-	-
35V	-	+	-	-	-	-
40V	-	+	+	+	+	+
42V	+	+	+	+	+	+
45V	+	+	+	+	+	+
49R	+	+	-	-	-	-
50R	-	-	-	-	-	-
50V	+	-	+	+	+	+
51V	+	+	+	+	+	+
53V	-	+	+	+	+	+
53R	-	+	-	-	-	-
55V	+	+	+	+	+	+
55B	-	+	-	-	-	-
56V	+	+	+	+	+	+
57V	+	+	-	-	+	-
57B	+	-	-	-	-	-
60V	+	+	+	+	+	+
61V	+	+	+	+	+	+
64V	+	+	+	+	+	+
66V	-	-	+	+	+	+
66R	-	-	-	-	-	-
67A	-	+	-	-	-	-
68V	+	-	+	+	+	+
70V	+	+	+	+	+	+
70B	-	+	-	-	-	-

APÊNDICE J: Valores de absorvância e classificação da formação de biofilme entre as monoculturas das espécies de *Candida*.

Amostras	CCP - 0,075%	Grupo	CCP - 0,07%	Grupo	CHX -0,12%	Grupo
2V	0,060	1	0,044	1	0,114	2
3V	0,022	1	0,040	1	0,036	1
4V	0,041	1	0,135	2	0,065	1
5V	0,088	1	0,108	2	0,151	2
5A	0,001	1	0,000	1	0,013	1
5R	0,006	1	0,004	1	0,029	1
7V	0,021	1	0,023	1	0,025	1
9V	0,062	1	0,022	1	0,061	1
13V	0,045	1	0,186	2	0,031	1
14V	0,002	1	0,007	1	0,004	1
20V	0,002	1	0,014	1	0,020	1
20B	0,001	1	0,001	1	0,011	1
24V	0,001	1	0,005	1	0,014	1
24B	0,002	1	0,001	1	0,008	1
27V	0,002	1	0,006	1	0,017	1
31A	0,039	1	0,093	1	0,039	1
32V	0,001	1	0,008	1	0,006	1
34V	0,004	1	0,022	1	0,024	1
34R	0,004	1	0,006	1	0,012	1
35V	0,004	1	0,010	1	0,003	1
40V	0,009	1	0,024	1	0,007	1
42V	0,007	1	0,018	1	0,006	1
45V	0,005	1	0,008	1	0,002	1
49R	0,028	1	0,026	1	0,050	1
50R	0,024	1	0,008	1	0,028	1
50V	0,036	1	0,014	1	0,016	1
51V	0,023	1	0,019	1	0,041	1
53V	0,017	1	0,020	1	0,006	1
53R	0,038	1	0,008	1	0,016	1
55V	0,004	1	0,011	1	0,004	1
55B	0,013	1	0,016	1	0,022	1
56V	0,013	1	0,022	1	0,012	1
57V	0,003	1	0,012	1	0,002	1
57B	0,002	1	0,003	1	0,002	1
60V	0,001	1	0,004	1	0,003	1
61V	0,001	1	0,010	1	0,004	1
64V	0,001	1	0,003	1	0,002	1
66V	0,002	1	0,003	1	0,003	1
66R	0,020	1	0,009	1	0,005	1
67A	0,004	1	0,007	1	0,002	1
68V	0,003	1	0,008	1	0,008	1
70V	0,005	1	0,004	1	0,003	1
70B	0,003	1	0,014	1	0,001	1

1=biofilme negativo; 2= baixa produção de biofilme; 3= produção moderada de biofilme, 4 = forte produtor de biofilme.

APÊNDICE K: Valores da atividade (absorbância e grupo) de três formulações comerciais frente os isolados mistos das espécies de *Candida*.

Amostras	CCP - 0,075%	Grupo	CCP - 0,07%	Grupo	CHX - 0,12%	Grupo
5V	0,088	1	0,108	2	0,151	2
5A	0,001	1	0,000	1	0,013	1
5R	0,006	1	0,004	1	0,029	1
5VAR	0,042	1	0,043	1	0,051	1
20V	0,002	1	0,014	1	0,020	1
20B	0,001	1	0,001	1	0,011	1
20VB	0,014	1	0,010	1	0,007	1
24V	0,001	1	0,005	1	0,014	1
24B	0,002	1	0,001	1	0,008	1
24VB	0,005	1	0,010	1	0,006	1
34V	0,004	1	0,022	1	0,024	1
34R	0,004	1	0,006	1	0,012	1
34RV	0,032	1	0,057	1	0,043	1
50R	0,024	1	0,008	1	0,028	1
50V	0,036	1	0,014	1	0,016	1
50RV	0,033	1	0,026	1	0,056	1
53V	0,017	1	0,020	1	0,006	1
53R	0,038	1	0,008	1	0,016	1
53RV	0,037	1	0,024	1	0,052	1
55V	0,004	1	0,011	1	0,004	1
55B	0,013	1	0,016	1	0,022	1
55RV	0,013	1	0,037	1	0,021	1
57V	0,003	1	0,012	1	0,002	1
57B	0,002	1	0,003	1	0,002	1
57BV	0,003	1	0,011	1	0,002	1
66V	0,002	1	0,003	1	0,003	1
66R	0,020	1	0,009	1	0,005	1
66VR	0,003	1	0,008	1	0,006	1
70V	0,005	1	0,004	1	0,003	1
70B	0,003	1	0,014	1	0,001	1
70VB	0,002	1	0,011	1	0,004	1

1=biofilme negativo; 2= baixa produção de biofilme; 3= produção moderada de biofilme, 4 = forte produtor de biofilme