



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Liliana de Sousa Fernandes

**Estratégias alternativas para combater  
biofilmes de *Candida***

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Biotecnologia

Trabalho efetuado sob a orientação de

Doutora Maria Elisa da Costa Rodrigues

Professora Doutora Mariana Contente Rangel Henriques

Outubro de 2017

“A porta entreaberta convida à curiosidade. Entrei, lenta e serenamente, mas apenas encontrei silêncio e sombras. Ao mesmo tempo começo a perceber o que me rodeia, formas lineares, retilíneas e um odor que embora não consiga qualificar, me transmite tranquilidade. Os meus olhos percebem melhor as formas - são livros.”

Elísio Maia Araújo



## **AGRADECIMENTOS**

Concluída esta jornada importante na minha vida académica, não posso deixar de constatar o quanto aprendi e desenvolvi as capacidades adquiridas durante a licenciatura e o mestrado, também não posso deixar de reconhecer que tive um grande contributo nesse sentido e que a realização desta dissertação teve o envolvimento de várias pessoas. Por isso, queria expressar os meus sinceros agradecimentos:

Em primeiro lugar à Doutora Elisa Rodrigues, por ter sido incansável desde do primeiro dia, agradeço-lhe toda a simpatia, total disponibilidade, dedicação, motivação e paciência manifestada. Agradeço à Professora Doutora Mariana Henriques pelo apoio, disponibilidade e simpatia que demonstrou durante a realização deste trabalho. Queria agradecer a ambas pela orientação, aconselhamento, sugestões sempre muito relevantes e pelos excelentes ensinamentos que foram indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho.

Gostaria de deixar uma palavra de agradecimento a todos os elementos do laboratório LIBRO que sempre me ajudaram quando precisei, principalmente ao grupo Candida, pelas sugestões que me deram ao longo do trabalho, foram um grande contributo. Não posso deixar de agradecer à Célia, pela simpatia, ajuda e paciência que me disponibilizou desde do início. Assim, como à Doutora Ana Oliveira, pelas sugestões e por ter-me cedido o mel, que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Quero ainda deixar um grande obrigada às meninas dos almoços/ pausas pelos momentos de descontração, pelo apoio e pela amizade que construímos. Em especial à Ana Luísa pela amizade, apoio, conselhos, pela paciência e por estar sempre presente durante estes dois anos. Também não podia deixar de agradecer às amigas de sempre, Cátia, Adriana e Márcia por estarem sempre presentes, por apoiarem e incentivarem. E às minhas meninas da Covilhã, Sofia, Sara e Inês com quem partilhei e irei sempre partilhar os melhores momentos da minha vida, agradeço pela amizade, incentivo e apoio constante, e por acreditarem sempre no meu trabalho e alegrarem os meus dias.

E por último mas não menos importante, um grande obrigada a minha família pelo apoio absoluto, motivação, por toda a confiança depositada em mim, pelo enorme carinho e compreensão não só agora mas ao longo de toda a minha vida e por me terem ensinado a maior lição que levo para a vida “nesta casa não existe a palavra desistir”. Queria deixar um obrigada especial a minha irmã pela paciência e ajuda que me deu ao longo destes anos. Sem eles esta conquista não seria possível, a eles todos os meus agradecimentos não serão suficientes.

A Todos, Muito Obrigada!



Este estudo foi apoiado pela FCT no âmbito do financiamento estratégico da unidade UID/BIO/04469/2013 e COMPETE 2020 (POCI-01-0145-FEDER-006684) e operação BioTecNorte (NORTE-01-0145-FEDER-000004) financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional no âmbito de Norte 2020 - Programa Operacional Regional do Norte.



## RESUMO

As infecções fúngicas nosocomiais causadas por espécies de *Candida* representam as causas mais comuns de infecção do trato urinário e da corrente sanguínea. Estas infecções estão geralmente associadas a biofilmes. Nestes casos, quando ocorre infecção, os tratamentos existentes são praticamente ineficazes, existindo assim uma necessidade crescente na procura de terapias antifúngicas mais eficazes e com menores efeitos adversos colaterais. Nesta perspetiva, surgiu o mel como potencial agente antifúngico, devido às suas propriedades: antioxidantes, anti-tumorais, anti-inflamatórias e antivirais, reconhecidas por todo o mundo. Posto isto, este estudo tem como objetivo principal avaliar o efeito do mel em espécies de *Candida*, assim como testar o efeito da combinação de mel com diferentes agentes antifúngicos comerciais, nomeadamente, nistatina (NIS), clorhexidina (CLR) e fluconazol (FLC). Para tal, inicialmente avaliou-se o efeito do mel urze e do mel manuka em células de *Candida* em crescimento planctónico pelo método de difusão em agar e foram determinadas as concentrações mínimas inibitórias (CMIs). De seguida, foi avaliado o efeito antifúngico dos mesmos méis em biofilmes pelos métodos cristal violeta (CV), contagem de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) e por último microscopia de fluorescência. Adicionalmente, numa perspetiva clínica tornou-se fulcral avaliar o efeito do mel em biofilmes polimicrobianos de *C. tropicalis* e *P. aeruginosa*, visto que na natureza os biofilmes são constituídos por mais de uma espécie microbiana, conferindo-lhes uma maior resistência. Nesta associação, foram também testadas as combinações de mel com FLC e mel com FLC e gentamicina.

Os resultados demonstraram que o mel consegue reduzir o crescimento de todas as espécies em estudo, quer em estado planctónico como em biofilmes, demonstrando maior efeito em *Candida tropicalis*. Na terapia combinacional os resultados sugerem que a combinação de mel com CLR e mel com NIS são significativamente mais eficazes que o tratamento apenas com mel. Em biofilmes polimicrobianos o mel demonstrou ser uma escolha promissora, visto que permitiu reduzir o biofilme para ambas as espécies. Neste caso, as terapias combinacionais não demonstraram o efeito pretendido. Apesar disso, estas terapias poderão ser promissoras utilizando agentes antimicrobianos diferentes ou alterando as concentrações.

Em geral, os resultados obtidos neste estudo destacaram o grande potencial do mel como estratégia alternativa ou complementar para o controle de infecções provocadas por *Candida*.

**Palavras-Chave:** *Candida*, biofilme, mel, urze, manuka





## ABSTRACT

Nosocomial fungal infections triggered by *Candida* species represent the most common causes of infection of the urinary tract and bloodstream. These infections are usually associated with biofilms. In these cases, when an infection occurs, the existing treatments are practically ineffective, so there is an increasing need to find more effective antifungal therapies with less adverse side effects. In this perspective, honey emerged as a potential antifungal agent, due to its antioxidant, antitumoral, anti-inflammatory and antiviral properties, recognized all over the world. Hence, the aim of this study was to evaluate the effect of honey on *Candida* species, as well as to test the effect of combining honey with different commercial antifungal agents, namely nystatin (NIS), chlorhexidine (CLR) and fluconazole (FLC). For this, the effect of heather honey and manuka honey on planktonic growth of *Candida* was initially evaluated by the agar diffusion method to determine minimum inhibitory concentrations (MICs). Then, the same types of honey were evaluated in biofilms by crystal violet (CV) staining, Colony Forming Units (CFU) counting and fluorescence microscopy. Moreover, from a clinical viewpoint, it became essential to assess the effect of honey on polymicrobial biofilms of *C. tropicalis* and *P. aeruginosa*, since biofilms are composed of more than one microbial species in nature, which gives it a higher resistance. In addition to this evaluation, the combinations of honey plus FLC and honey plus FLC and gentamicin were also tested. The results have shown that honey enables a growth reduction of all species under study, both in planktonic state and in biofilms, with a greater effect on *Candida tropicalis*. In combinational therapy, the results suggest that the combination of honey with CLR, and honey with NIS are significantly more effective than treatment with honey alone. In polymicrobial biofilms, honey has shown to be a promising choice, since it was able to reduce the biofilm in both species. In this case, combinational therapies did not demonstrate the intended effect. Nonetheless, these therapies could have a greater potential when using different antimicrobial agents or by altering their concentrations. In general, the results obtained in this study highlight the great potential of honey as an alternative or complimentary strategy for the control of *Candida* infections.

**KEYWORDS:** *Candida*, biofilm, honey, heather, manuka



## ÍNDICE

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
Lista de Figuras.....	xvii
Lista de Tabelas.....	xxi
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	xxii
Introdução Geral.....	1
1.1    Caraterização geral de espécies de <i>Candida</i> .....	3
1.2    Formação de biofilmes.....	5
1.2.1    Organização estrutural dos biofilmes.....	6
1.2.2    Interação em biofilmes mistos.....	8
1.3    Mecanismos de resistência a antifúngicos.....	9
1.3.1    Produção da matriz extracelular.....	10
1.3.2    Heterogeneidade do biofilme.....	10
1.3.3    Bombas de efluxo.....	11
1.3.4    Densidade celular.....	11
1.3.5    Células <i>persiste</i> r.....	12
1.4    Agentes antifúngicos e respetiva resistência.....	12
1.4.1    Equinocandinas: Inibidores da síntese de $\beta$ -1,3-D-glucano.....	13
1.4.2    Azóis: Inibidores da enzima lanosterol 14- $\alpha$ - desmetilase.....	15
1.4.2.1    Fluconazol (FLC).....	15
1.4.3    Polienos: Ligantes do ergosterol.....	16
1.4.3.1    Anfotericina B (AmB).....	16
1.4.3.2    Nistatina (NIS).....	17
1.5    Terapias alternativas.....	17
1.5.1    Terapia baseada em produtos naturais.....	18
1.5.1.1.    Um produto natural promissor: o mel.....	19
1.5.2    Terapia combinacional.....	21

1.6	Objetivos.....	23
	Materiais e métodos.....	25
2.1	Microrganismo e condições de armazenamento e crescimento .....	27
2.2	Agentes antimicrobianos .....	27
2.2.1	Mel.....	28
2.2.2	Agentes antifúngicos comerciais .....	29
2.2.3	Agente antibacteriano comercial .....	29
2.3	Avaliação de suscetibilidade de células planctónicas de <i>Candida</i> ao mel .....	29
2.3.1	Métodos de difusão em agar.....	29
2.3.2	Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima fungicida (CMF) .....	30
2.4	Avaliação da suscetibilidade de biofilmes de <i>Candida</i> ao mel .....	31
2.4.1	Formação de biofilme .....	31
2.4.2	Tratamento com mel e terapia combinacional de mel com um agente antifúngico comercial em biofilmes de <i>Candida</i> .....	31
2.4.3	Método de quantificação de Biomassa: Cristal Violeta (CV) .....	32
2.4.4	Determinação da viabilidade celular: Unidades Formadoras de Colónias (UFC) .....	32
2.4.5	Microscopia de fluorescência .....	33
2.5	Avaliação da suscetibilidade de biofilmes mistos de <i>C. tropicalis</i> e <i>P. aeruginosa</i> ao mel ....	33
2.5.1	Formação do biofilme misto.....	33
2.5.2	Determinação da viabilidade celular (UFC) e microscopia de fluorescência .....	34
2.6	Análise estatística.....	34
	Resultados e discussão.....	35
3.1	Avaliação da suscetibilidade de células planctónicas de <i>Candida</i> ao mel .....	37
3.2	Avaliação do efeito antifúngico do mel em biofilmes de <i>Candida</i> .....	40
3.2.1	Quantificação da biomassa total do biofilme.....	40
3.2.2	Determinação da viabilidade celular .....	41
3.3	Avaliação da combinação de mel com antifúngicos comerciais em biofilmes de <i>C. tropicalis</i> .....	47
3.4	Avaliação do efeito do mel em biofilmes mistos de <i>C. tropicalis</i> e <i>P. aeruginosa</i> .....	52

3.5	Avaliação da combinação de mel mais antifúngico em biofilmes mistos de <i>C. tropicalis</i> e <i>P. aeruginosa</i> .....	56
3.6	Avaliação da combinação de mel com agentes antifúngico e com antibacteriano em biofilmes mistos de <i>C. tropicalis</i> e <i>P. aeruginosa</i> .....	59
	Conclusão e perspectivas futuras.....	61
4.1	Conclusões.....	63
4.2	Perspetivas futuras .....	64
	Bibliografia .....	67



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** Processo de formação de biofilmes constitui um ciclo e pode dividir-se em quatro fases distintas: (A) Adesão por proteínas da parede celular ao material inerte; (B) Proliferação e formação de uma matriz extracelular; (C) Crescimento contínuo, dando origem à formação de biofilme maduro; (D) Propagação através da libertação de células fúngicas (adaptado de ( Cuéller-Cruz *et al.*<sup>34</sup>)). .....6
- Figura 1.2** Visão esquemática dos mecanismos de resistência em biofilmes fúngicos. Esta figura ilustra a densidade e a complexidade de biofilmes de *C. albicans*, comum a outras espécies, com os diferentes tipos morfológicos presentes rodeados pela MEC. As setas representam os diferentes fatores que impulsionam a resistência antifúngica dentro do biofilme, incluindo densidade, stress, células persister, MEC, efluxo da droga, alvos sobreexpressos, e a fisiologia geral do biofilme. Estes foram colocados de ordem decrescente de acordo com sua contribuição para a resistência, com efeito superior situado no centro (imagem adaptada de (Ramage *et al.*<sup>38</sup>)). .....7
- Figura 1.3** Estrutura dos biofilmes de diversas estirpes de *Candida*. (A) biofilme de *C. albicans*; (B) biofilme de *C. tropicalis*; (C) biofilme de *C. glabrata* e (D) biofilme de *C. parapsilosis*. Representando por (a) formas filamentosas (hifas ou pseudo-hifas) e (b) blastosporos. Imagens obtidas por microscopia eletrónica de varredura, após 24 h de crescimento de biofilme (Imagem adaptada de (Araújo *et al.*,<sup>41</sup>)). .....7
- Figura 1.4** Micrografia eletrónica de varredura de biofilmes heterogéneos constituídos por *C. albicans* e *Pseudomonas*. (A) *P. aeruginosa* (PA01) aglutinada a biofilmes pré-formados de *C. albicans* (imagem adaptada de (El-Azizi *et al.*<sup>50</sup>)). (B) Filamento de *C. albicans* incubado na presença de *P. aeruginosa* por 48 h (imagem adaptada de (Hogan e Kolter<sup>52</sup>)). .....8
- Figura 1.5** Visão esquemática dos mecanismos de ação das três classes de antifúngicos, nomeadamente equinocandinas (inibidores da síntese de  $\beta$ -1,3-D-glucano, atuam ao nível da parede celular), azóis (inibidores da enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase, envolve a destabilização da membrana celular) e polienos (ligantes do ergosterol, atuam ao nível da parede celular) (imagem adaptada de (Dixon e Walsh<sup>76</sup>)). .....13
- Figura 3.1** Imagens representativas dos resultados obtidos através do método de difusão em agar para as espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* por (A) inoculação da suspensão celular na superfície da placa de SDA e aplicação do mel em discos de papel estéreis, (B) inoculação direta no meio SDA e aplicação do mel em discos de papel estéreis e (C) inoculação direta no meio SDA com aplicação do mel em furos feitos no agar. ....38
- Figura 3.2** Imagens obtidas da quantificação da biomassa total pelo método de coloração com CV em biofilmes de 24 h de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* após tratamento com mel manuka e mel urze nas concentrações 25 % (v/v), 50 % (v/v) e 75 % (v/v) (A) antes da aplicação do corante e (B) após aplicação do corante CV. ....41



**Figura 3.3** Avaliação da suscetibilidade de biofilmes de 24 h de (A) *C. albicans*, (B) *C. tropicalis*, (C) *C. glabrata* e (D) *C. parapsilosis* expostos a concentrações de 25 % (v/v), 50 % (v/v) e 75 % (v/v) de mel urze e manuka, pela quantificação do número de colónias formadas por área do poço da microplaca ( $\text{Log}_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>). As barras de erro indicam o respetivo desvio padrão. \*Concentração para a qual o valor de UFC/cm<sup>2</sup> é estatisticamente diferente em relação ao respetivo controlo (\*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* correspondentes a  $p < 0,1$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respetivamente). ..... 42

**Figura 3.4** Avaliação da suscetibilidade de biofilmes de 48 h de (A) *C. albicans*, (B) *C. tropicalis*, (C) *C. glabrata* e (D) *C. parapsilosis* expostos a concentrações de 25 % (v/v), 50 % (v/v) e 75 % (v/v) de mel urze e manuka, pela quantificação do número de colónias formadas por área do poço da microplaca ( $\text{Log}_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>). As barras de erro indicam o respetivo desvio padrão. \*Concentração para a qual o valor de UFC/cm<sup>2</sup> é estatisticamente diferente em relação ao respetivo controlo (\*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* correspondentes a  $p < 0,1$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respetivamente). ..... 43

**Figura 3.5** Imagens de microscopia de fluorescência de biofilmes pré-formados de 24 h de *C. tropicalis* (A) na ausência de mel (B) tratado com 25 % (v/v) de mel manuka, (C) tratado com 50 % (v/v) de mel manuka, (D) tratado com 75 % (v/v) de mel manuka, (E) tratado com 25 % (v/v) de mel urze, (F) tratado com 50 % (v/v) de mel urze e (G) tratado com 75 % (v/v) de mel urze. Células coradas de verde correspondem a células viáveis e células coradas de vermelho a células não viáveis. A barra representa 10  $\mu\text{m}$ . ..... 46

**Figura 3.6** Avaliação da suscetibilidade de biofilmes de 24 h de *C. tropicalis* expostos a concentrações de 25 % (v/v) e 50 % (v/v) de mel urze e manuka e (A) tratamento apenas com NIS (50 000 UI) e a combinação de NIS (50 000 UI) + mel manuka e mel urze nas concentrações de 25 % (v/v) e 50 % (v/v), (B) tratamento apenas com CLR (0,1 %) e a combinação de CLR (0,1 %) + mel manuka e mel urze nas concentrações de 25 % (v/v) e 50 % (v/v), (C) tratamento apenas com FLC (100 mg/L) e a combinação de FLC (100 mg/L) + mel manuka e mel urze nas concentrações de 25 % (v/v) e 50 % (v/v), pela quantificação do número de colónias formadas por área do poço da microplaca ( $\text{Log}_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>). As barras de erro indicam o respetivo desvio padrão. \*Concentração para a qual o valor de UFC/cm<sup>2</sup> é estatisticamente diferente em relação ao tratamento apenas com o antifúngico, H relativo a terapia apenas com mel nas respetivas concentrações (\*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* correspondentes a  $p < 0,1$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respetivamente). ..... 47

**Figura 3.7** Avaliação da suscetibilidade de biofilmes de 24 horas de *C. tropicalis* expostos a concentrações de 25 % (v/v) e 50 % (v/v) de mel urze e manuka e tratamento apenas com FLC (100 mg/L) e a combinação de (A) FLC (20 mg/L), (B) FLC (30 mg/L), (C) FLC (40 mg/L), (D) FLC (80 mg/L), (E) FLC (200 mg/L) + mel manuka e mel urze nas concentrações de 25 % (v/v) e 50 % (v/v), pela quantificação do número de colónias formadas por área do poço da microplaca ( $\text{Log}_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>). As barras de erro indicam o respetivo desvio padrão. \*Concentração para a qual o valor de UFC/cm<sup>2</sup> é estatisticamente diferente em relação ao tratamento apenas com o antifúngico, H relativo a terapia apenas com mel nas respetivas

concentrações (\*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* correspondentes a  $p < 0,1$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente).....50

**Figura 3.8** Imagens de microscopia de fluorescência de biofilmes de 24 horas de *C. tropicalis* (A) após tratamento com CLR (B) após terapia combinacional de CLR e 25 % (v/v) de mel manuka, (C) após terapia combinacional de CLR e 25 % (v/v) de mel urze, (D) após tratamento com NIS (E) após terapia combinacional de NIS e 25 % (v/v) de mel manuka, (F) após terapia combinacional de NIS e 25 % (v/v) de mel urze, (G) após tratamento com FLC, (H) após terapia combinacional de FLC e 25 % (v/v) de mel manuka, (I) após terapia combinacional de FLC e 25 % (v/v) de mel urze. Células coradas de verde correspondem a células viáveis e células coradas de vermelho a células não viáveis. A barra representa 10  $\mu\text{m}$ . ..... 50

**Figura 3.9** Avaliação da suscetibilidade após tratamento com mel urze e manuka nas concentrações 25 % (v/v), 50 % (v/v) e 75 % (v/v) de (I) biofilmes de *C. tropicalis* e de (II) biofilmes mistos relativos a *C. tropicalis*, (A) após 6 h de tratamento (B) após 12 h de tratamento, (C) após 24 h de tratamento, pela quantificação do número de colônias formadas por área do poço da microplaca ( $\text{Log}_{10}$  UFC/ $\text{cm}^2$ ). As barras de erro indicam o respectivo desvio padrão. \*Concentração para a qual o valor de UFC/ $\text{cm}^2$  é estatisticamente diferente em relação ao respectivo controle (\*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* correspondentes a  $p < 0,1$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente)..... 53

**Figura 3.10** Avaliação da suscetibilidade após tratamento com mel urze e manuka nas concentrações 25 % (v/v), 50 % (v/v) e 75 % (v/v) de (I) biofilmes de *P. aeruginosa* e de (II) biofilmes mistos relativos a *P. aeruginosa*, (A) após 6 h de tratamento (B) após 12 h de tratamento, (C) após 24 h de tratamento, pela quantificação do número de colônias formadas por área do poço da microplaca ( $\text{Log}_{10}$  UFC/ $\text{cm}^2$ ). As barras de erro indicam o respectivo desvio padrão. \*Concentração para a qual o valor de UFC/ $\text{cm}^2$  é estatisticamente diferente em relação ao respectivo controle (\*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* correspondentes a  $p < 0,1$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente)..... 53

**Figura 3.11** Imagens de microscopia de fluorescência de biofilmes de 24 h de *C. tropicalis* e *P. aeruginosa* após 24 h (A) sem tratamento, após tratamento com (B) 25 % (v/v) de mel manuka (C) 50 % (v/v) de mel manuka, (D) 75 % (v/v) de mel manuka, (E) 25 % (v/v) de mel urze, (F) 50 % (v/v) de mel urze e (G) 75 % (v/v) de mel urze. Células coradas de verde correspondem a células viáveis e células coradas de vermelho a células não viáveis. A barra representa 10  $\mu\text{m}$ . ..... 55

**Figura 3.12** Avaliação da suscetibilidade após tratamento com mel urze e manuka nas concentrações 25 % (v/v), 50 % (v/v) e 75 % (v/v) e a combinação destas concentrações de mel com FLC (100 mg/L) de (I) biofilmes de *C. tropicalis* e de (II) biofilmes mistos relativos a *C. tropicalis*, (A) após 6 h de tratamento (B) após 12 h de tratamento, (C) após 24 h de tratamento, pela quantificação do número de colônias formadas por área do poço da microplaca ( $\text{Log}_{10}$  UFC/ $\text{cm}^2$ ). As barras de erro indicam o respectivo desvio padrão. \*Concentração para a qual o valor de UFC/ $\text{cm}^2$  é estatisticamente diferente em relação ao

tratamento apenas com o antifúngico, H relativo a terapia apenas com mel nas respectivas concentrações (\*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* correspondentes a  $p < 0,1$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respetivamente). ..... 57

**Figura 3.13** Avaliação da suscetibilidade após tratamento com mel urze e manuka nas concentrações 25 % (v/v), 50 % (v/v) e 75 % (v/v) e a combinação destas concentrações de mel com FLC (100 mg/L) de (I) biofilmes de *P. aeruginosa* e de (II) biofilmes mistos relativos a *P. aeruginosa*, (A) após 6 h de tratamento (B) após 12 h de tratamento, (C) após 24 h de tratamento, pela quantificação do número de colónias formadas por área do poço da microplaca ( $\text{Log}_{10}$  UFC/ $\text{cm}^2$ ). As barras de erro indicam o respetivo desvio padrão. \*Concentração para a qual o valor de UFC/ $\text{cm}^2$  é estatisticamente diferente em relação ao tratamento apenas com o antifúngico, relativo a terapia apenas com mel nas respectivas concentrações (\*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* correspondentes a  $p < 0,1$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respetivamente). ..... 58

**Figura 3.14** Avaliação da suscetibilidade de biofilmes de *C. tropicalis* e *P. aeruginosa* após 24 h de tratamento combinado de FLC (100 mg/L) + GEN (20 mg/L) + mel urze e manuka nas concentrações 25 % (v/v) e 50 % (v/v). As barras de erro indicam o respetivo desvio padrão. \*Concentração para a qual o valor de UFC/ $\text{cm}^2$  é estatisticamente diferente em relação ao respetivo controlo (\*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* correspondentes a  $p < 0,1$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respetivamente). ..... 59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> Características do paciente, como a idade, condições subjacentes e principais locais que predisõem a infecções causadas por CNA, nomeadamente <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i> (adaptado de Kolaczkoska e Kolaczowski).....	4
<b>Tabela 1.2</b> Organização dos antifúngicos mais utilizados de acordo com a classe de antifúngicos e respetivo modo de ação.....	14
<b>Tabela 2.1</b> Lista de espécies fúngicas, <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> e <i>C. parapsilosis</i> e espécie bacteriana, <i>P. aeruginosa</i> , utilizadas neste estudo e respetiva referência.....	27
<b>Tabela 2.2</b> Concentrações testadas de mel (urze e manuka), de agentes antifúngicos comerciais (NIS, CLR e FLC) e do agente antibacteriano comercial (GEN) .....	28
<b>Tabela 2.3</b> Descrição detalhada das propriedades dos méis urze e manuka, nomeadamente cor, pH, concentração de proteína, HMF e MGO .....	28
<b>Tabela 3.1</b> Valores de CMI e CMF obtidos pela avaliação da suscetibilidade das espécies de referência <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> e <i>C. parapsilosis</i> para os méis manuka e urze .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

**ABC:** *ATP-binding cassette*;

**AGNPs:** Nanopartículas de prata;

**AmB:** Anfotericina B;

**ANOVA:** Análise de variância;

**CDR:** *Candida drug resistance*;

**CLR:** Clorhexidina;

**Cm<sup>3</sup>:** Centímetro cúbico;

**CMF:** Concentração mínima fungicida;

**CMI:** Concentração mínima inibitória;

**CNA:** *Candida não albicans*;

**CV:** cristal violeta;

**DO:** Densidade ótica;

**EUCAST:** *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*;

**FLC:** Fluconazol;

**g:** Força centrífuga;

**GEN:** Gentamicina;

**h:** hora;

**HMF:** Hidroximetilfurfural;

**L:** Litro;

**Log<sub>10</sub>:** Logaritmo de base 10;

**Kg:** Quilograma;

**MDR:** *Multidrug resistant*;

**MEC:** Matriz extracelular;

**MFS:** *Major facilitator superfamily*;

**mg:** miligrama;

**MGO:** *Methylglyoxal*;

**mL:** mililitro;

**NIS:** Nistatina;

**nm:** nanómetro;

**PIA:** *Pseudomonas isolation agar*;

**rpm:** Rotações por minuto;

**SDA:** *Sabouraud dextrose agar*;

**SDB:** *Sabouraud dextrose broth*;

**TFS:** Tampão fosfato salino;

**TSB:** *Tryptic soy broth*;

**UFC:** Unidades formadoras de colônias;

**°C:** Graus Celsius;

**%:** Percentagem;

**μL:** Microlitro.



# Capítulo I

---

## INTRODUÇÃO GERAL





## 1.1 Caracterização geral de espécies de *Candida*

As infecções fúngicas nosocomiais são amplamente reconhecidas como uma das principais causas de morbidade e mortalidade, destacando-se entre estas as infecções provocadas por fungos patogênicos oportunistas, em particular o género *Candida*. Este representa a terceira e quarta causa mais comum de infecção do trato urinário e da corrente sanguínea, respetivamente, sendo as suas infecções denominadas candidíases. As características clínicas da candidíase são dependentes dos locais de infeção<sup>1,2,3</sup>. Neste sentido, micoses causadas por estes fungos mostram um amplo espectro de manifestações clínicas e podem ser classificadas como superficiais, no caso de infeções cutâneas, das unhas e das mucosas (candidíase genital, intra-uterina, anal ou oral), ou generalizadas, de alta severidade e profundas como é o caso da candidíase invasiva<sup>4,5</sup>.

Na patologia humana, o género *Candida* apresenta um papel importante, como colonizadores das membranas mucosas da cavidade oral e do trato gastrointestinal e como constituintes comuns da flora normal da pele e da flora vaginal, sendo em circunstâncias normais microrganismos comensais não patogênicos para o ser humano<sup>6,7</sup>. No entanto, alterações nas defesas do hospedeiro podem levar a um crescimento desproporcional e, conseqüente, colonização por parte desta espécie, particularmente quando a microflora bacteriana normal é eliminada ou quando existe comprometimento de barreiras anatómicas secundárias<sup>8,9</sup>. De facto, os fatores de risco mais comuns para infeções invasivas por *Candida* incluem cirurgias extensas, uso de antibióticos com largo espectro, nutrição parenteral, quimioterapia, agentes imunossuppressores, transplantes e, ainda, a aplicação de dispositivos médicos invasivos (válvulas, articulações ou cateteres)<sup>10,11</sup>.

O género *Candida* inclui mais de 150 espécies de levedura, destas pelo menos 15 espécies distintas de *Candida* podem ser patogênicas para o ser humano, das mais conhecidas e estudadas destacam-se a *Candida albicans*, a *Candida glabrata*, a *Candida tropicalis*, a *Candida parapsilosis* e a *Candida krusei*. Embora a espécie *C. albicans* seja considerada o agente patogénico mais comum, a incidência de infeções devido a espécies de *Candida* não *albicans* (CNA) têm-se mostrado cada vez mais frequentes<sup>12,13,14</sup>. Vários fatores podem contribuir para esta alteração, nomeadamente o aumento do uso de antifúngicos que, conseqüentemente, provoca a redução da suscetibilidade destas espécies, o acréscimo da população de pacientes imunocomprometidos e, principalmente, a falta de conhecimento em geral destas espécies, uma vez que cada espécie apresenta características únicas em relação ao tropismo tecidual, tendência para causar doença invasiva, virulência e suscetibilidade aos agentes antifúngicos<sup>1</sup>.

A maioria das infecções atribuídas a CNA são causadas por *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, consideradas anteriormente não patogênicas surgem agora com uma importância significativa na indução de candidíase sistêmica<sup>15</sup>. A incidência varia de acordo com diversos fatores de risco, nomeadamente a condição do indivíduo, em relação a idade e ao estado de saúde, os locais de infecção específicos e distintos associados a cada espécie, resumidos na Tabela 1.1<sup>11</sup>.

**Tabela 1.1** Características do paciente, como a idade, condições subjacentes e principais locais que predisõem a infecções causadas por CNA, nomeadamente *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (adaptado de Kolaczkoska e Kolaczowski<sup>12</sup>)

<i>Espécie</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
<b>Caraterísticas</b>			
Idade do paciente	Adultos (>65 anos)	Prematuros, crianças e adolescentes (1-19 anos)	Adultos (>60 anos)
Condições subjacentes	Transplante de órgãos; Tumores; Diabetes <i>mellitus</i> ; Doenças hematológicas malignas; Uso de corticoide; Doença cardiovascular.	Neutropenia; Nutrição parenteral; Terapia imunossupressora; Queimaduras; Cateterismo vascular; Próteses; Terapia prévia com antibiótico; Cirurgia prévia.	Neutropenia; Transplante de órgãos; Doenças hematológicas malignas; Cateterização prolongada.
Principais locais de infecção	Vagina; Cavidade oral; Trato urinário.	Trato gastrintestinal; Cavidade oral.	Pele; Cavidade oral; Trato geniturinário e gastrointestinal.

De acordo com alguns estudos epidemiológicos realizados, a espécie *C. tropicalis* destaca-se do grupo de CNA, encontrando-se associada a uma maior mortalidade e parece apresentar maior potencial de disseminação em indivíduos neutropênicos em comparação com outras espécies de *Candida*<sup>6,17,18</sup>. Ao contrário de *C. albicans* que pode ser ocasionalmente encontrada como comensal, a *C. tropicalis* está frequentemente associada ao desenvolvimento de infecções fúngicas<sup>19</sup>. Além disso, um estudo realizado por Kontoyiannis *et al.*<sup>16</sup>, demonstrou que a *C. tropicalis* é mais persistente, levando deste modo a períodos de recuperação superiores em casos de infecção. Este facto pode implicar maior virulência e resistência aos antifúngicos aquando comparada com *C. albicans*, por exemplo<sup>20</sup>. A propensão de *C. tropicalis* para disseminação e a alta mortalidade associada pode estar relacionada com os fatores de virulência exibidos por esta espécie, como a formação de biofilmes, secreção de proteases e dimorfismo<sup>21,22</sup>.

Em geral, a transição de espécies de *Candida* de comensal para potente agente patogénico é facilitada por uma série de fatores de virulência, tais como atividade hemolítica, secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares (coagulase, fosfolipase e proteases), que parecem desempenhar um papel

importante na adesão, penetração, invasão e destruição dos tecidos do hospedeiro, e por último e mais importante a capacidade de adesão a dispositivos médicos ou tecidos do hospedeiro com posterior formação de estruturas mais resistentes, os biofilmes<sup>13,14</sup>.

## 1.2 Formação de biofilmes

Geralmente em ambientes naturais, a formação de biofilmes representa o tipo de crescimento microbiano mais predominante e é frequentemente associado a infeções clínicas persistentes<sup>23,24</sup>. Biofilmes são definidos como comunidades microbianas, impregnadas numa matriz extracelular (MEC) polimérica derivada das próprias células, que se encontram reversivelmente ligadas entre si, a um substrato ou a uma interface<sup>25</sup>. Consequentemente, estas células exibem diferente fenótipo, com taxa de crescimento e transcrição de genes alterados<sup>25</sup>. Nos últimos anos, com o avanço da medicina, e consequente utilização de dispositivos médicos, verificou-se um aumento paralelo das infeções associadas aos biofilmes<sup>2,26</sup>. Os dispositivos mais propensos a este tipo de infeções incluem cateteres, *pacemakers* cardíacos, e próteses vasculares cardíacas<sup>2,27</sup>.

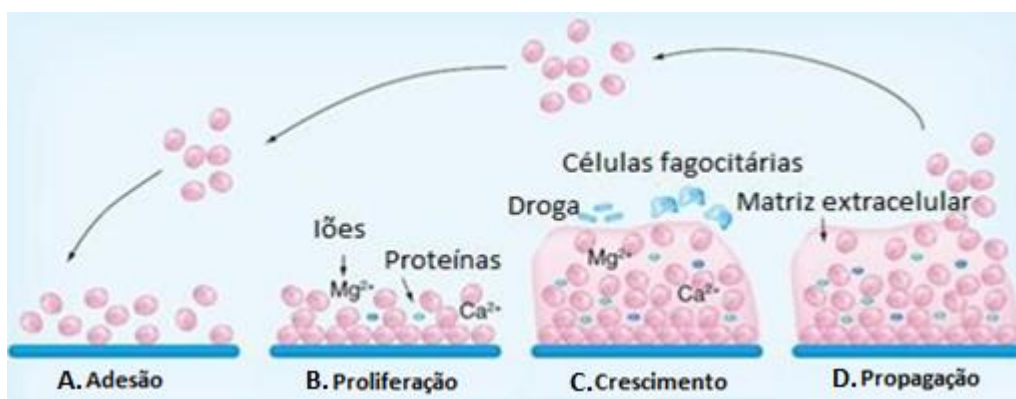
A formação de biofilmes é um processo dinâmico, que ocorre inicialmente com a adesão de microrganismos a uma superfície abiótica ou biótica, tais como mucosas ou dispositivos médicos, com posterior co-agregação de células e, consequente, colonização<sup>28,29</sup>. O processo de formação de biofilme constitui um ciclo e pode dividir-se em quatro fases distintas (Figura 1.1).

A primeira etapa consiste na adesão mediada por proteínas da parede celular (CWPs)<sup>30</sup>. Esta fixação inicial a biomateriais é mediada por fatores não específicos, tais como hidrofobicidade da superfície das células, forças eletrostáticas e por adesinas específicas, por exemplo proteínas séricas (fibrinogénio e fibronectina), que se ligam especificamente a aminoácidos e a açúcares na superfície de outras células ou promovem a adesão a superfícies abióticas (Figura 1.1 (A))<sup>31,32</sup>.

Na fase intermédia, correspondente à proliferação, ocorre o crescimento e multiplicação celular através do desenvolvimento de hifas (no caso de leveduras, como por exemplo *C. albicans*) com consequente início da formação de uma matriz constituída por polissacarídeos, hidratos de carbono e proteínas, entre outros componentes<sup>30,33</sup>. Esta matriz desempenha um papel fulcral para os biofilmes, possuindo diversas funções, como a defesa da ação das células fagocíticas, a manutenção de nutrientes e como barreira na difusão de fármacos e substâncias tóxicas para as células (Figura 1.1 (B))<sup>33</sup>.

De seguida ocorre a maturação, onde a densidade e complexidade do biofilme aumenta à medida que as células se dividem/morrem. Nesta etapa, os componentes extracelulares gerados pelos fungos interagem com moléculas orgânicas e inorgânicas do ambiente circundante e a matriz extracelular encontra-se totalmente desenvolvida, tornando os biofilmes altamente hidratados (Figura 1.1 (C))<sup>30</sup>.

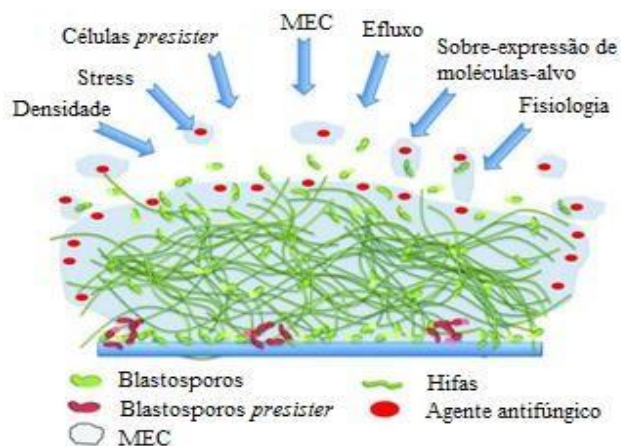
Por último, sucede-se a propagação, quando o biofilme atinge uma determinada massa crítica e o equilíbrio dinâmico é alcançado ocorre libertação de algumas das células fúngicas em estado planctónico, que se podem dispersar e multiplicar, colonizando novas superfícies e formando novos biofilmes (Figura 1.1 (D))<sup>34</sup>.



**Figura 1.1** Processo de formação de biofilmes constitui um ciclo e pode dividir-se em quatro fases distintas: (A) Adesão por proteínas da parede celular ao material inerte; (B) Proliferação e formação de uma matriz extracelular; (C) Crescimento contínuo, dando origem à formação de biofilme maduro; (D) Propagação através da libertação de células fúngicas (adaptado de (Cuéller-Cruz *et al.*<sup>34</sup>)).

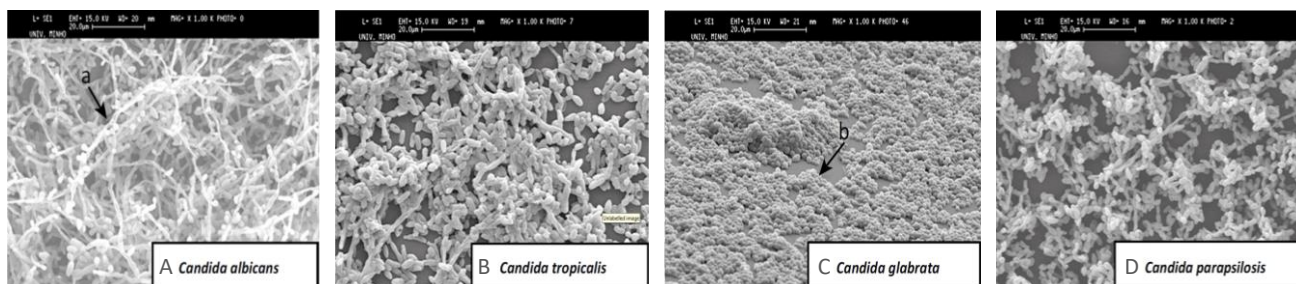
### 1.2.1 Organização estrutural dos biofilmes

A complexidade estrutural de biofilmes representa o arranjo espacial ideal para facilitar o fluxo de nutrientes, a eliminação de resíduos, bem como o estabelecimento de micro-nichos (Figura 1.2)<sup>31,35</sup>. A organização característica dos biofilmes permite, também, a cooperação metabólica, a regulação da expressão génica e, uma vez estabelecido o biofilme, serve como reservatório persistente de infeção<sup>36,37</sup>. Além disso, este oferece uma maior resistência a antifúngicos e outras terapias antimicrobianas, devido a diversos fatores como a densidade, o *stress*, a presença de células *persisters*, a existência de MEC, o efluxo de drogas, moléculas-alvo sobre expressos e a fisiologia em geral do biofilme, sendo que em comparação com leveduras em fase planctónica são capazes de suportar concentrações fúngicas até mil vezes superiores<sup>36,37</sup>. A arquitetura global do biofilme pode variar dependendo do substrato sobre o qual é formado e das condições de crescimento, tais como a composição do meio, o pH e a disponibilidade em oxigénio, bem como a composição da matriz e a estirpe fúngica que o forma<sup>31,35</sup>.



**Figura 1.2** Visão esquemática dos mecanismos de resistência em biofilmes fúngicos. Esta figura ilustra a densidade e a complexidade de biofilmes de *C. albicans*, comum a outras espécies, com os diferentes tipos morfológicos presentes rodeados pela MEC. As setas representam os diferentes fatores que impulsionam a resistência antifúngica dentro do biofilme, incluindo densidade, stress, células *persister*, MEC, efluxo da droga, alvos sobreexpressos, e a fisiologia geral do biofilme. Estes foram colocados de ordem decrescente de acordo com sua contribuição para a resistência, com efeito superior situado no centro (imagem adaptada de (Ramage *et al.*<sup>38</sup>)).

De modo a aumentar a resistência, diversas espécies de *Candida* apresentam capacidade para formar biofilmes, sendo o processo de formação semelhante entre elas. No entanto, a composição do próprio biofilme e a estrutura da MEC podem diferir consideravelmente entre estirpes<sup>39,40</sup>. No caso da *C. albicans*, o biofilme característico desta estirpe consiste numa estrutura com duas camadas compostas por uma mistura heterogênea de leveduras, pseudo-hifas e hifas embutidas em substâncias poliméricas extracelulares, compostas principalmente por hidratos de carbono, proteínas, fósforo e hexosaminas (Figura 1.3 (A))<sup>35,41</sup>. Em relação às CNA, a *C. tropicalis* desenvolve uma estrutura complexa contendo microcolônias com morfologias filamentosas evidentes, incluídas numa espessa camada polimérica extracelular, com baixos níveis de hidratos de carbono e proteínas (Figura 1.3 (B))<sup>41,42,43,44</sup>. Por sua vez, a *C. glabrata*, forma um biofilme com uma estrutura em monocamada compacta ou multicamada de apenas blastosporos, onde as células são incorporadas dentro de uma matriz extracelular composta por níveis elevados de hidratos de carbono, proteínas e hexosaminas (Figura 1.3 (C))<sup>41,42,43,45</sup>. No caso de *C. parapsilosis*, o biofilme característico é pouco espesso com blastóporos agregados, incluindo células de levedura e pseudo-hifas, formando estruturas compactas, com mono ou múltiplas camadas contendo grandes quantidades de hidratos de carbono e baixos níveis de proteínas (Figura 1.3 (D))<sup>41,42,45</sup>.

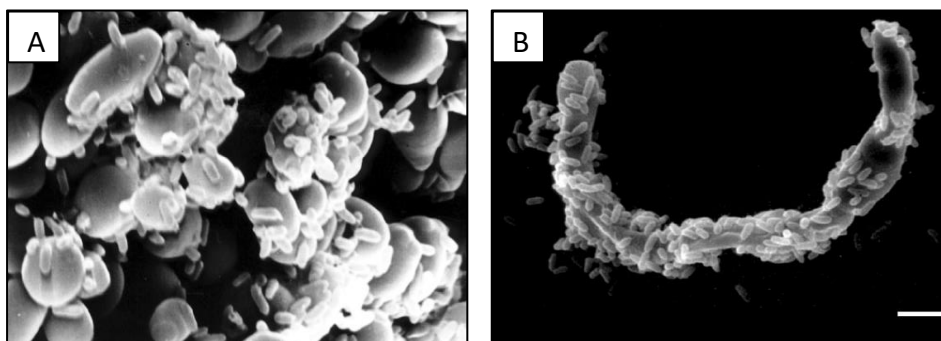


**Figura 1.3** Estrutura dos biofilmes de diversas estirpes de *Candida*. (A) biofilme de *C. albicans*; (B) biofilme de *C. tropicalis*; (C) biofilme de *C. glabrata* e (D) biofilme de *C. parapsilosis*. Representando por (a) formas filamentosas (hifas ou pseudo-hifas) e (b) blastosporos. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, após 24 h de crescimento de biofilme (Imagem adaptada de (Araújo *et al.*, <sup>41</sup>)).

Apesar de cada espécie possuir características próprias, na natureza os biofilmes são constituídos por mais de uma espécie microbiana, espécies bactérias e fungos, o que lhe confere ainda uma maior resistência<sup>46</sup>.

### 1.2.2 Interação em biofilmes mistos

Embora o estudo da estrutura e das propriedades de biofilmes mono espécie seja uma importante etapa na compreensão das doenças infecciosas, a elucidação do comportamento comunal dos microrganismos em biofilmes constituídos por diferentes espécies pode ter um grande impacto neste sentido e, conseqüentemente, na sua terapia<sup>46</sup>. Em biofilmes mistos os fatores secretados e a proximidade física entre os microrganismos permite interações metabólicas, muitas vezes necessárias para o equilíbrio ecológico e para a própria sobrevivência das espécies<sup>47</sup>. Portanto, existem diversos estudos, *in vivo* e *in vitro*, referentes às interações patogênicas em biofilmes mistos, como por exemplo biofilmes constituídos por *C. albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 1.4)<sup>48,49,50,51</sup>. De facto, estes dois microrganismos têm tendência para formar biofilmes polimicrobianos e, como tal, são muitas vezes responsáveis por infeções nosocomiais, em indivíduos imunocomprometidos e especialmente em pacientes com fibrose cística<sup>50,51</sup>. Sendo a uma bactéria gram-negativa ubíqua, comumente colonizadora de uma variedade notável de nichos, incluindo ambientes aquáticos, terrestres e organismos eucarióticos, além destes, faz parte da microbiota humana, como agente patogénico oportunista<sup>51</sup>.



**Figura 1.4** Micrografia eletrônica de varredura de biofilmes heterogêneos constituídos por *C. albicans* e *Pseudomonas*. (A) *P. aeruginosa* (PA01) aglutinada a biofilmes pré-formados de *C. albicans* (imagem adaptada de (El-Azizi *et al.*<sup>49</sup>). (B) Filamento de *C. albicans* incubado na presença de *P. aeruginosa* por 48 h (imagem adaptada de (Hogan e kolter<sup>51</sup>).

O comportamento antifúngico de *P. aeruginosa* em espécies de *Candida* foi relatado pela primeira vez por Kerr *et al.*<sup>49</sup>, posteriormente foram realizadas diversas investigações neste sentido. Um estudo realizado por Nseir *et al.*<sup>48</sup>, mostrou que *P. aeruginosa* elimina *C. albicans* formando uma película densa sobre filamentos fúngicos. No entanto, este microrganismo não se liga nem mata *C. albicans* na forma de levedura. Um estudo mais recente, levado a cabo por Bandara *et al.*<sup>46</sup>, observou

que este tipo de biofilmes apresentavam crescimento menos denso, maior número de células agrupadas, células mortas e detritos celulares, demonstrando o efeito inibitório mútuo de ambos os agentes patogénicos no biofilme. Uma investigação realizada por Hogan e Kolter<sup>52</sup>, especula que o antagonismo entre bactérias e fungos contribuem para a evolução e manutenção de muitos genes relacionados com a sua patogénese. Assim, uma compreensão mais profunda das interações entre bactérias e fungos pode fornecer uma nova perspetiva sobre o papel dos determinantes de virulência conhecidos e pode levar à descoberta de novos fatores envolvidos na patogenicidade em múltiplos hospedeiros<sup>52</sup>.

### 1.3 Mecanismos de resistência a antifúngicos

A crescente resistência a drogas e a terapias antimicrobianas é um enorme obstáculo para o tratamento de numerosas doenças infecciosas<sup>36,53,54</sup>. Como referido anteriormente, um dos principais mecanismos de resistência de *Candida* é a formação de biofilmes. Por conseguinte, quando ocorre infeção associada ao implante de dispositivos médicos, um dos primeiros passos consiste na remoção da fonte de infeção através da substituição do dispositivo implantado, o que poderá apresentar um sério risco para os pacientes, por exemplo, no caso de substituição de válvulas cardíacas ou próteses de articulações infetadas<sup>42,55</sup>. Ao detetar-se a ineficácia destes procedimentos iniciais, é estabelecida uma terapia antifúngica, o que pode constituir um desafio, devido a elevada resistência que os biofilmes apresentam, tornando os tratamentos existentes praticamente ineficazes. No entanto, se este tipo de infeções não for tratado antecipadamente, pode progredir para infeções sanguíneas ou fúngicas invasivas com elevado risco de mortalidade<sup>36</sup>.

A resistência verificada em biofilmes de *Candida* ao tratamento antifúngico consiste num processo multifatorial, com diversos mecanismos que atuam de forma coordenada ao longo de várias fases do crescimento dos biofilmes<sup>36,56</sup>. Como referido anteriormente, os diversos mecanismos em questão podem incluir, por exemplo: (I) produção da MEC; (II) heterogeneidade da população no biofilme; (III) exclusão ativa através de bombas de efluxo; (IV) densidade celular e (V) presença de células *persistor* (Figura 1.2)<sup>42,30,38,57,58</sup>. No entanto, estes mecanismos de resistência ainda não estão completamente compreendidos<sup>59</sup>. Determinar os mecanismos responsáveis pela resistência antifúngica específica das diferentes espécies de *Candida* é importante para um tratamento antifúngico eficaz, uma vez que permite atuar de modo exclusivo dependendo das condições ambientais ou do tipo de biofilme formado<sup>36</sup>.



### 1.3.1 Produção da matriz extracelular

A produção de MEC contribui para a sobrevivência dos biofilmes afetando diversos fatores, como por exemplo a densidade, a carga, a porosidade e a hidrofobicidade<sup>60</sup>. Portanto, uma das hipóteses mais estudadas para a recalcitrância de biofilmes a agentes antimicrobianos é a presença da MEC que limita a penetração e posterior difusão da droga através da formação de uma barreira, ficando apenas as camadas superficiais do biofilme expostas a doses letais do agente antimicrobiano<sup>61</sup>. Em biofilmes de *Candida*, a produção de MEC é influenciada por vários fatores, nomeadamente, a fonte de carbono, a espécie e o tipo de fluxo do meio<sup>60</sup>. Assim, a taxa de difusão do fármaco depende da natureza química, tanto do agente como do material da matriz, isto é da sua composição e estrutura, que varia de acordo com a natureza dos organismos presentes. Por exemplo, verifica-se frequentemente uma difusão mais rápida em *C. glabrata* ou *C. krusei* em comparação com *C. tropicalis* ou *C. parapsilosis*, enquanto a difusão em biofilmes mistos, como por exemplo *C. albicans* e *Staphylococcus epidermidis* é mais lenta<sup>61,62</sup>. Um estudo realizado por Al-Fattani e Douglas<sup>61</sup>, concluiu que os polímeros da matriz contribuem para a resistência a fármacos tanto em biofilmes de apenas uma espécie como em biofilmes constituídos por mais de uma espécie, contendo *Candida*, especialmente sob as condições de fluxo que prevalecem em muitas infeções associadas a implantes. Este mesmo estudo observou, também, que biofilmes de *C. tropicalis* são menos suscetíveis aos agentes antifúngicos em comparação com os biofilmes de *C. albicans*, mesmo quando crescidos estaticamente<sup>61</sup>. No entanto, um estudo levado a cabo por Kuhn *et al.*<sup>63</sup>, relatou que biofilmes de *C. parapsilosis* apresentam um nível de resistência semelhante a *C. albicans*, apesar de serem considerados menos complexos e formarem muito menos MEC. De facto, estes resultados sugerem que a presença e complexidade de MEC não serão os únicos fatores a constituir uma barreira significativa à difusão de drogas antifúngicas.

### 1.3.2 Heterogeneidade do biofilme

Os microrganismos no interior do biofilme exibem um amplo espectro de estados, o que pode aumentar a tolerância a drogas. Um dos fatores que contribui para este amplo espectro é o gradiente de concentração de nutrientes e de produtos residuais que atravessam o biofilme de modo heterogêneo, alterando o ambiente local, o que leva a variadas taxas de crescimento das células microbianas individuais<sup>64</sup>. Outro fator, é a existência de células dentro do biofilme que apresentam a

capacidade de se diferenciar num fenótipo altamente protegido<sup>64</sup>. Tendo isto em conta, a heterogeneidade da população celular dentro do biofilme é outro potencial mecanismo de resistência<sup>64</sup>.

### 1.3.3 Bombas de efluxo

Muitos casos de resistência a fármacos estão relacionados com o aumento da expressão de bombas de efluxo na membrana das células de *Candida* e consequente redução da acumulação de fármacos dentro das células. De acordo com vários estudos, a regulamentação excessiva de genes que codificam sistemas de efluxo, como por exemplo o gene *CDR1* (*Candida drug resistance*) e o gene *MDR1* (*multi-drug resistance*) resultam em fenótipos multi-resistentes<sup>65,66,67</sup>. A título de exemplo, o mecanismo molecular primário que conduz a um alto nível de resistência em *C. albicans* é o aumento do efluxo do fármaco mediado por bombas de efluxo localizadas na membrana, principalmente ABC (*ATP-binding cassette*) e MFS (*Major Facilitator Superfamily*)<sup>36,66</sup>. Num dos estudos realizado por Mukherjee *et al.*<sup>67</sup>, foi analisado o efeito da presença de bombas de efluxo na resistência antifúngica durante a fase inicial da formação de biofilmes de *C. albicans*. Este estudo envolveu a eliminação dos três genes codificadores de bombas de efluxo (*CDR1*, *CDR2*, *MDR1*). Deste modo, foi possível constatar que a suscetibilidade a determinados agentes antifúngicos nestes biofilmes mutantes variou consoante o número de bombas eliminadas e com a fase de desenvolvimento do biofilme. Assim, com base neste estudo concluiu-se que as bombas de efluxo são expressas diferencialmente durante a formação de biofilmes e contribuem para a resistência apenas na fase inicial do desenvolvimento do biofilme<sup>67</sup>.

### 1.3.4 Densidade celular

A densidade celular constitui um fator importante de resistência em biofilmes fúngicos maduros. Estes biofilmes são densamente povoados e apresentam heterogeneidade espacial com micro-colónias e canais de água, possuindo assim uma arquitetura altamente ordenada<sup>68</sup>. Os biofilmes permitem a cooperação entre as células individuais através de processos designados por *quorum sensing*, que permitem comunicação entre os microrganismos e consequente coordenação do seu comportamento, através da secreção de moléculas de sinalização<sup>68</sup>. Este processo é essencial na formação de biofilmes na medida que permite controlar a competição por nutrientes, prevenir a superpopulação desnecessária e tem implicações importantes ao nível do processo infeccioso, particularmente na disseminação e estabelecimento em locais distantes da infeção<sup>32</sup>.

### 1.3.5 Células *persiste*r

Um possível fator de resistência é a existência de células *persiste*r. Estas representam uma pequena subpopulação de células que espontaneamente entram num estado dormente e não se dividem, exibindo tolerância a várias classes de fármacos antifúngicos<sup>69</sup>. Desta forma, quando uma população é tratada com fungicidas, onde as células regulares são eliminadas, este tipo de células sobrevive, uma vez que os fungicidas requerem alvos ativos, o que explica a tolerância de células *persiste*r<sup>38,69</sup>. Em *C. albicans*, as células *persiste*r fornecem um elevado nível de resistência no seguimento da adesão, o qual é independente da regulação positiva de bombas de efluxo e da composição da membrana celular<sup>38</sup>. Numa investigação levada a cabo por Ramange *et al.*<sup>38</sup>, verificou-se que este subconjunto de células apenas foi detetado em biofilmes, sendo inexistente em populações planctónicas. Além disso, estudos realizados por Al-Dhaheri e Douglas<sup>70</sup>, constataram que este tipo de células apenas existe em *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, sendo os biofilmes de *C. glabrata* e *C. tropicalis* desprovidos destas mesmas células.

## 1.4 Agentes antifúngicos e respetiva resistência

Os tratamentos disponíveis para tratar as infeções causadas por *Candida* variam substancialmente, baseando-se em diversos fatores, tais como a localização anatómica da infeção, a doença subjacente e o estado imunológico do paciente, fatores de risco para a infeção, estirpes de *Candida* responsáveis e, em alguns casos, a suscetibilidade da espécie de *Candida* para antifúngicos específicos<sup>71,72,73</sup>. O facto de pacientes de alto risco realizarem atempadamente terapia empírica contra candidíase permite uma redução na morbidade e mortalidade, impedindo a progressão da infeção<sup>72,73</sup>. No entanto, a seleção de uma terapia adequada é complicada, uma vez que é necessário considerar os fatores referidos anteriormente.

Numa visão geral, da classe de antifúngicos com atividade contra espécies de *Candida* destacam-se três grupos principais, nomeadamente as equinocandinas, os azóis e os polienos (Figura 1.5)<sup>74</sup>. Estes agentes antifúngicos são classificados de acordo com o seu modo de ação nas células fúngicas, cada classe procede de modo diferente no sentido de eliminar ou inibir o crescimento de fungos patogénicos<sup>74</sup>. Além disso, na terapia antifúngica, dependendo do tipo de infeção a tratar, as vias de administração e excreção são considerações fundamentais na seleção de um agente antifúngico apropriado<sup>71</sup>. Todavia, a resistência clínica verificada para este tipo de fármacos tem aumentado ao longo do tempo<sup>75</sup>.

Os mecanismos de resistência são classificados como primários ou secundários e estão relacionados com as características intrínsecas ou adquiridas pelo agente patogênico fúngico, envolvendo quer a interferência com o mecanismo antifúngico do fármaco, quer a diminuição na ligação da droga ao alvo<sup>58</sup>. Neste sentido, a resistência primária ou intrínseca verifica-se quando um organismo é resistente a uma determinada droga antes da exposição<sup>58</sup>. Por outro lado, resistência secundária desenvolve-se em resposta a um agente antifúngico ao longo do tempo<sup>58</sup>.



**Figura 1.5** Visão esquemática dos mecanismos de ação das três classes de antifúngicos, nomeadamente equinocandinas (inibidores da síntese de  $\beta$ -1,3-D-glucano, atuam ao nível da parede celular), azóis (inibidores da enzima lanosterol 14 - $\alpha$ -desmetilase, envolve a destabilização da membrana celular) e polienos (ligantes do ergosterol, atuam ao nível da parede celular) (imagem adaptada de (Dixon e Walsh<sup>60</sup>)).

#### 1.4.1 Equinocandinas: Inibidores da síntese de $\beta$ -1,3-D-glucano

O alvo principal dos antifúngicos é a parede celular, estando o modo de ação das equinocandinas relacionado com a sua biogénese<sup>11</sup>. Estes antifúngicos lipopeptídicos cíclicos provocam a inibição não competitiva das subunidades Fks1 ou Fks2  $\beta$ -1,3-D-glucano sintases que são responsáveis pela síntese de  $\beta$ -1,3-D-glucano, um componente estrutural essencial da parede celular fúngica, levando assim a lise e, conseqüente, morte celular (Figura 1.5)<sup>74</sup>.

A resistência a equinocandinas ocorre muito raramente. No entanto, tem-se verificado um aumento do número de CNA que exibe tolerância a esta classe<sup>11,77</sup>. Têm sido relatados dois mecanismos principais de resistência<sup>78,79</sup>: o primeiro encontra-se associado a mutações pontuais e intrínsecas em regiões específicas “*hot-spot*” de genes que codificam as subunidades FKs<sup>78,80</sup>, resultando assim em valores de concentração mínima inibitória (CMI) elevados, sensibilidade reduzida para  $\beta$ -1,3-D-glucano sintetase e resistência cruzada entre as equinocandinas<sup>78,81</sup>. Dados experimentais indicam que a resistência adquirida em *C. tropicalis* e em *C. glabrata* está associada a estas mutações

no gene que codifica Fks1, resultando na redução da velocidade máxima ( $V_{max}$ ) da enzima  $\beta$ -1,3-D-glucano sintetase<sup>11,82,83</sup>. Além disso, a resistência em *C. glabrata* também pode estar associada a mutações em Fks2<sup>78,81</sup>. Em contraste, a *C. parapsilosis* é intrinsecamente menos suscetível, devido à substituição de prolina por alanina na posição do aminoácido 660 (P660A) dentro da região de HS1 Fks1<sup>11,84</sup>. Assim sendo, esta apresenta valores superiores de CMI em comparação com outras espécies de *Candida*<sup>78,85</sup>. Outro potencial mecanismo de resistência a equinocandinas envolve o início da resposta ao *stress* adaptativo<sup>86</sup>. Foi verificado através de estudos *in vitro* um aumento da síntese de quitina em resposta à inibição da  $\beta$ -1,3-D-glucano sintetase, mediada pela proteína quinase C (PKC), pela resposta de alta osmolaridade a glicerol e vias de sinalização  $Ca^{2+}$  por calcineurina, que permite anular os efeitos letais das equinocandinas<sup>86</sup>.

As equinocandinas incluem a caspofungina, micafungina e anidulafungina, estes agentes antifúngicos apresentam atividade fungicida, dependente da concentração, contra a maioria das espécies de *Candida* (Tabela 1.2)<sup>87</sup>. No entanto, o grande tamanho destes compostos impede formulações orais, pelo que a sua administração é exclusivamente intravenosa, indicada principalmente para o tratamento da candidíase esofágica e invasiva<sup>87</sup>.

**Tabela 1.2** Organização dos antifúngicos mais utilizados de acordo com a classe de antifúngicos e respetivo modo de ação

<b>Classe de antifúngicos</b>	<b>Modo de ação</b>	<b>Antifúngico</b>	
<b>Equinocandinas</b>	Inibidores da síntese de $\beta$ -1,3-D-glucano	Casponfungina	
		Micafungina	
		Anidulafungina	
<b>Azóis</b>	Inibidores da enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase	Imidazoles	Miconazol
			Econazol
			Clotrimazol
			Cetoconazol
		Triazóis	Fluconazol
			Itraconazol
			Voriconazol
		Posaconazol	
<b>Polienos</b>	Ligantes do ergosterol	Nistatina	
		Anfotericina B	

#### 1.4.2 Azóis: Inibidores da enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase

A classe dos azóis constitui o maior grupo de agentes antifúngicos a nível clínico, sendo que o seu modo de ação envolve a destabilização da membrana celular<sup>11,88</sup>. Especificamente, o mecanismo de ação dos azóis consiste na inibição da enzima oxidativa associada ao citocromo P450, lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase, codificada pelo gene ERG11 e envolvida na biossíntese do ergosterol<sup>11,88</sup>. Deste modo, bloqueando a conversão de lanosterol em ergosterol, induz a acumulação de esteróis metilados tóxicos, desencadeia *stress* e aumento da fluidez da membrana, e afeta a função de várias proteínas (Figura 1.5)<sup>11,88</sup>. A ação dos azóis contra espécies de *Candida* é fungicida<sup>11,88</sup>.

Atualmente, com a evolução e o uso contínuo de azóis, têm sido descritos mecanismos de resistência adquirida e pontais tais como, redução na acumulação intracelular do antifúngico através da ativação de bombas de efluxo proteicas, codificadas por genes CDR e MDR resultando na redução da concentração intracelular da enzima alvo, 14- $\alpha$ -desmetilase do lanosterol<sup>78,79</sup>. Outro mecanismo comum envolve a regulação positiva da enzima-alvo ou mutações no gene ERG11, que consequentemente impede a ligação do antifúngico ao local enzimático<sup>78,89</sup>. Assim como mutações no gene ERG3, que induz bloqueio na acumulação do esteroide tóxico, este tipo de resistência foi verificada em *C. albicans*<sup>8,90</sup>.

Os azóis podem ser classificados em imidazóis (miconazol, econazol, clotrimazol e cetoconazol) ou triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol) de acordo com a afinidade para seus alvos celulares e contribuindo assim para diferenças no espectro de atividade (Tabela 1.2)<sup>91</sup>. Muitos destes são eficazes tanto para uso tópico como para o tratamento e profilaxia de infeções fúngicas invasivas. O agente mais comum desta classe antifúngica é o fluconazol (FLC)<sup>91</sup>.

##### 1.4.2.1 Fluconazol (FLC)

O FLC demonstrou ser eficaz contra infeções por *Candida*, numa vasta gama de locais e tecidos corporais, independentemente do estado imunitário do paciente<sup>92</sup>. Este antifúngico é indicado para tratamento de candidíase vaginal, das mucosas cutâneas e sistêmicas<sup>92</sup>. O seu perfil de baixa toxicidade, a farmacocinética favorável, e a sua eficácia geral tornaram-no na principal opção profilática em doentes considerados de risco<sup>92</sup>. Além disso, é frequentemente estabelecido como a primeira opção para infeções localizadas e sistêmicas causadas por *C. albicans*, devido à sua boa hidrossolubilidade e ao seu alto nível de biodisponibilidade após a administração oral<sup>93,94</sup>. Este fármaco também tem sido

usado extensivamente no tratamento de infecções causadas por outras estirpes de *Candida*, incluindo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, embora possam ser necessárias doses mais elevadas<sup>94,95</sup>.

As formulações orais de FLC são rápida e completamente absorvidas através do intestino, o que significa que a administração oral é um meio eficaz, podendo também ser administrado sistemicamente, pois apresenta um bom perfil de segurança com poucos efeitos secundários<sup>96</sup>.

#### 1.4.3 Polienos: Ligantes do ergosterol

Os polienos induzem a morte celular fúngica por intercalação na membrana plasmática contendo o ergosterol, resultando na produção de poros aquosos (Figura 1.5)<sup>74,65</sup>. Por conseguinte, a permeabilidade celular é alterada, o que conduz à fuga dos componentes citosólicos e, portanto, a morte da célula fúngica<sup>74,65</sup>. Esta classe de antifúngicos tem sido amplamente utilizada ao longo de várias décadas, apesar disso casos de resistência em espécies de *Candida* aos polienos ainda são pouco frequente, no entanto podem surgir através da redução no teor de ergosterol da membrana celular<sup>95</sup>. Dos polienos, destaca-se a nistatina (NIS) e a anfotericina B (AmB), sendo esta última uma das drogas antifúngica mais eficaz atualmente (Tabela 1.2)<sup>36,97</sup>

##### 1.4.3.1 Anfotericina B (AmB)

A AmB exibe atividade antifúngica de largo espectro contra uma variedade de fungos patogénicos, sendo a resistência a este antifúngico algo incomum em espécies de *Candida*<sup>1,98</sup>. No entanto, tem sido descrita em casos de pacientes com cancro, submetidos a quimioterapia e a terapia profilática a longo prazo<sup>99</sup>. Os mecanismos pelos quais os biofilmes de *Candida* resistem à ação de agentes antifúngicos ainda são pouco compreendidos, mas presume-se que envolvem alterações na composição da membrana celular. Por exemplo, linhagens genéticas com defeito em esteróis C5,6-dessaturase, o que induz a uma pequena produção de ergosterol, aumentando assim a resistência clínica a AmB<sup>90</sup>. Outra possível causa de resistência é a mudança de esterol, principalmente em *C. glabrata*<sup>100</sup>. Neste sentido, AmB intravenosa tem sido o fármaco de eleição para as infecções fúngicas invasoras<sup>74,65</sup>. No entanto, doses previstas de AmB necessárias para reduzir significativamente a carga celular em biofilmes *Candida* não é segura para ser administrada no paciente<sup>36,97</sup>. Além disso, este antifúngico apresenta fraca absorção oral e intramuscular<sup>101</sup>.

#### 1.4.3.2 Nistatina (NIS)

A NIS é produzida por estirpes de *Streptomyces noursei* e encontra-se disponível em várias formas, tais como suspensão ou comprimido oral e creme tópico<sup>102</sup>. No entanto, este agente antifúngico não é absorvida pelo trato gastrointestinal quando administrada por via oral<sup>103</sup>. Portanto, o uso mais comum é aplicação tópica, uma vez que a exposição sistêmica é mínima<sup>102</sup>. É indicada para o tratamento de candidíase da cavidade bucal e do trato digestivo superior, em pacientes que foram sujeitos ao uso prolongado de antibióticos, radioterapia ou drogas imunossupressoras que provocam uma queda de resistência orgânica<sup>102</sup>. Além disso, a NIS também desempenha um papel importante na profilaxia da candidíase oral e sistêmica em recém-nascidos e prematuros, lactentes e pacientes imunocomprometidos<sup>104,105</sup>. Geralmente a resistência à NIS não se desenvolve durante o tratamento<sup>104,105</sup>.

Infeções fúngicas superficiais podem ser tratadas com sucesso através de drogas antifúngicas tópicas, como a NIS, AmB, miconazol e clotrimazol, que são recomendadas para tratamento primário em casos simples de candidíase, como por exemplo oral<sup>106</sup>. Por outro lado, os agentes antifúngicos sistêmicos, são recomendados em infecções sistêmicas ou quando ocorre falha na ação de agentes antifúngicos tópicos. Nestes casos podem ser tratadas apenas com preparações orais, (por exemplo, posaconazol e flucitosina), ou podem ser administradas por via intravenosa e oral (por exemplo, FLC, itraconazol e voriconazol), dependendo da solubilidade do fármaco<sup>106</sup>.

## 1.5 Terapias alternativas

A crescente incidência de agentes patogênicos resistentes aos antifúngicos convencionais e a toxicidade dos compostos antifúngicos existentes chamaram a atenção para o desenvolvimento de terapias alternativas, sendo fulcral a descoberta de novos agentes antifúngicos, a fim de alargar o espectro de atividade, de modo a combater estirpes resistentes a antifúngicos, tais como a AmB e o FLC.

Neste sentido, têm sido realizadas abordagens inovadoras tais como a utilização de nanopartículas de prata (AGNPs), sendo a prata um agente antimicrobiano bastante conhecido, apresenta também um perfil de baixa toxicidade, assim como resposta tolerável pelo organismo. Deste modo, o uso de AGNPs tem sido sugerido para o revestimento de implantes médicos de titânio, com o objetivo de inibir a formação de biofilmes, reduzindo assim a incidência de infecções microbianas<sup>107,108,109</sup>. Outra terapia antifúngica recentemente utilizada é a imunoterapia, resumidamente, a imunidade inata e mediada por



células é importante para a defesa do hospedeiro contra infecções disseminadas por *Candida*, ambos os componentes da defesa do hospedeiro interagem uns com os outros para fornecer proteção efetiva, assim favorecer um tipo de célula em função de outro é uma interpretação simplificada dos estudos sobre a defesa do hospedeiro contra a candidíase disseminada<sup>110,111</sup>. Outra estratégia antifúngica promissora é a terapia fotodinâmica, esta técnica consiste na combinação de um fármaco sensibilizante e luz visível, isto é, as células são tratadas com um agente fotossintético, tornando-as suscetíveis à morte por exposição à luz, o que leva a destruição seletiva de células microbianas<sup>112,113</sup>.

Apesar das terapias referidas se revelarem promissoras, apresentam uma eficácia limitada que tem chamado a atenção para a necessidade de desenvolvimento de novas terapias, surgiu assim um maior interesse em terapias baseadas em produtos naturais e a sua possível combinação com antifúngicos comerciais existentes.

#### 1.5.1 Terapia baseada em produtos naturais

Novas terapias têm sido desenvolvidas com base em produtos naturais, demonstrando ser terapias alternativas para o tratamento de candidíase. A utilização de produtos naturais destinados ao controlo de doenças fungicidas é considerada uma interessante alternativa aos fungicidas sintéticos, apresentando diversas vantagens, tais como, menores custos e reações adversas, facilmente acessível, podem ser aplicáveis a diversas patologias e menor impacto negativo na saúde do indivíduo, visto que, em geral as terapias naturais são bem toleradas pelos pacientes e ao contrário dos antifúngicos, não induzem resistência, o que permite uma utilização prolongada<sup>114,115,116</sup>. Por conseguinte, as plantas constituem uma excelente fonte de substâncias que podem ser utilizadas na formulação de novos agentes antifúngicos, uma alternativa natural para a terapia antimicrobiana, evitando assim, a terapia antifúngica sintética a qual tem sido excessiva nos últimos anos<sup>116</sup>.

Vários estudos foram realizados utilizando produtos naturais para avaliar a interferência em *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, como por exemplo saponinas, polifenóis (chá verde) ou extrato de alho em *C. albicans*, óleo de canela e ácido úsnico em *C. parapsilosis* e péptidos para todas as espécies de *Candida*, exceto *C. glabrata*<sup>4</sup>. Muitos destes extratos de plantas e óleos essenciais demonstraram exercer atividade antimicrobiana, tanto *in vivo* como *in vitro*, o que justificou pesquisas sobre a caracterização da sua atividade, e por conseguinte os óleos essenciais tornaram-se os mais promissores<sup>114</sup>. Contudo, a investigação de novos compostos obtidos a partir de plantas, abrange novas estruturas químicas, complexas e diversas, necessitando assim de um estudo mais completo antes da sua utilização como novos agentes antifúngicos. Neste sentido, a identificação de outros produtos

naturais, nomeadamente o mel, contra isolados clínicos resistentes de *Candida* é importante do ponto de vista prático<sup>114,117</sup>.

#### 1.5.1.1. Um produto natural promissor: o mel

O mel tem sido reconhecido por todo o mundo desde do século XIX pelas suas diversas propriedades: antioxidantes, anti-tumorais, anti-inflamatórias e antivirais<sup>118</sup>. Além destas propriedades, estudos laboratoriais e ensaios clínicos *in vivo* demonstraram que o mel é um agente antimicrobiano eficaz, de largo espectro e ativo contra uma elevada variedade de bactérias e fungos<sup>119</sup>. Além disso, ao contrário da maioria dos antibióticos ou antifúngicos, a resistência ao mel não pode ser induzida<sup>120</sup>. Estas características tornam o mel um tratamento alternativo atraente, particularmente para aplicação tópica na pele e nas membranas mucosas<sup>121</sup>.

Como um produto natural complexo, existe uma variedade de fatores que contribuem para a atividade antimicrobiana do mel. Um dos fatores mais importante é apresentar na sua constituição peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), o componente antimicrobiano primário na maioria dos méis, produzido pela enzima glucose-oxidase adicionada pela abelha na produção do mel, e a sua ação consiste na destruição dos componentes essenciais das células dos organismos<sup>122</sup>. Outros fatores são o efeito osmótico, pois o mel apresenta uma elevada concentração de hidratos de carbono, mas reduzido volume de água, podendo assim inibir o crescimento de bactérias por desidratação celular, com ação mais difícil nos fungos devido a uma maior resistência à pressão osmótica<sup>123</sup>; acidez devido a sua constituição em ácidos orgânicos, particularmente ácido glutâmico, pirúvico, málico e cítrico, que resulta num pH ácido entre 3.2-4.5 que inibe o crescimento de diversos microrganismos<sup>124</sup>. Além destes fatores, evidências indicam que algumas variedades de mel contêm ácido cinurênico, um metabolito de triptofano com atividade neuroativa<sup>125</sup>. Assim como, a presença de enzimas como a diastase, invertase, fosfatase, catalase e peroxidase encontradas no mel contribuem para inibir o crescimento de espécies de *Candida*<sup>125</sup>.

Certos tipos de mel contêm atividade antimicrobiana adicional, que tem sido atribuída a diferentes componentes, incluindo *methylglyoxal* (MGO), defensina-1 de abelha e outros compostos derivados de abelhas, como compostos fenólicos de origem floral, lisozima entre outros compostos ainda não determinados<sup>121</sup>. Estas propriedades diferem de acordo com os parâmetros físico-químicos característicos do próprio mel, tais como humidade (15,0 % -17,3 %), pH (3,2-4,5), acidez total (8.68-59.49 meq/kg), densidade, viscosidade dinâmica, índice de refração, condutividade elétrica e cor, bem

como quantidades relativas de açúcares redutores e não-redutores, açúcares totais, sólidos insolúveis em água, composição mineral, teor de 5-hidroximetilfurfural e o valor da diastase, etc<sup>126</sup>.

Atualmente existem diversos estudos que comprovam o efeito antimicrobiano do mel, nomeadamente um levado a cabo por Koc AN *et al.*<sup>127</sup>, onde demonstraram que todos os méis testados apresentavam atividade antifúngica numa concentração elevada de 80 % (v/v) em estripes resistentes ao FLC. Outro estudo, realizado por Al-Waili *et al.*<sup>128</sup>, constatou que o mel com concentração entre 30 - 50 % (v/v) inibe o crescimento de vários microrganismos, incluindo *C. albicans*. Além disso, num estudo de Mercan *et al.*<sup>129</sup>, o mel apresentou alta atividade contra *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*. Também Irish *et al.*<sup>122</sup>, verificaram a eficiência de vários méis contra isolados de *C. albicans*, *C. glabrata* e *Candida dubliniensis*. Assim como, num estudo realizado por Khosravi *et al.*<sup>130</sup>, onde se relatou que o mel possui atividade antifúngica contra espécies de *Candida*, tais como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *Candida kefyr*. Num estudo *in vivo*, levado a cabo por Varidi A. *et al.*<sup>131</sup>, foi investigado o efeito da aplicação tópica de 5-10 mL de mel fresco não processado, duas vezes por dia, em feridas abertas e infetadas. Neste estudo concluíram que o mel é útil no tratamento de feridas pós-cirúrgicas que estão infetadas e não respondem a tratamentos com antibióticos sistêmicos ou locais convencionais. Pois, o mel mantém um ambiente húmido na ferida que promove a cura e a sua alta viscosidade ajuda a fornecer uma barreira protetora para prevenir a infeção<sup>131</sup>. Além disso, a leve acidez e a liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de baixo nível auxilia o reparo tecidual<sup>131</sup>. No entanto, foi demonstrado que o mel apenas teve efeitos inibitórios<sup>132</sup>.

Dos inúmeros méis existentes e disponíveis para uso clínico, atualmente, o mel manuka produzido por abelhas (*Apis mellifera*) e derivado da árvore Manuka (*Leptospermum scoparium*), é um dos agentes terapêuticos mais utilizados em todo o mundo devido à sua eficácia documentada no tratamento de infeções causadas tanto por agentes patogénicos suscetíveis como por agentes resistentes a antibióticos<sup>133</sup>. Estudos *in vitro* demonstraram que este mel possui atividade contra os microrganismos mais comuns que podem infetar feridas, incluindo *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*<sup>34</sup>. Além deste tipo de mel, os méis monoflorais também mostraram ser promissores como agentes antifúngicos numa variedade de infeções micóticas, incluindo as provocadas por *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* e, até por espécies resistentes a FLC e miconazol<sup>135</sup>. Dos méis monoflorais destaca-se o mel português urze produzido pela espécie *Erica*, que tem demonstrado ser eficaz como agente antifúngico em 89 amostras de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. Neoformans*, como pode ser verificado no estudo realizado por Feás e Estevinho<sup>136</sup>. Este mel caracteriza-se pela sua cor marrom escuro, sabor forte e ligeiramente salgado.

Embora a utilização do mel apresente muitas vantagens, há algumas considerações práticas para o seu uso. Em primeiro lugar, o mel é limitado a tratamentos locais, não podendo ser usado no tratamento de candidemia, a forma mais grave de candidíase. Em segundo lugar, sendo o mel solúvel em água, numa aplicação clínica pode diluir-se ou ser removido por fluidos corporais, em particular na cavidade oral pela saliva. Outro problema prático é a presença de catalase em fluidos do corpo, diminuindo a atividade de  $H_2O_2$ <sup>122</sup>. No entanto, como o fator de risco mais importante para infecção da corrente sanguínea é a colonização de locais externos, tais como cateteres, a mucosa oral ou vaginal, o mel pode ser usado para evitar infecções mais graves. Embora vários estudos *in vitro* tenham demonstrado a atividade antibacteriana do mel, ainda existe um número limitado de estudos que comprovam a atividade contra fungos. Portanto, considerando-se que os extratos naturais/compostos de origem vegetal podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de agentes antifúngicos, um dos objetivos do presente trabalho consiste numa avaliação do potencial antifúngico de diferentes méis em espécies de *Candida*.

#### 1.5.2 Terapia combinacional

No sentido de evitar a resistência aos agentes antifúngicos uma potencial abordagem consiste na combinação de duas ou três classes de drogas ou agentes antifúngicos, o raciocínio envolvido nesta terapia baseia-se essencialmente nos diferentes mecanismos de ação dos fármacos<sup>137</sup>. As combinações mais lógicas são as que envolvem fármacos com diferentes mecanismos de ação, as quais poderão induzir três tipos de respostas, nomeadamente: adição, sinergia e antagonismo<sup>138,137</sup>. O efeito aditivo e o efeito sinérgico referem-se a situações em que a ação combinada das duas drogas é equivalente ou significativamente maior, respetivamente, à soma das ações de cada droga individualmente, quando utilizadas individualmente. Por outro lado, a ocorrência de antagonismo implica que o efeito combinado seja menor que o efeito do agente mais eficaz quando utilizado individualmente<sup>137</sup>.

Posto isto, foram caracterizadas várias combinações de agentes antifúngicos em diversos estudos tanto *in vitro* como *in vivo* para espécies de *Candida*, por exemplo AmB + flucitosina, AmB + FLC, caspofungina + AmB lipossomal e caspofungina + FLC<sup>138,71</sup>. Estes estudos têm demonstrado resultados variáveis dependendo dos agentes antifúngicos selecionados, da espécie isolada e das condições experimentais<sup>138</sup>. A primeira aplicação clínica desta terapia para a candidíase invasiva envolveu o uso de AmB e flucitosina. O que demonstrou ser uma das melhores combinações, verificando-se que induz um efeito aditivo, além disso a investigação sugere que reduz o aparecimento de resistência a flucitosina<sup>139</sup>. Apesar de estes estudos serem predominantemente em *C. albicans* foi

efetuado também um estudo em *C. tropicalis*<sup>40</sup>. Assim, esta combinação tem sido utilizada há várias décadas em diversos cenários clínicos, incluindo *Candida* endocardite, meningite e outras infecções invasivas<sup>139</sup>.

Existem várias vantagens documentadas da terapia combinada, que incluem alcance e potência superior da atividade fungicida, efeito antifúngico mais rápido, diminuição na dosagem da droga, o que contribui para a diminuição dos efeitos secundários e da toxicidade enquanto mantém a eficácia, podendo ainda retardar o desenvolvimento de mutantes resistentes<sup>137</sup>. Além disso, pode também ser usado para fornecer uma ampla cobertura em pacientes gravemente doentes, suspeitos de terem infecções mistas ou resistentes, isto é, pode fornecer proteção contra dois ou três agentes patogénicos simultaneamente<sup>137</sup>. No entanto, pode também apresentar algumas desvantagens, como aumento do custo da terapia, além de que o uso desta terapia pode ainda criar uma falsa sensação de segurança, uma vez que o médico pode presumir que existe proteção contra todos os agentes patogénicos possíveis<sup>137</sup>. Neste sentido, a combinação de um agente antifúngico com um produto natural, pode reduzir as desvantagens descritas anteriormente. Em relação a terapias combinadas com mel, existem estudos que demonstraram eficácia no tratamento de candidíases, tais como, combinação de mel com iogurte ou FLC na candidíase vulvovaginal; a adição de amido de gengibre ao mel, o que já demonstrou um aumento da atividade contra *C. albicans* resistente; o mel combinado com azeite e cera de abelhas também já mostrou inibir o crescimento de *C. albicans*<sup>141,142,143</sup>.

Um dos objetivos deste projeto consiste na avaliação do efeito da combinação do mel com dois antifúngicos comerciais mais utilizados, o FLC, a NIS e um anticético oral, digluconato de clorohexidina (CLR). Antifúngicos estes bastante comuns na prática clínica, quer no tratamento como na prevenção antifúngica, devido à sua atividade contra uma ampla gama de espécies microbianas incluindo *Candida*<sup>44</sup>.

## 1.6 Objetivos

O aumento da incidência de micoses sistêmicas causadas por espécies de *C. albicans* e *CNA*, em pacientes hospitalizados é uma causa importante de mortalidade e morbidade. Portanto, é fulcral a descoberta de novos agentes ou terapias antifúngicas. Nesta perspectiva, existe uma necessidade crescente na procura de novos produtos com capacidades antifúngicas mais eficazes e com menores efeitos adversos colaterais comparando com medicamentos ou terapias existentes. Assim, este trabalho tem como objetivo geral explorar abordagens alternativas para o tratamento de candidiases. Mais especificamente, avaliar em diferentes espécies de *Candida*, o efeito antifúngico de um produto natural, o mel, e a combinação deste composto com agentes antifúngicos comerciais. Adicionalmente, tem como objetivo complementar avaliar o efeito do mel em biofilmes mistos, constituídos por *C. tropicalis* e *P. aeruginosa*.

Portanto, os objetivos específicos deste projeto são:

1. Determinar a suscetibilidade de células suspensas ao mel;
2. Avaliar o efeito antifúngico do em biofilmes de *C. albicans* e *CNA* (*C. glabrata*; *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*);
3. Avaliar o efeito antifúngico do mel em biofilmes mistos de *C. tropicalis* e *P. aeruginosa*;
4. Combinar o mel com agentes antifúngicos comerciais (NIS, CLR e FLC) de modo a otimizar o seu efeito em biofilmes de *C. tropicalis* e biofilmes mistos de *C. tropicalis* e *P. aeruginosa*, adicionalmente em biofilmes mistos, combinação de mel com FLC e com um antibiótico comercial (GEN).



# Capítulo II

---

## **MATERIAIS E MÉTODOS**





## 2.1 Microrganismo e condições de armazenamento e crescimento

Neste estudo foram utilizadas 5 estirpes de referência, quatro espécies fúngicas, nomeadamente a *C. albicans* SC 5413, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. glabrata* ATCC 2001 e *C. parapsilosis* ATCC 9001 e uma espécie bacteriana, *P. aeruginosa* DSM 22644 (Tabela 2.1). As espécies fúngicas foram mantidas a  $-80 \pm 2$  °C em meio *Yeast Peptone Dextrose* (YPD, Thermo Fisher Scientific) contendo 15 % (v/v) de glicerol (Merck®, Germany). Após descongelação, as células foram crescidas em meio *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB, Liofilchem®) contendo 2 % (v/v) de agar (Liofilchem®) durante 24 h a 37 °C. A espécie bacteriana foi armazenada em meio *Tryptic Soy Broth* (TSB, Liofilchem®) contendo 15 % (v/v) de glicerol também a  $-80 \pm 2$  °C e foram crescidas em meio TSB contendo 2 % (v/v) de agar durante 16 h a 37 °C.

**Tabela 2.1** Lista de espécies fúngicas, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* e espécie bacteriana, *P. aeruginosa*, utilizadas neste estudo e respetiva referência

Espécies	Referência
<i>C. albicans</i>	SC 5413
<i>C. tropicalis</i>	ATCC 750
<i>C. glabrata</i>	ATCC 2001
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 9001
<i>P. aeruginosa</i>	DSM 22644

## 2.2 Agentes antimicrobianos

Neste estudo foram testadas varias condições, em biofilmes de *Candida* foi avaliado o efeito da combinação de mel com um antifúngico comercial, nomeadamente NIS, CLR e FLC, e nos biofilmes mistos, adicionalmente, foi avaliado o efeito da combinação de mel com um antifúngico (FLC) um antibacteriano (gentamicina, GEN). Os agentes antimicrobianos testados foram diluídos para as concentrações pretendidas, discriminadas na Tabela 2.2, com meio RPMI 1640 (meio este preparado com água ultra-pura contendo 34,53 g/L de solução tampão 3- [N-Morpholino] *Propanesulfonic acid* (MOPS, Panreac Applichem), 10,4 g/L de meio RPMI 1640 (Gibco® by Life Technologies) e 2 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>, Thermo Fisher Scientific), pH 7 ajustado utilizando drageias de hidróxido de sódio (NaOH, Scharlau), esterilizado por filtração e armazenado a 4 °C).

**Tabela 2.2** Concentrações testadas de mel (urze e manuka), de agentes antifúngicos comerciais (NIS, CLR e FLC) e do agente antibacteriano comercial (GEN)

Agente antimicrobiano		Concentração
<b>Mel</b>		6 % (v/v)
	Manuka	12,5 % (v/v)
		25 % (v/v)
	Urze	50 % (v/v)
		75 % (v/v)
<b>Antifúngico</b>	NIS	50000 UI
	CLR	0,1 % (v/v)
		20 mg/L
		30 mg/L
		40 mg/L
		80 mg/L
		100 mg/ L
		200 mg/L
<b>Antibacteriano</b>	GEN	20 mg/L

### 2.2.1 Mel

Na realização deste trabalho foram avaliados dois méis, urze (mel de origem portuguesa) e manuka (Medihoney®) com diferentes origens e, conseqüentemente, com propriedades distintas, entre elas: a cor, o pH, as concentrações de proteína, de hidroximetilfurfural (HMF) e de *methylglyoxal* (MGO) descritas na Tabela 2.3, parâmetros anteriormente determinados por Ribeiro HG.<sup>145</sup>. Os méis foram armazenados à temperatura ambiente e preparados antes de serem testados, isto é, efetuaram-se as diluições com meio RPMI 6420 para se obter concentrações entre 6-75 % (Tabela 2.2).

**Tabela 2.3** Descrição detalhada das propriedades dos méis urze e manuka, nomeadamente cor, pH, concentração de proteína, HMF e MGO

Mel	Cor	pH	[Proteína] mg/mL	HMF mg/ kg	MGO mg/kg
Urze	Âmbar extra claro	4,32	10,8	151,9	1266,4
Manuka	Âmbar claro	3,50	60,9	189,4	756,5

### 2.2.2 Agentes antifúngicos comerciais

Os três antifúngicos comerciais testados foram a nistatina (NIS, Mycostatin®), o digluconato de clorohexidina (CLR, Parodontax®) e o fluconazol (FLC, Sigma-Aldrich). A NIS e a CLR foram testados em 50 % da concentração das preparações clínicas existentes, isto é, 50 000 UI e 0,1 % (v/v), respetivamente. O FLC foi diluído para a concentração de 5 000 mg/L em água ultra-pura estéril, a partir da qual se prepararam soluções finais nas concentrações de 20 a 200 mg/L (Tabela 2.2).

### 2.2.3 Agente antibacteriano comercial

Na realização deste trabalho foi também testado um antibacteriano, o sal sulfato de gentamicina (GEN, Sigma-Aldrich), com a concentração de 20 mg/L preparada a partir de uma solução *stock* de 30 mg/L em água ultra-pura estéril (Tabela 2.2).

## 2.3 Avaliação de suscetibilidade de células planctónicas de *Candida* ao mel

Foram realizados dois testes de suscetibilidade em células planctónicas para a determinação da CMI e da concentração mínima fungicida (CMF). Para a realização destes testes, numa primeira etapa, foi necessário o ajuste da densidade celular. Para tal as diferentes estirpes de *Candida* foram repicadas novamente em SDA a 37 °C, durante 24 h. Após incubação foi colocada, individualmente, uma colónia de cada espécie em 5 mL de cloreto de sódio 0,85 % (v/v) (NaCl, Thermo Fisher Scientific) estéril, ajustando a densidade celular por comparação visual da turbidez com a solução-padrão da escala de McFarland 0.5 (Barium sulfate standard, Liofilchem®). Este procedimento fornece uma suspensão-padrão contendo  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  cél/mL.

### 2.3.1 Métodos de difusão em agar

Através do método de difusão em agar baseado em Lima *et al.*<sup>146</sup> e Moussa *et al.*<sup>125</sup>, pretendeu-se avaliar o efeito do mel urze e do mel manuka nas concentrações 25 % (v/v), 50 % (v/v), e 100 % (v/v) nas espécies de *Candida*, nomeadamente, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Este método foi realizado de duas formas distintas, uma consistiu em inocular uniformemente 100 µL de suspensão celular em SDA, noutra técnica adicionou-se diretamente 1 mL de suspensão celular por cada 20 mL de meio SDA com a temperatura moderada, vertendo-se de seguida para as placas de petri e deixou-se arrefecer. Em ambas as técnicas foram feitas cavidades no

agar com 6 mm de diâmetro onde se depositou 50 µL do mel diluído, foram também aplicados discos de papel de filtro estéreis (5 mm de diâmetro) (Blank discs, Liofilchem®), previamente impregnados com 20 µL de mel diluído. De seguida, as placas foram incubadas a 37 °C, durante 24 h. Simultaneamente foram usados controlos com quantidades equivalentes de água. Após incubação mediu-se os diâmetros das zonas de inibição e considerou-se como CMI a concentração capaz de desenvolver um halo de inibição maior ou igual a 10 mm de diâmetro. Cada ensaio foi realizado em triplicado.

### 2.3.2 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima fungicida (CMF)

Foram determinados os valores da CMI e da CMF dos méis urze e manuka para as diferentes espécies de *Candida* estudadas, protocolos adaptados de *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (EUCAST)<sup>147</sup>. Neste método, após ajuste da densidade celular realizou-se uma diluição de 1:10 em meio RPMI 1640. De seguida, colocou-se 100 µL da suspensão celular final juntamente com 100 µL de mel diluído nas concentrações de 50 % (v/v), 25 % (v/v), 12.5 % (v/v) e 6 % (v/v) (duas vezes concentradas) numa microplaca de 96 poços de poliestireno (Orange Scientific, Braine-l' Alleud, Belgium), realizando-se simultaneamente um controlo positivo contendo 100 µL da suspensão e 100 µL de meio RPMI 1640 e um controlo negativo, contendo apenas 200 µL de meio RPMI. Posteriormente, incubou-se a placa a 37 °C, com rotação 120 rpm, durante 24 h. Os resultados das CMI obtiveram-se visualmente e confirmados por medição da densidade ótica a 570 nm ( $DO_{570nm}$ ). Os ensaios foram realizados quatro vezes com cada condição em triplicado.

A determinação das CMFs obteve-se a partir da contagem de Unidades Formadora de Colónias (UFC), após incubação da microplaca foi recolhido o meio dos poços e procedeu-se a diluições de  $10^6$ - $10^7$  com NaCl 0,85 % (v/v) numa placa de diluição, colocando uma gota de 10 µL de cada diluição sobre a placa de meio SDA, pela técnica da “gota escorrida”. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 24 h. Por último realizou-se a contagem das colónias formadas, determinando-se o valor de UFC/cm<sup>2</sup>.

## 2.4 Avaliação da suscetibilidade de biofilmes de *Candida* ao mel

### 2.4.1 Formação de biofilme

Para avaliar a suscetibilidade de biofilmes em fase de desenvolvimento (24 h) e em fase madura (48 h) de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* aos potenciais agentes antimicrobianos estudados, é necessário numa primeira etapa a formação de biofilmes. Para tal, as condições de crescimento foram realizadas de forma semelhante aos métodos previamente descritos<sup>148</sup>. Para cada ensaio as células foram inoculadas em meio SDB e incubadas a 37 °C durante 16 h, aproximadamente. Após incubação, a suspensão foi centrifugada (3000 g, 10 minutos a 4 °C) e lavada duas vezes com Tampão Fosfato Salino (TFS), preparado com 8 g/L de NaCl, 0,2 g/L de Cloreto de potássio (KCl, Merck®, Germany), 0,2 g/L de Fosfato dipotássico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Scharlau) e 1,15 g/L de Fosfato dissódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich), pH a 7,5. Para o ajuste da concentração celular ressuspendeu-se o *pellet* em RPMI 1640 e procedeu-se a contagem do número de células na câmara de Neubauer (Marienfeld, Germany), ajustando-se a densidade celular para  $\approx 1 \times 10^7$  cél/mL através da equação 1.

$$\text{UFC/mL} = \text{número de células} \times 50\,000 \times \text{fator de diluição} \quad (1)$$

Os biofilmes foram formados em microplacas de 96 poços de poliestireno e incubados durante 24 h a 37 °C, com agitação de 120 rpm. Realizaram-se controlos negativos apenas com meio RPMI 1640. No caso de biofilmes maduros (48 h) o meio foi trocado após 24 h.

### 2.4.2 Tratamento com mel e terapia combinacional de mel com um agente antifúngico comercial em biofilmes de *Candida*

O tratamento com mel de biofilmes de 24 e 48 h de *Candida* foi realizado aplicando-se 200 µL destes potenciais agentes antimicrobianos, os méis urze e manuka nas concentrações de 25 % (v/v), 50 % (v/v), e 75 % (v/v). Adicionalmente, os biofilmes de *C. tropicalis* foram tratados com mel nas concentrações de 25 % (v/v) e 50 % (v/v) combinados com antifúngicos comerciais NIS, CLR e FLC nas concentrações de 5000 UI, 0,1 % (v/v) e 20-200 mg/L, respetivamente, na proporção de 1:1. Realizou-se simultaneamente controlos positivos com meio RPMI 1640 e de cada antifúngico individualmente. As placas foram incubadas a 37 °C, com agitação 120 rpm, durante 24 h. Os ensaios foram realizados quatro vezes com cada condição em triplicado.

De modo a avaliar o efeito antifúngico das condições descritas recorreu-se a três métodos distintos, nomeadamente a quantificação da biomassa total pelo método cristal violeta (CV), determinação da viabilidade celular pela contagem de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) e avaliação do biofilme por observação ao microscópio de fluorescência.

#### 2.4.3 Método de quantificação de Biomassa: Cristal Violeta (CV)

O método de coloração por cristal violeta (CV) permite quantificar a biomassa total, visto que o CV é um corante básico, que se liga a superfícies das moléculas carregadas negativamente e aos polissacarídeos da MEC<sup>31</sup>.

Neste método foi quantificada a biomassa total de biofilmes de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* após tratamento com mel urze e manuka nas concentrações 25 % (v/v), 50 % (v/v) e 75 % (v/v), procedimento descrito anteriormente por Silva *et al.*<sup>45</sup>. Assim, após incubação dos biofilmes nestas condições foi removido o meio dos poços e os biofilmes fixados com 200 µL de metanol (Fisher Chemical) durante 15 minutos. Depois de secos, procedeu-se à coloração dos biofilmes pela adição de 200 µL do corante CV a 1 % (v/v) (Pro-Lab Diagnostics Inc.) durante 5 minutos. De seguida, os biofilmes foram lavados 2 vezes com água desionizada, removeu-se e deixou-se secar. De modo a dissolver o corante ligado à matriz do biofilme foi adicionando 200 µL de ácido acético 33 % (v/v) (Fisher Chemical). A análise quantitativa da biomassa total foi obtida pela medição da densidade ótica a 570 nm ( $DO_{570nm}$ ) usando um leitor de placas automático. Foram realizadas três ensaios independentes com cada condição em triplicado.

#### 2.4.4 Determinação da viabilidade celular: Unidades Formadoras de Colónias (UFC)

A determinação da viabilidade celular foi realizada a partir da contagem de UFC. Em biofilmes de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* foi avaliada a viabilidade celular aquando aplicado mel urze e manuka nas concentrações de 25 % (v/v), 50 % (v/v) e 75 % (v/v). Em biofilmes de *C. tropicalis*, além destas condições foi avaliada a viabilidade celular na combinação de mel urze e manuka nas concentrações de 25 % (v/v) e 50 % (v/v) com antifúngicos comerciais NIS (50000 UI), FLU (20, 30, 40, 80, 100 e 200 mg/L) e CLR (0,1 % (v/v)).

Os biofilmes expostos aos vários agentes antimicrobianos e respetivos controlos foram lavados com 200 µL de NaCl 0,85 % (v/v) e, de modo a retirar a biomassa total, foram raspados os fundos dos poços com 200 µL de NaCl 0,85 % (v/v), procedendo-se de seguida a diluições de  $10^0$ - $10^7$  em NaCl

0,85 % (v/v) em placas de diluição. Colocou-se uma gota de 10 µL correspondente a cada diluição sobre a placa de meio SDA, pela técnica da “gota escorrida”. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 24 h. Por último, procedeu-se à contagem do número de colónias formadas e os resultados foram expressos em termos de UFC por área do poço da microplaca ( $\text{Log}_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>). Foram realizados três ensaios independentes, em triplicado cada condição.

#### 2.4.5 Microscopia de fluorescência

De modo a confirmar o efeito antifúngico das terapias aplicadas e, de melhor forma, analisar o efeito na estrutura do biofilme foi realizada microscopia de fluorescência com ensaio Live / Dead. Este ensaio foi realizado como descrito anteriormente por Rodrigues *et al.*<sup>149</sup>, onde os biofilmes foram formados como descrito no ponto 2.4.1, com a exceção de serem formados em placas de poliestireno de 24 poços (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) contendo cupões de poliestireno esterilizados (1x1 cm<sup>2</sup>), com 1 mL de suspensão celular em cada poço. Após 24 h, foi aplicado 1 mL dos agentes antimicrobianos, sendo a cultura incubada a 37 °C durante 24 h. Após o tratamento, a cultura foi sujeita a ensaios com o Kit de Viabilidade Live / Dead® BacLight™ (Molecular Probes, Leiden, Países Baixos). Basicamente, os cupões foram corados por 15 minutos com uma mistura dos corantes SYTO 9 e Iodeto de Propídio, ambos preparados a 3 µl/mL em solução salina, procedimento realizado no escuro. Para a observação microscópica, utilizou-se um microscópio Olympus BX51 equipado com iluminação de fluorescência. Utilizou-se a combinação de filtro ótico de 470 a 490 nm em combinação com filtros de excitação de 530 a 550 nm.

## **2.5 Avaliação da suscetibilidade de biofilmes mistos de *C. tropicalis* e *P. aeruginosa* ao mel**

### 2.5.1 Formação do biofilme misto

Na avaliação da suscetibilidade em biofilmes mistos, de *C. tropicalis* e *P. aeruginosa*, as condições de formação do biofilme de *Candida* são semelhante ao referido no ponto 2.4.1, com a exceção da suspensão celular de *C. tropicalis* ter o dobro da concentração pretendida. Para a espécie *P. aeruginosa* procedeu-se a inoculação de 3-4 colónias isoladas em 25 mL de TSB a 37 °C durante 14 h aproximadamente. Após incubação, centrifugou-se a suspensão bacteriana (3000 g, 10 minutos a 4°C) e lavou-se duas vezes em 15 mL de TFS, adicionando-se de seguida 5 mL de RPMI 1640, como



realizado para *C. tropicalis*. O ajuste da concentração celular foi realizado pela medição da densidade ótica por espectrometria a 640 nm ( $DO_{640nm}$ ), acertando-se para  $\approx 1 \times 10^7$  cél/mL através da equação 2, previamente estabelecida pelo grupo de investigação.

$$UFC/mL = 6 \times 10^9 \times DO_{640} - 3 \times 10^8 \quad (2)$$

Por último, as suspensões celulares foram colocadas em placas de poliestireno de 96 poços na proporção de 1:1 e incubadas a 37 °C com rotação 120 rpm durante 24 h. Realizaram-se controlos negativos apenas com meio RPMI 1640.

#### 2.5.2 Determinação da viabilidade celular (UFC) e microscopia de fluorescência

Em biofilmes mistos de *C. tropicalis* e *P. aeruginosa* foi avaliada a viabilidade celular aquando aplicado mel urze e manuka nas concentrações de 25 % (v/v), 50 % (v/v) e 75 % (v/v). Além destas condições foi avaliada também a combinação dupla de cada mel (urze e manuka) nas concentrações de 25 % (v/v) e 50 % (v/v) com antifúngico comercial FLC (100 mg/L). Adicionalmente realizou-se combinação tripla, também de cada mel testado, na concentração de 50 % (v/v) com FLC (100 mg/L) e GEN (20 mg/L), neste ensaio procedeu-se inicialmente ao tratamento de 24 h com mel, retirou-se o meio e adicionou-se o FLC durante 24 h e por fim procedeu-se ao tratamento com GEN por 24 h. O procedimento realizado para a determinação das UFCs é semelhante ao ponto 2.4.4, exceto os meios sólidos utilizados, isto é, utilizaram-se meios seletivos, nomeadamente, meio SDA suplementado com 30 mg/L de GEN para crescimento de *C. tropicalis* e meio *Pseudomonas Isolation Agar* (PIA, Sigma-Aldrich), contendo 2 % (v/v) de glicerol para o crescimento de *P. aeruginosa*. Foram realizados três ensaios independentes em triplicado cada condição. Estas condições foram também analisadas através de microscopia de fluorescência como referido no ponto 2.4.5.

## 2.6 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizado utilizando o *software* Prism (GraphPad Software versão 6.01). Os dados foram comparados pela análise de variância unidirecional (ANOVA) e as comparações subsequentes foram realizada com o teste de comparações múltiplas. As diferenças entre as condições foram consideradas estatisticamente significantes quando *p-value* < 0,05.

# Capítulo III

---

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

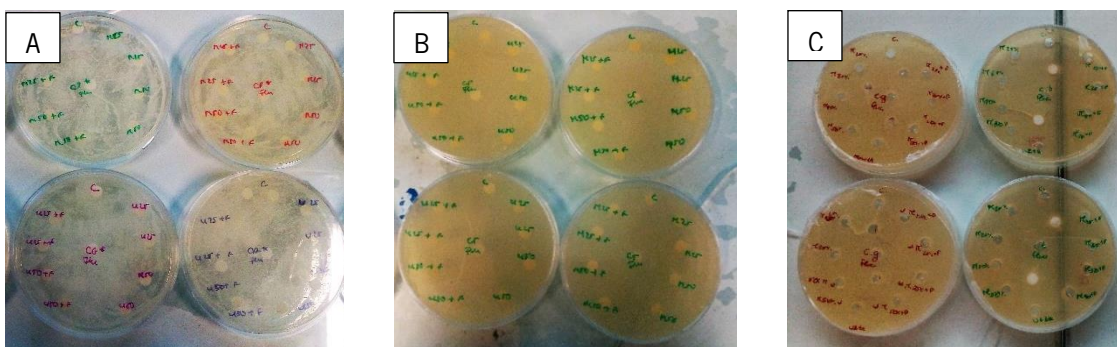


Perante o aumento e a variedade de manifestações clínicas que as infeções por *Candida* podem apresentar, o reconhecimento do padrão de sensibilidade à terapia antifúngica é fundamental. Para além de orientar a escolha da terapia antifúngica mais adequada, representa uma importante ferramenta de monitorização da evolução de resistência fúngica, na medida em que se assiste ao aparecimento de estirpes resistentes, que conseqüentemente deixam de ser eficazes aos tratamentos existentes. Neste sentido, existem várias técnicas para determinar a sensibilidade das estirpes aos antifúngicos ou às terapias antifúngicas, que se baseiam na determinação da capacidade que um microrganismo tem de se multiplicar *in vitro*, na presença de diferentes fármacos ou concentrações do antifúngico. Neste seguimento e, numa perspetiva geral, este estudo encontra-se dividido em 3 partes contínuas: a primeira, referente ao comportamento de *Candida* em crescimento planctónico na presença do potencial agente antifúngico, o mel; a segunda parte, relativa ao estudo de biofilmes de *Candida* quando tratados com mel e por último, avaliação da influência do mel em biofilmes mistos de *Candida* e *Pseudomonas*.

### **3.1 Avaliação da suscetibilidade de células planctónicas de *Candida* ao mel**

A atividade antimicrobiana de um composto pode ser quantificada com base na determinação da CMI desse composto, que é concentração capaz de inibir o crescimento de um dado microrganismo num determinado período de tempo ou pela menor CMF que representa a morte de 99,9 % dos microrganismos, os resultados são apresentados geralmente de forma quantitativa e qualitativa<sup>150</sup>. De facto, quanto menor forem os valores de CMI e CMF do antifúngico em relação a uma determinada espécie fúngica, maior será a sua efetividade clínica no tratamento de infeções e mais suscetível é a espécie, geralmente, a CMF é superior a CMI<sup>151</sup>. Estes parâmetros são, geralmente, considerados as medidas laboratoriais mais básicas da atividade de um agente antimicrobiano contra um organismo. Apesar disso, os valores de CMI e CMF são importantes numa etapa inicial de diagnóstico do potencial agente terapêutico.

Inicialmente foi realizado o método de difusão em agar, sendo este um teste simples e rápido para determinação da CMI, baseando-se na presença ou ausência de um halo de inibição e respetivo diâmetro. Os resultados deste prévio ensaio revelaram a não formação de halo em ambas as técnicas de inoculação da suspensão celular com difusão em disco ou em poço (Figura 3.1), o que poderia indicar que os compostos testados não teriam efeito antifúngico.



**Figura 3.1** Imagens representativas dos resultados obtidos através do método de difusão em agar para as espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* por (A) inoculação da suspensão celular na superfície da placa de SDA e aplicação do mel em discos de papel estéreis, (B) inoculação direta no meio SDA e aplicação do mel em discos de papel estéreis e (C) inoculação direta no meio SDA com aplicação do mel em furos feitos no agar.

De facto, estes resultados estão de acordo com estudos realizados anteriormente, como é o caso da investigação levada a cabo por Moussa *et al.*<sup>125</sup>, onde testaram o efeito antifúngico de quatro tipos de mel pelo método de difusão em agar e verificaram que *C. albicans* mostrou resistência a todas as concentrações de mel usadas (10 % (v/v), 30 % (v/v), 50 % (v/v), 70 % (v/v) e 100 % (v/v)) por ambos os métodos, difusão em disco ou por aplicação direta de mel no poço feito no agar. Assim como, um estudo realizado por Kacániová *et al.*<sup>152</sup>, onde também verificaram ausência do halo de inibição em seis amostras de mel multifloral com concentrações de 25 % (v/v) e 50 % (v/v) para as espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Foi, ainda, verificado o mesmo cenário noutro estudo realizado por Schneider *et al.*<sup>153</sup>, onde investigaram a atividade antimicrobiana de um mel da Escócia e do mel manuka nas concentrações de 1 % (v/v), 10 % (v/v), 50 % (v/v) e 70 % (v/v) contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Escherichia coli*, usando o método difusão em agar e microdiluição. Também neste estudo o método de difusão em agar não demonstrou qualquer atividade antimicrobiana dos méis testados, em contrapartida o ensaio de microdiluição, por sua vez, demonstrou que efetivamente os méis apresentava atividade contra as espécies testadas. Deste modo, estes autores observaram que o mel permaneceu na superfície do disco e não se diluiu no agar, não permitindo a formação do halo.

Considerando-se os resultados obtidos e os estudos realizados anteriormente referidos, não se pode concluir nada acerca da atividade antifúngica do mel, uma vez que o método de difusão em agar, poderia não ser o método indicado para o estudo, uma vez que a viscosidade do mel não permite a difusão, permanecendo deste modo no disco ou no poço feito no agar. Posto isto, neste ponto não foi possível determinar a CMI, nem aferir qual o melhor mel ou a espécie mais suscetível ou resistente, utilizando este método.

Após o insucesso do método de difusão em agar, as CMI e as CMF dos méis urze e manuka foram determinadas para as espécies de *C. albicans* e *CNA* através da realização de um protocolo adaptado de EUCAST<sup>147</sup>. Na Tabela 3.1 é possível verificar que se obteve CMI e CMF de 50 % (v/v), para ambos os méis, para *C. albicans*. Para *C. glabrata* e *C. parapsilosis* obtiveram-se CMI de 50 % (v/v) e CMF superior a 50 % (v/v) (Tabela 3.1). Relativamente a *C. tropicalis*, obteve-se uma CMI inferior no mel urze, de 12,5 % (v/v), e 25 % (v/v) para o mel manuka. Relativamente aos valores de CMF, estes foram de 50 % (v/v) no mel urze e superior a 50 % (v/v) de mel manuka, indicando que o mel urze apresenta um efeito inibidor superior em comparação com o mel manuka em células desta espécie quando estão em crescimento planctónico.

**Tabela 3.1** Valores de CMI e CMF obtidos pela avaliação da suscetibilidade das espécies de referência *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* para os méis manuka e urze

Espécie	Manuka		Urze	
	CMI % (v/v)	CMF % (v/v)	CMI % (v/v)	CMF % (v/v)
<b><i>C. albicans</i></b>	50	50	50	50
<b><i>C. tropicalis</i></b>	25	>50	12,5	50
<b><i>C. glabrata</i></b>	50	>50	50	>50
<b><i>C. parapsilosis</i></b>	50	>50	50	>50

Relativamente aos resultados obtidos para *C. albicans*, valores semelhantes foram relatados por Ansari *et al.*<sup>151</sup>, para a mesma espécie, onde obtiveram uma CMI de 40 % (v/v) e uma CMF de 50 % (v/v) para o mel Jujube, originário da espécie *Zizyphus spina-chistr*. Além deste estudo, numa investigação levada a cabo por Khosravi *et al.*<sup>130</sup>, foram determinadas as CMI e CMF de méis do Norte e do Sul do Irão, onde a média de CMI e CMF dos méis foram determinadas como sendo, respetivamente: *C. albicans* de 38,5 % (v/v) e 45,1 % (v/v), para *C. tropicalis* de 38,5 % (v/v) e 43,7 % (v/v), para *C. glabrata* de 35,7 % (v/v) e 40,8 % (v/v) e *C. parapsilosis* de 36,7 % (v/v) e 42,8 % (v/v), assemelhando-se aos valores obtidos neste estudo. Apesar dos valores obtidos se encontrarem na mesma gama de concentração dos estudos mencionados, as CMI e CMF dos méis podem variar dependendo do mel e de acordo com diversas condições, sendo a fonte de néctar um dos fatores que mais condiciona a atividade antifúngica do mel, uma vez que a origem floral determina muitos dos atributos do mel<sup>127,154</sup>. Num estudo realizado por Koc *et al.*<sup>127</sup>, onde investigaram o efeito de diferentes amostras de mel, com distintas origens nomeadamente eucalipto, multifloral, laranja e rododendro

em *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* verificaram que as faixas de CMI variaram consideravelmente entre 20 – 80 % (v/v), dependendo da sua origem, além disso verificaram que o mel multifloral obteve um valor de CMI menor.

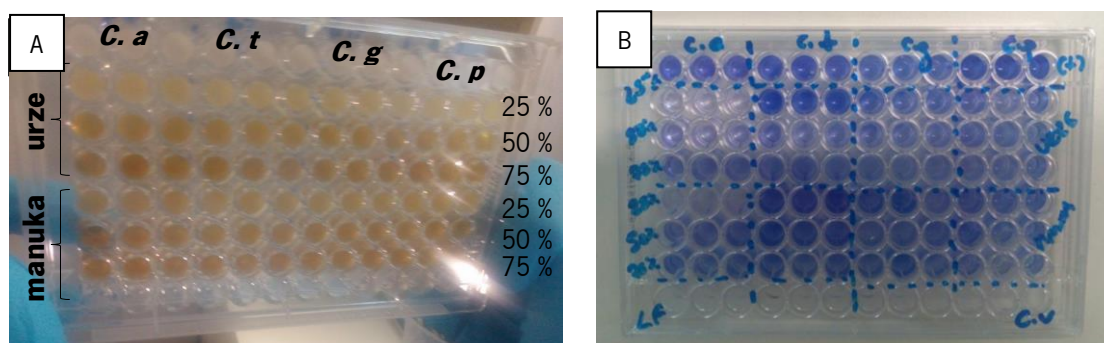
Comparando os resultados obtidos de CMI e CMF dos dois méis estudados neste trabalho para as quatro espécies de *Candida*, verificou-se que a *C. tropicalis* é espécie mais suscetível ao mel, apresentando-se o mel urze com os melhores resultados. No entanto, a importância dos valores das CMI e das CMF para qualquer agente terapêutico potencial quer seja antibacteriano ou antifúngico é altamente questionável, uma vez que a maioria das bactérias e fungos demonstram a capacidade de formar biofilmes e a concentração de erradicação do biofilme geralmente é de 10 a 1000 vezes superior em relação a CMI para a mesma estirpe<sup>36,37</sup>.

### **3.2 Avaliação do efeito antifúngico do mel em biofilmes de *Candida***

A organização das células em biofilme oferece uma maior resistência a antifúngicos em comparação com células em crescimento planctônico, pelo que se torna fulcral o estudo do efeito terapêutico do mel em biofilmes de *Candida*, nomeadamente *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Esta avaliação realizou-se a partir da quantificação da biomassa total, pelo método do CV e da avaliação da viabilidade celular pela contagem de UFC. O ensaio de coloração com CV é uma metodologia rápida que permite verificar e quantificar a formação do biofilme, enquanto o método de contagem UFC é mais preciso e permite a determinação de células viáveis no biofilme<sup>155</sup>.

#### **3.2.1 Quantificação da biomassa total do biofilme**

Neste ensaio, a formação do biofilme e respetiva redução foi medida usando o corante CV. A facilidade, o baixo custo e flexibilidade do ensaio em microplacas tornaram-no numa ferramenta útil para o estudo de biofilmes<sup>155</sup>. Assim, de acordo com os resultados visuais obtidos por observação da microplaca antes e depois da coloração com CV foi evidente a formação de biofilmes em todas as espécies estudadas (Figura 3.2 (A) e (B)).



**Figura 3.2** Imagens obtidas da quantificação da biomassa total pelo método de coloração com CV em biofilmes de 24 h de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* após tratamento com mel manuka e mel urze nas concentrações 25 % (v/v), 50 % (v/v) e 75 % (v/v) (A) antes da aplicação do corante e (B) após aplicação do corante CV.

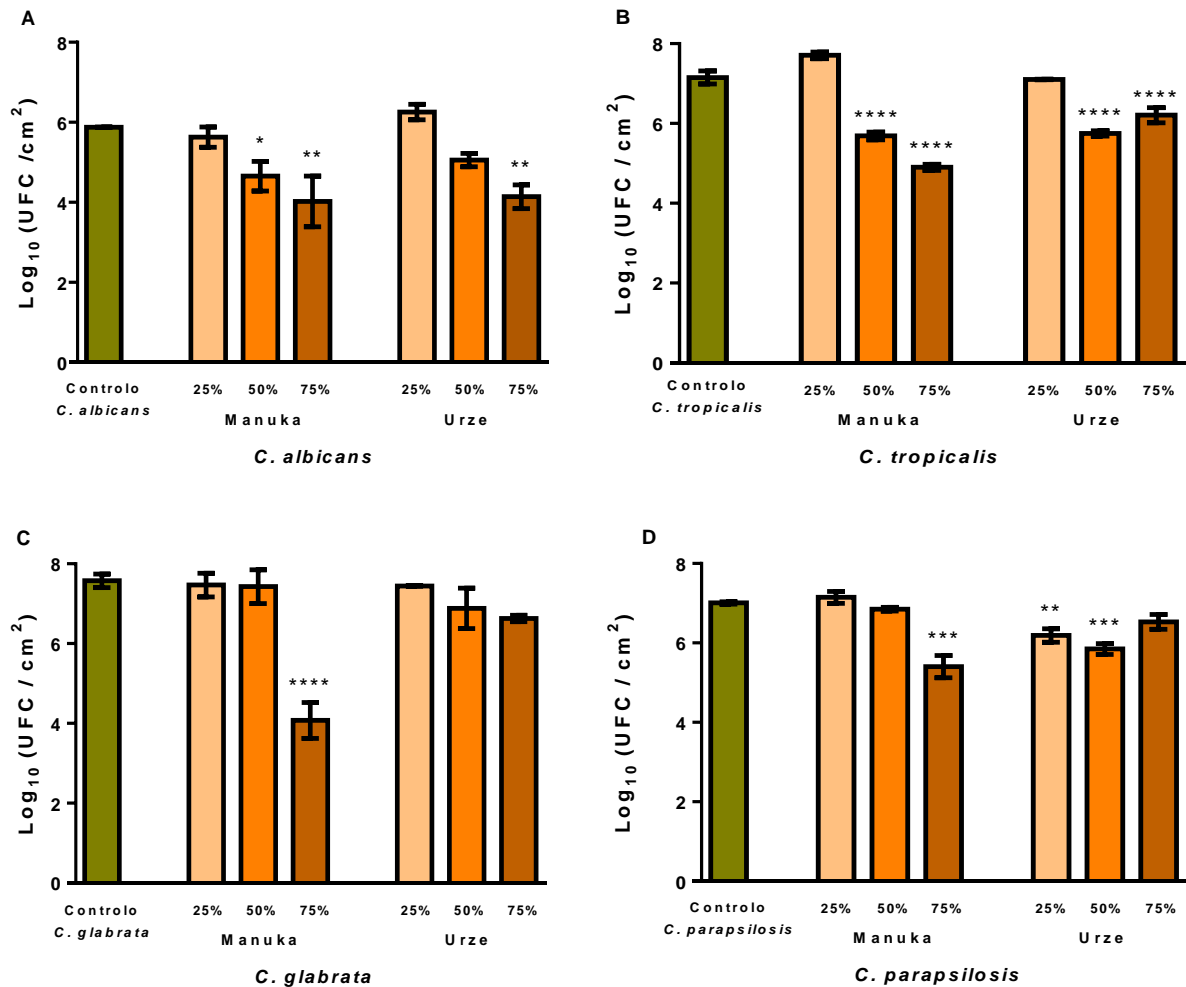
Em geral, constatou-se que o mel urze permitiu uma maior redução do biofilme em comparação com o mel manuka (Figura 3.2 (B)). Na espécie *C. tropicalis* é perceptível a redução gradual da biomassa da concentração 25 % (v/v) para 75 % (v/v) em ambos os méis (Figura 3.2 (B)). No entanto, nas restantes espécies, principalmente em *C. glabrata* e *C. parapsilosis* a coloração dos poços é semelhante em todas as concentrações, o que não permite uma conclusão (Figura 3.2 (B)), apesar da análise da microplaca antes da aplicação do corante demonstrar também uma redução crescente de 25 % (v/v) para 75 % (v/v) (Figura 2.2 (A)). Relativamente a *C. albicans* verificou-se que apenas com 25 % (v/v) de mel apresentava uma coloração bastante reduzida, isto é existiu uma redução quase total do biofilme, o que está de acordo com um estudo realizado por Ansari *et al.*<sup>151</sup>, em *C. albicans*, aquando biofilmes de 24 h foram tratados com diferentes concentrações de mel de jujube (entre 5-80 % (v/v)). No estudo em questão a biomassa de *C. albicans* foi significativamente reduzida após 24 h de contato com concentrações de mel superiores a 10 % (v/v). Apesar disso, as restantes concentrações 50 % (v/v) e 75 % (v/v) exibiram alguma coloração (Figura 3.2 (B)), o que significa que nestas concentrações apresentava mais biofilme em comparação com 25 % (v/v), facto que pode estar relacionado com a viscosidade do mel, uma vez que o mel na concentração de 75 % (v/v) é muito concentrado e a cor resultante na coloração com CV pode resultar da fixação do mel em vez da biomassa resultante, podendo deste modo levar a conclusões equivocadas da atuação do mel nas diferentes espécies. Portanto, a quantificação da biomassa total pelo método CV no estudo do mel não é indicado.

### 3.2.2 Determinação da viabilidade celular

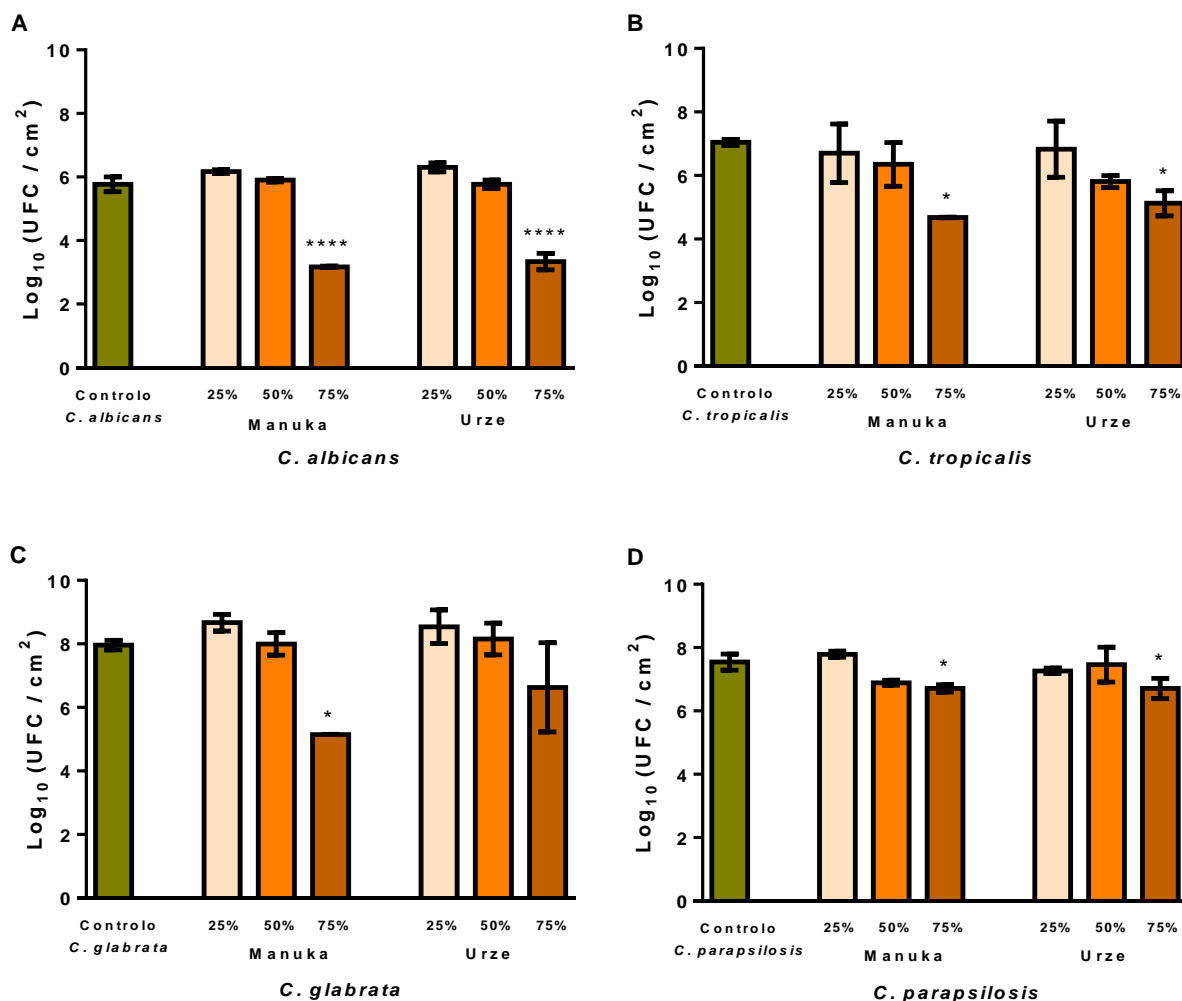
Para uma avaliação mais exata do efeito antimicrobiano do mel urze e do mel manuka em biofilmes de 24 h e 48 h (biofilmes maduros) de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*,



foi realizada a quantificação de células viáveis pela contagem de UFC por unidade de área. Analisando os resultados expressos em  $\text{Log}_{10}$  (UFC/  $\text{cm}^2$ ), de um modo geral verifica-se que ambos os méis na concentração de 25 % (v/v) não exercem efeito antifúngico em biofilmes de 24 h (Figura 3.3) ou 48 h (Figura 3.4) das espécies de *Candida* estudadas. Além disso, em alguns casos, exerce o efeito oposto, ocorrendo um aumento de células viáveis, como por exemplo nos biofilmes de *C. albicans* ou de *C. tropicalis* (Figuras 3.3 e 3.4).



**Figura 3.3** Avaliação da suscetibilidade de biofilmes de 24 h de (A) *C. albicans*, (B) *C. tropicalis*, (C) *C. glabrata* e (D) *C. parapsilosis* expostos a concentrações de 25 % (v/v), 50 % (v/v) e 75 % (v/v) de mel manuka e urze, pela quantificação do número de colônias formadas por área do poço da microplaca ( $\text{Log}_{10}$  UFC/ $\text{cm}^2$ ). As barras de erro indicam o respetivo desvio padrão. \*Concentração para a qual o valor de UFC / $\text{cm}^2$  é estatisticamente diferente em relação ao respetivo controlo (\*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* correspondentes a  $p < 0,1$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respetivamente).



**Figura 3.4** Avaliação da suscetibilidade de biofilmes de 48 h de (A) *C. albicans*, (B) *C. tropicalis*, (C) *C. glabrata* e (D) *C. parapsilosis* expostos a concentrações de 25 % (v/v), 50 % (v/v) e 75 % (v/v) de mel manuka e urze, pela quantificação do número de colónias formadas por área do poço da microplaca (Log UFC/cm<sup>2</sup>). As barras de erro indicam o respetivo desvio padrão. \*Concentração para a qual o valor de UFC/cm<sup>2</sup> é estatisticamente diferente em relação ao respetivo controlo (\*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* correspondentes a p <0,1, p <0,01, p <0,001 e p <0,0001, respetivamente).

A partir de uma análise detalhada dos resultados obtidos para biofilmes de 24 h (Figura 3.3), constatou-se que na estirpe *C. albicans* ocorreu uma redução significativa do biofilme, em relação ao controlo, após tratamento com mel manuka nas concentrações de 50 % (v/v) (p <0,1) e 75 % (v/v) (p <0,01), e com mel urze na concentração de 50 % (v/v) (p <0,01). De facto, ocorreu uma redução de, aproximadamente, 1 Log<sub>10</sub> (UFC/cm<sup>2</sup>) com concentração de 50 % (v/v) de mel manuka e, de aproximadamente 2 Log<sub>10</sub> (UFC/cm<sup>2</sup>) com a concentração de 75 % (v/v) com ambos os méis (Figura 3.3 (A)). Em relação aos biofilmes de *C. tropicalis*, apresentam reduções significativas em relação ao controlo em ambos os méis com as concentrações de 50 % (v/v) e 75 % (v/v) (p <0,0001). Efetivamente os dois méis induziram uma redução de 1,5 Log<sub>10</sub> (UFC/cm<sup>2</sup>), aproximadamente, com a concentração de 50 % (v/v) e, com o mel manuka na concentração de 75 % (v/v) uma redução de

aproximadamente 2 Log<sub>10</sub> (UFC/cm<sup>2</sup>) (Figura 3.3 (B)). Relativamente a espécie *C. glabrata* apenas se verificou uma redução significativa em relação ao controlo com 75 % (v/v) de mel manuka (p <0,0001), mais concretamente de 3,5 Log<sub>10</sub> (UFC/cm<sup>2</sup>). No entanto, o mel urze não demonstrou atividade antifúngica contra esta espécie (Figura 3.3 (C)). Por último, na análise do gráfico referente a *C. parapsilosis*, verificou-se que à semelhança com os biofilmes de *C. glabrata*, o mel manuka apenas apresentou uma redução significativa, de 1,5 Log<sub>10</sub> (UFC/cm<sup>2</sup>) aproximadamente, em relação ao controlo com concentração de 75 % (v/v) (p <0,001). Por outro lado, o mel urze apresentou reduções significativas em relação ao controlo nas concentrações de 25 % (v/v) (p <0,01) e 50 % (v/v) (p <0,001), de 1 Log<sub>10</sub> (UFC/cm<sup>2</sup>) e 1,5 Log<sub>10</sub> (UFC/cm<sup>2</sup>), respetivamente (Figura 3.3 (D)).

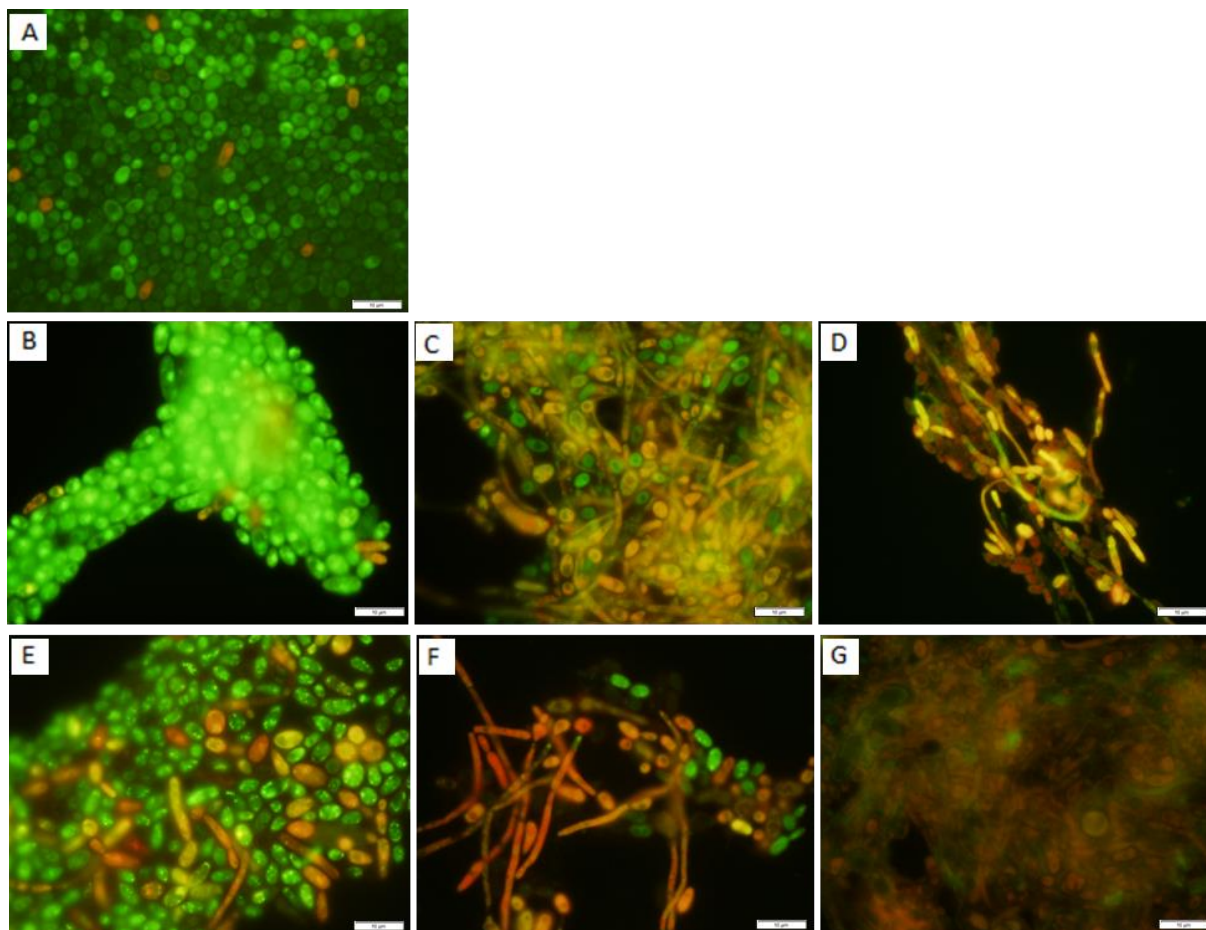
Relativamente a biofilmes de 48 h, obtiveram-se resultados semelhantes para ambos os méis e apenas ocorreu redução significativa em relação ao controlo com 75 % (v/v) de mel em todas as estirpes estudadas (Figura 3.4). Em relação à espécie *C. albicans*, obteve-se uma redução significativa em relação ao controlo de 3 Log<sub>10</sub> (UFC/cm<sup>2</sup>) (p <0,0001) com mel manuka e com mel urze (Figura 3.4 (A)). No caso de biofilmes de *C. tropicalis* obteve-se uma redução significativa em relação ao controlo de aproximadamente de 2 Log<sub>10</sub> (UFC/cm<sup>2</sup>) (p <0,1) nos dois méis (Figura 3.4 (B)). Relativamente à estirpe *C. glabrata* apenas se obteve uma redução significativa em relação ao controlo com mel manuka (p <0,01), de aproximadamente de 2,5 Log<sub>10</sub> (UFC/cm<sup>2</sup>) (Figura 2.4 (C)), semelhante ao ocorrido em biofilmes de 24 h (Figura 3.3 (C)). Nos biofilmes de *C. parapsilosis* (Figura 3.4 (D)), verificou-se que ocorreu redução significativa em relação ao controlo de 1 Log<sub>10</sub> (UFC/cm<sup>2</sup>) (p <0,1), aproximadamente, com mel urze e mel manuka. Os resultados obtidos e descritos sugerem que tanto o mel manuka como o mel urze exercem efeito antifúngico superior em biofilmes de 24 h comparativamente aos biofilmes maduros (48 h).

Ao avaliar o efeito antifúngico do mel dependente do tempo e da concentração em biofilmes de 24 e 48 h, constatou-se que o efeito antifúngico do mel é dose-dependente, ou seja, em geral as concentrações de mel mais eficientes na redução de biofilmes é 50 % (v/v) ou 75 % (v/v). No entanto, verificou-se que apenas 25 % (v/v) de mel induz um aumento de células viáveis no biofilme, possivelmente como o mel está bastante diluído as células aproveitam a baixa concentração de açúcar presente no mel promovendo o seu crescimento, enquanto concentrações superiores de açúcar tornam-se tóxicas, visto que o mel possui cerca de 70 % (v/v) de açúcar na sua constituição<sup>156</sup>. De facto, foi reconhecido que altas concentrações de açúcar provocam condições hipertónicas que levam à lise das paredes das células microbianas<sup>157</sup>. No entanto, um estudo realizado por Nassar, Li e Gregory<sup>158</sup>, indica que o teor de açúcar pode não ser o único fator decisivo para a propriedade

antimicrobiana do mel. Além disso, de acordo com Ansari *et al.*<sup>151</sup>, a diluição do mel até certo ponto torna os ingredientes antimicrobianos ativos no mel ineficazes. O mecanismo do efeito antifúngico do mel ainda não é totalmente compreendido, neste sentido têm sido propostas várias hipóteses potenciais<sup>151</sup>. Tais como a presença do composto MGO, um agente antimicrobiano efetivo contra células em estado planctônico e em biofilme<sup>159</sup>. No entanto, neste estudo obteve-se resultados semelhantes para ambos os méis apesar da diferença nas concentrações de MGO, de 2092,4 mg/kg e 756,5 mg/kg no mel urze e manuka, respectivamente (Tabela 2.3). Outro mecanismo proposto é a presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, um potente agente antimicrobiano que é produzido no mel pela enzima glucose oxidase<sup>160</sup>. O efeito antifúngico de alguns méis, especialmente de favos de mel mais escuros, que contém própolis, pode ocorrer devido à presença de ácidos aromáticos, além disso, pode haver proteínas especiais no mel que tenham atividade antifúngica<sup>161</sup>. No entanto, não é possível quantificar a contribuição dos diferentes fatores para a atividade antimicrobiana do mel, uma vez que esses fatores podem ter atividade redundante, serem mutuamente dependentes ou ter atividade aditiva ou sinérgica dependendo das espécies microbianas<sup>162</sup>.

Diversos estudos demonstraram que diferentes amostras de mel diferem do grau de atividade antibacteriana<sup>154</sup>. Portanto, a sensibilidade da *Candida* ao mel não pode ser comparada com os resultados de estudos realizados, pois os méis utilizados neste estudo podem ter diferente atividade antimicrobiana como referido por Mulu *et al.*<sup>154</sup>. Porém, a sensibilidade das espécies entre si pode ser validamente determinada num único estudo com as mesmas condições e o mesmo mel testado<sup>154</sup>. Assim, por comparação dos gráficos obtidos para as quatro espécies estudadas, foi possível verificar que a espécie que apresentou reduções mais significativas, isto é, mais suscetível aos méis testados foi a *C. tropicalis*. Portanto, é relevante um estudo mais centrado nesta espécie, além de que estudos demonstraram que *C. tropicalis* é a espécie mais persistente, levando a períodos de recuperação superiores em caso de infecção, o que pode implicar maior virulência e resistência aos antifúngicos quando comparada com outras estirpes de *Candida*<sup>16,17,18,20</sup>. Posto isto, o tratamento com base em produtos naturais, como o mel, pode diminuir a resistência verificada atualmente.

Para uma melhor compreensão das alterações ocorridas nos biofilmes de *C. tropicalis*, após aplicação de mel, estes foram corados e observados no microscópio de fluorescência (Figura 3.5).



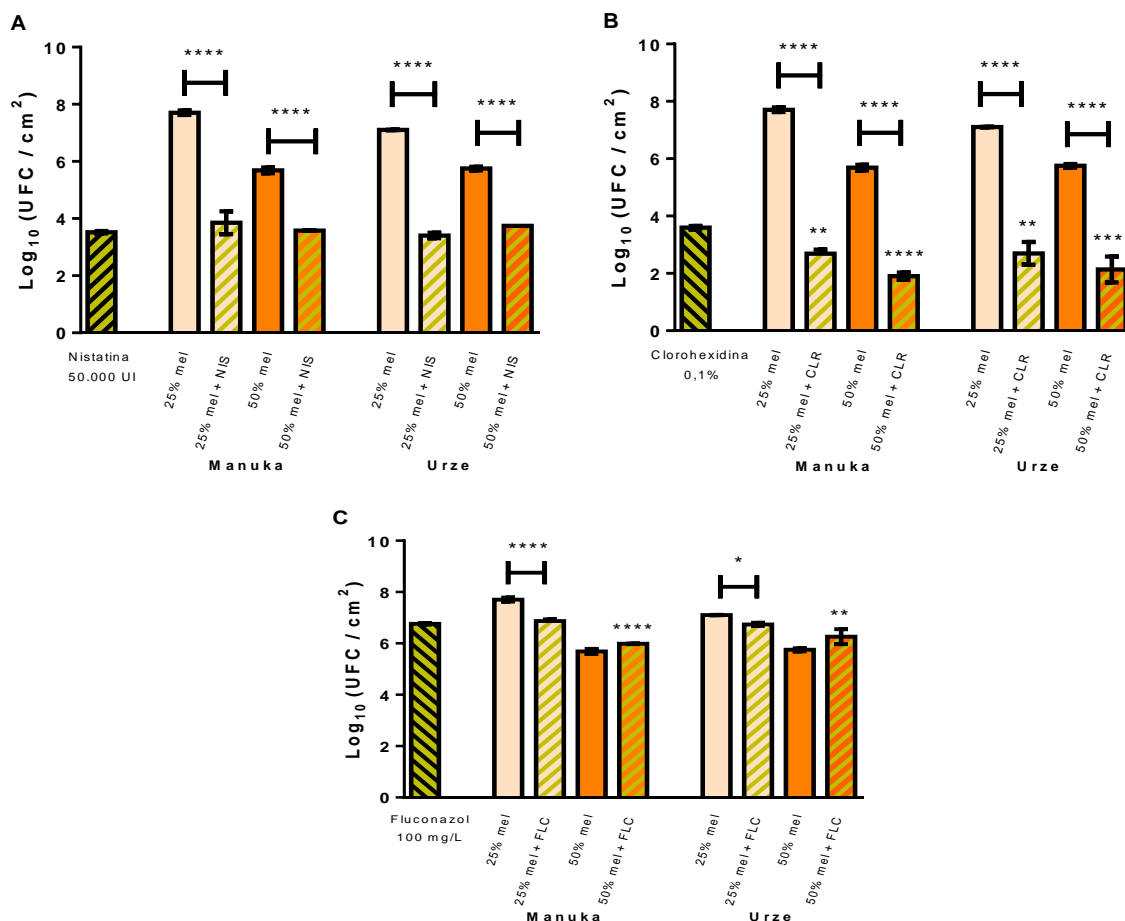
**Figura 3.5** Imagens de microscopia de fluorescência de biofilmes pré-formados de 24 h de *C. tropicalis* (A) na ausência de mel (B) tratado com 25 % (v/v) de mel manuka, (C) tratado com 50 % (v/v) de mel manuka, (D) tratado com 75 % (v/v) de mel manuka, (E) tratado com 25 % (v/v) de mel urze, (F) tratado com 50 % (v/v) de mel urze e (G) tratado com 75 % (v/v) de mel urze. Células coradas de verde correspondem a células viáveis e células coradas de vermelho a células não viáveis. A barra representa 10 µm.

Por comparação da imagem referente ao biofilme sem tratamento (Figura 3.5 (A)) com as imagens após terapia com mel, verificou-se um aumento do número de células danificadas (coradas de vermelho) com o aumento da concentração de mel. De facto, é notória a diferença entre o controlo, onde as células estão maioritariamente viáveis (coradas de verde) e na forma de levedura (Figura 3.5 (A)) e as imagens referentes as concentrações de 50 % (v/v) e 75 % (v/v) dos dois méis, onde as células se encontram comprometidas e na forma de hifas (Figura 3.5 (C), (D), (F) e (G)). Desta forma, foi possível observar que as células *de C. tropicalis* em situações de *stress* formam hifas como modo de proteção, quanto maior a concentração de mel maior é a percentagem de células na forma de hifa. Facto que se encontra de acordo com um estudo realizado por Chen *et al.*<sup>163</sup>, em *C. tropicalis*, onde demonstraram que a calcineurina controla o crescimento de hifas em resposta à falta da fonte de carbono, a virulência e a tolerância ao fármaco. Por outro lado, com 25 % (v/v) de mel confirma-se que praticamente não ocorre alterações no biofilme, continuando na forma de levedura e viável (Figura 3.5

(B) e (E)). As imagens obtidas vão ao encontro dos resultados da contagem de UFC descritos anteriormente para os biofilmes de *C. tropicalis*.

### 3.3 Avaliação da combinação de mel com antifúngicos comerciais em biofilmes de *C. tropicalis*

Após análise do efeito antifúngico do mel manuka e urze nas quatro espécies de *Candida* estudadas verificou-se que a espécie mais suscetível ao mel foi *C. tropicalis*. Neste sentido, aprofundou-se o estudo nesta espécie recorrendo-se a terapia combinacional de modo a potenciar o efeito do mel sobre a mesma. Foi testada a combinação de mel com 3 agentes antifúngicos comerciais distintos, nomeadamente a NIS, CLR e FLC nas concentrações 50 000 UI, 0,1 % (v/v) e 100 mg/L, respetivamente (Figura 3.6).

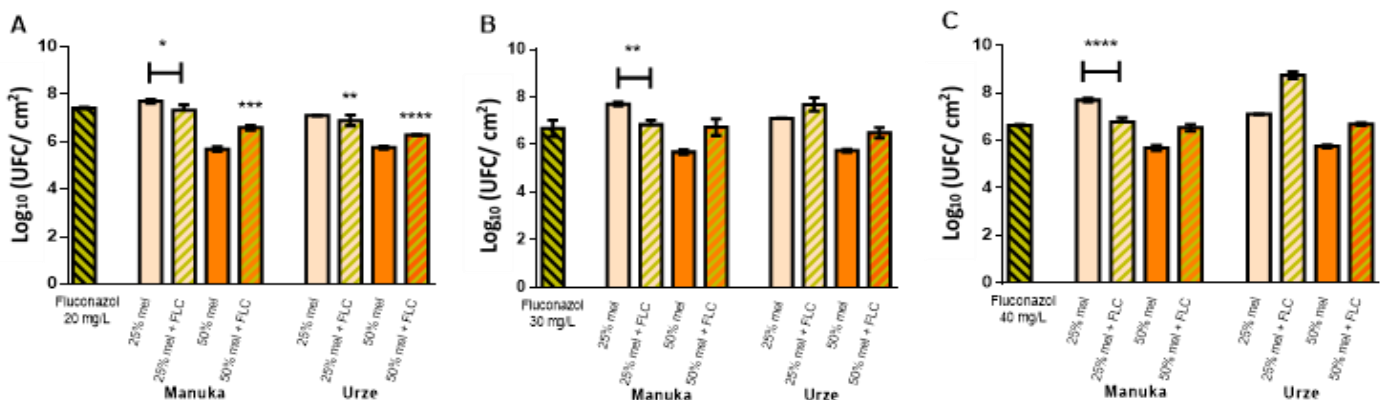


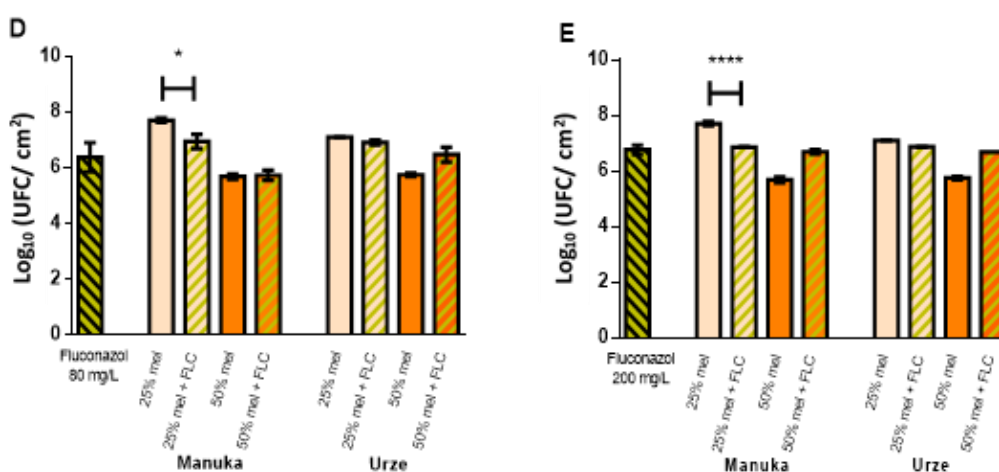
**Figura 3.6** Avaliação da suscetibilidade de biofilmes de 24 h de *C. tropicalis* expostos a concentrações de 25 % (v/v) e 50 % (v/v) de mel manuka e urze e (A) tratamento apenas com NIS (50 000 UI) e a combinação de NIS (50 000 UI) + mel manuka e mel urze nas concentrações de 25 % (v/v) e 50 % (v/v), (B) tratamento apenas com CLR (0,1 %) e a combinação de CLR (0,1 %) + mel manuka e mel urze nas concentrações de 25 % (v/v) e 50 % (v/v), (C) tratamento apenas com FLC (100 mg/L) e a combinação de FLC (100 mg/L) + mel manuka e mel urze nas concentrações de 25 % (v/v) e 50 % (v/v), pela quantificação do número de colónias formadas por área do poço da microplaca (Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>). As barras de erro indicam o respetivo desvio padrão. \*Concentração para a qual o valor de UFC/cm<sup>2</sup> é estatisticamente diferente em relação ao tratamento apenas com o antifúngico, **H** relativo a terapia apenas com mel nas respetivas concentrações (\*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* correspondentes a p < 0,1, p < 0,01, p < 0,001 e p < 0,0001, respetivamente).

No caso da combinação mel + NIS, com mel urze ou manuka, verificaram-se valores semelhantes em ambos os méis. De facto, a combinação do antifúngico com mel na concentração de 25 % (v/v) permitiu uma redução significativa de aproximadamente 3,5 Log<sub>10</sub> (UFC/cm<sup>2</sup>) em relação ao tratamento apenas com mel (p <0,0001). No caso da combinação deste antifúngico com 50 % (v/v) de mel verificou-se também uma redução significativa em relação ao tratamento apenas com mel (p <0,0001), mais concretamente de 2 Log<sub>10</sub> (UFC/cm<sup>2</sup>). Os valores obtidos com esta combinação assemelham-se ao tratamento apenas com NIS na concentração de 50 000 UI (Figura 3.6 (A)).

Relativamente à combinação de mel + CLR, também neste caso verificaram-se resultados semelhantes para ambos os méis de acordo com as concentrações usadas. Isto é, com a concentração de 25 % (v/v), independentemente do mel, ocorreu redução significativa em relação ao tratamento realizado anteriormente (p <0,0001) no valor de, aproximadamente, 6 Log<sub>10</sub> (UFC/cm<sup>2</sup>). Esta combinação apresentou também redução significativa em relação ao tratamento apenas com CLR na concentração 0,1 % (v/v) (p <0,01). Na combinação de 50 % (v/v) de mel com CLR, também se obteve redução significativa em relação ao tratamento apenas com mel (p <0,0001), de aproximadamente 4 Log<sub>10</sub> (UFC/cm<sup>2</sup>), e em relação ao tratamento apenas com CLR na concentração 0,1 % (v/v) (p <0,0001) (Figura 3.6 (B)).

Por último, a combinação de mel + FLC foi testada numa gama de 20-200 mg/L. Comparando os gráficos obtidos para as diferentes concentrações (Figura 3.7), nomeadamente 20, 30, 40, 80, 100 e 200 mg/L, verificou-se que os resultados para as concentrações entre 20-80 mg/L e 200 mg/L se assemelham, apresentado redução significativa do biofilme apenas com 25 % (v/v) de mel manuka, nas restantes condições verificou-se menor redução em comparação com o tratamento apenas com mel. Além disso em alguns casos ocorreu um aumento do biofilme em relação ao tratamento apenas com FLC ou com mel.





**Figura 3.7** Avaliação da suscetibilidade de biofilmes de 24 h de *C. tropicalis* expostos a concentrações de 25 % (v/v) e 50 % (v/v) de mel urze e manuka e tratamento apenas com FLC e a combinação de (A) FLC (20 mg/L), (B) FLC (30 mg/L), (C) FLC (40 mg/L), (D) FLC (80 mg/L), (E) FLC (200 mg/L) + mel manuka e mel urze nas concentrações de 25 % (v/v) e 50 % (v/v), pela quantificação do número de colônias formadas por área do poço da microplaca ( $\text{Log}_{10}$  UFC/ $\text{cm}^2$ ). As barras de erro indicam o respetivo desvio padrão. \*Concentração para a qual o valor de UFC/ $\text{cm}^2$  é estatisticamente diferente em relação ao tratamento apenas com o antifúngico,  $\text{H}$  relativo a terapia apenas com mel nas respetivas concentrações (\*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* correspondentes a  $p < 0,1$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respetivamente).

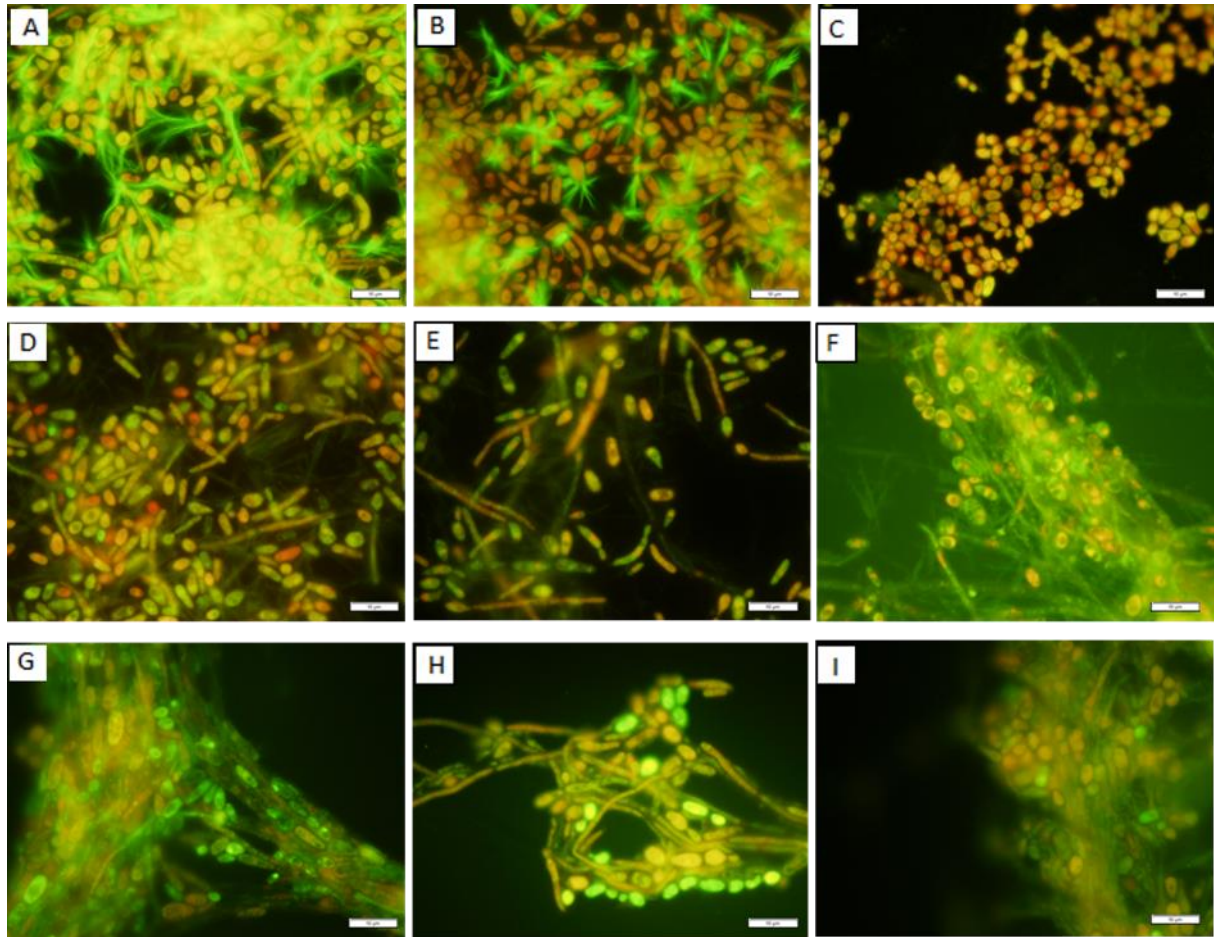
Das 6 concentrações testadas a combinação de mel com 100 mg/L de FLC apresentou ligeiramente melhores resultados (Figura 3.6 (C)). Neste caso, apenas a combinação de 25 % (v/v) de mel manuka e de mel urze com FLC apresentou vantagem relativamente a terapia realizada anteriormente, isto é, com mel manuka ocorreu redução significativa ( $p < 0,0001$ ) no valor de 1  $\text{Log}_{10}$  (UFC/ $\text{cm}^2$ ), e com mel urze de aproximadamente 0,5  $\text{Log}_{10}$  (UFC/ $\text{cm}^2$ ) ( $p < 0,1$ ). Apesar das combinações com 50 % (v/v) de mel manuka e mel urze não apresentarem vantagem relativamente ao tratamento apenas com mel, obteve-se redução significativa quando comparado apenas com o agente antifúngico comercial ( $p < 0,0001$ ) ( $p < 0,01$ ). No entanto, esta espécie demonstrou resistência a este antifúngico, mesmo na combinação com mel e alterando a concentração testada.

Comparando os resultados obtidos nas três combinações efetuadas mel + NIS, mel + CLR e mel + FLC, constatou-se que todas as combinações apresentaram vantagem relativamente ao tratamento apenas com mel ou apenas com o antifúngico, permitindo reduzir a dosagem tipicamente requerida em ambientes clínicos em 50 %, isto é para 50 000 UI, 0,1 % (v/v) e 100 mg/L de NIS, CLR e FLC, respetivamente. Além disso, constata-se ainda que a combinação com CLR, seguida da combinação com NIS, apresentaram os melhores resultados. Estes resultados corroboram com estudo realizado por Hamers *et al.*<sup>164</sup>, onde averiguaram que a CLR é mais eficaz relativamente a NIS ou AmB na eliminação de células aderentes de *C. albicans*. Foi também confirmado por Machado *et al.*<sup>165</sup>, num



estudo *in vitro*, que diversas soluções de CLR foram capazes de reduzir significativamente o número de UFC em biofilme de *Candida*.

Para uma melhor compreensão do efeito antifúngico das diferentes combinações foi realizada microscopia de fluorescência (Figura 3.8).



**Figura 3.8** Imagens de microscopia de fluorescência de biofilmes de 24 h de *C. tropicalis* (A) após tratamento com CLR (B) após terapia combinacional de CLR e 25 % (v/v) de mel manuka, (C) após terapia combinacional de CLR e 25 % (v/v) de mel urze, (D) após tratamento com NIS (E) após terapia combinacional de NIS e 25 % (v/v) de mel manuka, (F) após terapia combinacional de NIS e 25 % (v/v) de mel urze, (G) após tratamento com FLC, (H) após terapia combinacional de FLC e 25 % (v/v) de mel manuka, (I) após terapia combinacional de FLC e 25 % (v/v) de mel urze. Células coradas de verde correspondem a células viáveis e células coradas de vermelho a células não viáveis. A barra representa 10  $\mu\text{m}$ .

Em relação a combinação de mel + CLR, através das imagens obtidas por microscopia foi possível verificar a diferença a nível de células comprometidas entre o tratamento apenas com CLR (Figura 3.8 (A)) e a combinação com mel na concentração de 25 % (v/v) de mel manuka (Figura 3.8 (B)) e 25 % (v/v) de mel urze (Figura 3.8 (C)). Nestas últimas condições o biofilme já se encontra bastante comprometido, no entanto ao contrário do ocorrido no tratamento apenas com mel (Figura 3.5) não formou hifas em situação de *stress*, o que pode estar relacionado com o seu modo de ação. A CLR atua ligando-se a superfície da membrana e, quando utilizada em baixas concentrações, forma

poros na mesma alterando a sua permeabilidade, por outro lado em concentrações mais elevadas a solução penetra na célula e conduz à destruição do microrganismo<sup>166</sup>. De acordo com MacNeil *et al.*<sup>167</sup>, a exposição de *Candida* a CLR resulta na perda da integridade estrutural, diminuição da capacidade de adesão e fragmentação da parede celular. Além disso, outros estudos demonstraram a coagulação de nucleoproteínas e alterações da parede celular, permitindo a possível fuga de componentes citoplasmáticos em espécies de *Candida*<sup>68</sup>.

A combinação de mel + NIS também foi observada por microscopia de fluorescência. Neste caso, comparando as imagens referentes ao tratamento apenas com NIS (Figura 3.8 (D)), onde as células começam a formar hifas, com as imagens relativas a terapia combinacional de mel manuka (Figura 3.8 (E)) e mel urze (Figura 3.8 (F)) na concentração de 25 % (v/v), verifica-se que nestas condições o biofilme já se encontra bastante comprometido e existe uma maior percentagem de células em forma de hifas à semelhança do ocorrido quando tratado apenas com mel e o oposto do tratamento com CLR. Tais resultados, parecem fazer sentido, uma vez que o modo de ação de NIS difere deste último. A NIS sendo um polieno, atua inibindo a biossíntese do ergosterol na membrana celular fúngica<sup>169</sup>. Além disso, após breve exposição ao medicamento, demonstrou ser capaz de perturbar a formação do tubo germinativo, modular a hidrofobicidade relativa da superfície celular e inibir a atividade proteolítica de *Candida*<sup>170,171,172</sup>. No entanto, a eficácia terapêutica da suspensão oral encontra-se comprometida devido a diversos fatores, tais como a administração tópica descontínua, a diluição provocada pela saliva e a ação de limpeza da musculatura oral, que tendem a reduzir a disponibilidade de NIS abaixo da concentração terapêutica efetiva, essencialmente durante os intervalos de dosagem<sup>172</sup>. Neste sentido, a combinação de mel + NIS, além de reduzir a concentração requerida clinicamente pode reduzir as desvantagens descritas, uma vez que o mel é um produto viscoso, o que pode retardar a diluição e limpeza da musculatura oral.

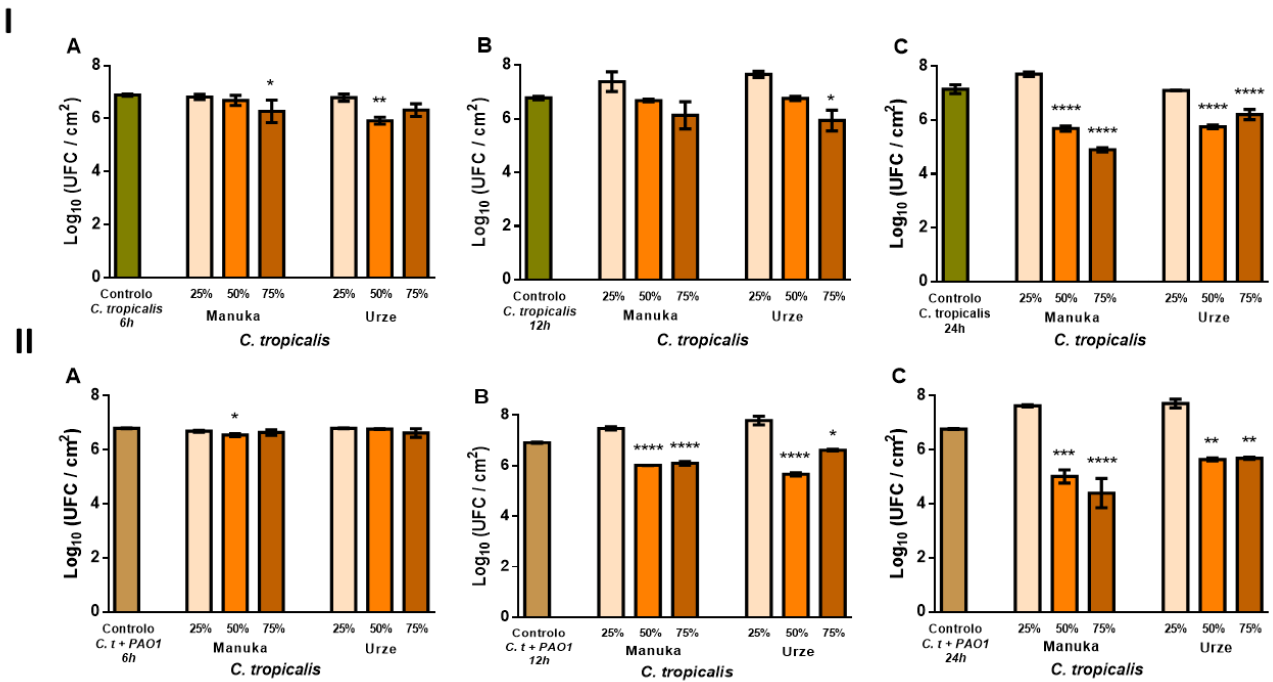
Relativamente a combinação de mel + FLC, através das imagens de microscopia de fluorescência é possível verificar a resistência constatada pelos resultados de UFC descritos anteriormente, uma vez que o biofilme ainda se encontra com células viáveis (coradas de verde), tanto nas imagens relativas ao tratamento apenas com FLC (Figura 3.8 (G)) como nas imagens referentes a combinação com mel manuka (Figura 3.8 (H)) e com mel urze (Figura 3.8 (I)) nas concentrações de 25 % (v/v), apesar disso os biofilmes apresentam hifas.

Num estudo realizado por Barchiesi *et al.*<sup>173</sup>, foi avaliado, *in vitro*, o desenvolvimento de resistência ao FLC em *C. tropicalis* ATCC 750. Neste estudo, os autores concluíram que a aquisição de resistência aos azóis ocorre muito rapidamente, assim como os genes transportadores multidrogas de

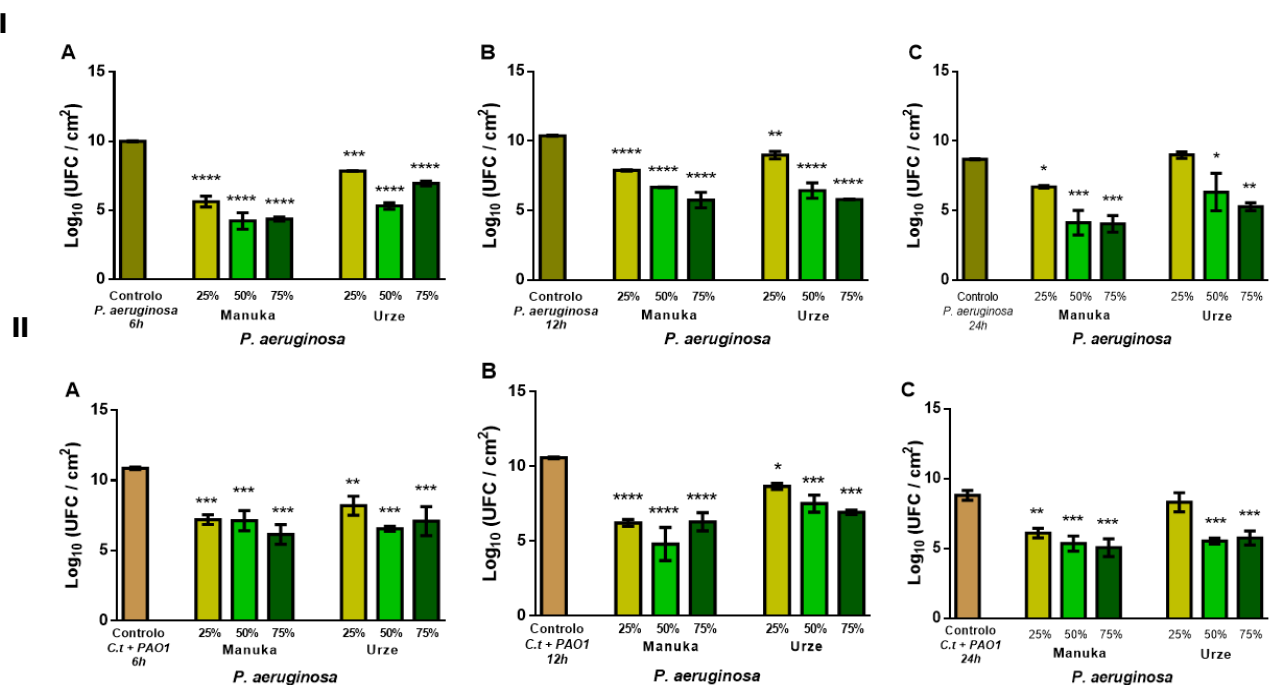
duas famílias diferentes, os transportadores ABC e os MFS, são regulados positivamente nos fenótipos resistentes, indicando que um dos mecanismos de resistência nesta estirpe é possivelmente o efluxo da droga da célula. Além disso quando exposta a concentrações crescentes do fármaco pode haver risco de resistência ao FLC devido ao aumento da regulação desses transportadores, o que se verificou no presente estudo quando a concentração foi aumentada para 200 mg/L (Figura 3.7 (E)).

### **3.4 Avaliação do efeito do mel em biofilmes mistos de *C. tropicalis* e *P. aeruginosa***

Apesar de cada espécie possuir características únicas e de reagir de um modo próprio na presença do mel, como se verificou anteriormente, na natureza os biofilmes são constituídos por mais do que uma espécie microbiana, o que lhe altera o seu comportamento e lhe confere uma maior resistência<sup>46</sup>. Nesta, perspectiva como o presente estudo se centrou em *C. tropicalis* é fundamental perceber como esta espécie se comporta na presença de outras espécies, como por exemplo *P. aeruginosa*. De facto, estes dois microrganismos têm tendência para formar biofilmes polimicrobianos, o que os torna muitas vezes responsáveis por infeções nosocomiais, em indivíduos imunocomprometidos<sup>50,51</sup>. Portanto, numa perspectiva clínica é importante averiguar o efeito antifúngico/ antibacteriano do mel em biofilmes mistos. Para tal, realizou-se a avaliação do efeito antimicrobiano do mel urze e do mel manuka em biofilmes mistos (24h) de *C. tropicalis* e *P. aeruginosa* pela quantificação de células viáveis pela contagem de UFC por unidade de área, determinando-se a concentração de células vivas em Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>. Neste caso, em particular, foi realizada uma monitorização do efeito dos dois méis ao longo de 24 h, entre intervalos de 6, 12 e 24 h. Além disso foram realizados, em simultâneo, dois controlos nas mesmas condições, compostos por biofilmes simples de *C. tropicalis* e *P. aeruginosa*, a partir dos quais se pode estabelecer uma comparação que permite analisar as diferenças ocorridas a nível da redução de *C. tropicalis* (Figura 3.9) e/ou de *P. aeruginosa* (Figura 3.10).



**Figura 3.9** Avaliação da suscetibilidade após tratamento com mel urze e manuka nas concentrações 25 % (v/v), 50 % (v/v) e 75 % (v/v) de (I) biofilmes de *C. tropicalis* e de (II) biofilmes mistos relativos a *C. tropicalis*, (A) após 6 h de tratamento (B) após 12 h de tratamento, (C) após 24 h de tratamento, pela quantificação do número de colônias formadas por área do poço da microplaca ( $\text{Log}_{10}$  UFC/ $\text{cm}^2$ ). As barras de erro indicam o respectivo desvio padrão. \*Concentração para a qual o valor de UFC/ $\text{cm}^2$  é estatisticamente diferente em relação ao respectivo controle (\*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* correspondentes a  $p < 0,1$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respetivamente).



**Figura 3.10** Avaliação da suscetibilidade após tratamento com mel urze e manuka nas concentrações 25 % (v/v), 50 % (v/v) e 75 % (v/v) de (I) biofilmes de *P. aeruginosa* e de (II) biofilmes mistos relativos a *P. aeruginosa*, (A) após 6 h de tratamento (B) após 12 h de tratamento, (C) após 24 h de tratamento, pela quantificação do número de colônias formadas por área do poço da microplaca ( $\text{Log}_{10}$  UFC/ $\text{cm}^2$ ). As barras de erro indicam o respectivo desvio padrão. \*Concentração para a qual o valor de UFC/ $\text{cm}^2$  é estatisticamente diferente em relação ao respectivo controle (\*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* correspondentes a  $p < 0,1$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respetivamente).

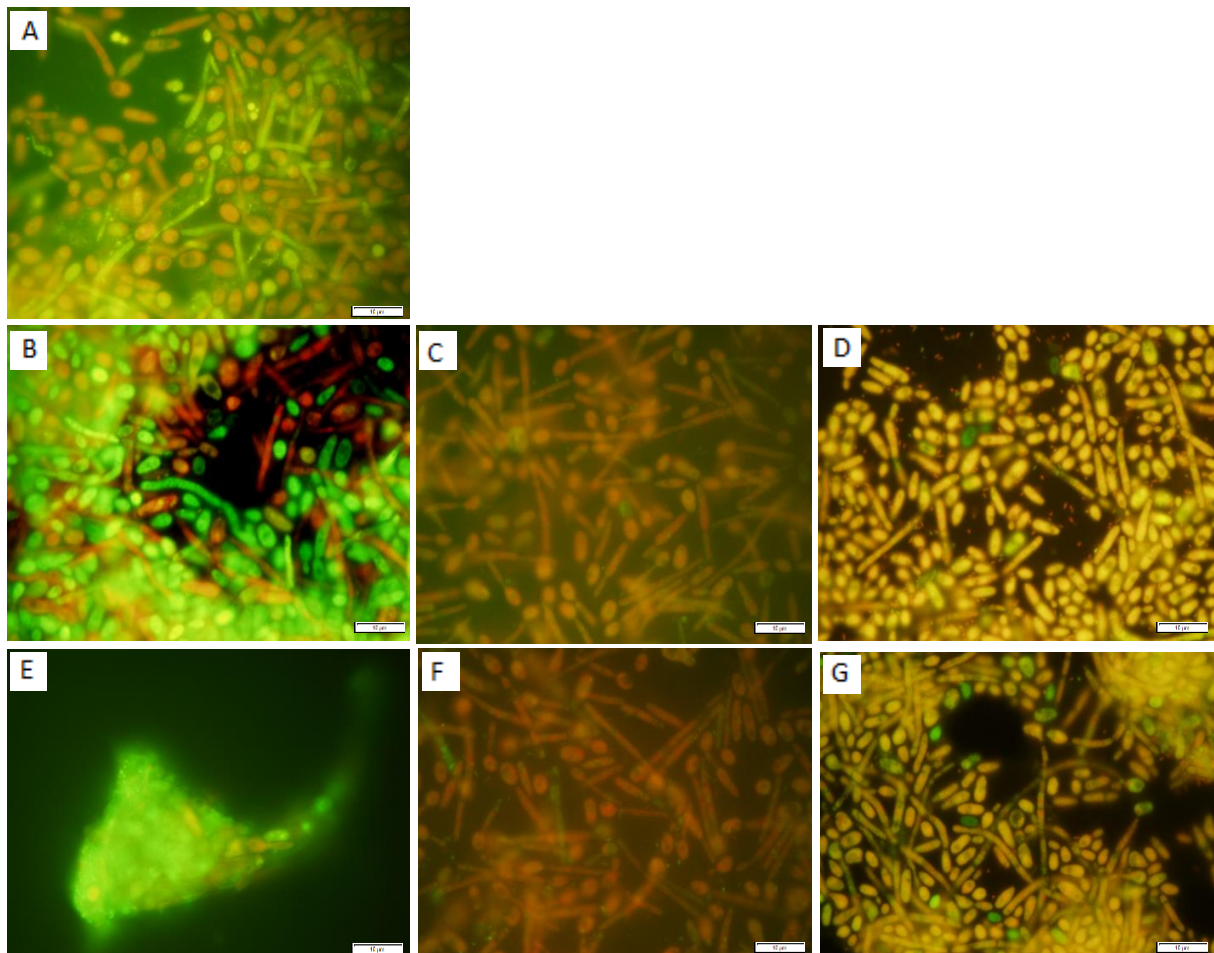
Assim, relativamente à espécie fúngica verificou-se que após 6 h de tratamento os biofilmes simples e mistos se mantiveram constantes (Figura 3.9 (I/II-A)), a partir das 12 h obtiveram-se reduções significativas em *C. tropicalis* nos biofilmes mistos com mel manuka na concentração de 50 % (v/v) ( $p < 0,0001$ ) e 75 % (v/v) ( $p < 0,0001$ ) e com mel urze na concentração de 50 % (v/v) ( $p < 0,0001$ ) e 75 % (v/v) ( $p < 0,1$ ) (Figura 3.9 (II-B)). Apesar disso, em biofilmes simples apenas ocorreu redução significativa com 75 % (v/v) de mel urze ( $p < 0,1$ ) (Figura 3.9 (I-B)). Estes resultados poderão demonstrar, deste modo, que o mel poderá exercer um efeito redutor mais rápido nos biofilmes mistos. Após 24 h de tratamento, com o produto natural, verificou-se que o mel manuka tem efeito semelhante em biofilmes mistos e simples, obtendo-se uma redução significativa superior com 75 % (v/v) de mel ( $p < 0,0001$ ), no valor de  $2 \text{ Log}_{10}$  (UFC/cm<sup>2</sup>), aproximadamente (Figura 3.9 (I/II-C)). No caso do mel urze, os resultados demonstraram valores idênticos entre as concentrações 50 % (v/v) e 75 % (v/v), tendo-se registado uma redução significativa superior em biofilmes simples ( $p < 0,0001$ ) (Figura 3.9 (I-C)), em comparação com biofilmes mistos ( $p < 0,001$ ), com a redução no valor de, aproximadamente,  $1 \text{ Log}_{10}$  (UFC/cm<sup>2</sup>) (Figura 3.9 (II-C)). Estes dados sugerem que, após 24 h de tratamento, o mel manuka exerce o mesmo efeito antifúngico na presença ou ausência da *P. aeruginosa*, e que o mel urze exerce um efeito ligeiramente superior em biofilmes simples de *C. tropicalis*.

Em relação aos resultados obtidos para os biofilmes de *P. aeruginosa* constatou-se que às 6 h já apresentava reduções significativas após o tratamento com ambos os méis nas concentrações testadas. Neste período de tempo o mel manuka permitiu redução do biofilme simples para metade ( $p < 0,0001$ ) e o mel urze conseguiu reduzir em média  $2-3 \text{ Log}_{10}$  (UFC/cm<sup>2</sup>) (Figura 3.10 (I-A)). Em biofilmes mistos também se verificou redução significativa mas não foi tão acentuada como nos biofilmes simples ( $p < 0,001$ ) (Figura 3.10 (II-A)). Com os resultados obtidos pode constatar-se, assim, que o mel apresenta um efeito antibacteriano mais rápido e superior em comparação com os resultados obtidos para *C. tropicalis*. Verificou-se, ainda, que se obtiveram resultados semelhantes para os biofilmes simples e mistos como se constatou para *C. tropicalis*. Resumidamente ocorreram reduções significativas em relação ao controlo com os dois méis, sendo que o mel manuka apresentou melhores resultados, de facto foi capaz de reduzir  $4$  e  $3 \text{ Log}_{10}$  (UFC/cm<sup>2</sup>) nas concentrações de 50 % (v/v) e 75 % (v/v) ( $p < 0,001$ ) em biofilmes simples (Figura 3.10 (I-C)) e mistos (Figura 3.10 (II-C)), respetivamente.

Em suma, após 24 h de tratamento verificou-se que o mel permite a redução do biofilme relativo às duas espécies, o que torna o mel numa terapia bastante promissora para o tratamento de infeções polimicrobianas de *C. tropicalis* e *P. aeruginosa*, uma vez que existem poucos tratamentos que

apresentam a capacidade de reduzir mais que uma espécie em simultâneo. Além disso, a interação entre *C. tropicalis* e *P. aeruginosa* não interferiu no efeito antimicrobiano do mel, verificando-se resultados semelhantes entre biofilmes simples e mistos. Comparando os dois méis testados constatou-se que o mel manuka apresenta efetivamente um efeito superior, permitindo uma maior redução na espécie bacteriana. De acordo com a literatura o mel possui atividade antibacteriana de amplo espectro. No entanto, diferentes méis variam substancialmente na potência de sua atividade antibacteriana<sup>174</sup>. Relativamente ao efeito do mel manuka em bactérias, um estudo levado a cabo por Roberts, Moddocks e Cooper<sup>175</sup> observaram que o mel atua inibindo a flagelação das bactérias, o que limita a sua mobilidade e impede a formação de biofilmes.

De modo a tentar perceber melhor a interação entre *C. tropicalis* e *P. aeruginosa* e o efeito do mel nestas duas espécies em conjunto foi realizada microscopia de fluorescência (Figura 3.11).



**Figura 3.11** Imagens de microscopia de fluorescência de biofilmes de 24 h de *C. tropicalis* e *P. aeruginosa* após 24 h (A) sem tratamento, após tratamento com (B) 25 % (v/v) de mel manuka (C) 50 % (v/v) de mel manuka, (D) 75 % (v/v) de mel manuka, (E) 25 % (v/v) de mel urze, (F) 50 % (v/v) de mel urze e (G) 75 % (v/v) de mel urze. Células coradas de verde correspondem a células viáveis e células coradas de vermelho a células não viáveis. A barra representa 10  $\mu$ m.

A partir da análise das imagens obtidas por microscopia verificou-se que curiosamente o biofilme sem tratamento já apresentava bastantes células de *C. tropicalis* comprometidas (Figura 3.11 (A)). No entanto, as células de *P. aeruginosa* permaneciam viáveis, facto que não se verificou nos resultados obtidos anteriormente. Apesar disso, encontra-se de acordo com estudos realizados anteriormente, como no caso da investigação levada a cabo por Bandara *et al.*<sup>46</sup>, onde investigaram as interações entre espécies de *Candida* e *P. aeruginosa* e constataram que após incubação prolongada de 24 h ocorreu uma redução significativa de 88 % (v/v) de *C. tropicalis*. Aliás neste estudo confirmou-se que, em geral, a espécie de *Candida* e *P. aeruginosa* têm efeitos mutuamente supressivos em todas as fases da formação do biofilme. Porém, a maioria dos estudos anteriores sobre interações entre *Candida* e bactérias em biofilmes mistos concentram-se em *C. albicans* e apenas alguns são relativos a CNA<sup>46</sup>.

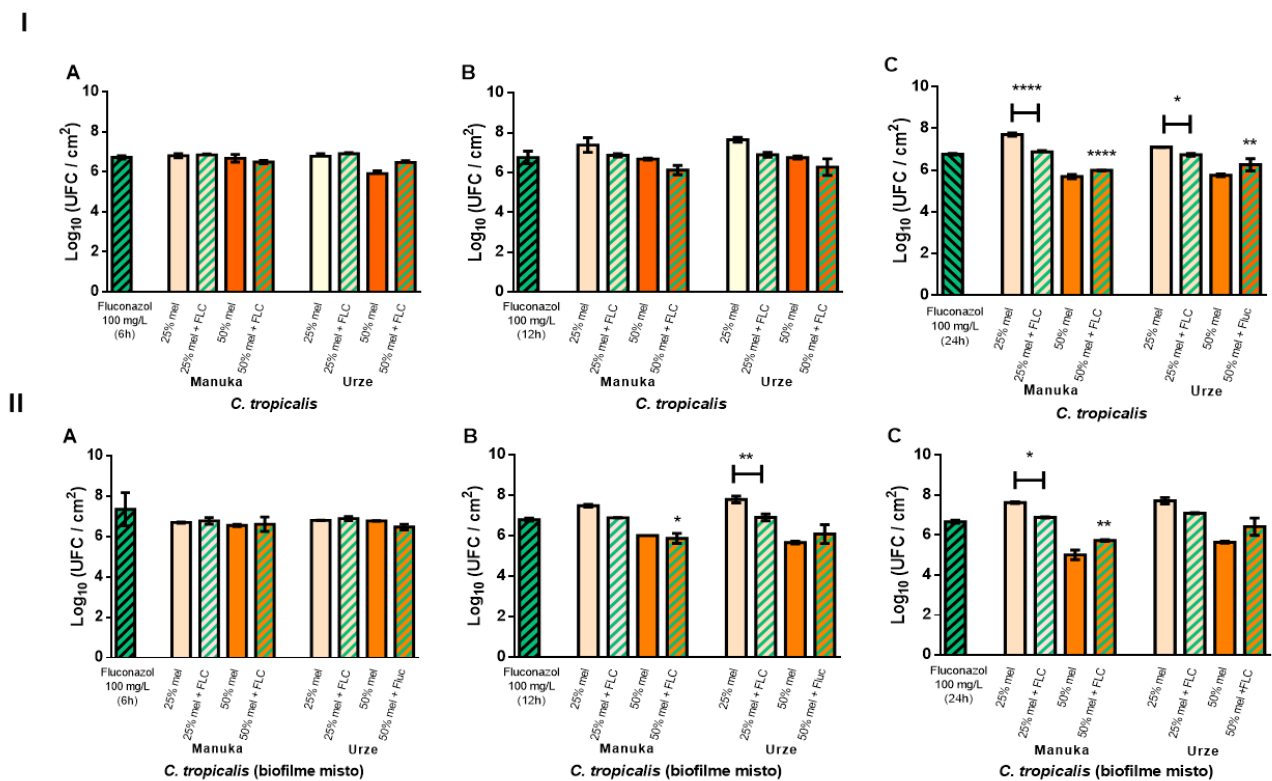
Analisando as restantes imagens, com 25 % (v/v) de mel manuka ou urze verifica-se que o biofilme contém mais células viáveis de *C. tropicalis* em comparação com o biofilme sem tratamento (Figuras 3.11 (B) e (E)), o que neste caso corrobora com os resultados de UFC obtidos anteriormente. Constata-se, também, que a partir de 50 % (v/v) de mel as células de *Candida* começam a formar hifas como acontece em biofilmes simples (Figuras 3.11 (C) e (F)), apoiando o facto de que esta estirpe forma hifas em situação de *stress*, mesmo na presença de *P. aeruginosa*. No caso do tratamento com 75 % (v/v) de mel, o biofilme encontra-se bastante comprometido a nível das duas espécies (Figuras 3.11 (D) e (G)). No entanto, ao contrário do que acontece normalmente, a espécie fúngica não formou hifas, sendo que a *Pseudomonas* se encontra situada em redor das células de *Candida* o que possivelmente dificultou esse processo. Relativamente a *P. aeruginosa*, verifica-se que desde dos 25 % (v/v) de mel urze e mel manuka que esta se encontra bastante comprometida (Figura 3.11), corroborando com um estudo realizado por Cooper e Molan<sup>176</sup>, onde relataram que o mel manuka apresentava uma CMI inferior a 10 % (v/v) contra 17 estirpes de *P. aeruginosa* de feridas infetadas.

### **3.5 Avaliação da combinação de mel mais antifúngico em biofilmes mistos de *C. tropicalis* e *P. aeruginosa***

No seguimento dos ensaios realizados até este ponto é importante tentar perceber o efeito da combinação de mel mais agente antifúngico comercial em biofilmes mistos, com a finalidade de averiguar se a interação entre *C. tropicalis* e *P. aeruginosa* aumenta ou reduz a resistência da espécie fúngica em estudo à terapia combinacional. Nesta perspetiva, foi avaliado o efeito da combinação de mel urze e mel manuka nas concentrações de 25 % (v/v) e 50 % (v/v) com FLC na concentração de



100 mg/L em biofilmes mistos. Neste caso, realizou-se também uma monitorização do efeito desta terapia durante 24 h, nos intervalos de 6, 12 e 24 h, uma vez que anteriormente a espécie *P. aeruginosa* demonstrou ser suscetível ao mel a partir das 6 h de tratamento (Figura 3.10). Relativamente à espécie *Candida*, às 6 h de tratamento não se obteve alterações nos biofilmes (Figura 3.12 (I/II- A)), e a partir das 12 h de tratamento começou-se a verificar uma pequena redução do biofilme em relação ao tratamento individual com mel ou com FLC (Figura 3.12 (I/II- B)). Após o termino das 24 h de terapia combinada em biofilmes mistos, apenas se verificou redução significativa em relação ao tratamento com mel manuka na concentração 25 % (v/v) ( $p < 0,1$ ) (Figura 3.12 (II-C)), à semelhança do que se observou em biofilmes simples (Figura 3.12 (I-C)). Demonstrando assim, que a combinação de *C. tropicalis* com *P. aeruginosa* é indiferente no tratamento de mel + FLC e que esta espécie continua a demonstrar resistência a este antifúngico.

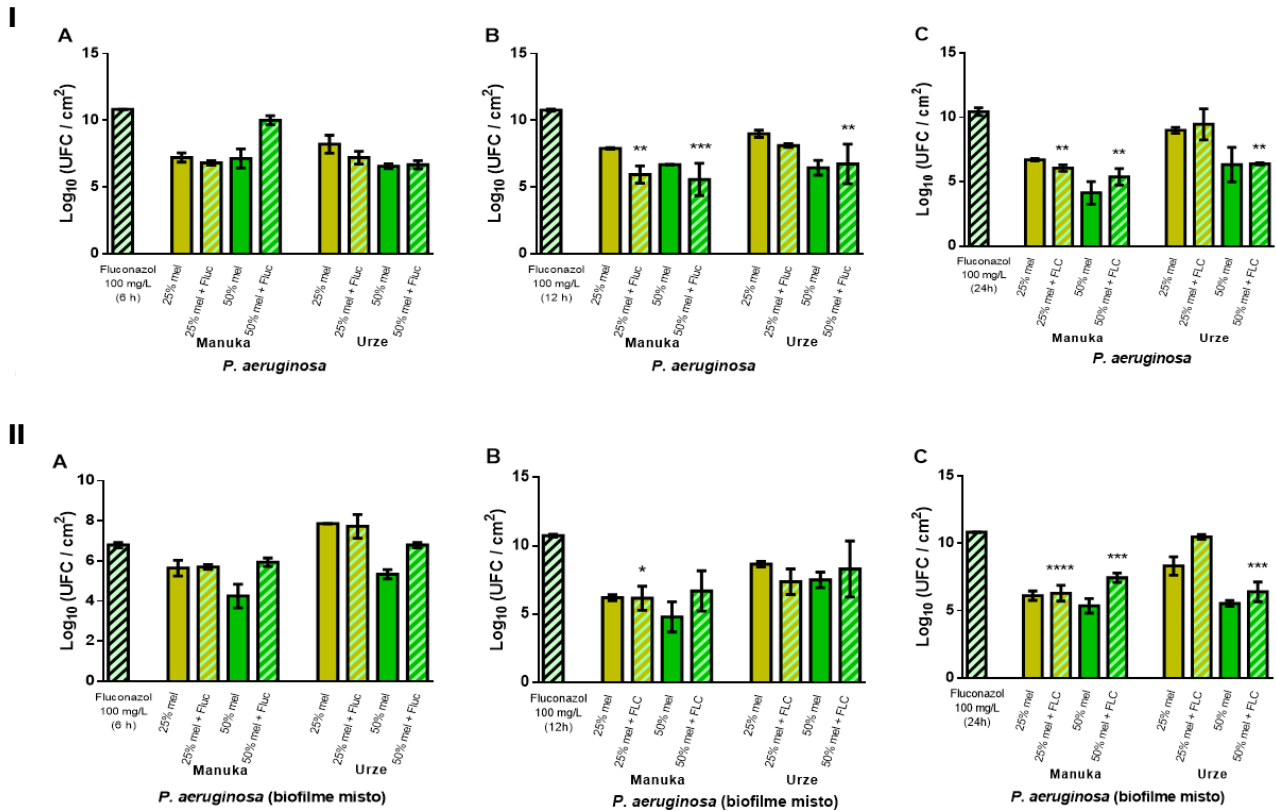


**Figura 3.12** Avaliação da suscetibilidade após tratamento com mel manuka e urze nas concentrações 25 % (v/v), 50 % (v/v) e 75 % (v/v) e a combinação destas concentrações de mel com FLC (100 mg/L) de (I) biofilmes de *C. tropicalis* e de (II) biofilmes mistos relativos a *C. tropicalis*, (A) após 6 h de tratamento (B) após 12 h de tratamento, (C) após 24 h de tratamento, pela quantificação do número de colónias formadas por área do poço da microplaca (Log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>). As barras de erro indicam o respetivo desvio padrão. \*Concentração para a qual o valor de UFC/cm<sup>2</sup> é estatisticamente diferente em relação ao tratamento apenas com o antifúngico, H relativo a terapia apenas com mel nas respetivas concentrações (\*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* correspondentes a  $p < 0,1$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respetivamente).

Relativamente à *P. aeruginosa*, a aplicação de FLC no tratamento com mel, não provoca alterações significativas nos biofilmes simples ou mistos até 12 h de tratamento (Figura 3.13), sendo o



FLC um antifúngico, este não apresenta efeito antibacteriano. Após as 24 h de tratamento verificou-se resultados bastante semelhantes entre os biofilmes simples (Figura 3.13 (I-C)) e mistos (Figura 3.13 (II-C)), além disso observou-se que a adição de FLC ao mel aumenta substancialmente o número de células viáveis nos biofilmes mistos em comparação ao tratamento apenas com mel.



**Figura 2.13** Avaliação da suscetibilidade após tratamento com mel urze e manuka nas concentrações 25 % (v/v), 50 % (v/v) e 75 % (v/v) e a combinação destas concentrações de mel com FLC (100 mg/L) de (I) biofilmes de *P. aeruginosa* e de (II) biofilmes mistos relativos a *P. aeruginosa*, (A) após 6 h de tratamento (B) após 12 h de tratamento, (C) após 24 h de tratamento, pela quantificação do número de colónias formadas por área do poço da microplaca ( $\text{Log}_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>). As barras de erro indicam o respetivo desvio padrão. \*Concentração para a qual o valor de UFC/ cm<sup>2</sup> é estatisticamente diferente em relação ao tratamento apenas com o antifúngico, **I** relativo a terapia apenas com mel nas respetivas concentrações (\*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* correspondentes a  $p < 0,1$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respetivamente).

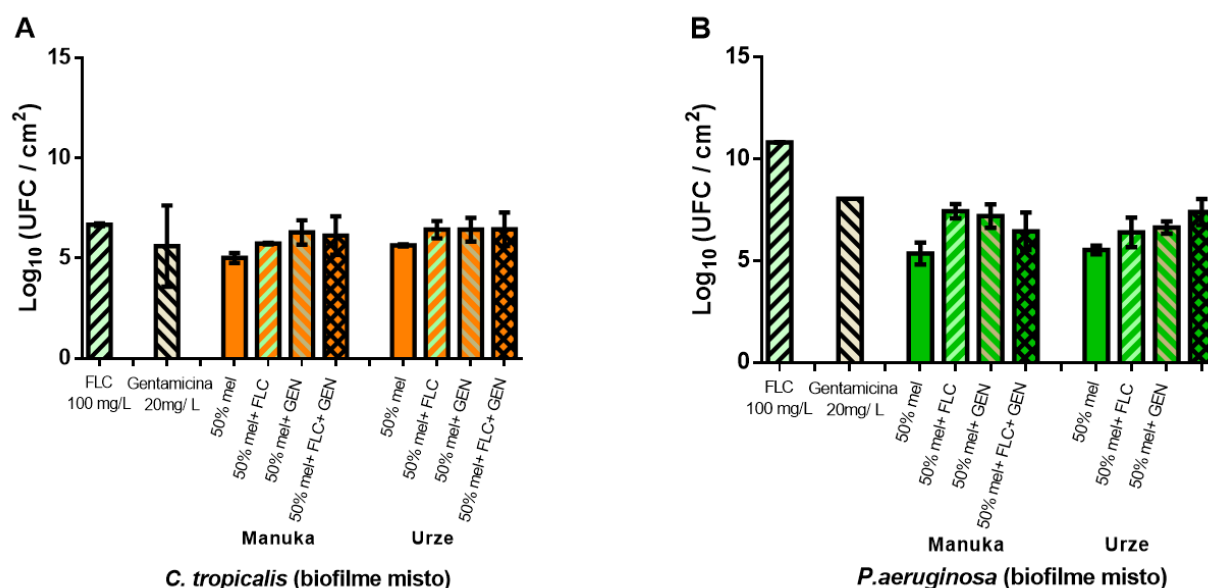
Resumidamente, o mel por si só permite uma redução superior em comparação com a combinação de mel + FLC em todas as condições em biofilmes mistos ou simples, exceto com 25 % (v/v) de mel. Nestes casos, esta combinação demonstrou uma pequena vantagem relativamente à espécie *Candida*. Apesar disso, *C. tropicalis* continua a demonstrar uma elevada resistência a FLC, mesmo combinado com mel, quer seja em biofilmes simples como em biofilmes mistos. Facto que se encontra de acordo com diversos estudos onde constataram que a resistência a FLC tem aumentado em isolados clínicos de *C. tropicalis*<sup>77</sup>. Portanto, a combinação com outro antifúngico poderá fornecer melhores resultados, nesta perspetiva era importante numa etapa posterior testar a combinação com

CLR e com NIS, uma vez que se obteve melhores resultados em biofilmes de *C. tropicalis*. Além disso, a CLR é um antisséptico e desinfetante eficaz contra uma ampla gama de bactérias, incluindo *P. aeruginosa*, alguns fungos e alguns vírus<sup>178</sup>. Assim como, a NIS já demonstrou num estudo *in vitro* que a combinação com sulfadiazina de prata, um bactericida, foi igualmente eficaz em espécies fúngicas, como *C. albicans* e espécies bacterianas, como *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*<sup>79</sup>.

### 3.6 Avaliação da combinação de mel com agentes antifúngico e com antibacteriano em biofilmes mistos de *C. tropicalis* e *P. aeruginosa*

Considerando-se os resultados obtidos anteriormente, delineou-se uma terceira estratégia que consiste na adição de um terceiro agente antimicrobiano, a GEN às combinações já testadas. Deste modo, pretende-se combater as duas partes distintas do biofilme, isto é, as espécies fúngicas através de FLC e as espécies bacterianas pela GEN. Posto isto, foi realizada terapia combinacional de mel + FLC + GEN nas concentrações de 50 % (v/v), 100 mg/L e 20 mg/L, respetivamente. Neste ensaio foi usado como termo de comparação cada elemento terapêutico individualmente.

No entanto, após verificação dos resultados obtidos constatou-se que ao contrário do pretendido ocorreu um aumento de células viáveis no biofilme relativamente ao tratamento apenas com mel, em todas as condições testadas (Figura 3.14). De facto, a combinação destes três elementos não apresentou vantagem em comparação com tratamento apenas com mel, tanto na espécie fúngica como na espécie bacteriana.



**Figura 3.14** Avaliação da suscetibilidade de biofilmes de *C. tropicalis* e *P. aeruginosa* após 24 h de tratamento combinado de FLC (100 mg/L) + GEN (20 mg/L) + mel urze e manuka nas concentrações 25 % (v/v) e 50 % (v/v). As barras de erro indicam o respetivo desvio padrão. \*Concentração para a qual o valor de UFC/ cm<sup>2</sup> é estatisticamente diferente em relação ao respetivo controlo (\*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* correspondentes a p <0,1, p <0,01, p <0,001 e p <0,0001, respetivamente).

A interação entre FLC e GEN foi investigada por Lu *et al.*<sup>180</sup>, como tratamento de biofilmes pré-formados de 4, 8 e 12 h de *C. albicans*, onde verificaram que ocorreu sinergismo apenas contra biofilmes pré-formados de 4 e 8 h e à medida que o biofilme amadureceu diminuiu, não se verificando em biofilmes de 24 h. Os mesmos autores concluíram, que a GEN aumentou a eficácia do FLC contra biofilmes em estágio inicial, mas não em biofilmes mais maduros. Relativamente a *P. aeruginosa*, os dados obtidos não se encontram de acordo com a literatura, uma vez que no estudo levado a cabo por Campeau *et al.*<sup>181</sup>, verifica que a combinação de mel manuka com concentração de 17,5 % (v/v) com GEN na concentração 100 mg/L demonstrou ter efeito aditivo. Possivelmente, a falta de concordância encontra-se relacionada com a concentração de GEN usada, 20 mg/L, ser baixa. Facto que corrobora com um estudo realizado por Adeleke, Olaitan e Okpekpe<sup>182</sup>, onde testaram o tratamento com GEN com concentrações entre 4-8 mg/L e verificaram que a atividade antibacteriana foi inferior em comparação ao mel não diluído e na concentração de 50 % (v/v). Portanto numa próxima etapa deste estudo poderia ser interessante testar a mesma combinação com concentrações crescentes do agente antibacteriano comercial.

# Capítulo IV

---

## **CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS**



## 4.1 Conclusões

Com o aumento de infeções associadas a espécie *Candida* torna-se necessária a descoberta de novas terapias antifúngicas, mais eficazes e com menos efeitos adversos. Nesta perspetiva, surgiu o mel como potencial agente antifúngico. De facto, neste estudo foi avaliado o efeito antifúngico do mel urze e do mel manuka, com diferentes concentrações, em *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Em todas as espécies testadas verificou-se uma redução tanto a nível do crescimento planctónico como em biofilmes. Comparando os resultados obtidos para as diferentes espécies, *C. tropicalis* demonstrou ser a espécie mais suscetível ao tratamento com mel, assim como, o mel manuka demonstrou maior capacidade de redução em comparação com o mel urze. E neste seguimento, realizou-se na espécie *C. tropicalis* terapia combinacional de mel urze e mel manuka com diferentes antifúngicos, nomeadamente clorhexidina (CLR), a nistatina (NIS) e fluconazol (FLC). Neste ensaio constatou-se que todas as combinações apresentavam vantagem relativamente ao tratamento apenas com mel ou apenas com o antifúngico, permitindo reduzir em 50 % a dosagem tipicamente requerida em ambientes clínicos. De facto, os resultados obtidos neste ensaio sugerem que a terapia combinada com CLR e com NIS foram significativamente mais eficaz do que a monoterapia com mel, assim sendo, a combinação com estes dois antifúngicos podem ser um tratamento alternativo ou complementar para a candidíase.

Além do estudo de *Candida* isoladamente, a compreensão do comportamento desta espécie em biofilmes polimicrobianos constitui uma importante etapa no contexto clínico e, conseqüentemente, na escolha do tratamento mais eficaz. Neste sentido, avaliou-se o efeito do mel urze e mel manuka em biofilmes de *C. tropicalis* e *P. aeruginosa*, estes méis demonstraram ser uma escolha promissora, visto que conseguiram reduzir o biofilme relativamente às duas espécies em simultâneo. Além desta avaliação foi testado o efeito da combinação dupla de mel e antifúngico (FLC) e a combinação tripla de mel com antifúngico (FLC) e com um antibiótico (GEN), tais combinações não demonstraram o efeito pretendido. Apesar disso, estas terapias combinacionais podem ser promissoras utilizando agentes antimicrobianos diferentes ou alterando as suas concentrações.

Em geral, os resultados obtidos neste estudo destacam o grande potencial do mel como terapia alternativa ou complementar para o controlo de infeções induzidas por espécies de *Candida*, o que permite reduzir a utilização de agentes antifúngicos comerciais, evitando deste modo as desvantagens que estes agentes apresentam, uma vez que se trata de um produto natural.

## 4.2 Perspetivas futuras

Considerando o potencial antifúngico que o mel demonstrou neste estudo é fulcral a continuação da pesquisa neste sentido, não só com o mel urze e o mel manuka, mas também se deve efetuar uma pesquisa com um maior número de amostras de mel, com origens mais heterogêneas, uma vez que as propriedades antimicrobianas podem variar dependendo das propriedades do mel. Como referido anteriormente, na terapia combinacional de mel com um agente antifúngico comercial e com agente antibacteriano é importante numa próxima etapa desta investigação optar por outros agentes antifúngicos, assim como concentrações crescentes do antibacteriano comercial. Além disso, é importante um estudo mais profundo, no sentido de compreender os mecanismos subjacentes às mudanças ocorridas em *Candida* após tratamento com mel, assim como determinar o modo de ação deste composto como agente antifúngico.

## **BIBLIOGRAFIA**

---





## BIBLIOGRAFIA

1. McCarty, T. P. & Pappas, P. G. Invasive Candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America* (2015).
2. Nett, J. E. The Host's Reply to *Candida* Biofilm. *Pathog. (Basel, Switzerland)* **5**, 33 (2016).
3. Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* **20**, 133–163 (2007).
4. Martins, N., Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Silva, S. & Henriques, M. Candidiasis: Predisposing Factors, Prevention, Diagnosis and Alternative Treatment. *Mycopathologia* **177**, 223–240 (2014).
5. Abi-Said, D., Anaissie, E., Uzun, O., Raad, I., Pinzcowski, H., Vartivarian, S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin. Infect. Dis.* **24**, 1122–8 (1997).
6. Meersseman, W., Lagrou, K., Spriet, I., Maertens, J., Verbeken, E., Peetermans, WE., Van Wijngaerden, E. Significance of the isolation of *Candida* species from airway samples in critically ill patients: A prospective, autopsy study. *Intensive Care Med.* **35**, 1526–1531 (2009).
7. Wang, X., van de Veerdonk, F. L. & Netea, M. G. Basic Genetics and Immunology of *Candida* Infections. *Infectious Disease Clinics of North America* **30**, 85–102 (2016).
8. Kett, D. H., Azoulay, E., Echeverria, P. M., Vincent, J. L. & Extended Prevalence of Infection in, I. C. U. S. G. of I. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit Care Med* **39**, 665–670 (2011).
9. Tobudic, S., Kratzer, C., Lassnigg, A., Willinger, B., Graninger, W., Presterl, E., Biofilm formation of *Candida spp.* isolates from patients at a cardiothoracic intensive care unit. *Int J Artif Organs* **34**, 818–823 (2011).
10. Michalopoulos, A. S., Geroulanos, S. & Mentzelopoulos, S. D. Determinants of Candidemia and Candidemia-Related Death in Cardiothoracic ICU Patients. *Chest* **124**, 2244–2255 (2003).
11. Kołaczowska, A. & Kołaczowski, M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-*albicans Candida* species. *J. Antimicrob. Chemother.* dkv445 (2016).
12. Alonso-Valle, H., Acha, O., García-Palomo, JD., Fariñas-Alvarez, C., Fernández-Mazarrasa, C., Fariñas, MC. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**, 254–7 (2003).

13. Deorukhkar, S. C., Saini, S. & Mathew, S. Non-*albicans Candida* Infection: An Emerging Threat. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* **2014**, 615958 (2014).
14. Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M. & Mendes Giannini, M. J. S. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology* **62**, 10–24 (2013).
15. Collin, B., Clancy, C. J. & Nguyen, M. H. Antifungal resistance in non- *albicans Candida* species. *Drug Resist. Updat.* **2**, 9–14 (1999).
16. Kontoyiannis, D. P., Vaziri, I., Hanna, HA., Boktour, M., Thornby, J., Hachem, R., Bodey, GP., Raad, II. Risk Factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 1676–81 (2001).
17. Eggimann, P., Garbino, J. & Pittet, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infectious Diseases* **3**, 685–702 (2003).
18. Nucci, M. & Colombo, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **58**, 77–82 (2007).
19. Wingard, J. R., Merz, W. G. & Saral, R. *Candida tropicalis*: A major pathogen in immunocompromised patients. *Ann. Intern. Med.* **91**, 539–543 (1979).
20. Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, DW., Azeredo, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 288–305 (2012).
21. Negri, M. Gonçalves, V., Silva, S., Henriques, M., Azeredo, J., Oliveira, R. Crystal violet staining to quantify *Candida* adhesion to epithelial cells. *Br. J. Biomed. Sci.* **67**, 120–5 (2010).
22. Krcmery, V. & Barnes, A. J. Non-*albicans Candida* spp. causing fungaemia: Pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of Hospital Infection* **50**, 243–260 (2002).
23. Melo, A. S., Bizerra, F. C., Freymüller, E., Arthington-Skaggs, B. a & Colombo, A. L. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med. Mycol.* **49**, 253–262 (2011).
24. Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* **284**, 1318–1322 (1999).
25. Donlan, R. M. & Costerton, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* **15**, 167–193 (2002).
26. Kojic, E. M. & Darouiche, R. O. *Candida* Infections of Medical Devices. *Clinical Microbiology*

- Reviews* **17**, 255–267 (2004).
27. Donlan, R. M. Biofilms and device-associated infections. in *Emerging Infectious Diseases* **7**, 277–281 (2001).
  28. Nobile, C. J. & Mitchell, A. P. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cellular Microbiology* **8**, 1382–1391 (2006).
  29. ten Cate, J. M., Klis, F. M., Pereira-Cenci, T., Crielaard, W. & de Groot, P. W. J. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J. Dent. Res.* **88**, 105–115 (2009).
  30. Blankenship, J. R. & Mitchell, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology* **9**, 588–594 (2006).
  31. Li, X., Yan, Z. & Xu, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology* **149**, 353–362 (2003).
  32. Ramage, G., Saville, S. P. & Thomas, D. P. Biofilms: an Update†. *Society* **4**, 633–638 (2005).
  33. Baillie, G. S. & Douglas, L. J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**, 397–403 (2000).
  34. Cuéllar-Cruz, M., López-Romero, E., Villagómez-Castro, J. C. & Ruiz-Baca, E. *Candida* species: new insights into biofilm formation. *Future Microbiol.* **7**, 755–71 (2012).
  35. Chandra, J. Kuhn, DM., Mukherjee, PK., Hoyer, LL., McCormick, T., Ghannoum, MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* **183**, 5385–5394 (2001).
  36. Taff, H. T., Mitchell, K. F., Edward, J. a & Andes, D. R. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol.* **8**, 1325–37 (2013).
  37. Douglas, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology* **11**, 30–36 (2003).
  38. Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L. & Williams, C. Fungal biofilm resistance. *International Journal of Microbiology* (2012).
  39. Pannanusorn, S., Fernandez, V. & Römling, U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. *Mycoses* **56**, 264–272 (2013).
  40. Ferreira, A. V., Prado, C. G., Carvalho, R. R., Dias, K. S. T. & Dias, A. L. T. *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* **175**, 265–272 (2013).
  41. Araújo, D., Henriques, M. & Silva, S. Portrait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Network

- Genes. *Trends in Microbiology* **25**, 62–75 (2017).
42. Costa, A. C. B. P., Pereira, C. A., Freire, F., Junqueira, J. C. & Jorge, A. O. C. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed in vitro. *Mycoses* **56**, 614–622 (2013).
  43. Seneviratne, C. J., Silva, W. J., Jin, L. J., Samaranayake, Y. H. & Samaranayake, L. P. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Arch. Oral Biol.* **54**, 1052–1060 (2009).
  44. Parahitiyawa, N. B., Samaranayake, YH., Samaranayake, LP., Ye. J., Tsang, PW., Cheung, BP., Yau, JY., Yeung, SK. Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device. *APMIS* **114**, 298–306 (2006).
  45. Silva, S. Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D., Azeredo, J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med. Mycol.* **47**, 681–9 (2009).
  46. Bandara, H. M., Yau, J. Y., Watt, R. M., Jin, L. J. & Samaranayake, L. P. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits in-vitro *Candida* biofilm development. *BMC Microbiol* **10**, 125 (2010).
  47. Diaz, P. I., Strausbaugh, L. D. & Dongari-Bagtzoglou, A. Fungal-bacterial interactions and their relevance to oral health: linking the clinic and the bench. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, 101 (2014).
  48. Nseir, S. Jozefowicz, E., Cavestri, B., Sendid, B., Di Pompeo, C., Dewavrin, F., Favory, R., Roussel-Delvallez, M., Durocher, A. Impact of antifungal treatment on *Candida*–*Pseudomonas* interaction: a preliminary retrospective case–control study. *Intensive Care Med.* **33**, 137–142 (2007).
  49. Kerr, J. R. Suppression of fungal growth exhibited by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 525–7 (1994).
  50. El-Azizi, M. A., Starks, S. E. & Khardori, N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms\*. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 1067–1073 (2004).
  51. McAlester, G., O’Gara, F. & Morrissey, J. P. Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *J. Med. Microbiol.* **57**, 563–569 (2008).
  52. Hogan, D. a & Kolter, R. *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. *Science* **296**, 2229–32 (2002).
  53. Mah, T.-F. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol.* **7**, 1061–1072 (2012).
  54. Römling, U. & Balsalobre, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative

- treatment strategies. *Journal of Internal Medicine* **272**, 541–561 (2012).
55. Williams, D. W., Kuriyama, T., Silva, S., Malic, S. & Lewis, M. A. O. *Candida* biofilms and oral candidosis: Treatment and prevention. *Periodontol. 2000* **55**, 250–265 (2011).
  56. Marie, C. & White, T. C. Genetic basis of antifungal drug resistance. *Current Fungal Infection Reports* **3**, 163–169 (2009).
  57. Prasad, R. & Kapoor, K. Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int. Rev. Cytol.* **242**, 215–248 (2005).
  58. Niimi, M., Firth, N. A. & Cannon, R. D. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology* **98**, 15–25 (2010).
  59. Silva, S., Rodrigues, C. F., Araújo, D., Rodrigues, M. E. & Henriques, M. *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. *Journal of fungi* 3.1,(2017).
  60. Seneviratne, C. J., Jin, L. & Samaranayake, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: A mini review. *Oral Diseases* **14**, 582–590 (2008).
  61. Al-Fattani, M. A. & Douglas, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol* **55**, 999–1008 (2006).
  62. Gilbert, P., Maira-Litran, T., McBain, A. J., Rickard, A. H. & Whyte, F. W. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Advances in Microbial Physiology* **46**, 203–256 (2002).
  63. Kuhn, D. M., Chandra, J., Mukherjee, P. K. & Ghannoum, M. A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect. Immun.* **70**, 878–888 (2002).
  64. Stewart, P. S. & Costerton, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**, 135–138 (2001).
  65. Jabra-Rizk, M. A., Falkler, W. A. & Meiller, T. F. Fungal Biofilms and Drug Resistance. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 14–19 (2004).
  66. Morschhäuser, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* **1587**, 240–248 (2002).
  67. Mukherjee, P. K., Chandra, J., Kuhn, D. M. & Ghannoum, M. A. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: Phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect. Immun.* **71**, 4333–4340 (2003).
  68. Perumal, P., Mekala, S. & Chaffin, W. L. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 2454–2463 (2007).

69. Lewis, K. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 357–372 (2010).
70. Al-Dhaheeri, R. S. & Douglas, L. J. Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1884–1887 (2008).
71. Spampinato, C. & Leonardi, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. *BioMed Research International* **2013**, (2013).
72. Davis, S. L., Vazquez, J. A. & McKinnon, P. S. Epidemiology, risk factors, and outcomes of *Candida albicans* versus non-*albicans* candidemia in nonneutropenic patients. *Ann. Pharmacother.* **41**, 568–573 (2007).
73. Eggimann, P., Francioli, P., Bille, J., Schneider, R., Wu, MM., Chapuis, G., Chiolerio, R., Pannatier, A., Schilling, J., Geroulanos, S., Glauser, MP., Calandra, T. Fluconazole prophylaxis prevents intra-abdominal candidiasis in high-risk surgical patients. *Crit. Care Med.* **27**, 1066–1072 (1999).
74. Andriole, V. T. Current and future antifungal therapy: New targets for antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **44**, 151–162 (1999).
75. Baddley, J. W. & Moser, S. A. Emerging fungal resistance. *Clinics in Laboratory Medicine* **24**, 721–735 (2004).
76. Dixon, D. M., Walsh, T. J. *Antifungal Agents. Medical Microbiology.* **4<sup>th</sup>** edition (ed. Samuel Baron. Galveston, Texas, University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996).
77. Pfeiffer, C. D., Garcia-Effron G., Zaas A. K., Perfect J. R., Perlin D.S., Alexander B.D. Breakthrough invasive candidiasis in patients on micafungin. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 2373–2380 (2010).
78. Sanguinetti, M., Posteraro, B. & Lass-Flörl, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: Mechanisms and clinical impact. *Mycoses* **58**, 2–13 (2015).
79. Kanafani, Z. A. & Perfect, J. R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 120–8 (2008).
80. Perlin, D. S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist. Updat.* **10**, 121–130 (2007).
81. Park, S., Kelly, R., Kahn, JN., Robles, J., Hsu, MJ., Register, E., Li, W., Vyas, V., Fan, H., Abruzzo, G., Flattery, A., Gill, C., Chrebet, G., Parent, SA., Kurtz, M., Teppler, H., Douglas, CM., Perlin, DS. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3264–3273 (2005).

82. Perlin, D. S. Current perspectives on echinocandin class drugs. *Future Microbiol.* **6**, 441–457 (2011).
83. Katiyar, S. K. Alastruey-Izquierdo, A., Healey, KR., Johnson, ME., Perlin, DS., Edlind, TD. Fks1 and Fks2 are functionally redundant but differentially regulated in *Candida glabrata*: implications for echinocandin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 6304–6309 (2012).
84. Garcia-Effron, G., Katiyar, S. K., Park, S., Edlind, T. D. & Perlin, D. S. A naturally-occurring Fks1p Proline to Alanine amino acid change in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* accounts for reduced Echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **7**, 2305–2312 (2008).
85. Pfaller, MA. Diekema, DJ., Andes, D., Arendrup, MC., Brown, SD., Lockhart, SR., Motyl, M., Perlin, DS.; CLSI Subcommittee for Antifungal Testing. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist. Updat.* **14**, 164–176 (2011).
86. Lafayette, S. L. Collins, C., Zaas, AK., Schell, WA., Betancourt-Quiroz, M., Gunatilaka, AA., Perfect, JR., Cowen, LE. PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *candida albicans* via circuitry comprised of *mkc1*, calcineurin, and *hsp90*. *PLoS Pathog.* **6**, 79–80 (2010).
87. Cappelletty, D. & Eiselstein-McKitrick, K. The echinocandins. *Pharmacotherapy* **27**, 369–388 (2007).
88. Abe, F., Usui, K. & Hiraki, T. Fluconazole modulates membrane rigidity, heterogeneity, and water penetration into the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **48**, 8494–8504 (2009).
89. Löffler, J. Kelly, SL., Hebart, H., Schumacher, U., Lass-Flörl, C., Einsele, H. Molecular analysis of *cyp51* from fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**, 263–268 (1997).
90. Kelly, S. L., Lamb, DC., Kelly, DE., Manning, NJ., Loeffler, J., Hebart, H., Schumacher, U., Einsele, H. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol  $\Delta 5,6$ -desaturation. *FEBS Lett.* **400**, 80–82 (1997).
91. Hay, R. J. *Antifungal Drugs*. in *European Handbook of Dermatological Treatments*. 2<sup>th</sup> edition, 700–710 (Berlin Heidelberg, Springer, 2003).
92. Martin, M. V. The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans*



- infections: A review. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**, 429–437 (1999).
93. Goa, K. L. & Barradell, L. B. Fluconazole: An Update of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use in Major Superficial and Systemic Mycoses in Immunocompromised Patients. *Drugs* **50**, 658–690 (1995).
  94. Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J. L., Monod, M., Bille, J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2378–2386 (1995).
  95. Van't Wout, J. W. Fluconazole treatment of candidal infections caused by non-*albicans candida* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**, 238–242 (1996).
  96. Gubbins, P. O. CHAPTER 7 – *Antifungal Therapy*. In *Clinical Mycology*, **2th** edition, 161–95. (Churchill Livingstone, 2009).
  97. Gray, K. C., Palacios, DS., Dailey, I., Endo, MM., Uno, BE., Wilcock, BC., Burke, MD. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2234–9 (2012).
  98. Anderson, T. M., Clay, MC., Cioffi, AG., Diaz, KA., Hisao, GS., Tuttle, MD., Nieuwkoop, AJ., Comellas, G., Maryum, N., Wang, S., Uno, BE., Wildeman, EL., Gonen, T., Rienstra, CM., Burke, MD. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 400–6 (2014).
  99. White, T. C., Marr, K. A. & Bowden, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **11**, 382–402 (1998).
  100. Vandeputte, P., Tronchin, G., Larcher, G., Ernoult, E., Bergès, T., Chabasse, D., Bouchara, JP. A Nonsense Mutation in the ERG6 Gene Leads to Reduced Susceptibility to Polyenes in a Clinical Isolate of *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3701–3709 (2008).
  101. Ruhnke, M., Rickerts, V., Cornely, OA., Buchheidt, D., Glöckner, A., Heinz, W., Höhl, R., Horré, R., Karthaus, M., Kujath, P., Willinger, B., Presterl, E., Rath, P., Ritter, J., Glasmacher, A., Lass-Flörl, C., Groll, AH.; German Speaking Mycological Society; Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. Diagnosis and therapy of *Candida* infections: Joint recommendations of the German Speaking Mycological Society and the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. *Mycoses* **54**, 279–310 (2011).
  102. Lyu, X., Zhao, C., Hua, H. & Yan, Z. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des. Devel. Ther.* 1161–1171 (2016).
  103. Samaranayake, L. P., Keung Leung, W. & Jin, L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol.*

- 2000 **49**, 39–59 (2009).
104. Howell, a, Isaacs, D. & Halliday, R. Oral nystatin prophylaxis and neonatal fungal infections. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **94**, F429-33 (2009).
  105. Gøtzsche , P. C. & Johansen, H. K. Nystatin prophylaxis and treatment in severely immunodepressed patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2017**, (2014).
  106. Dodds Ashley, E. S., Lewis, R., Lewis, J. S., Martin, C. & Andes, D. Pharmacology of Systemic Antifungal Agents. *Clin. Infect. Dis.* **43**, S28–S39 (2006).
  107. Nam, K.-Y. In vitro antimicrobial effect of the tissue conditioner containing silver nanoparticles. *J. Adv. Prosthodont.* **3**, 20–24 (2011).
  108. Lu, X., Zhang, B., Wang, Y., Zhou, X., Weng, J., Qu, S., Feng, B., Watari, F., Ding, Y., Leng, Y. Nano-Ag-loaded hydroxyapatite coatings on titanium surfaces by electrochemical deposition. *J. R. Soc. Interface* **8**, 529–539 (2011).
  109. Huang, T., Cao, W., Elsayed-Ali, H. E. & Xu, X.-H. N. High-throughput ultrasensitive characterization of chemical, structural and plasmonic properties of EBL-fabricated single silver nanoparticles. *Nanoscale* **4**, 380–5 (2012).
  110. Vonk, A. G., Netea, M. G., van der Meer, J. W. M. & Kullberg, B. J. Host defence against disseminated *Candida albicans* infection and implications for antifungal immunotherapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* **6**, 891–903 (2006).
  111. Mishra, N. N., Ali, S. & Shukla, P. K. A monoclonal antibody against 47.2 kDa cell surface antigen prevents adherence and affects biofilm formation of *Candida albicans*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11–21 (2014).
  112. Bliss, J. M., Bigelow, C. E., Foster, T. H. & Haidaris, C. G. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of Photofrin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2000–2006 (2004).
  113. Donnelly, R. F., McCarron, P. A. & Tunney, M. M. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiological Research* **163**, 1–12 (2008).
  114. Rodrigues, M. E., Silva, S., Azeredo, J. & Henriques, M. Novel strategies to fight *Candida* species infection. *Crit. Rev. Microbiol.* **7828**, 1–13 (2014).
  115. Doddanna, S. J., Patel, S., Sundarrao, M. A. & Veerabhadrapa, R. S. Antimicrobial activity of plant extracts on *Candida albicans*: an in vitro study. *Indian J. Dent. Res.* **24**, 401–5 (2013).
  116. Sardi, J. C. O., Almeida, A. M. F. & Mendes Giannini, M. J. S. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites - A brief review. *Archives of Oral Biology* **56**, 951–959 (2011).

117. Anibal, P. C., Sardi, J. de C. O., Peixoto, I. T. A., Moraes, J. J. de C. & Höfling, J. F. Conventional and alternative antifungal therapies to oral candidiasis. *Brazilian J. Microbiol.* **41**, 824–831 (2010).
118. Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoğlu, S., Ulusoy, E., Baltacı, C., Candan, F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chem.* **100**, 526–534 (2007).
119. Al-Waili, N. S., Al-Waili, NS., Al-Waili, FS., Akmal, M., Ali, A., Salom, KY., Al, Ghamdi. AA. Effects of natural honey on polymicrobial culture of various human pathogens. *Arch. Med. Sci.* **10**, 246–250 (2014).
120. Blair, S. E., Cokcetin, N. N., Harry, E. J. & Carter, D. A. The unusual antibacterial activity of medical-grade *Leptospermum* honey: Antibacterial spectrum, resistance and transcriptome analysis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 1199–1208 (2009).
121. Chen, C., Campbell, L. T., Blair, S. E. & Carter, D. A. The effect of standard heat and filtration processing procedures on antimicrobial activity and hydrogen peroxide levels in honey. *Front. Microbiol.* **3**, (2012).
122. Irish, J., Carter, D. a, Shokohi, T. & Blair, S. E. Honey has an antifungal effect against *Candida* species. *Med. Mycol.* **44**, 289–291 (2006).
123. Boukraâ, L. & Bouchehrane, S. Additive action of honey and starch against *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. *Rev. Iberoam. Micol.* **24**, 309–11 (2007).
124. Lusby, P. E., Coombes, A. L. & Wilkinson, J. M. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Arch. Med. Res.* **36**, 464–467 (2005).
125. Moussa, A., Noureddine, D., Saad, A., Abdelmelek, M. & Abdelkader, B. Antifungal activity of four honeys of different types from Algeria against pathogenic yeast: *Candida albicans* and *Rhodotorula* sp. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2**, 554–557 (2012).
126. Cohen, S., Berman, L. H., Blanco, L., Bakland, L. & Kim, J. S. A Demographic Analysis of Vertical Root Fractures. *J. Endod.* **32**, 1160–1163 (2006).
127. Koc, AN., Silici, S., Ercal, BD., Kasap, F., Hörmet-Oz, HT., Mavus-Buldu, H. 'Antifungal Activity of Turkish Honey against *Candida* Spp. and *Trichosporon* Spp: An in Vitro Evaluation.' Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology 47: 707–12. Antifunga. *Med. Mycol.* **47**, 707–712 (2009).
128. Al-Waili, N. S. Therapeutic and prophylactic effects of crude honey on chronic seborrheic dermatitis and dandruff. *Eur. J. Med. Res.* **6**, 306–308 (2001).

129. Mercan, N., Guvensen, A., Celik, A. & Katircioglu, H. Antimicrobial activity and pollen composition of honey samples collected from different provinces in Turkey. *Nat. Prod. Res.* **21**, 187–195 (2007).
130. Khosravi, a R. Fungicidal potential of different Iranian honeys against some pathogenic *Candida* species. *J. Apic. Res.* **47**, 256–260 (2008).
131. Vardi, A., Barzilay, Z., Linder, N., Cohen, HA., Paret, G., Barzilai, A. Local application of honey for treatment of neonatal postoperative wound infection. *Acta Paediatr. Int. J. Paediatr.* **87**, 429–432 (1998).
132. Al-Waili, N. S. & Saloom, K. Y. Effects of topical honey on post-operative wound infections due to gram positive and gram negative bacteria following caesarean sections and hysterectomies. *Eur. J. Med. Res.* **4**, 126–30 (1999).
133. Mandal, M. D. & Mandal, S. Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **1**, 154–160 (2011).
134. Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman, S., Humphreys, H. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complement. Altern. Med.* **10**, 47 (2010).
135. Israili, Z. H. Antimicrobial properties of honey. *Am. J. Ther.* **21**, 304–23 (2014).
136. Feás, X. & Estevinho, M. L. A Survey of the *In Vitro* Antifungal Activity of Heather ( *Erica* Sp.) Organic Honey. *J. Med. Food* **14**, 1284–1288 (2011).
137. Vazquez, J. a. Combination antifungal therapy against *Candida* species: the new frontier—are we there yet? *Med. Mycol.* **41**, 355–368 (2003).
138. Baddley, J. W. & Pappas, P. G. Combination antifungal therapy for the treatment of invasive yeast and mold infections. *Current Infectious Disease Reports* **9**, 448–456 (2007).
139. Pappas, PG., Rex, JH., Sobel, JD., Filler, SG., Dismukes, WE., Walsh, TJ., Edwards, JE. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* **38**, 161–189 (2004).
140. Thaler, M., Bacher, J., O'Leary, T. & Pizzo, P. A. Evaluation of single-drug and combination antifungal therapy in an experimental model of candidiasis in rabbits with prolonged neutropenia. *J Infect Dis* **158**, 80–88 (1988).
141. Abdelmonem, A. M., Rasheed, S. M. & Mohamed, A. S. Bee-honey and yogurt: A novel mixture for treating patients with vulvovaginal candidiasis during pregnancy. *Arch. Gynecol. Obstet.* **286**, 109–114 (2012).

142. Moussa, A., Nouredine, D., Hammoudi, SM., Saad, A., Bourabeh, A., Houari, H. Additive potential of ginger starch on antifungal potency of honey against *Candida albicans*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2**, 253–255 (2012).
143. Al-Waili, N. S. An alternative treatment for pityriasis versicolor, tinea cruris, tinea corporis and tinea faciei with topical application of honey, olive oil and beeswax mixture: An open pilot study. *Complement. Ther. Med.* **12**, 45–47 (2004).
144. Salem, A. M., Adams, D., Newman, H. N. & Rawle, L. W. Antimicrobial properties of 2 aliphatic amines and chlorhexidine in vitro and in saliva. *J. Clin. Periodontol.* **14**, 44–47 (1987).
145. Ribeiro, H. G. Developing an antimicrobial product with Portuguese honey and bacteriophages. (Universidade do Minho, Braga, 2016).
146. Lima, I. D. O., Oliveira, R. D. A. G., Lima, E. D. O., Farias, N. M. P. & Souza, E. L. De. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **16**, 197–201 (2006).
147. Arendrup, M. C., Guinea, J, Cuenca-Estrella, M., Meletiadis, j., Mouton, J. W., Lagrou, K., Howard, S. J. EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 7.3 Method for the Determination of Broth Dilution Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungal Agents for Yeasts. (2017).
148. Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D., Azeredo, J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med. Mycol.* **47**, 681–9 (2009).
149. Rodrigues, ME., Lopes, SP., Pereira, CR., Azevedo, NF., Lourenço, A., Henriques, M., Pereira, MO. Polymicrobial ventilator-associated pneumonia: Fighting in vitro *Candida albicans-pseudomonas aeruginosa* biofilms with antifungal-antibacterial combination therapy. *PLoS One* **12**, (2017).
150. Cantón, E., Pemán, J., Gobernado, M., Viudes, A. & Espinel-Ingroff, A. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2477–2482 (2004).
151. Ansari, MJ., Al-Ghamdi, A., Usmani, S., Al-Waili, NS., Sharma, D., Nuru, A., Al-Attal, Y. Effect of jujube honey on *Candida Albicans* growth and biofilm formation. *Arch. Med. Res.* **44**, 352–360 (2013).
152. Kačániová, M., Melich, M., Kňazovická, V., Felšöciová, S. & Sudzinová, J. The antimicrobial activity of honey and propolis against yeasts *Candida* species. *Lucr. Stiint. Zoteh. si Biotehnol.* **42**, (2009).

153. Schneider, M., Coyle, S., Warnock, M., Gow, I. & Fyfe, L. Anti-microbial activity and composition of manuka and portobello honey. *Phyther. Res.* **27**, 1162–1168 (2013).
154. Mulu, A., Diro, E., Tekleselassie, H., Anagaw, B., Alemayehu, M., Gelaw, A., Biadglegne, F., Desalegn, K., Yifiru, S., Tiruneh, M., Kassu, A., Nishikawa, T., Isogai, E. Effect of Ethiopian multiflora honey on fluconazole-resistant *Candida* species isolated from the oral cavity of AIDS patients. *Int. J. STD AIDS* **21**, 741–5 (2010).
155. Welch, K., Cai, Y. & Strømme, M. A Method for Quantitative Determination of Biofilm Viability. *J. Funct. Biomater.* **3**, 418–431 (2012).
156. Shannon, I. L., Edmonds, E. J. & Madsen, K. O. Honey: sugar content and cariogenicity. *ASDC J. Dent. Child.* **46**, 29–33 (1979).
157. Jay, JM., Loessner, MJ., Golden, DA. Modern food microbiology. **7th** edition (New York: Springer Science, 2005).
158. Nassar, H. M., Li, M. & Gregory, R. L. Effect of honey on *Streptococcus mutans* growth and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 536–540 (2012).
159. Atrott, J. & Henle, T. Methylglyoxal in manuka honey - correlation with antibacterial properties. in *Czech Journal of Food Sciences* **27**, (2009).
160. Al-Waili, N. S., Salom, K., Butler, G. & Al Ghamdi, A. A. Honey and Microbial Infections: A Review Supporting the Use of Honey for Microbial Control. *J. Med. Food* **14**, 1079–1096 (2011).
161. Israili, Z. H. Antimicrobial Properties of Honey. *Am. J. Ther.* **21**, 304–323 (2014).
162. Kwakman, P. H. S., te Velde, AA., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, CM., Zaat, SA. How honey kills bacteria. *FASEB J.* **24**, 2576–82 (2010).
163. Chen, YL., Yu, SJ., Huang, HY., Chang, YL., Lehman, VN., Silao, FG., Bigol, UG., Bungay, AA., Averette, A., Heitman, J. Calcineurin controls hyphal growth, virulence, and drug tolerance of *Candida tropicalis*. *Eukaryot. Cell* **13**, 844–854 (2014).
164. Hamers, a D., Shay, K., Hahn, B. L. & Sohnle, P. G. Use of a microtiter plate assay to detect the rate of killing of adherent *Candida albicans* by antifungal agents. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **81**, 44–9 (1996).
165. Campos Machado, F., Portela, MB., Carneiro, A., Sousa, I., Soares, R., Castro, G.. Antifungal activity of chlorhexidine on *Candida* spp. biofilm. *Rev Odontol UNESP, Araraquara. set./out. Machado al. Rev Odontol UNESP* **39**, 271–275 (2010).
166. Franco Neto, C. A., Parolo, C. C. F., Rösing, C. K. & Maltz, M. Comparative analysis of the effect of two chlorhexidine mouthrinses on plaque accumulation and gingival bleeding. *Braz. Oral Res.*

- 22**, 139–144 (2008).
167. MacNeill, S., Rindler, E., Walker, a, Brown, a R. & Cobb, C. M. Effects of tetracycline hydrochloride and chlorhexidine gluconate on *Candida albicans*. An in vitro study. *J. Clin. Periodontol.* **24**, 753–60 (1997).
  168. Bobichon, H. & Bouchet, P. Action of chlorhexidine on budding *Candida albicans*: scanning and transmission electron microscopic study. *Mycopathologia* **100**, 27–35 (1987).
  169. White, T. C., Marr, K. A. & Bowden, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 382–402 (1998).
  170. Ellepola, A. N. B. & Samaranayake, L. P. Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. *Arch. Oral Biol.* **43**, 999–1007 (1998).
  171. Wu, T., Samaranayake, L. P., Cao, B. Y. & Wang, J. In-vitro proteinase production by oral *Candida albicans* isolates from individuals with and without HIV infection and its attenuation by antimycotic agents. *J. Med. Microbiol.* **44**, 311–316 (1996).
  172. Ellepola, a N., Panagoda, G. J. & Samaranayake, L. P. Adhesion of oral *Candida* species to human buccal epithelial cells following brief exposure to nystatin. *Oral Microbiol. Immunol.* **14**, 358–363 (1999).
  173. Barchiesi, F., Calabrese, D., Sanglard, D., Francesco, L., Caselli, F., Giannini, D., Giacometti, A., Gavaudan, S., Scalise, G.. Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1578–1584 (2000).
  174. Mullai, V. & Menon, T. Bactericidal activity of different types of honey against clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Altern. Complement. Med.* **13**, 439–41 (2007).
  175. Roberts, A. E. L., Maddocks, S. E. & Cooper, R. A. Manuka honey reduces the motility of *Pseudomonas aeruginosa* by suppression of flagella-associated genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 716–725 (2015).
  176. Cooper, R. & Molan, P. The use of honey as an antiseptic in managing *Pseudomonas* infection. *J. Wound Care* **8**, 161–4 (1999).
  177. Kothavade, R. J., Kura, M. M., Valand, A. G. & Panthaki, M. H. *Candida tropicalis*: Its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology* **59**, 873–880 (2010).
  178. Thomas, L., Maillard, J. Y., Lambert, R. J. W. & Russell, A. D. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a 'residual' concentration.

- J. Hosp. Infect.* **46**, 297–303 (2000).
179. Heggors, J. P., Robson, M. C., Herndon, D. N. & Desai, M. H. The efficacy of nystatin combined with topical microbial agents in the treatment of burn wound sepsis. *J. Burn Care Rehabil.* **10**, 508–511 (1989).
180. Lu, M., Yu, C., Cui, X., Shi, J., Yuan, L., Sun, S. Gentamicin synergizes with azoles against resistant *candida albicans*. *Int. J. Antimicrob. Agents* (2017).
181. Campeau, M. E. M., Patel, R., Campeau, M. E. M. & Patel, R. Antibiofilm Activity of Manuka Honey in Combination with Antibiotics. *Int. J. Bacteriol.* **2014**, 1–7 (2014).
182. Adeleke, O. E., Olaitan, J. O. & Okpekpe, E. L. Comparative antibacterial activity of honey and gentamicin against *Escherichia coli* and *pseudomonas aeruginosa*. *Ann. Burns Fire Disasters* **19**, 201–204 (2006).