

ATIVIDADE ANTIBIOFILME *IN VITRO* DE LIPOSSOMAS DE FLUCONAZOL¹ *IN VITRO ANTIBIOFILM ACTIVITY OF FLUCONAZOLE LIPOSOMES*

**Mariana Brandão Paz², Diego Becker Borin², Alexandre Machado Rubim³,
Jaqueline Bandeira Rubenick⁴ e Roberto Christ Vianna Santos⁵**

RESUMO

Em consequência do crescente número de pacientes imunodeprimidos, se faz necessário aumentar o grau de atenção a infecções ocasionadas por leveduras oportunistas, especialmente do gênero *Candida* sp. Essas infecções são preocupantes, pois os microrganismos podem se organizar em forma de biofilme, apresentando alta taxa de resistência aos agentes antifúngicos. Portanto torna-se necessário a busca por novas modalidades terapêuticas como a utilização de vetores de biodistribuição nanométricos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibiofilme *in vitro* de fluconazol livre e lipossomas de fluconazol. Utilizando a técnica de formação de biofilmes em placas de poliestireno de 96 poços, verificou-se que a concentração de lipossomas de fluconazol necessária para erradicação do biofilme foi de 12,5%. Quando analisado o fluconazol livre, foi necessária uma concentração de 25%. Este estudo ratifica a necessidade de pesquisas com vetores nanométricos oportunizando a redução na dosagem, diminuindo a frequência utilizada, reduzindo custos da terapia e tornando a toxicidade diminuída.

Palavras-chave: biofilme, antifúngico, nanotecnologia.

ABSTRACT

As a result of the increasing number of immunocompromised patients, it is necessary to increase the level of attention to infections caused by opportunistic yeasts, especially with those of the Candidasp gender. These infections are dangerous because the microorganisms can be organized in the form of biofilm, which has high resistant rates to antifungal agents. Therefore, it becomes necessary to search for new therapeutic modalities such as the use of nanometric biodistribution vectors. The aim of this study is to evaluate the in vitro antibiofilm activity of free fluconazole and fluconazole liposomes. By using the technique of biofilm formation in microtiter plates of 96 wells, it was found out that the concentration of fluconazole of liposomes required for biofilm eradication was of 12.5%. When the free fluconazole was analyzed, it was required a concentration of 25%. This study confirms the need for more researches with nanometric vectors in order to nurture the reduction of the dose, and to decrease the frequency of use, and to reduce the costs and toxicity.

Keywords: biofilm, antifungal agent, nanotechnology.

¹ Trabalho de Iniciação Científica - Centro Universitário Franciscano.

² Alunos do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano.

³ Colaborador - Centro Universitário Franciscano.

⁴ Acadêmica do Curso de Farmácia - Centro Universitário Franciscano.

⁵ Orientador - Centro Universitário Franciscano.

INTRODUÇÃO

Atualmente é notório o aumento da incidência de infecções causadas por fungos, principalmente no ambiente hospitalar (TORTORA et al., 2006) e o gênero *Candida* representa um dos mais frequentemente isolados. Esse gênero é formado por aproximadamente 163 espécies, e dentre elas, cerca de 10 são responsáveis por infecções no homem (OLIVEIRA et al., 2001). O gênero *Candida* representa a quarta causa mais comum de infecções de corrente sanguínea, nos Estados Unidos, com índices de mortalidade que variam de 40 a 60% (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). A *C. albicans* é a espécie mais relevante clinicamente, representando atualmente 50 a 70% de todas as infecções superficiais e invasivas em diferentes tipos de sítios anatômicos (BODEY et al., 2002). Essas infecções invasivas, além de apresentar altas taxas de mortalidade, associam-se a internações prolongadas elevando os custos (GUDLAUGSSON et al., 2003).

Além disso, é constatado que a capacidade do microrganismo em aderir, infectar e causar doença é definida como um potencial de virulência ou patogenicidade, sendo que um dos principais fatores de virulência de *Candida* sp. é a versatilidade de adaptação e adesão em diferentes sítios, principalmente quando associam-se a várias superfícies bióticas e/ou abióticas, compondo dessa forma o biofilme (TAMURA et al., 2007). Estas superfícies podem constituir ambientes propícios à formação de biofilmes, servindo como substrato e suporte para o crescimento microbiano (CHANDRA et al., 2001; FERGUSON et al., 1986), tornando assim difícil o tratamento (POZO; PATEL, 2007).

A fim de prevenir a adesão microbiana, retardar a formação dos biofilmes e eliminar ou pelo menos reduzir a sua acumulação, muitas estratégias ou combinação de estratégias podem ser utilizadas (MACHADO, 2005; PEREIRA, 2001). A utilização de lipossomas (EDWARDS; BAEUMNER, 2006) possibilitaria um tratamento mais eficaz e com menor probabilidade de efeitos adversos, diminuindo a toxicidade associada ao uso dos antifúngicos. Lipossomas são vesículas microscópicas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso, que podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas (BATISTA et al., 2007).

Diante desta problemática induzida pela formação do biofilme e considerando as dificuldades terapêuticas, torna-se importante o desenvolvimento de formulações que aumentem a eficácia do tratamento, fazendo com que as doses sejam diminuídas sem perda da efetividade, minimizando assim o risco de toxicidade. Portanto, a busca por novas modalidades terapêuticas torna-se de fundamental importância. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi testar a atividade antibiofilme *in vitro* de lipossomas de fluconazol.

MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento e caracterização dos lipossomas de fluconazol foram realizados no laboratório de nanotecnologia e a atividade antibiofilme *in vitro* dos lipossomas no laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Franciscano.

REAGENTES, ACESSÓRIOS E EQUIPAMENTOS

Para a produção e caracterização dos lipossomas de Fluconazol, foram utilizados álcool etílico absoluto (Nuclear), Colesterol e Fluconazol (Sigma-Aldrich), Fosfatidilcolina S75 e S100 (Lipoid), Balança Analítica Eletrônica - (Bioprecisa), Rotaevaporador (Fisatom), Vórtex P56 (Phoenix), Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments), Chromafil 0,2µm e 0,45 µm (Macherey-Nagel). Para os estudos envolvendo a formação de biofilme, foi utilizado o caldo Mueller-Hinton (Himedia); estufa de esterilização e estufa bacteriológica (Nova ética, Brasil), Autoclave (Phoenix), Glicose e Corante cristal violeta (Synth, Brasil), leitor de Microplacas (Thermo-Cientific). Os experimentos foram realizados dentro de capela de capela fluxo laminar (Pachane, Brasil).

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ÓTIMA DE GLICOSE

Inicialmente foi realizada a determinação da concentração ótima de glicose para a formação de biofilmes. Foi realizada uma curva de glicose com concentrações que variam de 0 a 3%. A partir dessa concentração, foram realizados os demais testes.

DESENVOLVIMENTO DOS LIPOSSOMAS DE FLUCONAZOL

Os lipossomas foram preparados pelo método de injeção de etanol, utilizando a técnica descrita por Justo e Moraes (2005) com modificações e uma proporção de fosfolípidios, colesterol e polissorbato 80, de 8:2:1 (v/v/v). Foram solubilizados 5 mg de Fluconazol em 1 ml de etanol e injetados em solução salina a 50°C sob agitação, sendo o etanol removido no evaporador rotatório e o volume ajustado para 10 ml. Após este processo, a suspensão passou por um processo de extrusão utilizando filtro de membrana de 0,2 micrometros.

DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO DE PARTÍCULA E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO

As determinações do diâmetro e do índice de polidispersão dos lipossomas foram realizadas através de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer® nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern) de acordo com Justo e Moraes (2005). Os resultados foram expressos em nanômetros (nm) a partir da leitura de três suspensões diferentes.

POTENCIAL ZETA

O potencial zeta foi obtido através de eletroforese (Zetasizer® nano-Zs modelo ZEN 3600, Malvern). Os resultados foram expressos em milivolts (mV) a partir de uma média de três determinações de suspensões diferentes.

DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME

A metodologia foi baseada na técnica de formação de biofilmes em placas de poliestireno de 96 poços descritas por Stepanovic et al. (2000). As placas foram incubadas por 24 e 48h a 37° C. Após o período de incubação, foi realizado o tratamento. Foram testadas as seguintes concentrações de lipossomas de fluconazol e fluconazol livre: 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 e 0,156 mg/ml.

A fim de revelar o biofilme formado, foram removidos os microrganismos não aderentes lavando com água, e corando com solução cristal violeta 0, 2% em cada poço, após sua remoção adicionou-se solução etanol 95%. Determinando a densidade ótica de cada poço em um comprimento de onda de 580 nm (DUPRÉ et al., 2003; TENDOLKAR et al., 2004).

MICRORGANISMOS

Para os ensaios, foi utilizada uma cepa de *C. albicans* de relevante patogenia, pertencente a American Type Culture Collection (ATCC 40006).

Suspensões da cepa teste foram preparadas em caldo Mueller Hinton e padronizadas de acordo com o tubo nº 0,5 da escala McFarland, correspondendo à concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia - (UFC.mL¹).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A formação de biofilme foi avaliada com o auxílio do software Graphpad Prism[®] 5.0 (Graphpad Software, INC). A comparação estatística foi realizada através da análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*) seguida do teste *post hoc* de Tukey. Os resultados foram expressos em média \pm e.p.m, considerando-se significante quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir da caracterização dos lipossomas de fluconazol mostram que a técnica utilizada permitiu a formação de partículas na escala nanométrica. Foram obtidas partículas de pequeno tamanho ($171 \pm 4,5$ nm), com baixo índice de polidispersão ($0,182 \pm 0,053$), caracterizando um sistema com pequena distribuição de tamanho de partículas. Os valores do potencial zeta (PZ) determinados demonstraram que os lipossomas sintetizados possuem carga negativa ($-17,2 \pm 2,1$). O PZ é um parâmetro fundamental para prever a estabilidade dos lipossomas. Esta medida indica a carga de superfície das partículas: quanto maior o valor absoluto, maior será a repulsão eletrostática entre as partículas, mantendo desta forma o sistema mais estável (MEHNERT; MÄDER, 2001;

SCHAFFAZICK et al., 2003). Valores de PZ próximos de -20 mV (como ocorre com os lipossomas de Fluconazol do presente estudo) podem ser considerados satisfatórios para manter a estabilidade do sistema (MORA-HUERAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

A partir dos resultados dos ensaios microbiológicos (figura 1), pode-se observar que a concentração ótima de glicose obtida em 24 horas foi de 1,5%. Assim, a concentração de glicose evidencia que as espécies de *Candida* têm esta característica de dimorfismo, podendo crescer sob a forma de levedura e também sob a forma filamentosa. A maioria das espécies de *Candida* mostram uma predominância da forma filamentosa em meios com concentrações baixas de glicose, e concentrações elevadas de CO₂. Já a forma leveduriforme prevalece quando estas espécies são crescidas em meios com elevadas concentrações de glicose e baixas tensões de CO₂ (CARDOSO, 2004). No estudo de cinética de formação, a maioria dos biofilmes produzidos pelos isolados de *Candida* apresentaram aumento da atividade metabólica até 48h de crescimento e posterior decréscimo. Hawser e Douglas (1994), em experimento utilizando superfície de cateter, também observaram um crescimento máximo dos biofilmes de *C. albicans* até 24 h, com posterior declínio. Tal fato pode ser explicado devido à diminuição do oxigênio e dos nutrientes disponíveis no interior do biofilme. Acredita-se que a limitação de nutrientes no biofilme maduro possa levar à dispersão, mediada por comunicação intercelular, de células-filhas menos aderidas à matriz do biofilme (UPPULURI et al., 2010).

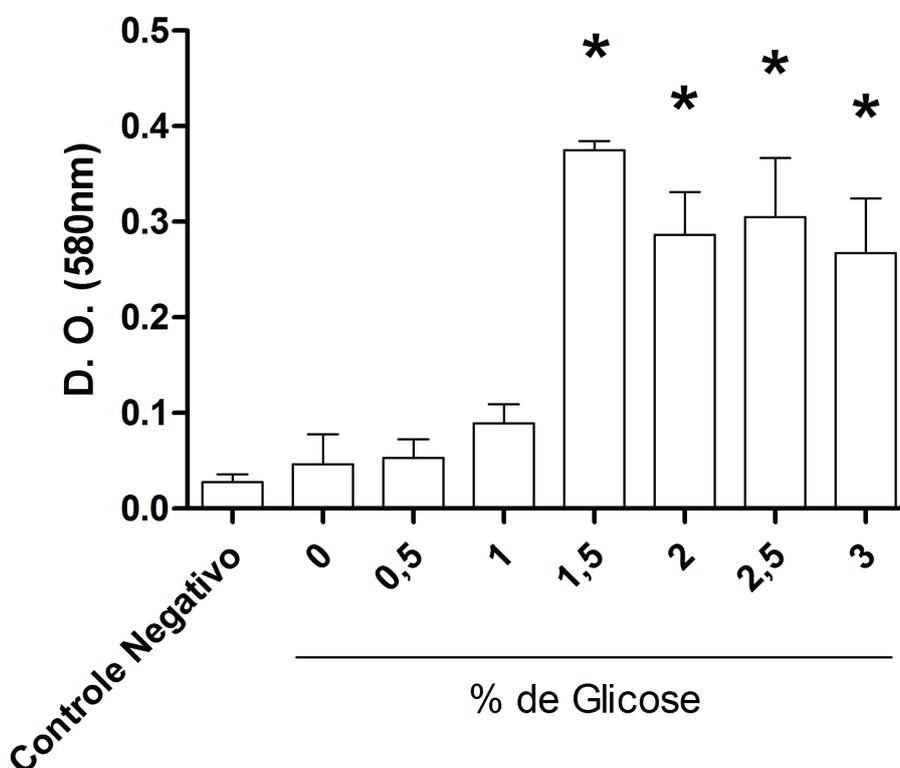


Figura 1 - Determinação da concentração ótima de glicose para a formação de biofilmes de 24h de *C. albicans*. D.O - Densidade ótica. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p<0,05).

Al- Fattani e Douglas (2004) também demonstraram em seus estudos que a glicose é um componente fundamental utilizado pela *C. albicans*. Neste estudo, foi verificado que biofilmes formados em ambientes com menores concentrações de glicose apresentaram uma matriz polimérica menos extensa, sendo mais prontamente penetrados por fármacos e conseqüentemente foi formado um biofilme mais frágil.

Quando analisada a suscetibilidade ao fluconazol livre, observou-se que nas concentrações de 2,5 e 1,25 mg/ml houve ação antibiofilme, diminuindo significativamente o tamanho do biofilme formado, como pode ser visualizado na figura 2 A.

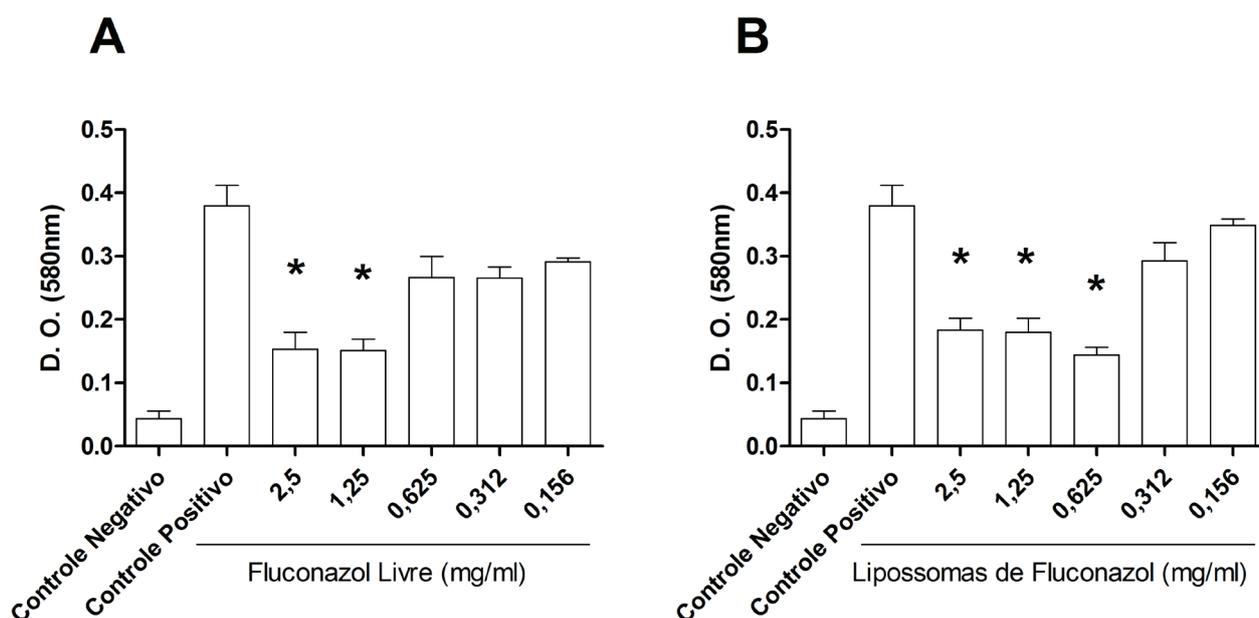


Figura 2 - Avaliação da atividade antibiofilme de Fluconazol Livre (A) e Lipossomas de Fluconazol (B) sobre *C. albicans*. D.O - Densidade ótica. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Infecções associadas a biofilmes são de difícil tratamento uma vez que estas estruturas microbianas apresentam resistência, tanto aos antimicrobianos quanto aos mecanismos de defesa do hospedeiro (HAWSER; DOUGLAS, 1994; KUMAMOTO et al., 2002; KROM et al., 2007). Os derivados azólicos como o fluconazol e o itraconazol têm como mecanismo de ação a inibição da biossíntese do ergosterol pela interação com a enzima lanosterol demetilase, responsável pela conversão do lanosterol a ergosterol, componente essencial da membrana fúngica (WYNN et al., 2003). Segundo Kumamoto et al. (2002), células de *C. albicans* dispostas como biofilme são 100 ou mais vezes resistentes ao fluconazol em comparação às células planctônicas (células não sésseis).

O aumento da resistência ao fluconazol durante a maturação do biofilme parece estar associado com um decréscimo significativo no conteúdo total de ergosterol, devido ao ergosterol ser o sítio de ação dos fármacos azólicos (MUKHERJEE et al., 2003; PÉRMAN et al., 2008). Outra hipótese, para explicar a resistência de biofilmes aos antifúngicos, é a presença da matriz extracelular que teria a

função de impedir a sua difusão para o interior da estrutura formada, e apenas a camada superficial do biofilme estaria exposta a dose letal do fármaco administrado (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2004).

Partindo do resultado obtido do fluconazol livre foram testadas as mesmas concentrações de lipossomas de fluconazol frente a mesma estirpe de *C. albicans*. A menor concentração necessária para inibição do biofilme de *C. albicans* foi de 0,625 ml mg/ como pode ser observado na figura 2 B.

Devido à versatilidade estrutural em termos de tamanho, composição, carga da superfície, fluidez da membrana e habilidade para incorporar fármacos hidrofílicos e/ou lipofílicos, os lipossomas se tornaram potentes carreadores para vários tipos de terapias. Atualmente, são comercializadas formulações contendo lipossomas para o tratamento do câncer e infecções sistêmicas por fungos. O aprofundamento das pesquisas irá possibilitar a consolidação de seu uso na terapia gênica e em vacinas (BATISTA et al., 2007). Alguns antifúngicos azólicos também foram encapsulados em nanocarreadores e testados em modelos animais. Um estudo realizado por Gupta et al. (2000b) em coelhos mostrou que a encapsulação do fluconazol em lipossomas aumentou significativamente a meia vida do fluconazol na cavidade vítrea destes animais. Em outro estudo do mesmo autor, utilizando modelo de endoftalmite induzida por *C. albicans* em coelhos, observou-se que o fluconazol encapsulado em lipossomas apresentou atividade inferior ao fluconazol livre (GUPTA et al., 2000a). Neste caso, Klein (2007) constatou que os lipossomas apresentam a grande vantagem de permitirem veicular o princípio ativo ao local a tratar e promover a libertação controlada e localizada do fármaco, tornando possível administrar doses superiores de medicamento e evitando os efeitos secundários observados nas terapêuticas convencionais.

Outra vantagem é que os lipossomas assemelham-se à membrana das células, por isso, estas partículas interagem mais intimamente e com maior eficiência com as células e tecidos do organismo (CHORILLI et al., 2004). Além disso, os lipossomas são atóxicos, biodegradáveis e podem ser preparados em grande quantidade. Finalmente, por se tratar de partículas em escala nanométrica, podem ser administradas por via intravenosa, ocular, pulmonar, ou dérmica (BATISTA et al., 2007). Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos são altamente versáteis para pesquisa, terapêutica e aplicações analíticas (EDWARDS; BAEUMNER, 2006). Ressalta-se também a grande vantagem de contornar propriedades físico-químicas limitantes dos fármacos não encapsulados (como sua solubilidade em água ou em membranas), melhorando assim a farmacodinâmica (potencialização do efeito terapêutico), a farmacocinética (controle da absorção e distribuição tecidual) e seus efeitos toxicológicos (redução da toxicidade local e sistêmica) (MACHADO et al., 2007). Barrat (2000) demonstrou também que os lipossomas podem oportunizar a redução na dosagem, diminuindo a frequência utilizada sem perda da efetividade, reduzindo custos da terapia e tornando o risco de toxidade menor, demonstrando assim que a estratégia de modificar o perfil de biodistribuição do fármaco é mais eficaz que utilizar o fluconazol livre.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados dos ensaios microbiológicos utilizados, foi verificado que a menor concentração de Fluconazol livre para a erradicação do biofilme formado foi de 1,25 mg/ml. Quando efetuamos a incorporação deste fármaco em lipossomas, a menor concentração necessária para erradicar o biofilme formado foi de 0,625 mg/ml. Na incorporação de Fluconazol aos lipossomas, ocorre a manutenção e potencialização da ação, pois a concentração de lipossomas de fluconazol necessária para o combate do biofilme formado representa metade da concentração de fluconazol na forma livre. As vantagens deste sistema lipossomal podem ocorrer em virtude da diminuição dos custos (em função da diminuição da quantidade de fármaco) e da diminuição dos efeitos indesejáveis, porém mais estudos devem ser realizados para a elucidação destes efeitos tóxicos associados ao uso do fluconazol e lipossomas de fluconazol.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Pró-Reitoria de Pós-graduação, Pesquisa e Extensão (PRPGPE/UNIFRA) pelo suporte financeiro e pela concessão de bolsa modalidade PROBIC.

REFERÊNCIAS

- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 9, p. 3291-3297, 2004.
- BARRATT, G. M.; Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharmaceutical Science Technology Today*, v. 3, n. 5, p. 163-171, 2000.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.
- BODEY, G. P. et al. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* Fungemia in Immunocompromised patients with cancer. *The American Journal of Medical*, v. 112, n. 1, p. 380-385, 2002.
- CARDOSO, B. C. **Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis***. [Dissertação]. Braga: Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga. 2004.
- CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture and drug resistance. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, 2001.

CHORILLI M.; LEONARDI, G. R.; OLIVEIRA, A. G., SCARPA, M. V. Lipossomas em formulações dermatológicas. **Infarma**, v. 16, p. 75-79, 2004.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* sp. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

DUPRÉ, I. et al. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 491-498, 2003.

EDWARDS, K. A., BAEUMNER, A. J. Liposomes in analyses. **Talanta**, v. 68, n. 5, p. 1432-1441, 2006.

FERGUSON, D. J. P. et al. A morphological study of experimental staphylococcal endocarditis and aortitis. II. Interrelationship of bacteria, vegetation and cardiovascularity in established infections. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 67, p. 679-686, 1986.

GUDLAUGSSON, O. et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. **Clinical Infection Diseases**, v. 37, n. 9, p. 1172-1177, 2003.

GUPTA, S. K. et al. Efficacy of fluconazole and liposome entrapped fluconazole for *C. albicans* induced experimental mycotic endophthalmitis in rabbit eyes. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v. 78, n. 4, p. 448, 2000a.

_____. Intravitreal pharmacokinetics of plain and liposome entrapped fluconazole in rabbit eyes. **Journal Ocular Pharmacology Therapy**, v. 16, n. 6, p. 511-518, 2000b.

HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 3, p. 915-21, 1994.

JUSTO, O. R.; MORAES, A. M. Kanamycin incorporation in lipid vesicles prepared by ethanol injection designed for tuberculosis treatment. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p. 23-30, 2005.

KLEIN, T. **Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo fluconazol potencialmente ativo contra esporotricose**. [Dissertação]. Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara; 2007.

KROM, B. P. et al. Optimized Candidal biofilm microtiter assay. **Journal Microbiological Methods**, v. 68, p. 421-423, 2007.

KUMAMOTO, C. A. *Candida* biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 608-611, 2002.

MACHADO, S. M. O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis.** [Dissertação]. Braga: Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga; 2005.

MACHADO, L. C.; GNOATTO, S. A.; KLUPPEL, M. L. W. Lipossomas aplicados em farmacologia: Uma revisão da literatura. **Estudos de Biologia**, v. 29, n. 67, p. 215-224, 2007.

MEHNERT, M.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2-3, p. 165-196, 2001.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmacy**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.

MUKHERJEE, P. K. et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 4333-4340, 2003.

OLIVEIRA, D. R.; MAFFEI, C. M. L.; MARTINEZ, R. **Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*.** [Trabalho]. Ribeirão Preto: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo; 2001.

PEREIRA, O. B. O. **Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme.** [Tese]. Braga: Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga; 2001.

PÉRMAN, J.; CANTÓN, E.; VALENTIN, A. Actividad de la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, p. 124-128, 2008.

POZO, J. L.; PATEL, R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. **Clinical Pharmacologic Therapy**, v. 82, p. 204-209, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

STEPANOVIC, S. et al. Modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation, **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p. 175-179, 2000.

TAMURA, N. K. et al. Fatores de virulência de *Candida sp* isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 91-93, 2007.

TENDOLKAR, M. P. et al. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by enterococcus faecalis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 6032-6039, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. São Paulo: Artmed, 2006.

UPPULURI, P. et al. Dispersion as na important step in the Candida albicans biofilme developmental Cycle. **Plos Pathogens**, v. 6, n. 3, p. 1-13, 2010.

WYNN, R. L.; JABRA-RIZK, M. A.; MEILLER, T. F. Fungal drug resistance, biofilms, and new antifungals. **Journal of General Dentistry**, v. 51, p. 94-108, 2003.