

Artigo

Síntese, Toxicidade e Atividade da Carboximetilquitosana na Formação de Biofilme por *Candida* sp.**Ribeiro, C. L.; Bukzen, A. L.; Ribeiro, E. L.; Silva, M. R. R.; Signini, R.; Naves, P. L. F.****Rev. Virtual Quim.*, 2015, 7 (6), 2113-2123. Data de publicação na Web: 3 de outubro de 2015<http://www.uff.br/rvq>**Synthesis, Toxicity and Activity of Carboxymethyl Chitosan on Biofilm Formation by *Candida* sp.**

Abstract: Increasing incidence of infections caused by *Candida* sp. and its resistance to antifungals justify the research of novel compounds with antimicrobial activity. Carboxymethylchitosan is a derivative of chitosan with properties such as biocompatibility, biodegradability and solubility in a wide range of pH and for these reasons is interested in medical and pharmaceutical areas. In this study, carboxymethylchitosan was obtained by carboxymethylation of chitosan and then purified and characterized by analysis of solubility degree, solubility at different pH ranges and infrared spectroscopy. The toxicity of the compound was determined by brine shrimp lethality assay, and its activity was subsequently evaluated in biofilm formation by *Candida* yeasts. The results showed an initial weight gain, after purification, a loss of the total weight of the polymer, the degree of substitution was influenced by the reaction conditions and the reaction time, the compound was soluble in a wide pH range including groups acid-neutral-base. It was found that the carboxymethylchitosan was non-toxic against *Artemia salina* in the evaluated concentrations and showed no significant inhibitory activity against biofilm formation by *Candida* sp. The lack of toxicity increases the prospect of further applications of the compound, for example, as a carrier and a complexing agent with proven antifungal compounds.

Keywords: Carboxymethylchitosan; toxicity; biofilm; *Candida* sp.

Resumo

O aumento da incidência de infecções provocadas por *Candida* sp. e da resistência aos antifúngicos reforçam a necessidade de investigação de compostos inovadores com atividade antimicrobiana. A carboximetilquitosana é um derivado da quitosana que possui propriedades tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e solubilidade em um amplo espectro de pH e por estes motivos tem despertado interesse nas áreas médicas e farmacêuticas. Neste estudo, a carboximetilquitosana foi obtida por carboximetilação da quitosana e depois purificada e caracterizada através de análise de grau de solubilidade, solubilidade em diferentes faixas de pH e espectroscopia de infravermelho. A toxicidade do composto foi determinada pelo ensaio de letalidade de *Artemia salina*, posteriormente foi avaliada a sua atividade na formação de biofilme por leveduras do gênero *Candida*. Os resultados demonstraram um ganho de massa inicial, e após a purificação, uma perda de massa total do biopolímero, o grau de substituição foi influenciado pelas condições reacionais e pelo tempo de reação, o composto foi hidrossolúvel numa ampla faixa de pH compreendendo faixas de ácido-neutro-base. Constatou-se que a carboximetilquitosana foi atóxica contra *Artemia salina* nas concentrações avaliadas e não apresentou atividade inibitória significativa contra a formação de biofilme por *Candida* sp. A ausência de toxicidade reforça a perspectiva de novas aplicações do composto, como por exemplo, como carreador e agente complexante de compostos com comprovada ação antifúngica.

Palavras-chave: Carboximetilquitosana; toxicidade; biofilme; *Candida* sp.

* Universidade Estadual de Goiás, Laboratório de Bioensaios, Unidade de Ciências Exatas e Tecnológicas, BR153 nº 3105, Fazenda Barreiro do Meio, Caixa Postal 459, CEP 75132-903, Anápolis-GO, Brasil.

✉ plinionaves@ueg.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20150124](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150124)

Síntese, Toxicidade e Atividade da Carboximetilquitosana na Formação de Biofilme por *Candida* sp.

Charles L. Ribeiro,^a Andrea L. Bukzen,^b Evandro L. Ribeiro,^c Maria do Rosário R. Silva,^c Roberta Signini,^b Plínio Lázaro F. Naves^{a,*}

^a Universidade Estadual de Goiás, Laboratório de Bioensaios, Unidade de Ciências Exatas e Tecnológicas, BR153 nº 3105, Fazenda Barreiro do Meio, Caixa Postal 459, CEP 75132-903, Anápolis-GO, Brasil.

^b Universidade Estadual de Goiás, Laboratório de Físico-química, Unidade de Ciências Exatas e Tecnológicas, BR153 nº 3105, Fazenda Barreiro do Meio, Caixa Postal 459, CEP 75132-903, Anápolis-GO, Brasil.

^c Universidade Federal de Goiás, Laboratório de Micologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia-GO, Brasil.

* plinionaves@ueg.br

Recebido em 17 de novembro de 2014. Aceito para publicação em 29 de setembro de 2015

1. Introdução

2. Materiais e Métodos

2.1. Síntese e purificação da carboximetilquitosana

2.2. Caracterização de carboximetilquitosana

2.3. Ensaio de letalidade de artemia salina

2.4. Ensaio de formação de biofilme

2.5. Avaliação da atividade da carboximetilquitosana na formação de biofilme

3. Resultados e discussão

4. Conclusão

1. Introdução

Relatos de infecções humanas associadas a patógenos fúngicos apresentaram um significativo aumento nos últimos anos. A partir da década de 1980, constatou-se a emergência de infecções fúngicas nosocomiais causadas principalmente por leveduras do gênero *Candida*, representando um sério problema de saúde.^{1,2}

As leveduras do gênero *Candida* são consideradas os terceiros agentes etiológicos comumente observados em casos de sepse em centros de terapias intensivas. O aumento do número de pacientes imunocomprometidos, principalmente portadores do vírus HIV e o aumento da resistência aos antifúngicos disponíveis são os principais responsáveis pela elevada prevalência desta infecção.^{3,4} A capacidade de colonização a distintos substratos

formando biofilmes confere maior resistência aos antimicrobianos.⁵⁻¹⁰

Os agentes terapêuticos indicados para tratamento de invasão na corrente sanguínea, como anfotericina B, nistatinas e derivados azólicos, possuem efeitos tóxicos, especialmente quando do seu uso prolongado, e devido a estes eventos colaterais a busca por novos modelos terapêuticos torna-se fundamental.^{11,12}

Além disso, as infecções fúngicas frequentemente apresentam recidivas e são de difícil controle, fato que justifica a necessidade de desenvolvimento de novas terapias antifúngicas. Os antifúngicos disponíveis podem ser inibitórios do crescimento ou mesmo causar a morte de leveduras em fase de crescimento, mas são incapazes de atuar com a mesma eficácia contra os mesmos micro-organismos quando crescem associados a biofilmes, que são considerados como um importante fator de virulência.¹³⁻¹⁶

A carboximetilquitosana é um derivado da quitosana com uma ampla gama de propriedades, incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, mucoadesividade, solubilidade em uma ampla faixa de pH e em água e capacidade de atuar na modulação celular.¹⁷⁻²¹

No presente estudo objetivou-se sintetizar a carboximetilquitosana por carboximetilação da quitosana, purificá-la e caracterizá-la através de análise de grau de solubilidade, solubilidade em diferentes faixas de pH e espectroscopia de infravermelho e analisar sua toxicidade e atividade na formação de biofilme em *Candida* sp.

2. Materiais e Métodos

2.1. Síntese e purificação da carboximetilquitosana

A síntese da carboximetilquitosana seguiu a metodologia utilizada por Abreu²² com

modificações. Foram suspensas 9 g de quitosana (Galena, lote 1108001902) com tamanho médio de grãos de 150 µm em 195 mL de isopropanol e mantida sob agitação por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados lentamente 61,2 g de solução aquosa de hidróxido de sódio 40% (m/V) e 43,2 g de solução de ácido monocloroacético em isopropanol (1:1 m/m), deixando ocorrer a reação por 24h sob agitação magnética a temperatura ambiente ($\approx 25^{\circ}\text{C}$).

Após a reação, o resíduo foi filtrado e suspenso em 450 mL de metanol 80%, sendo em seguida neutralizado com ácido acético glacial. O resíduo sólido foi filtrado novamente e lavado várias vezes com etanol 80%, etanol absoluto, e metanol absoluto, sendo em seguida seco a temperatura ambiente ($\approx 25^{\circ}\text{C} - 1 \text{ atm}$).

Para a purificação foram adicionados 1,5 g de carboximetilquitosana em 750 mL de água destilada, sendo a suspensão mantida sob agitação por cerca de 24 horas e filtrada sob pressão positiva através de membranas de dimensões de poros de 5 µm, 1,2 µm e 0,8 µm. Foram adicionadas 750 mL de NaCl 0,2 mol.L⁻¹ a solução resultante; permanecendo sob agitação durante cerca de 30 minutos. Em seguida, foi adicionado etanol 95%, em proporções de 100 mL e com forte agitação até sua total precipitação, sendo o precipitado filtrado e lavado com soluções de etanol a 75%, 80% e 90% (v/v) e etanol absoluto e seco a temperatura ambiente.

2.2. Caracterização de carboximetilquitosana

Os derivados secos de carboximetilquitosana foram caracterizados quanto ao grau de substituição por titulação potenciométrica, solubilidade em diferentes faixas de pH e por espectroscopia na região do infravermelho.

Para determinação do grau de substituição (GS), 0,25 g da carboximetilquitosana foi suspensa em 250

mL de água deionizada ficando sob agitação por 18 horas, em seguida adicionou-se 0,21 mL de HCl concentrado. Em seguida uma alíquota de 100 mL de solução foi titulada em titulador automático, modelo 877 Titripplus com solução aquosa padronizada de NaOH 0,1 mol.L⁻¹. Esta análise foi realizada em duplicata e O grau de substituição (GS) foi calculado de acordo com Abreu.²²

A determinação da solubilidade da carboximetilquitosana em diferentes faixas de pH foi baseada na turbidez de suas soluções em água. As amostras foram dissolvidas em água deionizada e o pH das soluções (Cp = 1,5 g.L⁻¹) foi ajustado com soluções aquosas de HCl e NaOH 0,5%. A transmitância das soluções foi registrada em espectrômetro UV (QUIMIS, modelo: 0798U2V5), utilizando-se uma cela de quartzo de 1 cm. A análise foi realizada considerando o aumento da absorção associada diretamente a turbidez das soluções, pois o aumento ou mesmo a diminuição do pH das amostras decorre a insolubilidade e as soluções passam a possuir suspensões.

Nas análises de espectroscopia no infravermelho, as amostras foram previamente secas em estufa a vácuo a 60 °C por 12 h e pulverizadas com KBr grau espectroscópico na proporção de 1/100 (m/m). As misturas resultantes foram prensadas em formato de pastilhas e secas em estufa a vácuo a 60 °C por 24 h. A análise de todas as amostras foi realizada em espectrofotômetro de infravermelho Perkin-Elmer modelo Spectrum Frontier FT-IR/NIR (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT), na região espectral entre 4000 a 400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹.

2.3. Ensaio de letalidade com *Artemia salina*

A metodologia foi adaptada de Molina & Said.²³ Neste ensaio foi empregado o meio de água marinha sintética preparado com a

dissolução em água destilada de sal marinho (40 g.L⁻¹) suplementado com extrato de leveduras (6 mg.L⁻¹) e esterilizado em autoclave. O pH foi ajustado a 8,5 com solução de Na₂CO₃ 0,1 mol.L⁻¹. Oitenta miligramas dos cistos foram incubadas por 36 horas em 1 L do meio com iluminação natural, com temperatura ambiente e oxigenação constantes. Após a eclosão, os náuplios foram atraídos por fonte de luz, pipetados e transferidos para uma placa de Petri com 5 mL de meio fresco de água marinha sintética.

O bioensaio foi realizado em microplaca de poliestireno estéril de 96 poços na qual foram adicionados diferentes concentrações (50 mg.mL⁻¹; 25 mg.mL⁻¹, 12,5 mg.mL⁻¹, 6,25 mg.mL⁻¹ e 3,125 mg.mL⁻¹) de carboximetilquitosana. Os náuplios foram distribuídos na placa, padronizando um total de 10±1 de indivíduos em cada poço. Foram incluídos nos ensaios controles negativos, de viabilidade e de letalidade utilizando K₂Cr₂O₇. Os resultados permitiram o cálculo da DL₅₀ pelo método gráfico para dose resposta - Próbito, no programa *Statplus 2009 professional* (AnalystSoft). Todos os ensaios realizados foram feitos em triplicata e de maneira independente.²⁴

2.4 Ensaio de formação de biofilme

Doze leveduras do gênero *Candida* provenientes do Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Goiás: *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, isolados clínicos de *C. albicans* - Ca05, Ca19, Ca26, Ca33, Ca34, Ca35; isolados clínicos de *C. parapsilosis* - Cp38, Cp120 e *C. tropicalis* - Ct154 e Ct155, foram incubadas em ágar Sabouraud dextrose a 35°C por 48h, posteriormente três colônias típicas foram transferidas para o caldo Sabouraud dextrose e incubadas a 35°C por 24h. Em seguida, 500 µL⁻¹ do caldo crescido foram transferidos para 4,5 mL⁻¹ de caldo RPMI 1640 e alíquotas de 200 µL⁻¹ foram colocadas em poços de placas de microtitulação de poliestireno, que

foram incubadas a 35 °C por 24h.⁷

As placas foram posteriormente tratadas segundo metodologia descrita por Naves *et al.*²⁵. As densidades ópticas obtidas foram utilizadas para a determinação do índice de Formação de Biofilme (FB) por meio da fórmula $FB = DO_{ia} - DO_c$, na qual a DO_{ia} = Densidade óptica a 492 nm das leveduras aderidas; DO_c = Densidade óptica a 492 nm do controle não inoculado.

Para a quantificação do biofilme formado realizou-se análises descritivas, incluindo valor da média e da variabilidade (desvio padrão e quartis) e os resultados obtidos foram classificados semiquantitativamente.

2.5. Avaliação da atividade da carboximetilquitosana na formação de biofilme

A formação de biofilme em poços pré-tratados com carboximetilquitosana foi avaliada por meio metodologia proposta por Naves *et al.* (2010).²⁶ Sucintamente, 200 μL^{-1} da solução de carboximetilquitosana em água destilada estéril com concentração de 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram colocados em poços das microplacas durante 1h e 24h a 35 °C, em seguida os poços foram lavados asépticamente com caldo RPMI 1640,

secados por 20 minutos a 35°C e foram realizados os ensaios de formação de biofilme conforme previamente descrito.

Todos os ensaios foram feitos em triplicata, incluídos controles de esterilidade e de crescimento das leveduras na ausência da carboximetilquitosana. Os resultados foram analisados semiquantitativamente a fim de avaliar a significância em amostras diferentes em um dado momento e das mesmas amostras em tempos diferentes o teste T de *Student* pareado e não pareado, com $p < 0,05$.

3. Resultados e discussão

A síntese da carboximetilquitosana foi realizada em duas etapas: a alcalinização e a eterificação. Na etapa de alcalinização, a quitosana foi tratada com solução de hidróxido de sódio na presença de isopropanol que atua simultaneamente como agente intumescedor e diluente facilitando a penetração do NaOH, que age como agente desprotonante (base) na estrutura da quitosana. Na segunda etapa, ácido monocloroacético foi adicionado ao meio reacional promovendo a eterificação do álcali de quitosana (Figura 1).²⁷

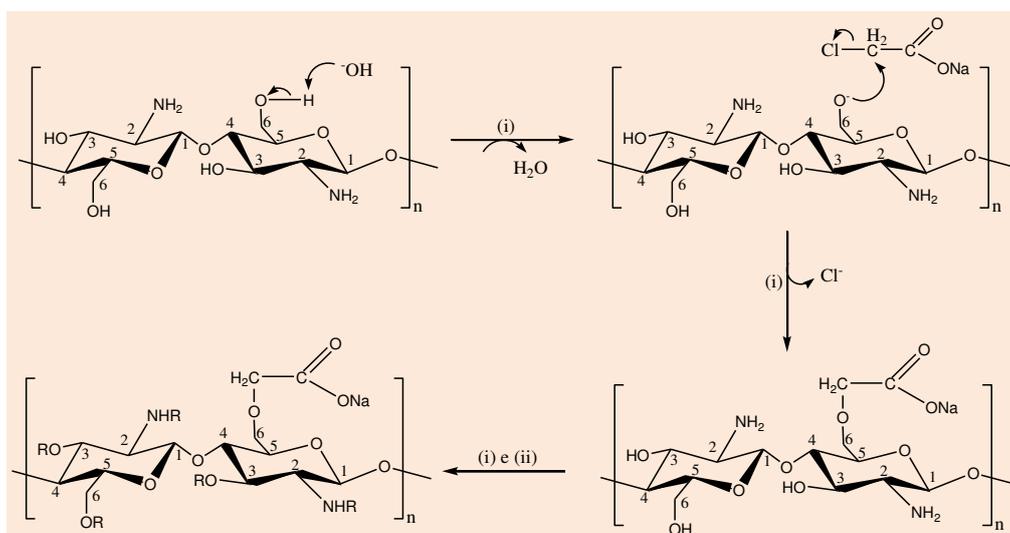


Figura 1. Mecanismo da reação de carboximetilação da quitosana: (i) alcalinização e (ii) eterificação (R=H ou CH_2COONa)

Durante a reação de carboximetilação ocorre a formação de glicolato de sódio pela reação entre o ácido monocloroacético e o hidróxido de sódio (Eq. 1). O glicolato é

eliminado na etapa de purificação através da lavagem com misturas etanol/água dos derivados carboximetilados.



O grau de substituição médio (%GS) da carboximetilaquitosana foi de $1,73 \pm 0,07$. Na Figura 2 é mostrada a curva de titulação potenciométrica. O grau de substituição é um nível médio de grupamentos CH_2COO^- que

substituíram o H presente nos grupamentos OH; principalmente nas posições C-6 e C-3 dos monômeros da cadeia polimérica de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose.

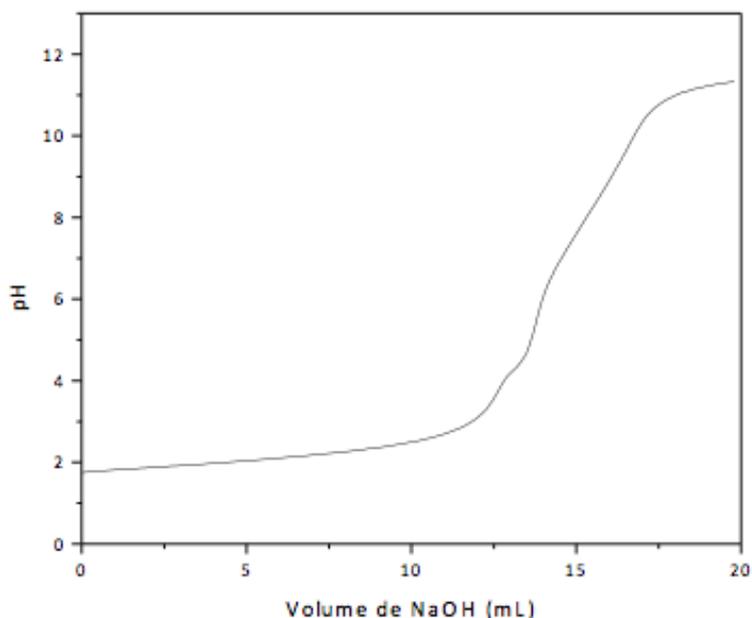


Figura 2. Curva de titulação potenciométrica da carboximetilquitosana com NaOH

O teste de solubilidade em diferentes faixas de pH da carboximetilquitosana demonstrou que o biopolímero foi solúvel em faixas de pH variando de 1,40 a 2,40 e 3,90 a 12,30. O composto foi insolúvel apenas na faixa entre 2,4 a 3,9, o que reforça a boa solubilidade do biopolímero sintetizado, inclusive em pH fisiológico (Figura 3).

Os compostos carboximetilados de quitosana são considerados os mais interessantes, particularmente pela sua

capacidade de dissolução em água e em uma ampla faixa de pH. Alguns trabalhos demonstram que a carboximetilquitosana é insolúvel em faixa de pH ácido²⁷, outros que a carboximetilquitosana é solúvel em pH ácido e neutro e insolúvel em pH básico.²⁸ As diferenças encontradas nos diversos estudos poderiam ser explicadas pela origem das quitosanas utilizadas, bem como pelos diferentes processos de carboximetilação.



Figura 3. Faixas de solubilidade (■) e insolubilidade (□) da carboximetilquitosana em diferentes faixas de pH

A análise comparativa dos espectros de infravermelho da quitosana e carboximetilquitosana permite avaliar as modificações químicas ocorridas nos monômeros do biopolímero após o processo de carboximetilação da quitosana (Figura 4).

Os espectros de quitosana e carboximetilquitosana permitem a identificação de que na amostra de quitosana existem bandas em cerca de 3428 cm^{-1} , característica de estiramento axial de O-H e N-H, em 2921 cm^{-1} , pico típico de estiramento de C-H; em 1659 cm^{-1} , pico característico da banda de deformação axial de C=O (banda de amida I); em 1603 cm^{-1} ,

característico da deformação angular de N-H; em 1377 , característico de deformação angular simétrica de CH_3 ; em 1320 , característico de deformação angular assimétrica de amida III e em 1051 , deformação angular de C-O.²⁹

No composto carboximetilado foram identificados picos bastante intensos em 1603 cm^{-1} e 1419 cm^{-1} , característicos das deformações axiais simétricas e assimétricas de COO, respectivamente, além de um aumento na intensidade do pico em 1320 , correspondente ao estiramento C-O-C, todos comprovando a ocorrência da carboximetilação da quitosana.³⁰⁻³²

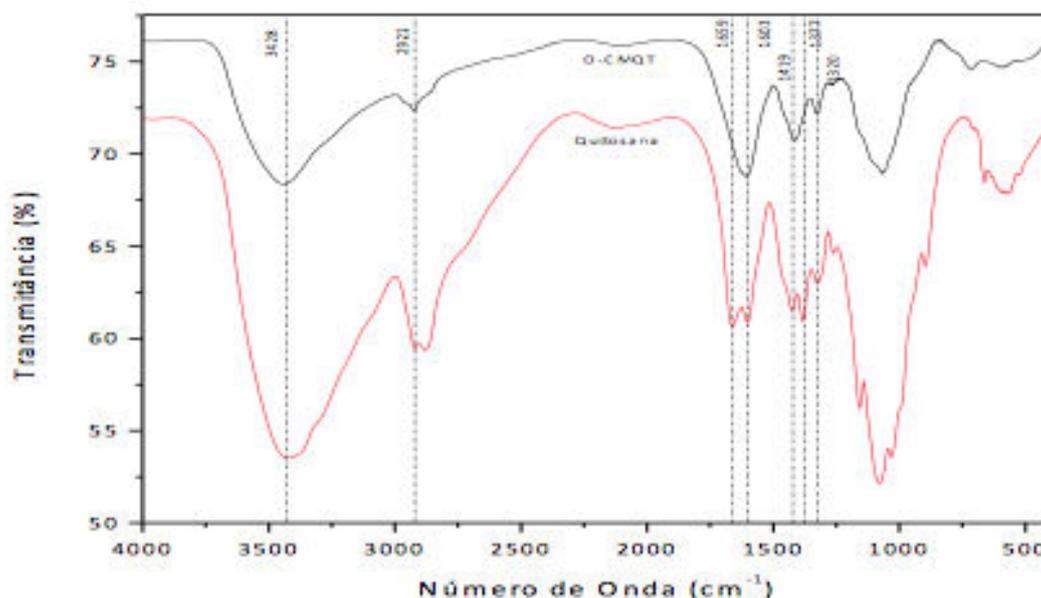


Figura 4. Espectros de infravermelho quitosana e carboximetilquitosana

A carboximetilquitosana não apresentou toxicidade nas concentrações testadas ($\text{DL}_{50} > 50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). A máxima concentração foi

limitada pelo aumento considerável de viscosidade e inchamento do composto nos testes.

O teste de letalidade de *Artemia salina* possui boa correlação quando comparado a outros testes de validação da toxicidade e bioatividade, por isso vem sendo amplamente utilizado na triagem da atividade biológica de vários compostos naturais e sintéticos,³³⁻³⁵ cujo aumento da mortalidade é proporcional ao aumento da concentração do composto avaliado; através dessa proporcionalidade de dose efeito determina-se a DL₅₀ [36].

Candida albicans quando comparadas com as demais espécies avaliadas no presente estudo – *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* – apresentaram maior capacidade de formação. Outros autores verificaram este fenômeno, assim como uma maior taxa de crescimento e complexidade dos biofilmes, como também considerável

produção de enzimas hidrolíticas e atividade hemolítica.^{14,37,38}

As maiores formadoras de biofilme foram *C. albicans* - ATCC 12031, Ca34 e Ca35, enquanto as que apresentaram menores capacidades de formação de biofilme foram cepas tanto de *C. albicans* quanto de *Cândidas* não albicans - Ca19, Ca26, Ct155 e CpATCC 22019. (Figura 5)

Constatou-se que nos poços pré-tratados com a carboximetilquitosana houve aumento da densidade óptica que indica a formação de biofilme, notadamente para as leveduras Ca19, CpATCC 220119, Cp120 e Ct155 nas placas que foram pré-tratadas durante 24 horas. Identificou-se um aumento na capacidade de formação de biofilme na presença de carboximetilquitosana em cepas que apresentaram baixa capacidade nos poços controle.

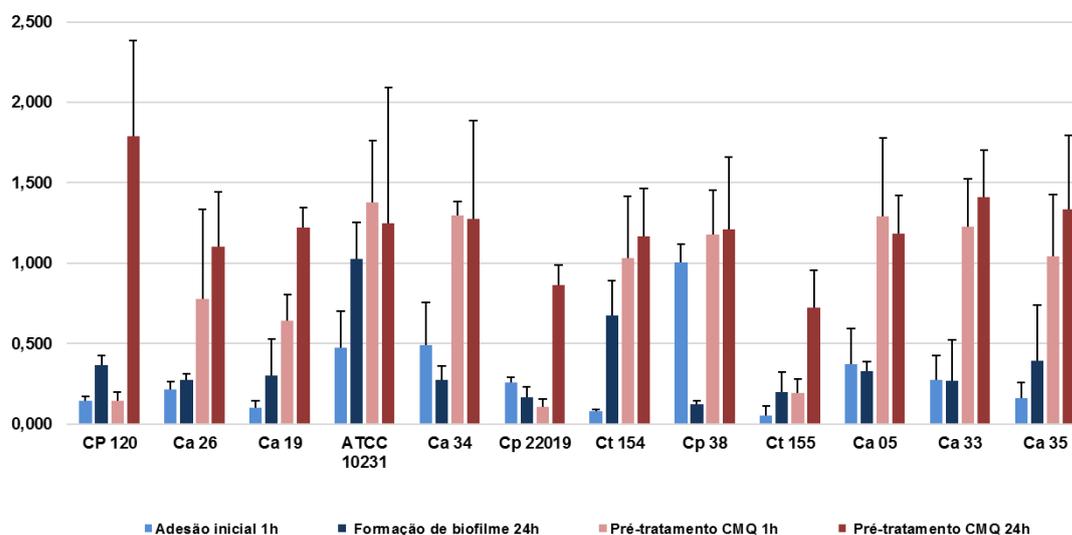


Figura 5. Formação de biofilme por *Candida albicans* (Ca), *Candida parapsilosis* (Cp) e *Candida tropicalis* (Ct)

A atividade da carboximetilquitosana pode ser explicada pela formação de uma película na superfície dos poços, pois o biopolímero possui propriedades hidrofóbicas e pode ter condicionado a

superfície do poliestireno, deixando-a mais susceptível a formação de biofilme.^{39,40}

Os dados obtidos confrontam os apresentados por Tan *et al.* (2011)⁴¹ que

propuseram a utilização de carboximetilquitosana como agente antibiofilme contra estirpes bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, pois neste estudo não foi observado o mesmo fenômeno de inibição de formação do biofilme fúngico.

4. Conclusão

A formação biofilme é considerada um importante fator de virulência de *Candida*. Estas leveduras podem crescer como biofilmes nas superfícies da maioria dos dispositivos médicos, e portanto são responsáveis por uma considerável morbidade e mortalidade em ambientes hospitalares. Crescendo em biofilmes, estes micro-organismos expressam elevada resistência aos agentes antimicrobianos que pode ser até mil vezes maior do que as células planctônicas.⁴²

Neste trabalho mostrou-se que a carboximetilquitosana foi atóxica nas concentrações avaliadas e que induziu de maneira significativa a formação de biofilmes por *Candida* sp. A ausência de toxicidade do composto reforça a perspectiva de novas aplicações principalmente nas áreas médicas e biomédicas, atuando como carreador de compostos com comprovada eficiência terapêutica ou antimicrobiana.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa concedido pelo Edital Universal nº 17/2011, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida ao primeiro autor e a Universidade Estadual de Goiás, pela bolsa concedida aos dois últimos autores pelo Programa de Bolsa de Incentivo à Pesquisa e Produção Científica (PROBIP).

Referências Bibliográficas

- ¹ Varo, S. D.; Martins, C. H. G.; Cardoso, M. J. O.; Sartori, F. G.; Montanari, L. B.; Pires-Gonçalves, R. H. Isolamento de fungos filamentosos em água utilizada em uma unidade de hemodiálise. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2007**, *40*, 326. [CrossRef] [PubMed]
- ² Vidigal, P. G.; Svidzinski, T. I. E. Leveduras nos tratos urinário e respiratório: Infecção fúngica ou não? *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* **2009**, *45*, 55. [CrossRef]
- ³ Bernardes, I.; Rodrigues, M. P. F.; Bacelli, G. K.; Munin, E.; Alves, L. P.; Costa, M.S. Aloe vera extract reduces both growth and germ tube formation by *Candida albicans*. *Mycoses* **2011**, *55*, 257. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴ Pinto, E.; Vale-Silva, L.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology* **2009**, *58*, 1454. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵ Henning, M. M.; Perrone, M. Factores determinantes de patogenicidad en relación a la ecologia de *Candida albicans* en cavidad bucal. *Acta Odontológica Venezolana* **2001**, *39*. [Link]
- ⁶ Gallardo-Moreno, A. M.; González-Martín, M.L.; Pérez-Giraldo, C.; Garduño, E.; Bruque, J. M.; Gómez-García, A. C. Thermodynamic analysis of growth temperature dependence in the adhesion of *Candida parapsilosis* to polystyrene. *Applied and Environmental Microbiology* **2002**, *68*, 2610. [CrossRef] [PubMed]
- ⁷ Jain, N.; Kohli, R.; Cook, E.; Gialanella, P.; Chang, T.; Fries, B. C. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, *73*, 1697. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ Katragkou, A.; Chatzimoschou, A.; Simitsopoulou, M.; Dalakiouridou, M.; Diza-Mataftsi, E.; Tsantali, C.; Roilides, E. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilm. *Antimicrobial Agents and*

- Chemotherapy* **2008**, *52*, 357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁹ Gondim, B. A.; Brito D. V. D.; Brito C. S.; Donlinger, E. J. O.V.; Abdallah, V. O. S.; Filho, P. P. G. Fatores de risco para colonização e sepse por *Candida albicans* e *Candida* não-albicans em neonatos críticos. *Arquivos de ciências da saúde* **2009**, *16*, 105. [[Link](#)]
- ¹⁰ Reis, N. T. P.; Lelis, T. C.; Mendonça, A. T.; Chavasco, J. K. Avaliação da ação de extratos vegetais sobre a formação de biofilme por *Candida albicans*. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde* **2011**, *9*, 337. [[CrossRef](#)]
- ¹¹ Oliveira, J. C. *Tópicos em Micologia Médica*. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Controlab; 1999. [[Link](#)]
- ¹² Montanari, C. A.; Bolzani, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova* **2001**, *24*, 105. [[CrossRef](#)]
- ¹³ La Fleur, M. D.; Lucumi, E.; Napper, A. D.; Diamond, S. L.; Lewis, K. Novel high-throughput screen against *Candida albicans* identifies antifungal potentiators and agents effective against biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2011**, *66*, 820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁴ Kuhn, D. M.; Chandra, J.; Mukherjee, P. K.; Ghannoum, M. A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and Immunity* **2002**, *70*, 878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁵ Tamura, N. K.; Negri, M. F. N.; Bonassoli, L. A.; Svidzinski, T. I. E. Fatores de virulência de *Candida* spp. Isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2007**, *40*, 91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁶ Costa, K. R. C.; Candido, R. C. O papel do biofilme de *Candida* na infecção. *NewsLab* **2009**, *94*, 124.
- ¹⁷ Zhu, A.; Chan-Park, M. B.; Dai, S.; Li, L. The aggregation behavior of O-carboxymethylchitosan in dilute aqueous solution. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2005**, *43*, 143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁸ Lamas, J. C. Carboximetilquitosanas: Preparação, caracterização e aplicação como agentes de estabilização de suspensões aquosas de alumina. **2008**. 103f. Dissertação (Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo), 2008.
- ¹⁹ Zhu, A. P.; Zhao, F.; Fang, N. Regulation of vascular smooth muscle cells on poly (ethylene terephthalate) film by O-carboxymethylchitosan surface immobilization. *Journal of Biomedical Materials Research* **2008**, *86*, 467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁰ Guo, Z.; Chen, R.; Xing, R.; Liu, S.; Yu, H.; Pibo, W.; Li, C.; Li, P. Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities *in vitro*. *Carbohydrate Research* **2006**, 341, 351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²¹ Yin, L.; Fei, L.; Cui, F.; Tang, C.; Yin, C. Superporous hydrogels containing poly (acrylic acid-co-acrylamide) O-carboxymethyl chitosan interpenetrating polymer networks. *Biomaterials* **2007**, 1258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²² Abreu, F. R.; Campana-Filho, S. P. Characteristics and properties of carboxymethylchitosan. *Carbohydrate Polymers* **2009**, *75*, 214. [[CrossRef](#)]
- ²³ Molinas-salinas, G. M.; Said-Fernández, S. A modified microplate cytotoxicity with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacologyonline* **2006**, *3*, 633. [[Link](#)]
- ²⁴ Rahman, A.; Choudhary, M. I.; Thomsen, W. J. *Bioassay Techniques for Drug Development*. 1ª. ed. Singapore: Taylor & Francis e-Library, 2005.
- ²⁵ Naves, P.; del Prado, G.; Huelves, L.; Gracia, M.; Ruiz, V.; Blanco, J.; Dahbi, G.; Blanco, M.; Ponte, C.; Soriano, F. Correlation between virulence factors and *in vitro* biofilm formation by *Escherichia coli* strains. *Microbial Pathogenesis* **2008**, *45*, 88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁶ Naves, P. L. F.; Prado, G.; Huelves, L.; Rodrigues-Cerrato, V.; Ruiz, V.; Ponte, M. C.; Soriano, F. Effects of human serum albumin, ibuprofen and N-acetyl-L-cysteine against biofilm formation by pathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of Hospital Infection* **2010**, *76*, 165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁷ Mourya, V.; Inamdar, N. N.; Tiwari, A. Carboxymethyl chitosan and its applications.

- Advanced Material Letters* **2010**, *1*, 11. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁸ Tungtong, S. et al. Solubility, viscosity and rheological properties of water-soluble chitosan derivatives. *Maejo International Journal of Science and Technology* **2012**, *6*, 315. [\[Link\]](#)
- ²⁹ Chen, X.-G.; Park, H.-J. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. *Carbohydrate Polymers* **2003**, *53*, 355. [\[CrossRef\]](#)
- ³⁰ Miao, J.; Chen, G.; Gao, C.; Lin, C.; Wang, D.; Sun, M. Preparation and characterization of N,O-carboxymethyl chitosan (NOCC) polysulfone (PS) composite nanofiltration membranes. *Journal of Membrane Science* **2006**, *280*, 478. [\[CrossRef\]](#)
- ³¹ Ghaee, A.; Shariaty-Niassar, M.; Barzin, J.; Matsuura, T. Effects of chitosan membrane morphology on copper ion adsorption. *Chemical Engineering Journal* **2010**, *165*, 46. [\[CrossRef\]](#)
- ³² Vaghani, S.; Patel, M.; Satish, C. Synthesis and characterization of carboxymethyl chitosan hydrogel: Application as site specific delivery for lercanidipine hydrochloride. *Bulletin of Materials Science* **2012**, *35*, 1133. [\[CrossRef\]](#)
- ³³ Pisutthanan, S.; Plianbangchang, P.; Pisutthanan, N.; Ruanruay, S.; Muanrit, O. Brine shrimp activity of thai medicinal plants in the family *Meliaceae*. *Naresuan University Journal* **2004**, *12*, 13. [\[Link\]](#)
- ³⁴ Luna, J. S.; Santos, A. F.; Lima, M. R. F.; Omena, M. C.; Mendonça, F. A. C.; Bieber, L. W.; Santana, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, *97*, 199. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ³⁵ Krishnaraju, A. V.; Rao, T. V. N.; Sunda-Raraju, D.; Vanisree, M.; Tsay, H. S.; Subbaraju, G. V. Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using Brine Shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. *International Journal of Applied Science and Engineering* **2005**, *3*, 125. [\[Link\]](#)
- ³⁶ Parra, A. L.; Yhebra, R. S.; Sardiñas, I. G.; Buela, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* **2001**, *8*, 395. [\[CrossRef\]](#)
- ³⁷ Colombo, A. L.; Guimarães, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2003**, *36*, 599. [\[CrossRef\]](#)
- ³⁸ Rorig, K. C. O.; Calocite, J.; Abegg, M. A. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2009**, *42*, 225. [\[Link\]](#)
- ³⁹ Blanco, M. T.; Sacristián, B.; Lúcio, L.; Blanco, J.; Pérez-Giraldo, C.; Gómez-García, A. C. La hidrofobicidad de la superficie celular como indicador de otros factores de virulencia em *Candida albicans*. *Rev. Iberoam. Mic.* **2010**, *27*, 195. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴⁰ Anitha, A.; Rani, V. V. D.; Krishna, R.; Sreeja, V.; Selvamurugan, N.; Nair, S. V.; Tamura, H.; Jayakumar, R. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan O-carboxymethyl and N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* **2009**, *78*, 672. [\[CrossRef\]](#)
- ⁴¹ Tan, Y.; Han, F.; Ma, S.; Yu, W. Carboxymethyl chitosan prevents formation of broad-spectrum biofilme. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *84*, 1365. [\[CrossRef\]](#)
- ⁴² Tobudic, S.; Kratzer, C.; Lassnigg, A.; Presterl, E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycosis* **2012**, *55*, 199. [\[CrossRef\]](#)