

ATIVIDADE ANTIBIOFILME E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMA CONTENDO ESCINA EM CATETER URINÁRIO¹

ANTIBIOFILM ACTIVITY AND THE CHARACTERIZATION OF LIPOSOME CONTAINING ESCIN ON URINARY CATHETER

Nádia Márcia Dumke², Liana da Silva Fernandes³, Solange Cristina Martins da Silva⁴,
Virginia Cielo Rech⁴, Rodrigo de Almeida Vaucher⁴, Renata Platcheck Raffin⁴,
Roberto Christ Viana Santos⁴ e Patrícia Gomes⁴

RESUMO

Candida albicans tem sido frequentemente associada à formação de biofilmes em materiais médicos hospitalares, como por exemplo, catéteres urinários. Os biofilmes apresentam resistência aos agentes antimicrobianos, o que leva à busca de novas estratégias de tratamento. Com este propósito, por meio da nanotecnologia, utilizaram-se lipossomas contendo escina como uma nova ferramenta terapêutica com o objetivo de melhorar a penetração e matar o microrganismo presente no biofilme. Os lipossomas utilizados foram cedidos gentilmente pela empresa Inventiva® (RS-Brasil), a caracterização físico-química foi realizada através do diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão, pH e a estabilidade após 80 dias. Foram avaliados métodos de formação e aderência de biofilme *in vitro* em cateter urinário utilizando ensaios para quantificação de proteínas e exopolissacarídeos do biofilme de *Candida albicans*. Posteriormente, foi realizado o tratamento com lipossomas contendo 0,5% de escina, lipossomas sem o fármaco e com o fármaco não encapsulado. Os resultados demonstraram a inibição do crescimento fúngico avaliados pelo método de *Calcofluor White Stain* e pela concentração inibitória mínima, de 1,56 µg/mL para o lipossoma contendo a escina, reduzindo o biofilme em 75% quando comparado ao fármaco livre. Já o lipossoma contendo escina a 0,5% na concentração de 1,56 µg/mL diminuiu a aderência e a formação do biofilme em cateter urinário, salientando a eficiência das nanoestruturas lipossomais contra *C. albicans in vitro*. Este estudo poderá ser utilizado em modelos *in vivo* com animais imunossuprimidos.

Palavras-chave: biofilme, *Candida albicans*, material médico hospitalar.

ABSTRACT

Candida albicans has often been associated with the formation of biofilms on medical and hospital materials such as urinary catheters. Biofilms are resistant to antimicrobial agents, which leads to the search for new treatment strategies. For this purpose, by means of nanotechnology, some liposomes containing escin were used as a new therapeutic tool in order to improve the penetration and to kill the microorganisms present in the biofilm. The liposomes used were kindly provided by Inventiva® company (RS-Brazil), the physicochemical characterization was performed by the average particle diameter, polydispersity index, pH and stability after 80 days. The methods for formation and adherence of *in vitro* biofilm on urinary catheter were evaluated using simulations for the quantification of proteins and exopolysaccharides of *Candida albicans* biofilm. Subsequently, it was done a treatment with liposomes containing 0.5% escin, liposomes without the

¹ Trabalho realizado no Programa de Pós-graduação em Nanociências.

² Aluna de mestrado do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano. E-mail: nadiadumke@gmail.com

³ Orientadora - Centro Universitário Franciscano. E-mail: liana@unifra.br

⁴ Colaboradores - Centro Universitário Franciscano. E-mail: scshoelzel@unifra.br; vga.cielo@gmail.com; rodvaucher@hotmail.com; reraffin@gmail.com; robertochrist@gmail.com; patriciagomes0@yahoo.com.br

drug and unencapsulated drug. The results showed the inhibition of fungal growth assessed by the Calcofluor White Stain method and the minimal inhibitory concentration of 1.56 ug/mL for liposomes containing escin, which reduced the biofilm in 75% when compared to the free drug. The liposome containing 0.5% escin at a concentration of 1.56 ug/mL decreased the adherence and biofilm formation in urinary catheter, which highlights the effectiveness of liposome nanostructures against *C. albicans* in vitro. This study may be used in in vivo models with immunosuppressed animals.

Keywords: biofilm, *Candida albicans*, hospital medical supplies.

INTRODUÇÃO

Candida albicans é o principal patógeno responsável por infecções fúngicas adquiridas por humanos em hospitais. Ele pode causar desde infecções superficiais como também a candidíase disseminada com risco de vida, especialmente em pacientes imunodeprimidos como adéticos em tratamento quimioterápico e sujeitos a transplante de órgãos (RAMAN et al., 2014). As células de *Candida* coexistem na microbiota da pele e mucosa humana, sem indução à doença, no entanto, qualquer alteração orgânica favorece sua manifestação infecciosa (RIBEIRO et al., 2004).

C. albicans está entre as poucas espécies de *Candida* considerada colonizadora em hospedeiro humano. Este sucesso está relacionado a sua flexibilidade bioquímica, genética e morfológica que facilita a adaptação a vários nichos hospedeiros, como por exemplo, biofilmes, que também fornecem proteção frente às condições ambientais adversas (POLKE et al., 2015).

Estima-se que mais da metade das infecções hospitalares estejam associadas com a inserção de materiais médico hospitalares (MMH) (RAMAN et al., 2014), devido à formação de biofilmes fúngicos na superfície dos mesmos onde *C. albicans* é o principal patógeno. Isso leva a um grande problema clínico porque as terapias antifúngicas frequentemente falham, fazendo-se necessário a intervenção cirúrgica, ocasionando um elevado custo dos prestadores de assistência médica (RAMAGE et al., 2012).

Os biofilmes são caracterizados por sua elevada resistência a agentes antifúngicos e esta insensibilidade à terapia antimicrobial ainda não está completamente elucidada (RAMAGE et al., 2012). Frente a isso, exige-se uma necessidade de desenvolvimento de novas terapias e o estudo de seus mecanismos de ação faz-se urgente. A nanotecnologia permite criar novos materiais com características funcionais (DURAN et al., 2006; SUH et al., 2009).

Assim, o desenvolvimento de lipossomas com escina torna-se uma nova alternativa terapêutica. Os lipossomas vêm sendo utilizados para reduzir a incidência dos efeitos colaterais dos fármacos, promovendo sua liberação prolongada ao local de ação, aumentando, assim, o intervalo entre a dose aplicada e a sua eficácia (ALAM et al., 2010).

Escina é uma mistura natural de saponinas triterpenóides isolada a partir das sementes da castanha da Índia (*Aesculus hippocastanum*) (FRANICZEK et al., 2015). As saponinas resultam do metabolismo das plantas e estão relacionadas com o seu sistema de defesa (WINA et al., 2005).

A escina exibe várias propriedades farmacológicas tais como: analgésica, anti-inflamatória, antipirética. Porém, relatos sobre atividade antifúngica destes compostos são limitados (FRANICZEK et al., 2015).

A utilização de MMH por períodos prolongados torna-se um risco à saúde, pois, as infecções no trato urinário estão relacionadas ao tempo de permanência do cateter, tornando-se um alvo atrativo para a colonização microbiana e consequente formação de biofilme (STICKLER; MORGAN, 2008).

Um sistema nanoestruturado contendo escina pode aumentar a efetividade do fármaco, favorecendo a sua estabilidade e o tempo de contato entre o microrganismo formador de biofilme, resultando na inibição de biofilme na superfície dos MMH. Assim, no presente trabalho, foi realizada a caracterização físico-química das suspensões nanoestruturadas bem como a sua estabilidade, com o objetivo de avaliar a atividade antifúngica e antibiofilme dos lipossomas contendo escina pelo método *Calcofluor White Stain* que mede a desestruturação do biofilme e a atividade antifúngica através da concentração inibitória mínima (CIM).

METODOLOGIA

REAGENTES E CATETER

A escina (FE) foi adquirida comercialmente da Sigma-Aldrich® (CAS Number 6805-41-0). Todos os outros reagentes utilizados possuem grau analítico. Os MMHs utilizados neste estudo foram catéteres vesicais Foley de duas vias constituídos de látex siliconado e tamanho 16 (French) da marca Solidor registro MS nº10237580014, Lote nº BE14A1630/12K02 com validade 11/2017, os quais foram adquiridos comercialmente e posteriormente conduzidos para o estudo de formação de biofilmes.

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTABILIDADE DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas contendo escina 0,5% (LE), lipossoma sem o fármaco, chamado de lipossoma branco (LB) foram produzidos pela empresa Inventiva® (RS-Brasil). A determinação do pH foi realizada diretamente nos lipossomas, em triplicata, em potenciômetro (Digimed® DM – 20, Brasil) previamente calibrado. As determinações do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta, foram realizados em equipamento Zetasizer® Nano-ZS ZEN 3600 (Malvern, Reino Unido). Para o diâmetro médio e índice de polidispersão foi utilizado o método de espalhamento de luz dinâmico, sendo as suspensões diluídas 500 vezes (v/v) em água ultra-pura. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de três repetições. Para o potencial zeta foi realizada a técnica de mobilidade eletroforética, sendo as amostras previamente diluídas 500 vezes (v/v) em solução de NaCl 10 mM. Os resultados foram expressos em milivolts (mV) a partir da média de três determinações independentes. Posteriormente a produção dos lipossomas, foi avaliada sua estabili-

dade. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os lipossomas analisados quanto ao tamanho das partículas, potencial zeta e pH, após 80 dias de exposição a temperatura ambiente.

MICROORGANISMO E MEIOS DE CULTURA

O microrganismo utilizado neste estudo para a determinação da concentração inibitória mínima e para formação dos biofilmes foi a *Candida albicans* (ATCC 14053). Foram utilizados os meios de cultura Sabouraud Dextrose Agar (Sigma-Aldrich®) para cultivo da *C. albicans* e caldo BHI (Brain Heart Infusion, Himedia®) nos experimentos de formação do biofilme em placas e nos catéteres. O meio RPMI (Gibco - BRL) foi utilizado nos experimentos para a determinação da concentração inibitória mínima.

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A CIM foi determinada frente à cepa de *C. albicans* ATCC 14053 utilizando a técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo M27-A3 do *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2008), com modificações. As concentrações utilizadas do LE e LB variaram entre 0,012 e 1,56 µg/mL e FE de 0,16 a 21 µg/mL diluídos em DMSO na proporção de 100 mg/mL de escina em DMSO, em ensaio de disco difusão em Ágar, o DMSO não apresentou efeito contra o microrganismo *C. albicans*. Para a revelação dos experimentos foi utilizado 20 µL por poço do corante cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio a 2%.

FORMAÇÃO DOS BIOFILMES NAS LÂMINAS E CATÉTERES URINÁRIOS

A formação dos biofilmes foi realizada utilizando duas técnicas diferentes: em lâminas de vidro e em cateter urinário.

Para o primeiro ensaio, foram utilizadas lâminas de vidro da marca Perfecta (26 X 76 mm). A *C. albicans* foi inoculada em ágar BHI e incubada em estufa a 37°C por 24 horas. A partir deste crescimento, foram realizadas suspensões correspondentes a 0,5 na escala de turbidez de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Nas placas de petri contendo as lâminas de vidro no seu interior, foram adicionados 2 mL dessa suspensão e 20 mL de caldo BHI. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Como controles negativos de formação dos biofilmes, foram utilizadas placas contendo lâminas somente com meio de cultura sem o inóculo fúngico. A adesão do microrganismo às lâminas foi verificada pela coloração com *Calcofluor White Stain* como descrito abaixo.

A formação dos biofilmes em catéteres urinários adotado neste estudo foi proposta por Jones e Versalovic (2009), com algumas modificações. Posteriormente, os catéteres urinários foram

seccionados na parte inicial obtendo-se um tamanho de 6 cm cada, sendo transferidos para tubos de ensaio estéreis contendo 7 mL de caldo BHI. Posteriormente, em cada tubo, foi inoculado 700 µL de uma suspensão de *C. albicans* equivalente a 0,5 na escala de turbidez de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), conforme descrito e padronizado por Santos et al. (2012). Os catéteres foram incubados a 35 ± 2 °C para a formação dos biofilmes em SHAKER® (NT 712, Novatecnica®, Brasil) de bancada com plataforma de movimento orbital e avaliados durante 24, 48 e 72 horas. Como controles negativos de formação dos biofilmes, foram utilizados tubos contendo somente o meio de cultura com segmentos dos catéteres sem inóculo fúngico. Decorrido os tempos de incubação para formação dos biofilmes, a aderência do fungo ao cateter foi confirmada pelo ensaio cristal violeta.

COLORAÇÃO COM *CALCOFLUOR WHITE STAIN*

Após a formação do biofilme, as lâminas de vidro foram retiradas da placa de petri e fixadas com acetona P. A. Realizou-se a coloração das lâminas com 10 mL de uma solução de 25 mM do corante *Calcofluor* (Sigma-Aldrich®, Canadá) seguido de incubação à temperatura ambiente durante 1 minuto, conforme descrito por Gonçalves et al. (2006). Posterior a incubação, as lâminas foram lavadas com 100 mL de água destilada estéril, secas a temperatura ambiente, sendo visualizadas em microscópio de fluorescência (Optical Technology, Alemanha). Foram analisados 30 campos de visualização por lâmina em objetivas de 10 e 40x. As imagens foram armazenadas e a quantificação de pixels foi realizada com auxílio do software *Image J*.

ENSAIO DE CRISTAL VIOLETA

Os catéteres foram inicialmente transferidos para tubos novos e secos em estufa a 60°C durante 5 minutos. Após este tempo, foram corados com cristal violeta a 0,1% (INLAB®, Brasil) durante 10 minutos, lavados cinco vezes com NaCl 0,9% e, novamente, secos em estufa a 60°C por 5 minutos. Posteriormente, os catéteres foram transferidos para tubos novos e adicionou-se 7 mL de etanol absoluto para dissolver o cristal violeta. Os tubos foram fechados e incubados à temperatura ambiente durante 10 minutos. Após, 200 µL dos sobrenadantes foram transferidos para microplacas de 96 poços e a densidade óptica (DO) determinada a 480 nm em leitora de microplaca (TP-READER, Thermo-Plate®, Brasil).

TRATAMENTOS COM LE, LB E FE E QUANTIFICAÇÃO DOS BIOFILMES FORMADOS

Após a formação dos biofilmes nas lâminas e nos catéteres urinários, foram realizados os tratamentos com LE, LB e FE na concentração de 1,56 µg/mL, seguido de exposição de 48 horas e

incubação a 35 ± 2 °C. A concentração foi determinada através da quantidade de volume de meios e inóculos utilizados nos experimentos,

A quantificação dos biofilmes foi realizada para estimar o número de fungos que permaneceram após o tratamento de 48 horas com LE, LB e FE. Para as lâminas, foi utilizada a coloração com *Calcofluor*, conforme descrito acima, e, para os cateteres, foram realizadas as determinações das concentrações de proteínas e quantificação de exopolissacarídeos (EPS).

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A determinação da concentração de proteínas dos biofilmes aderidos aos cateteres urinários e tratados com LE, LB e FE foram avaliadas utilizando o método descrito por Bradford (1976) com modificações. Para este ensaio, foi utilizado o reagente de Bradford (Invitrogen, CA, USA) adquirido comercialmente. Uma curva padrão foi realizada com albumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich®, Canadá) nas concentrações de 15,0 a 40,0 µg/mL. Foram adicionados 500 µL do reagente de Bradford e transferidos para cada tubo, em duplicata, sendo, posteriormente, adicionados os pontos da curva padrão ou amostras de biofilmes a serem testadas. As amostras foram agitadas e, após 5 minutos, submetidos à leitura da absorbância a 595 nm, em um espectrofotômetro (UV-VIS Spectrophotometer UV-1650 PC, Shimadzu, Japão). A concentração das amostras foi determinada através da comparação com a curva padrão de BSA, plotada e analisada por análise de regressão linear da curva no programa *GraphPad Prism* Versão 4.1.

QUANTIFICAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)

Após 48 horas de tratamento com LE, LB e FE, os biofilmes presentes nos cateteres foram raspados com agulha estéril juntamente com 1 mL de solução de salina 0,9%. Em seguida, esse volume foi adicionado aos tubos contendo 3 mL de soro de coelho e incubados a 35 °C em estufa bacteriológica durante 48 horas. Posteriormente, as amostras foram colocadas em banho de água fervente por 5 minutos e submetidas à sonicação (Ultra-Sonic (Unique®, Brasil)), a 60% de potência por 30 minutos. Realizou-se uma centrifugação a 1000 rpm por 15 minutos. Após, 1 mL do sobrenadante contendo os EPS, foram precipitados pela adição em gotas a 10 mL de álcool absoluto e submetido a centrifugação a 2400 rpm por 15 minutos. Os precipitados resultantes foram solubilizados com 1 mL de solução salina a 0,9% e digeridos em 7 mL de ácido sulfúrico a 77% com posterior incubação em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida, 1 mL de triptofano a 1% foi adicionado em cada tubo e misturados por inversão. Os tubos de ensaio foram submetidos a um aquecimento em banho maria fervente durante 20 minutos e resfriados em gelo, seguidos pela leitura da absorbância a 500 nm, em

espectrofotômetro (UV-VIS Spectrophotometer UV-1650 PC, Shimadzu, Japão) conforme proposto por Lawrence e Betty (1989).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas por análise de variância de uma via, seguido por teste de Tukey, quando o valor de FE foi significativo. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes para um $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* versão 4.0 (Graphpad Software, INC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTABILIDADE DOS LIPOSSOMAS

O valor de pH das suspensões para o LB foi 5,67 e LE de 3,98, demonstrando um caráter ácido. Essa diminuição do pH do lipossoma contendo o fármaco pode ser devido a presença de um grupamento carboxila na aglicona ou na cadeia de açúcares da escina (SIRTORI, 2001). A ação desses grupamentos sobre as membranas celulares pode alterar a sua permeabilidade ou até mesmo levar à destruição de microrganismos (COSTANTINI, 1999; SCHENKEL et al., 2001).

Os resultados obtidos a partir da caracterização dos LE e LB mostraram que a técnica utilizada permitiu a formação de partículas na escala nanométrica. Foram obtidas partículas de LB no tamanho 367,6 nm e índice de polidispersão (PDI) 0,332 e LE no tamanho 224 nm e PDI 0,215, caracterizando um baixo índice de polidispersão para ambas, demonstrando um sistema com adequada distribuição de tamanho de partículas. De acordo com Frézard et al. (2005), as propriedades farmacológicas dos lipossomas podem fazer com que este seja um sistema ideal de entrega de fármacos e o tamanho exerce influência na sua eficiência, podendo ser reconhecidos e capturados pelos macrófagos. Assim, lipossomas menores serão capturados com menor eficiência e permanecerão por um maior tempo na corrente circulatória, aumentando o tempo de liberação do ativo.

As determinações dos valores do potencial zeta para LE foi de -32,0 mV e LB - 19,6 mV demonstraram que os lipossomas possuem carga negativa. O potencial zeta é um parâmetro fundamental para prever a estabilidade dos lipossomas. Segundo Van de Ven et al. (2011), uma alta carga de superfície, tanto positiva quanto negativa, é geralmente preferida uma vez que não só assegura a estabilidade coloidal das nanopartículas durante a armazenagem, mas também, promove a absorção celular dessas nanopartículas.

O estudo da estabilidade dos lipossomas em relação ao diâmetro das partículas foi analisado com o intuito de observar possíveis ocorrências de agregação dos lipossomas. As amostras de lipossomas foram analisadas imediatamente após o recebimento do fabricante e após repouso de 80 dias a temperatura ambiente, ao qual não demonstraram alterações em suas características. Para o potencial zeta, as alterações foram mínimas, sendo que LE apresentou potencial de -18,9 mV e LB de -29,4 mV. Esse fato demonstrou que o sistema apresentou uma estabilidade coloidal entre as partículas. Já o valor de pH das suspensões para os LB foi de 5,45 e LE de 3,78, demonstrando uma pequena alteração neste parâmetro.

Segundo Vemuri e Rhodes (1995), as formulações de lipossomas devem ser acompanhadas durante toda a sua armazenagem para garantir a sua estabilidade, controlando-a através das caracterizações dessa nanoestrutura. Segundo Sharma e Sharma (1997), a instabilidade dessas estruturas pode ocorrer devido a processos químicos, físicos e biológicos, dependendo de sua formulação e de seus constituintes.

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

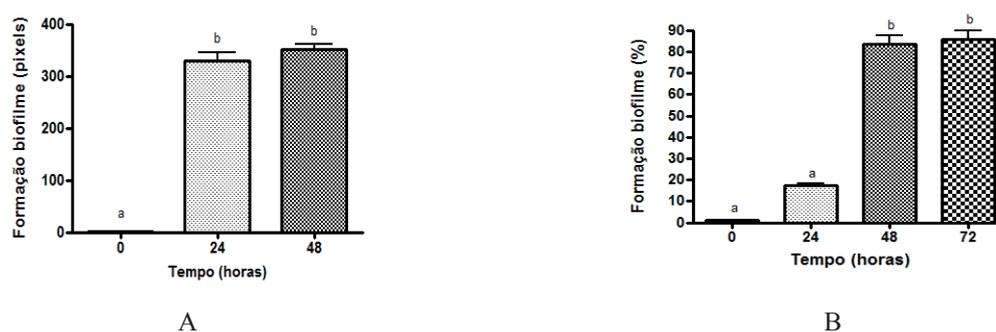
A determinação da CIM da LE, LB e FE foram realizadas conforme descrito no protocolo M27A3. Pode-se observar que após 48 horas o FE obteve uma CIM de 5,25 µg/mL, o LB apresentou a CIM de 0,78 µg/mL e o LE 0,39 µg/mL. Essa atividade antifúngica pode estar relacionada à presença de saponinas e alguns estudos já reportaram tal atividade (YANG, 2006; CHAPAGAIN et al., 2007). Contudo, a atividade de lipossomas contendo escina ainda não foi descrita. O aumento da atividade antifúngica do LE após 48 horas comparado ao FE pode ser atribuído ao fato que lipossomas são estruturas formadas por moléculas lipídicas, as quais possuem similaridade funcional e estrutural de uma célula. Eles podem armazenar substâncias hidrossolúveis em seu interior e substâncias lipofílicas e anfifílicas em suas membranas, aos quais podem ser transferidas a outras membranas, podendo, então, permear nessas (EGBARIA; WEINER, 1991; ALVES; MARTINS; SANTANA, 2008).

Existem outros relatos do aumento da atividade antimicrobiana após a incorporação em nanomateriais (PAL et al., 2007; SANTOS et al., 2014; VAUCHER et al., 2015). Recentemente, Giongo et al. (2015), reportou uma CIM para nanocápsulas contendo o óleo de gerânio de 149,7 µg/mL, sendo está capaz de reduzir significativamente este microrganismo em aproximadamente 5 log as unidades formadoras de colônias (UFC).

FORMAÇÃO DOS BIOFILMES NAS LÂMINAS E CATÉTERES URINÁRIOS

A figura 1 (A) e (B) demonstra a formação dos biofilmes de *C. albicans* nas lâminas e nos catéteres urinários.

Figura 1 - Formação dos biofilmes de *Candida albicans* em lâminas de vidro (A) e catéteres urinários (B). Os dados foram expressos como médias \pm desvio padrão dos pixels (lâminas de vidro) e percentagem de formação (%) (catéteres urinários). Os valores foram estatisticamente significativos se $p < 0,05$ quando comparado ao tempo 0. As médias seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes.



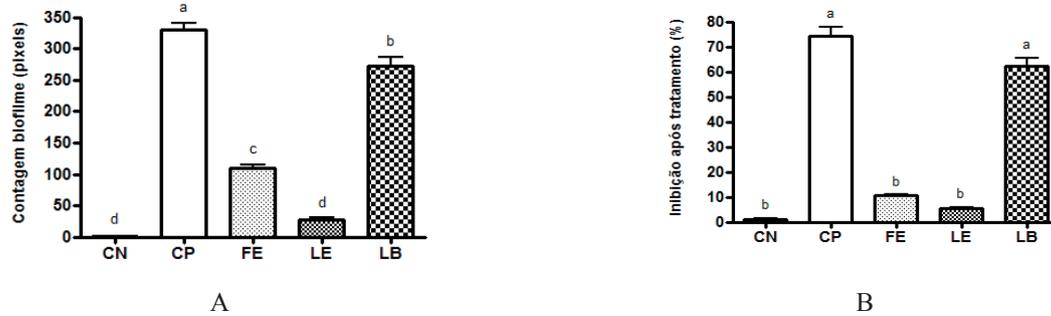
Após a utilização da coloração com Calcofluor, pode-se evidenciar a formação do biofilme na lâmina após 24 horas não ocorrendo aumentando significativamente decorridos 48 horas. Já, para os biofilmes, formados em catéteres urinários quantificados por cristal violeta e expressos como percentagem de formação, pode-se observar que um aumento significativo na formação do mesmo após 24 horas de incubação não sendo evidenciada diferença significativa com 48 e 72 horas. Recentemente, Alavarce et al. (2015), usando placas de acrílico, verificaram a capacidade de adesão e formação de biofilmes por espécies de *Candida* dentro de 12 horas. Contudo, ainda é escassa a utilização de materiais médicos hospitalares como catéteres urinários como modelo para a formação de biofilmes “*in vitro*”.

TRATAMENTOS COM LE, LB E FE E QUANTIFICAÇÃO DOS BIOFILMES

A atividade antibiofilme foi avaliada através a quantificação dos biofilmes formados através da utilização da coloração com *Calcofluor* (expresso em pixels) e cristal violeta (expressa percentagem de inibição) após tratamento com do FE, LE e LB na concentração de 1,56 $\mu\text{g/mL}$ conforme mostrado na figura 2 (A) e (B), respectivamente.

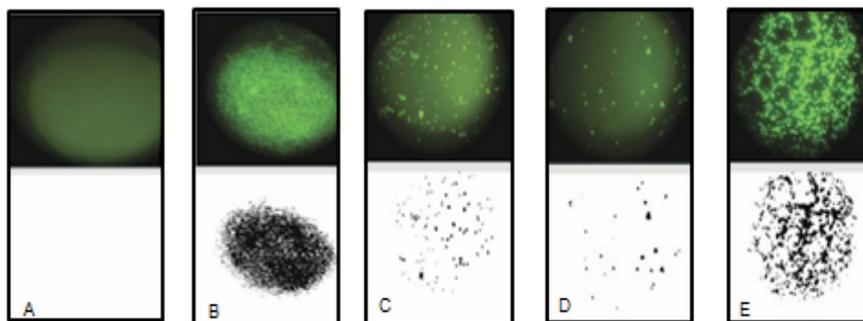
Conforme demonstrado na figura 2, o FE e LE inibiram significativamente a formação do biofilme de *C. albicans* quando comprado ao controle positivo nas lâminas e nos catéteres urinários tratados após 48 horas.

Figura 2 - Quantificação dos biofilmes de *Candida albicans* em lâminas de vidro (A) utilizando a coloração de Calcofluor e catéteres urinários (B) pelo método cristal violeta: (CN) Controle negativo, (CP) Controle de formação, (FE) Fármaco escina 1,56 µg/mL, (LE) Lipossoma de escina 1,56 µg/mL e (LB) Lipossoma branco. Os dados foram expressos como médias ± desvio padrão dos pixels (lâminas de vidro) e percentagem de formação (%) (catéteres urinários). Os valores foram estatisticamente significativos se $p < 0,05$ quando comparado ao tempo 0. As médias seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes.



Por outro lado, oLB não alterou significativamente os biofilmes formados, quando analisados através da técnica de cristal violeta. Na figura 3 estão representados os biofilmes formados nas lâminas e corados com *CalcoFluor* após 48 horas de tratamento. Os resultados apresentados exemplificados nas imagens armazenadas e quantificadas em pixels com auxílio do software *Image J*. Evidencia-se uma redução significativa dos biofilmes após tratamento com FE e LE na concentração de 1,56 µg/mL conforme reportado anteriormente na figura 2B.

Figura 3 - Coloração de Calcofluor para a quantificação do biofilme em lâmina após 48 horas de tratamento dos biofilmes em lâmina: A) (CN) Controle negativo - 0 pixel, B) (CP) Controle de formação -330 pixels, C) (FE) Fármaco escina 1,56 µg/mL - 110 pixels, D) (LE) Lipossoma de escina 1,56 µg/mL - 27 pixels e E) (LB) Lipossoma branco - 273 pixels.



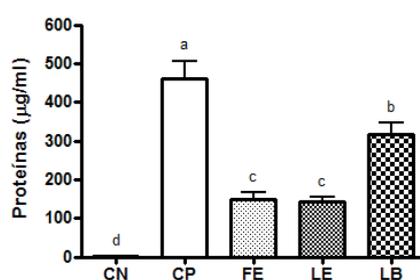
Devido à dificuldade de tratamento com antimicrobianos e os altos índices de infecções associadas à formação de biofilmes em materiais hospitalares, os resultados apresentados nesse estudo são promissores. Sabe-se que microrganismos de ambientes hospitalares apresentam grande resistência a novos tratamentos e também dependem dos mecanismos de defesa do hospedeiro (HAWSER; DOUGLAS, 1994; KUMAMOTO, 2002; KROM et al., 2007). Recentemente, um estudo realizado por Paz et al. (2013) avaliou a suscetibilidade do fluconazol livre e lipossomas de fluconazol frente a

biofilmes de *C. albicans*. Foi demonstrado que ocorreu uma diminuição do biofilme após utilização de 0,625 mg/mL do lipossoma com fluconazol e 1,25 mg/mL para o fluconazol livre. Esse resultado evidencia o benefício na utilização de fármacos nanoestruturados que apresentem atividade frente a esse microrganismo.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A determinação da concentração de proteínas presentes nos biofilmes após tratamento com FE, LE e LB na concentração de 1,56 µg/mL foi determinada nos catéteres urinários. Tais resultados podem ser observados na figura 4.

Figura 4 - Quantificação de proteínas dos biofilmes formados nos catéteres urinários após tratamento utilizando o método de Bradford: (CN) Controle negativo, (CP) Controle de formação, (FE) Fármaco escina 1,56 µg/mL, (LE) Lipossoma de escina 1,56 µg/mL e (LB) Lipossoma branco. Os dados foram expressos como médias ± desvio padrão e reportados como µg/mL de proteína. Os valores foram estatisticamente significativos se $p < 0,05$ quando comparado ao CN. As médias seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes.



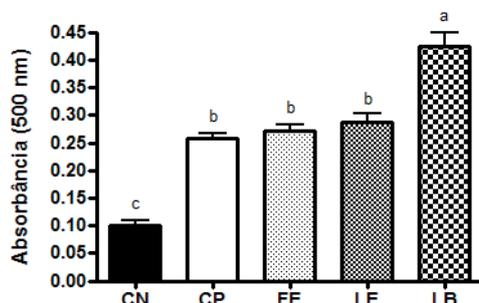
Ocorreu uma diminuição significativa nas proteínas dos biofilmes tratados com FE e LE nessa concentração se comparado ao controle positivo. Contudo, os lipossomas não diminuíram significativamente as proteínas dos biofilmes se comparado ao FE. Os resultados confirmam os demonstrados pelo ensaio de cristal violeta. Contudo, não foi possível evidenciar por este ensaio uma diminuição significativa do biofilme tratado com FE e LE.

Sabe-se que os biofilmes são constituídos por água, células, proteínas, produtos resultantes da lise celular e EPS. As proteínas são componentes de todas as células vivas e com sucesso têm sido utilizadas como medida da biomassa celular em biofilmes (BEHLAU; GILMORE, 2008). Alguns estudos têm utilizado este método para avaliar a capacidade de diminuir o biofilme fúngico após tratamento do mesmo com nanomateriais (DE SOUZA et al., 2014; ALAVARCE et al., 2015).

QUANTIFICAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)

Na figura 5 pode ser observada a quantificação de exopolissacarídeos (EPS) presentes nos biofilmes após tratamento com FE, LE e LB na concentração de 1,56 µg/mL nos catéteres urinários.

Figura 5 - Quantificação de exopolissacarídeos (EPS) dos biofilmes formados nos catéteres urinários após tratamentos. (CN) Controle negativo, (CP) Controle de formação, (FE) Fármaco escina 1,56 µg/mL, (LE) Lipossoma de escina 1,56 µg/mL e (LB) Lipossoma branco. Os dados foram expressos como médias ± desvio padrão. Os valores foram estatisticamente significativos se $p < 0,05$ quando comparado ao CN. As médias seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes.



Foi demonstrado que não ocorreu uma diminuição significativa dos exopolissacarídeos para os tratamentos com FE e LE se comparados ao LB na concentração testada. Contudo, o controle positivo teve um aumento significativo na quantificação de EPS, quando comparado com o controle negativo. Sabe-se que estas substâncias poliméricas extracelulares formam um emaranhado polimérico que envolve todas as células fúngicas, representam cerca de 70 a 95% da matéria orgânica da massa seca do biofilme. Segundo Kumar e Anand (1998), o aumento do EPS está intimamente associado ao aumento do tamanho do biofilme e sua capacidade de aderência a distintos substratos. A produção de EPS aumenta com as adesões dos microrganismos às superfícies e se as células dos biofilmes voltarem ao meio como células planctônicas, deverá ocorrer uma redução na produção de EPS (GEHRKE et al., 1998).

CONCLUSÃO

Os catéteres são amplamente utilizados em medicina, permitindo a administração de medicamentos, remoção de materiais biológicos e nutrição de pacientes. Contudo, sua utilização está associada a um aumento do risco de desenvolver infecções pela colonização de microrganismos e formação de biofilmes. Um dos principais microrganismos envolvidos na formação de biofilmes é o fungo *C. albicans* responsável, juntamente com bactérias, pela contaminação de materiais médicos hospitalares. Os dados do presente estudo confirmam que a escina (FE) e o lipossoma com escina (LE) podem potencializar a abordagem terapêutica para prevenir ou tratar infecções por *C. albicans* em catéteres urinários. Os diferentes métodos utilizados permitiram observar o potencial antibiofilme do LE quando comparado ao FE, através da redução de 75% na atividade antifúngica no ensaio de Coloração de *CalcoFluor* pela contagem de pixels. Somado a isso, as suspensões lipossomais demonstraram-se estáveis após o período de 80 dias, permanecendo sem alterações significativas para

diâmetro médio de partícula e índice de polidispersão, pois, não ocorreram alterações físico-químicas caracterizando, assim, um sistema estável. Demonstrando ser uma nanoestrutura promissora para o tratamento dos biofilmes de *C. albicans* em catéteres urinários.

REFERÊNCIAS

ALAM, M. I. et al. Strategy for effective brain drug delivery. **European Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 5, p. 385-403, 2010.

ALVES, G. P.; MARTINS, F.; SANTANA, M. H. A. Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos. **Fármacos & Medicamentos**, São Paulo, v. 9, p. 44-50, 2008.

ALAVARCE, R. A. S. et al. The Beneficial Effect of Equisetum giganteum L. against *Candida* Biofilm Formation: New Approaches to Denture Stomatitis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

BEHLAU, I.; GILMORE, M. S. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. **Arch Ophthalmol.**, v. 126, n. 11, p. 1572-1581, 2008.

BRADFORD, M. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHAPAGAIN, B. P. et al. In vitro study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 26, p. 109-115, 2007.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard M27-A3. 3. ed. **Wayne**: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

COSTANTINI A. Escin in pharmaceutical oral dosage forms: quantitative densitometric HPTLC determination. **Il Farmaco**, v. 54, p. 728-732, 1999.

DE SOUZA, M. E. et al. Antibiofilm Applications of Nanotechnology. **Fungal Genom Biol**, v. 4, 2014.

DURAN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia**: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo: Artliber p. 11-15, 2006.

EGBARIA, K.; WEINER, N. Topical application of liposomal preparations. **Cosm. Toil.**, v. 106, n. 3, p. 79-93, 1991.

FRANICZEK, R. et al. β -Aescin at subinhibitory concentration (sub-MIC) enhances susceptibility of glabrata clinical isolates to nystatin. **Med Mycol.** Jun 19. pii: myv035, 2015. [Epub ahead of print]

FRÉZARD, F. et al. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

GEHRKE, T. et al. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferro oxidans* for bleaching. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2743-2747, 1998.

GIONGO, J. L. et al. Antimycobacterial, antimicrobial and antifungal activities of geranium oil loaded nanocapsules. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 414-419, 2015.

GONÇALVES, A. B. et al. Fish and calcofluor staining techniques to detect in situ filamentous fungal biofilms in water. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 23, p. 194-198, 2006.

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.

JONES, S.; VERSALOVIC, J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 35, p. 35-43, 2009.

KROM, B. P. et al. Optimized Candidal biofilm microtiter assay. **J. Microb. Meth.**, v. 68, p. 421-423, 2007.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review International. **Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 1/2, p. 9-27, 1998.

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

LAWRENCE, D.; BETTY, H. Quantitative assay of glycocalyx produced by Viridans group Streptococci that cause Endocarditis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 9, p. 2039-2041, 1989.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1712-1720, 2007.

PAZ, M. B. et al. Atividade antibiofilme de Lipossomas de Fluconazol. **Disciplinarum Scientia, Série Ciências Naturais e Tecnológicas**, v. 14, p. 23, 2013.

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. *Candida* survival strategies. **Adv Appl Microbiol.**, v. 91, p. 139-235, 2015.

RAMAGE, G. et al. Fungal biofilm resistance. **Int J Microbiol.**, v. 2012, Article ID528521, 14 p, 2012.

RAMAN, N. et al. Polymer multilayers loaded with antifungal β -peptides kill planktonic *Candida albicans* and reduce formation of fungal biofilms on the surfaces of flexible catheter tubes. **J Control Release**, v. 191, p. 54-62, 2014.

RIBEIRO, E. L. et al. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas às infecções nosocomiais. **News Lab.**, Goiás, v. 64, n. 1, p. 106-128, 2004.

SANTOS, R. et al. Antimicrobial activity of Amazonian oils against *Paeni bacillus* species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, p. 265-268, 2012.

SANTOS, R. C. V. et al. Antimicrobial activity of teatree oil nanoparticles against American and European foul brood diseases agents. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 17, n. 3, p. 343-347, 2014.

SCHENKEL, E. P. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, cap. 27, p. 597-619, 2001.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposome in drug delivery: progress and limitations. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 154, p. 123-140, 1997.

SIRTORI, C. R. Aescin: Pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 3, p. 183-193, 2001.

STICKLER, D. J.; MORGAN, S. D. Observations on the development of the crystalline bacterial biofilms that encrust and block Foley catheters. **Journal of Hospital Infection**, v. 69, n. 4, p. 350-360, 2008.

SUH, W. H. et al. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. **Progress in Neurobiology**, v. 87, p. 133-170, 2009.

VAN DE VEN, H. et al. PLGA nanoparticles loaded with the anti leishmanial saponin escin: Factor influence study and in vitro efficacy evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, p. 122-132, 2011.

VAUCHER, R. A. et al. Antimicrobial activity of nanostructured Amazonian oils against *Paenibacillus* species and their toxicity on larvae and adult worker bees. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 18, p. 205-210, 2015.

VEMURI, S.; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharm. Acta Helvetica**, Berne, v. 70, p. 95-111, 1995.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Production - A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 8093-8105, 2005.

YANG, C. R. et al. Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 1710-1714, 2006.