

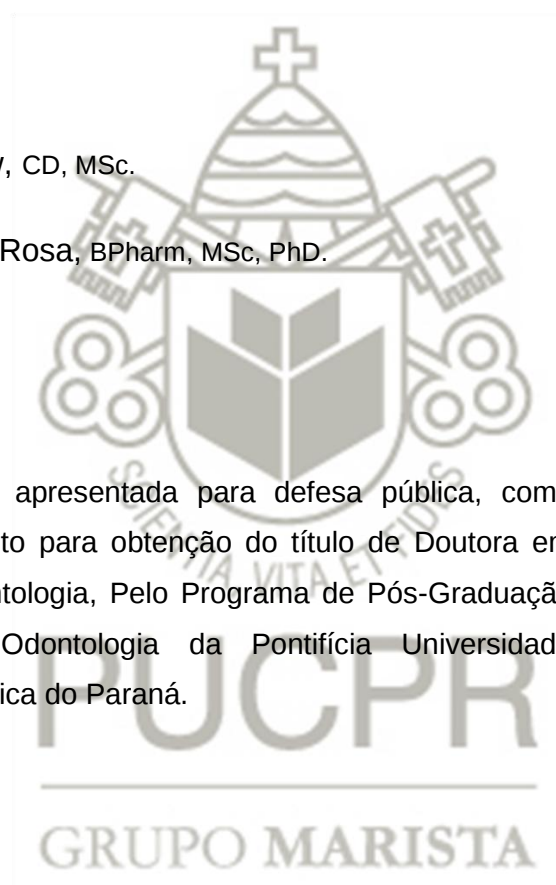
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Saúde e Biociências
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Concentração em Estomatologia

Proposição de bioreator para crescimento de biofilmes de
***Candida albicans* em matriz de papel**

Doutoranda: Marcela Lima Cardoso Selow, CD, MSc.

Orientador: Prof. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa, BPharm, MSc, PhD.

Tese apresentada para defesa pública, como
quesito para obtenção do título de Doutora em
Odontologia, Pelo Programa de Pós-Graduação
em Odontologia da Pontifícia Universidade
Católica do Paraná.



Curitiba, Junho de 2013

Marcela Lima Cardoso Selow, CD, MSc.

**Proposição de bioreator para crescimento de biofilmes de
Candida albicans em matriz de papel**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

S468p
2013 Selow, Marcela Lima Cardoso
Proposição de bioreator para crescimento de biofilmes de candida albicans
em matriz de papel / Marcela Lima Cardoso Selow ; orientador, Edvaldo Antonio
Ribeiro Rosa. – 2013.
41 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,
2013.
Inclui bibliografias
Texto em português e inglês

1. Candida albicans. 2. Biofilme. 3. Odontologia. I. Rosa, Edvaldo Antonio
Ribeiro. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-
Graduação em Odontologia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617.6



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

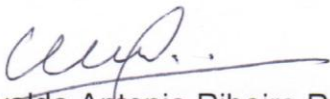
TERMO DE APROVAÇÃO

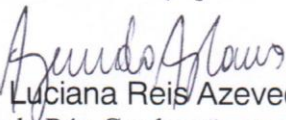
MARCELA LIMA CARDOSO SELOW

PROPOSIÇÃO DE BIOREATOR PARA CRESCIMENTO DE BIOFILMES DE *CANDIDA ALBICANS* EM MATRIZ DE PAPEL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Doutor em Odontologia**, Área de Concentração em **Estomatologia**.

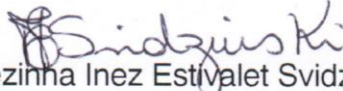
Orientador (a):


Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Profª Drª Luciana Reis Azevedo Alanis
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Profª Drª Patricia Maria Stuelp Campelo
Curso de Farmácia, PUCPR


Profª Drª Cristiane Yumi Koga Ito
Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, UNESP


Profª Drª Terezinha Inez Estivalet Svidzinski
Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, UEM

Curitiba, 21 de junho de 2013.

Dedico este trabalho...

... a *Deus*

Porque Ele me amou primeiro e me deu o sopro da vida.

Porque Ele tem minha vida em suas mãos.

Porque Ele planejou e sonhou com o meu doutorado.

Porque Ele, no seu tempo, está me presenteando com essa vitória!

... Aos meus filhos *Gabriel, Isabella e Davi*

Minhas verdadeiras riquezas e bênçãos.

A mãe ama vocês mais que tudo e todos!

Obrigada pela paciência, pelas orações e pelas idas para a cama cedo para que a mãe pudesse estudar.

Sem vocês minha vida não teria sentido.

Obrigada por vocês existirem e por me amar tanto. Amo vocês muito!

... Ao meu esposo *Roberto*

Agradeço toda paciência, carinho, cumplicidade e amor.

Obrigada por tornar este doutorado “nosso” e sempre ter estado ao meu lado aceitando e apoiando minhas decisões. Sinto-me privilegiada por tê-lo comigo.

Obrigada por você existir e por ter me escolhido como sua esposa. Eu te amo!

... Aos meus pais *Adilson e Rosane*

Agradeço pelo amor incondicional ao longo desses anos e por sempre acreditarem em mim. Pai, você me deixou heranças maravilhosas: o amor ao próximo, a honestidade e a perseverança. Mãe, você é uma mulher guerreira e cheia da graça de Deus. Obrigada, mãe, por ser meu porto seguro e estar sempre presente em minha vida.

Agradecimento Especial

... Ao meu orientador *Prof. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa*

Cheguei a seu laboratório perdida. Uma pedra bruta. E você transformou e lapidou. Obrigada por investir algo tão precioso como o seu tempo em mim. Sinto-me privilegiada por ser sua orientada.

Agradeço a você por acreditar em mim, por aceitar meu jeito de ser e por me ensinar a pesquisar e ir sempre além.

Tenho orgulho de você e de poder fazer parte de seu grupo de pesquisa.

É impossível não se apaixonar pelo seu laboratório e por todo o trabalho que você desenvolve.

Obrigada, do fundo do meu coração por tudo o que você fez por mim e por fazer parte dessa minha história.

Sinceramente, não queria que tudo terminasse aqui com esse ponto final.

Agradecimentos

... Aos meus sogros *Egon e Lídia*

Obrigada por serem mais que sogros. Vocês são maravilhosos. Agradeço pelo amor, pelo carinho e pela paciência em todos os momentos. Muito obrigada por tudo que vocês fazem por mim e para a nossa família. Como é bom tê-los ao meu lado. Vocês são únicos!

... Às minhas irmãs *Fabricia e Gabriele* e ao meu cunhado *Douglas*

Obrigada porque mesmo com a vida agitada de vocês, sempre houve um tempo para se preocupar comigo, para me ligar e para orar por mim. Como é bom ter a família ao nosso lado em todos os momentos. Amo vocês.

... À minha amiga *Rosimeire (Meire)*

Obrigada pelo apoio e pela sua amizade. Seu silêncio, muitas vezes, dava-me paciência e força para continuar. Sua ajuda permitia-me superar minhas dificuldades. Seu carinho me ajudava prosseguir feliz e segura. Seu potencial e capacidade vão além do que você imagina! Obrigada por tudo minha amiga.

... Professores *Monir Tacla e Narcizo Grein*

Agradeço a vocês por tudo que me ensinaram e no que vocês me transformaram. Muito do que sou hoje me inspirei em vocês. Vocês são presentes de Deus em minha vida. Obrigada por torcer por mim e por estar sempre ao meu lado. Vocês são muito especiais!

... À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, na pessoa de seu magnífico reitor, *Prof. Clemente Ivo Juliatto*, por tornar o lema "*Scientia, vita et fides*" uma realizada nesta casa.

... À Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão, que, na pessoa do *Prof. Natan Mendes*, permitiu-me investir mais tempo nos estudos e não me preocupar com parte do custeio do doutorado. Agradeço pela confiança depositada mesmo sem me conhecer. Acredite, esse tempo que direcionei aos estudos fez toda a diferença!

... Ao *Prof. Sérgio Vieira*, pela competência, profissionalismo e dedicação.

... Ao *Prof. Paulo Henrique Couto*, pela sua entrega ao Programa de Pós-Graduação e por me mostrar que os detalhes fazem toda a diferença na docência.

... Ao *Prof. Sérgio Ignácio*, pelo carinho, paciência, rapidez e atenção junto às análises estatísticas.

... À *Profª. Patrícia Maria Stuelp Campelo*, pelo carinho, atenção, entusiasmo e conselhos durante cada fase experimental no laboratório.

... Ao *Prof. João Armando Brancher*, pela competência, paciência, prontidão e amizade. Obrigada por tudo mesmo!

... À minha amiga *Clarice*, por estar sempre ao meu lado, dando-me não apenas suporte técnico, mas principalmente sua amizade e carinho.

... Às minhas super-colegas de laboratório *Alinne, Cristina, Renata e Maria Fernanda*, agradeço a vocês por terem compartilhado de cada momento de sucesso e insucesso, de acertos e erros, de alegrias e tristezas. Obrigada por fazerem parte dessa vitória! Vocês são demais...

... Ao meu amigo *Guilherme Martins*, meu maior incentivador para reiniciar a pensar no doutorado. Obrigada meu amigo você foi muito importante mesmo!

... À minha amiga e ex-“chefe” *Cleide*, sua serenidade e oração sustentavam-me diariamente. Obrigada por não desistir de mim.

... À equipe de *Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná* e a todos os professores e funcionários dessa instituição, meu muito obrigada pelo acolhimento, prontidão, rapidez e competência. Vocês fizeram toda a diferença!

... E propositalmente por último ... pois os últimos serão os primeiros ...

Ao *Prof. Iran Vieira*, meu muito obrigada por acreditar em mim. Serei eternamente grata por sua amizade e respeito. Você é um excelente profissional que com humildade e sabedoria transmite seus conhecimentos. “Quando eu crescer quero ser igual a você”, com essa frase traduzo um pouco de minha admiração por você. Muito obrigada por tudo.

SUMÁRIO

ARTIGO EM PORTUGUÊS

CAPA

RESUMO	1
INTRODUÇÃO	2
MATERIAL E MÉTODOS	3
<i>Paper Embedded Biofilm Reactor</i> (PEBR)	3
Testes de difusão capilar de cristal violeta	4
Crescimento de biofilmes de <i>C. albicans</i>	5
Microscopia Eletrônica de Varredura	6
Microscopia Confocal de Varredura a Laser	7
Estatística	7
RESULTADOS	8
Testes de difusão capilar de CV	8
Crescimento de biofilmes de <i>C. albicans</i>	8
Microscopia Eletrônica de Varredura	8
DISCUSSÃO	9
AGRADECIMENTOS	11
REFERÊNCIAS	11
TABELAS	
Tabela 1	15
FIGURAS	
Figura 1	16
Figura 2	17
Figura 3	18
Figura 4	19
Figura 5	20
Figura 6	21

ARTIGO EM INGLÊS

FRONT PAGE

ABSTRACT	22
INTRODUCTION	23

MATERIAL AND METHODS	24
Paper-Embedded Biofilm Reactor (PEBR)	24
Capillary diffusion tests	25
Growing <i>C. albicans</i> biofilms	25
Scanning Electron Microscopy	26
Confocal Laser Scanning Microscopy	27
Statistics	27
RESULTS	28
Capillary diffusion tests	28
Growing <i>C. albicans</i> biofilms	28
Scanning Electron Microscopy	28
DISCUSSION	29
ACKNOWLEDGEMENTS	31
REFERENCES	31
TABLES	35
Table 1	35
FIGURES	36
Figure 1	36
Figure 2	37
Figure 3	38
Figure 4	39
Figure 5	40
Figure 6	41

ANEXOS

Normas para preparo de artigos para envio ao <i>Applied and Environmental Microbiology</i>	43
--	----

Artigo em Português

**Proposição de bioreator para crescimento de biofilmes de
Candida albicans em matriz de papel**

RESUMO

Foi desenvolvido e validado um bioreator para crescimento de biofilmes de *Candida albicans* em matriz de papel (PEBR) que permite a distribuição confluenta de nutrientes por difusão capilar através de papel filtro. Discos de antibiograma foram distribuídos ao longo da margem de papel filtro e o PEBR recebeu cristal violeta (CV) 0,1% ou 0,01%, a $200 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ e 37°C , durante 48 h. O CV foi recuperado a partir dos discos e medido a 540 nm para quantificar sua difusão. Foi observada uma distribuição normal dos dados de retenção de CV (KS test; $p > 0,05$), com alta homogeneidade de distribuição ($\text{CV}_p \leq 12,055\%$). Para verificar a formação de biofilmes, *Candida albicans* SC5314 foi aplicada sobre discos de antibiograma. O bioreator foi montado e caldo YEPD foi admitido ($200 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$) a 37°C , durante 72 h. O crescimento de biofilme foi estimado pelo teste de redução de MTT. Foi observada uma distribuição normal dos dados de redução do MTT (KS test; $p > 0,05$), com alta homogeneidade de distribuição ($\text{CV}_p \leq 17,157\%$). O PEBR foi considerado como sendo de alta repetibilidade e reprodutibilidade e de baixo custo, o que o torna interessante viável para crescer biofilmes de *C. albicans*.

Palavras-chave: *Candida albicans*; Biofilme; Bioreator; Substrato de papel.

1 INTRODUÇÃO

2 Biofilmes de *Candida* spp. são especialmente importantes e vários
3 protocolos têm sido desenvolvidos na tentativa de entender como eles são
4 formados, como eles expressam o seu potencial de virulência, e como eles
5 podem ser controlados (1-3). A maioria deles, no entanto, envolve biofilmes
6 crescidos estaticamente, que não são adequados para mimetizar condições reais
7 (4). Eles não permitem o desenvolvimento de hifas invasivas; os caldos de cultura
8 são trocados após longos períodos de tempo, com o esgotamento de nutrientes e
9 acúmulo de metabólitos tóxicos; a evaporação faz com que ocorra concentração
10 de solutos levando a desequilíbrios osmóticos; Os pHs não são constantes,
11 mesmo usando caldos tamponados; há o risco de contaminação cruzada entre os
12 poços (em placas de microtitulação/cultura); etc.

13 Diferentes modelos de biofilmes dinâmicos foram desenvolvidos para
14 contornar tais problemas. Em placas de microtitulação/cultura, sob agitação, foi
15 demonstrado que um maior fluxo hidrodinâmico de nutrientes gera biofilmes mais
16 celularizados e com maior quantidade de matriz polimérica extracelular (5).

17 Dispositivos de Robbins modificados têm sido usados para crescer
18 biofilmes bacterianos e fúngicos em fluxo contínuo (6-8). Apesar de seu
19 desempenho, problemas relacionados com a ausência de interfaces gás/biofilme
20 dificultam a extrapolação para infecções relacionadas com mucosa ou pele.

21 Câmaras de fluxo adaptadas a microscópios são muito interessantes,
22 uma vez que permitem acompanhar o crescimento de biofilmes em tempo-real
23 (9), até mesmo, sobre células da mucosa (10); no entanto, estudos que envolvem
24 grandes volume de repetições são difíceis de ser realizados.

A obtenção de um fluxo laminar lento pode ser conseguida utilizando reatores baseados em gotejamento. A primeira vista, esses sistemas são muito atraentes, uma vez que permitem que biofilmes cresçam em baixa tensão de cisalhamento e com interface gás-líquido adequada. No entanto, tais sistemas têm sido raramente utilizados para crescer biofilmes de *C. albicans* (11). Uma variação desses reatores por gotejamento envolve o uso de materiais simples de laboratório (12, 13). Apesar de sua aparente simplicidade, problemas relativos à baixa repetibilidade limitam sua utilização em estudos envolvendo maior número de cepas/tratamentos/etc.

Atualmente, existe uma tendência em se empregar sistemas baseados em microfluídica (14). Entretanto, a implementação dessas tecnologias exige custos consideráveis para a aquisição de equipamentos para fotolitografia e plasma de argônio, além das técnicas serem trabalhosas e demoradas.

A fim de contribuir para a obtenção de um reator que permita o crescimento de biofilmes de *C. albicans* em condições dinâmicas, com grande número repetições e baixo custo, foi proposto um sistema com base na distribuição confluyente de nutrientes através de difusão capilar em papel filtro qualitativo.

MATERIAL E MÉTODOS

Paper Embedded Biofilm Reactor (PEBR)

O PEBR foi construído como apresentado na Figura 1. Ele consiste de uma secção de tubo de aço inoxidável [100 mm (Ø) × 70 mm (altura) x 1 mm (espessura)] excentricamente soldado em uma placa de metal (150 mm x 120 mm x 2 mm). Nos quatro cantos da placa, foram feitos orifícios para ajustes de nível e

um furo na parte inferior da mesma foi utilizado para a drenagem do caldo descartado.

Para completar a montagem do PEBR, um segmento de perfil de borracha U PEXT0640[®] (PAR Group Co., Lancashire, UK) foi adaptado à borda livre superior do reator, a fim de evitar qualquer fuga de gás ou contaminação externa. Uma tampa de vidro (120 mm x 120 mm x 4 mm), com um furo central (20 mm Ø) cobriu o bioreator. Um sistema de admissão de caldo de cultura foi construído com uma rolha de borracha (20 mm Ø) e um controlador de fluxo de ar de duas vias (Guandong Boyu Group Co. Ltd, Raoping, China) e uma agulha de aço inoxidável 121-D[™] 100 × 20 (Höppner Produtos Veterinários Ltd., São Paulo, Brasil).

A tampa de vidro foi firmemente unida ao reator usando abraçadeiras de aço inoxidável (120 mm x 20 mm x 2 mm) e parafusos/porcas. Uma vez montado, o PEBR foi esterilizado a 121° C, 1 atm.(cm²)⁻¹, por 15 min.

Testes de difusão capilar de cristal violeta

Uma mesa de vidro [90 mm (Ø) × 5 mm (espessura)] esterilizada por autoclavagem foi adaptada dentro do PEBR, evitando qualquer contato com sua parede. Sobre a mesa, um disco estéril de 90 mm (Ø) de papel filtro qualitativo grau III Whatman[™] (General Electric Co., Kent, UK) foi depositado. Esse disco de papel serve como matriz para a difusão de nutrientes.

A uma distância de 5 mm aquém da borda, 30 discos de papel para antibiograma de 6 mm estéreis (Cecon Ltd., São Paulo, Brasil) foram distribuídos com distância de 3-4 mm entre si.

O PEBR foi ligado a reservatórios (Kitasatos de 1 L) contendo cristal violeta 0,1% ou 0,01% por tubos de silicone (1 mm Ø interno). Entre o PEBR e os

reservatórios, uma bomba peristáltica P-1™ (Pharmacia Biotech Co., Uppsala, Suécia) foi posicionada para controlar o fluxo.

Os reservatórios foram preenchidos com 800 mL de cristal violeta (CV). Os sistemas foram montados e as soluções foram gotejadas (200 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) na área central de discos de filtro de difusão. Esses testes foram realizados a 37 °C e atmosfera normal.

Após 48 h, os sistemas foram desmontados e os discos de papel de antibiograma foram cuidadosamente recolhidos com pinças de ponta fina. Eles foram colocados em poços de placas de microtitulação com fundo U. Tais poços foram preenchidos com 200 μL de etanol absoluto e o corante absorvido foi eluído durante 5 min. A ausência de corante remanescente não-particionado nos discos de papel nos levou a inferir que todo CV foi extraído dos discos. Os eluatos foram transferidos para placas de fundo chato e as OD_{540nm} foram medidas em leitora de placas TP-Reader™ (Thermoplate Co., Shenzhen, China).

Crescimento de biofilmes de *C. albicans*

Em um segundo experimento, 30 discos para antibiograma foram depositados sobre a mesa de vidro e a matriz de difusão (papel filtro), conforme anteriormente descrito. O PEBR foi montado e esterilizado em autoclave.

Candida albicans SC5314 foi cultivada em caldo extrato de levedura-peptona-glucose (YEPD), a 37 °C, normóxia e 120 rpm até atingir OD_{540nm} igual a 1,00. Alíquotas de 10 μL de suspensão celular foram aplicadas nos discos de antibiograma. O bioreator foi novamente montado e ligado ao reservatório de caldo YEPD. O caldo foi admitido numa vazão de 200 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e os biofilmes foram cultivados aerobicamente a 37 °C (Figura 2).

Após 72 h de admissão contínua de caldo, o PEBR foi desmontado e os discos de papel de antibiograma foram cuidadosamente coletados com pinça de ponta fina estéril. Eles foram transferidos para poços de microplacas fundo U. Tais poços foram preenchidos com 200 μL de MTT 1 mg.mL^{-1} (em PBS 150 mM) (15). Após a incubação por 4 h, a 37 °C, a solução de MTT foi removida e os discos de papel foram cuidadosamente lavados por imersão (três vezes) com PBS 150 mM (2 mL cada) para remover excessos de MTT. Isopropanol absoluto (1 mL) foi então adicionado para solubilizar a formazana produzida. A formação de formazana foi medida a 540 nm. Trinta discos de papel não-inoculados embebidos em YEPD (72 h, 37 °C) serviram como controles.

Experimentos paralelos independentes foram realizados no PEBR com discos de membrana de filtração (0,45 μm) Immobilon-P™ (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) de 6 mm ($\varnothing$) e com discos de papel celofane comum (Emblema Ltd., São Paulo, Brasil) de 6 mm ($\varnothing$). Os resultados desses testes não foram satisfatórios, uma vez que houve grandes variações entre repetições ($\geq 312\%$). Assim, não foi dado prosseguimento a esses experimentos e os resultados referentes a eles não são apresentados aqui.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Biofilmes foram crescidos em discos de antibiograma, seguindo o protocolo anteriormente descrito. Esses foram fixados com uma solução recém-preparada contendo paraformaldeído 4% e tampão cacodilato 100 mM (pH 6,2), durante 4 h, em temperatura ambiente. As amostras foram então desidratadas em uma série graduada de etanol e secas em ponto-crítico em CO_2 (Mod. CPD-030 Critical Point Dryer, Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein). As amostras foram, então, montadas em bases de alumínio com tinta de prata. Nessa etapa, seis

discos foram montados invertidos, ou seja, com exposição das interfaces disco de papel/matriz. Os discos foram metalizados com ouro (Mod. SCD030, Balzers AG, Balzers, Liechtenstein) e as imagens foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura Tabletop Phenom™ (Phenom-World BV, Eindhoven, Holanda). A totalidade da superfície de cada amostra foi examinada, e imagens representativas da amostra foram capturadas.

Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLSM)

Biofilmes foram cultivados em discos de antibiograma, seguindo o protocolo acima descrito. Eles foram fixados, permeabilizados e tratados com Alexa Fluor 488-faloidina (Molecular Probes Inc., Eugene, OR). As lâminas foram examinadas em unidade Confocal Radiance™ 2100 (BioRad Co, Hercules, CA) acoplado a um microscópio Nikon E800 (Nikon Instech Co., Kanagawa, Japão) dotado de objetivas Plan-Apochromatic (Technologies Group Instruments Division, Melville, NY).

No entanto, como nenhum feixe de laser pôde passar através da grossa matriz de papel abaixo dos biofilmes, nenhuma imagem foi obtida e a CLSM não foi realizada.

Estatística

Para cada teste, foram calculados as médias e os desvios-padrão. Para testar a homogeneidade dos dados, foi determinado o coeficiente de variação de Pearson para cada experimento individualizado. Finalmente, para testar se os dados tinham distribuição normal, foi aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. O teste *t* de Student foi utilizado para acessar as diferenças entre as atividades redutoras de MTT em discos recobertos por biofilme. Um valor *p* igual a 0,05 foi considerado como limiar para o estabelecimento de diferenças.

RESULTADOS

Testes de difusão capilar de CV

Dados de estatística descritiva para difusão capilar de cristal violeta revelaram valores médios de OD_{540nm} iguais a $2,828 \pm 0,070$ para CV 0,1% e $0,597 \pm 0,072$ para CV 0,01%. Os coeficientes de variação de Pearson foram 2,467% e 12,065%, respectivamente, sendo que, em ambos os casos foram conseguidas altas homogeneidades de distribuição (Tabela 1). Em ambos os casos, o teste de Komogorov-Smirnov (KS) revelou normalidade de distribuição de dados ($p > 0,05$).

Crescimento de biofilmes de *C. albicans*

Os valores médios para redução de MTT foram $1,638 \pm 0,091$ (*C. albicans*) e $0,113 \pm 0,005$ (Controle). Os coeficientes de variação de Pearson foram 5,555% e 4,424%, respectivamente, sendo que, em ambos os casos foi atingida uma alta de homogeneidade de distribuição. Em ambos os casos, o teste de Komogorov-Smirnov (KS) revelou normalidade de distribuição de dados ($p = 0,696$). O teste *t* de Student revelou atividade redutora mais significativa nos discos recobertos por biofilme ($p < 0,0001$) (Figura 3).

Microscopia Eletrônica de Varredura

A inspeção das superfícies superiores dos discos de papel revelou o crescimento de biofilme de *C. albicans* rico em pseudohifas, com algumas hifas verdadeiras (Figura 4). Nas superfícies inferiores dos discos de papel, que permaneceram em contacto com a matriz difusora, foi observado um grande número de hifas verdadeiras (Figura 5). Digno de nota, grandes quantidades de leveduras em brotamento e pseudohifas foram vistas no interior dos discos de papel (Figura 6).

DISCUSSÃO

A necessidade de um sistema viável que gere biofilmes sob um fluxo constante de nutrientes e com opção de troca de gás parece ser muito atraente. Antes do desenvolvimento do PEBR, já havíamos considerado crescer biofilmes em telas de fibra de vidro cobertas com Teflon (telas anti-mosquito) e em tecidos sintéticos (dados não mostrados). Depois disso, foi avaliada a possibilidade de utilização de contas de vidro sinterizado, que, hipoteticamente, poderiam favorecer o crescimento de hifas. No entanto, nenhum desses substratos se mostrou adequado para gerar biofilmes consistentes.

A ideia de utilizar discos de papel filtro foi prontamente testada, mas o problema da imersão dos discos no fluxo de caldo ainda permanecia. O sistema aqui apresentado é uma variação que fornece um fluxo laminar de nutrientes em baixo estresse de cisalhamento e que mimetiza as situações nas quais os nutrientes vêm das camadas inferiores dos biofilmes.

No caso particular de *C. albicans*, é digno de nota salientar que as hifas invasoras podem crescer nos discos de papel. Isso pode ter alguma utilidade quando se pretende avaliar esse crescimento.

Outro ponto favorável do sistema é a possibilidade de crescer biofilmes em condições atmosféricas distintas. É sabido que *Candida* spp. podem crescer em hipóxia (16, 17) e anóxia (18, 19), utilizando-se da cadeia respiratória paralela (20) e de vias fermentativas (21). Como o PEBR tem uma porta de admissão de gás, a atmosfera do *headspace* pode ser facilmente alterada, conforme desejado.

Se a mesa de vidro no interior do PEBR estiver nivelada, a difusão centrífuga de fluidos permitirá que nutrientes cheguem de forma homogênea aos discos de antibiograma. Essa é uma vantagem diretamente relacionada às

biomassas finais do biofilme. Para avaliar a distribuição de moléculas solúveis em água, foi usado cristal violeta (CV). O CV é um corante catiônico com massa molar de 407,98 g.mol⁻¹ (22). Sua difusão através da matriz de papel filtro ocorre sem qualquer "arrestamento tipo-cromatográfico", de uma forma que, as moléculas de CV podem fluir livremente através da matriz do papel. Isso é interessante porque muitas moléculas usadas como nutrientes para o crescimento microbiano, como os aminoácidos, açúcares e vitaminas são menores que o CV. Moléculas maiores, que podem ser aprisionadas na matriz de papel, podem fluir após a saturação da mesma, um fenômeno perceptível 2-3 horas após a admissão de caldo (Figura 2). Em favor dessa tese, obtivemos biomassas finais de biofilme com pequena variação.

A inspeção por MEV revelou que células de *C. albicans* podem crescer através do substrato de papel (discos de antibiograma), o que é muito interessante. Longe da ideia de imitar tecidos vivos, tal evidência pode ser útil em futuros experimentos em que biofilmes formados dentro de um substrato forem necessários.

Em experimentos envolvendo biofilmes, a possibilidade de múltiplas repetições está entre as propriedades mais desejáveis para um método (23-25). Esse sistema parece ser muito robusto em oferecer essa vantagem, uma vez que é possível crescer até 30 biofilmes individuais com baixa variação entre suas biomassas.

Além das vantagens experimentais, também é importante mencionar que seus custos de construção foram inferiores a US\$ 25,00 (sem bomba peristáltica e frascos de Kitasato), com partes compradas em lojas de ferragens locais. Esse é um importante ponto de interesse, porque um reator para biofilme eficaz e com

1 custo acessível se torna muito atraente para grupos de pesquisa com baixo
2 orçamento.

3 O principal ponto negativo observado é que lidar com maiores biomassas
4 de microrganismos requer pessoal técnico ciente dos riscos de contaminação.
5 Assim, é imperativo evitar subestimar a possibilidade de contaminação ambiental
6 ou pessoal, bem como negligenciar as regras padrão de biossegurança
7 laboratorial. Além disso, apesar de tal sistema poder ser usado para outros
8 organismos, que não *Candida* spp., cremos que entidades celulolíticas [e.g.,
9 *Aspergillus terreus* e *Chaetomium globosum* (fungos) e *Chryseobacterium*
10 *kwangyangense* e *Bacillus cereus* cepa Razmin (bactérias)] certamente podem
11 solubilizar a matriz de papel e não se obterão bons biofilmes.

12 Em suma, apresentamos e validamos aqui um sistema de baixo custo que
13 permite a obtenção de grande número de biofilmes independentes, com pequenas
14 variações de biomassa.

16 **Agradecimentos**

17 Este estudo foi fomentado pela Fundação Araucária (Proc. 11524, Conv.
18 416/2009). Os autores agradecem a cooperação dos professores e técnicos do
19 Centro de Microscopia Eletrônica e do Laboratório de Microscopia Confocal da
20 Universidade Federal do Paraná.

21 **REFERÊNCIAS**

1. **Mendes A, Mores AU, Carvalho AP, Rosa RT, Samaranayake LP, Rosa EA.** 2007. *Candida albicans* biofilms produce more secreted aspartyl protease than the planktonic cells. Biol. Pharm. Bull. **30**:1813-1815.

2. **Taff HT, Nett JE, Zarnowski R, Ross KM, Sanchez H, Cain MT, Hamaker J, Mitchell AP, Andes DR.** 2012. A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. *PLoS Pathog.* **8**:e1002848.
3. **Vialás V, Perumal P, Gutierrez D, Ximénez-Embún P, Nombela C, Gil C, Chaffin WL.** 2012. Cell surface shaving of *Candida albicans* biofilms, hyphae, and yeast form cells. *Proteomics.* **12**:2331-2339.
4. **Baboni FB, Guariza-Filho O, Moreno AN, Rosa EA.** 2010. Influence of cigarette smoke condensate on cariogenic and candidal biofilm formation on orthodontic materials. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* **138**:427-434.
5. **Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP.** 2007. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch. Oral Biol.* **52**:761-767.
6. **McCoy WF, Costerton JW.** 1982. Fouling biofilm development in tubular flow systems. *Dev. Indust. Microbiol.* **23**:551-558.
7. **Ramage G, Wickes BL, López-Ribot JL.** 2008. A seed and feed model for the formation of *Candida albicans* biofilms under flow conditions using an improved modified Robbins device. *Rev. Iberoam. Micol.* **25**: 37-40.
8. **De Prijck K, De Smet N, Coenye T, Schacht E, Nelis HJ.** 2010. Prevention of *Candida albicans* biofilm formation by covalently bound dimethylaminoethylmethacrylate and polyethylenimine. *Mycopathologia.* **170**:213-221.
9. **Bernhardt H, Knoke M, Bernhardt J.** 2011. Efficacy of anidulafungin against biofilms of different *Candida* species in long-term trials of continuous flow cultivation. *Mycoses.* **54**:e821-827.

10. **Diaz PI, Xie Z, Sobue T, Thompson A, Biyikoglu B, Ricker A, Ikonomou L, Dongari-Bagtzoglou A.** 2012. Synergistic interaction between *Candida albicans* and commensal oral streptococci in a novel in vitro mucosal model. Infect. Immun. **80**:620-632.
11. **Carlson RP, Taffs R, Davison WM, Stewart PS.** 2008. Anti-biofilm properties of chitosan-coated surfaces. J. Biomater. Sci. Polym. Edn. **19**:1035-1046.
12. **Uppuluri P, Chaturvedi AK, Lopez-Ribot JL.** 2009. Design of a simple model of *Candida albicans* biofilms formed under conditions of flow: development, architecture, and drug resistance. Mycopathologia. **168**:101-109.
13. **Uppuluri P, Lopez-Ribot JL.** 2010. An easy and economical in vitro method for the formation of *Candida albicans* biofilms under continuous conditions of flow. Virulence. **1**:483-487.
14. **Gottschamel J, Richter L, Mak A, Jungreuthmayer C, Birnbaumer G, Milnera M, Brückl H, Ertl P.** 2009. Development of a disposable microfluidic biochip for multiparameter cell population measurements. Anal. Chem. **81**:8503-8512.
15. **Hawser SP, Douglas LJ.** 1994. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. Infect. Immun. **62**:915-921.
16. **Grahl N, Shepardson KM, Chung D, Cramer RA.** 2012. Hypoxia and fungal pathogenesis: to air or not to air? Eukaryot. Cell. **11**:560-570.
17. **Synnott JM, Guida A, Mulhern-Haughey S, Higgins DG, Butler G.** 2010. Regulation of the hypoxic response in *Candida albicans*. Eukaryot. Cell. **9**:1734-1746.

18. **Rosa EA, Rached RN, Ignácio SA, Rosa RT, José da Silva W, Yau JY, Samaranayake LP.** 2008. Phenotypic evaluation of the effect of anaerobiosis on some virulence attributes of *Candida albicans*. J. Med. Microbiol. **57**:1277-1281.
19. **Rymovicz AU, Souza RD, Gursky LC, Rosa RT, Trevilatto PC, Groppo FC, Rosa EA.** 2011. Screening of reducing agents for anaerobic growth of *Candida albicans* SC5314. J. Microbiol. Methods. **84**:461-466.
20. **Ruy F, Vercesi AE, Kowaltowski AJ.** 2006. Inhibition of specific electron transport pathways leads to oxidative stress and decreased *Candida albicans* proliferation. J. Bioenerg. Biomembr. **38**:129-135.
21. **Ogasawara A, Odahara K, Toume M, Watanabe T, Mikami T, Matsumoto T.** 2006. Change in the respiration system of *Candida albicans* in the lag and log growth phase. Biol. Pharm. Bull. **29**:448-450.
22. **Patil S, Deshmukh V, Renukdas S, Patel N.** 2011. Kinetics of adsorption of crystal violet from aqueous solutions using different natural materials. Int. J. Environ. Sci. **1**:1116-1134.
23. **Kim J, Hegde M, Kim SH, Wood TK, Jayaraman A.** 2012. A microfluidic device for high throughput bacterial biofilm studies. Lab Chip. **12**:1157-1163.
24. **Kim J, Park HD, Chung S.** 2012. Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation. Molecules. **17**:9818-9834.
25. **Pettit RK, Weber CA, Pettit GR.** 2009. Application of a high throughput Alamar blue biofilm susceptibility assay to *Staphylococcus aureus* biofilms. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. **8**:28.

Tabela 1. Estatística descritiva para testes de difusão capilar de cristal violeta

Parâmetro	Cristal violeta 0,1%	Cristal violeta 0,01%
Tamanho amostral (n)	30	30
Média ± desvio-padrão	2,828 ± 0,070	0,597 ± 0,072
Coeficiente de variação de Pearson	2,467%	12,065%
Normalidade (Komogorov-Smirnov)	p > 0,05 (normal)	p > 0,05 (normal)

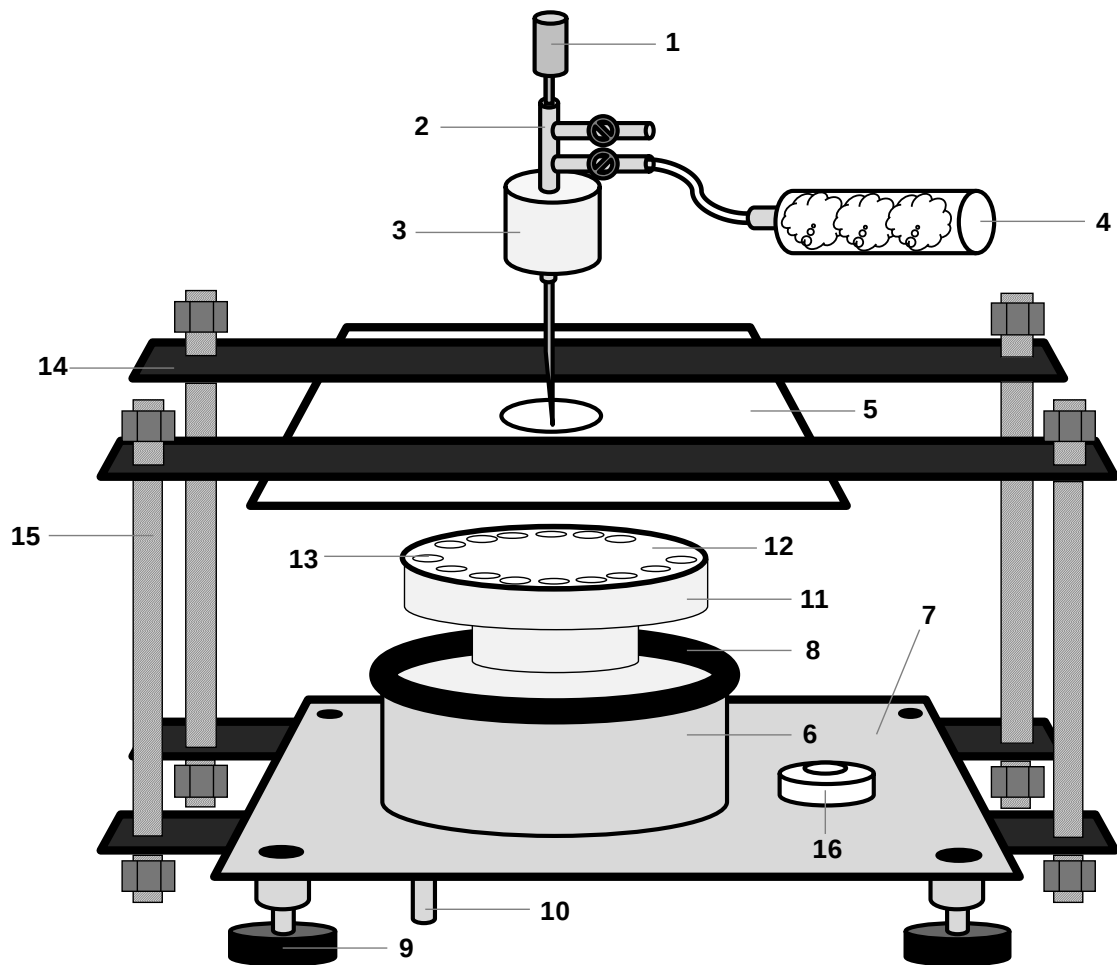


Figura 1. Partes que compõem o PEBR (detalhes no texto). 1: Agulha em aço inoxidável; 2: Controlador de duas vias; 3: Rolha de borracha; 4: Camisa de seringa com algodão estéril; 5: Tampa de vidro com furo central; 6: Cilindro em aço inoxidável; 7: Base em aço inoxidável; 8: Perfil em borracha; 9: Niveladores rosqueáveis; 10: Tubo para expurgo; 11: Mesa em vidro; 12: Matriz de difusão (papel filtro); 13: Discos para antibiograma com inóculos de *C. albicans*; 14: Abraçadeiras em aço; 15: Parafusos para selamento; 16: Nível removível.

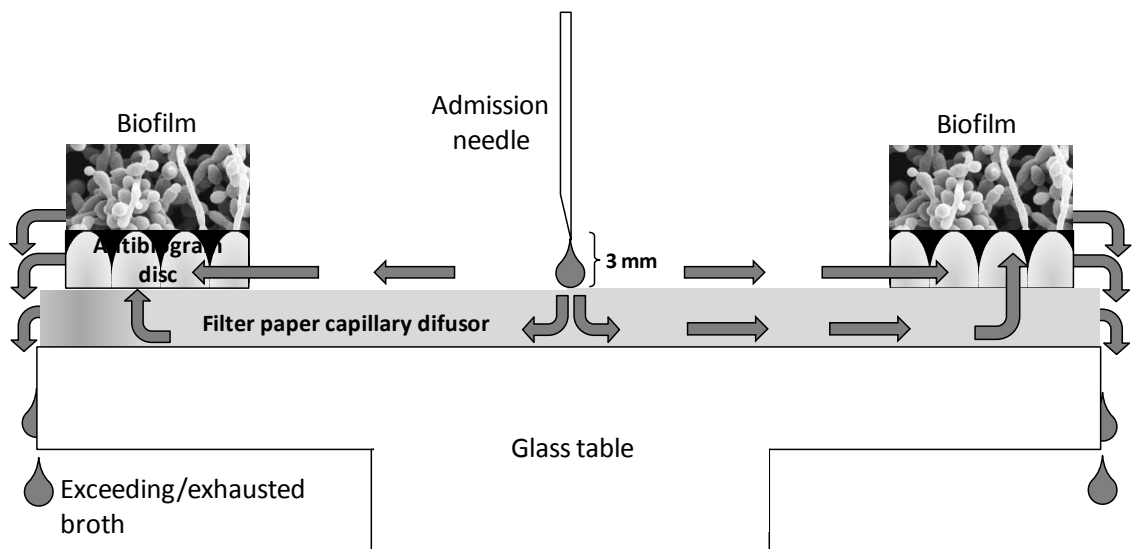


Figura 2. Eventos hipotéticos que ocorrem no PEER em funcionamento.

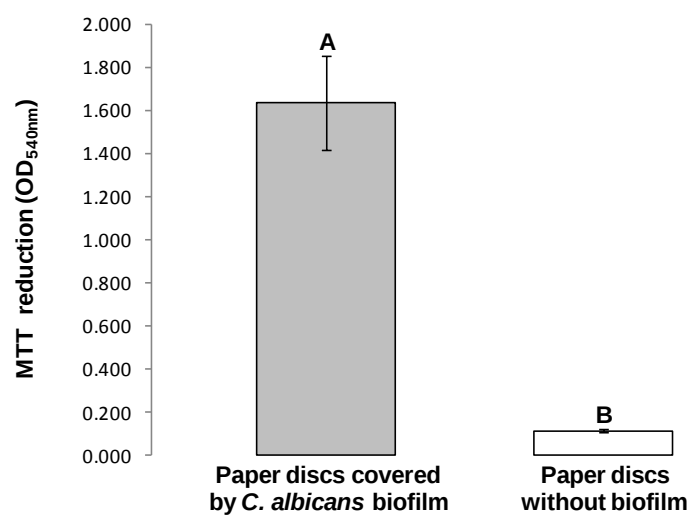


Figure 3. Taxa de redução de MTT induzida por biofilms de *C. albicans* SC5314 crescida empregando o PEBR. As barras indicam o intervalo de confiança de 95%.

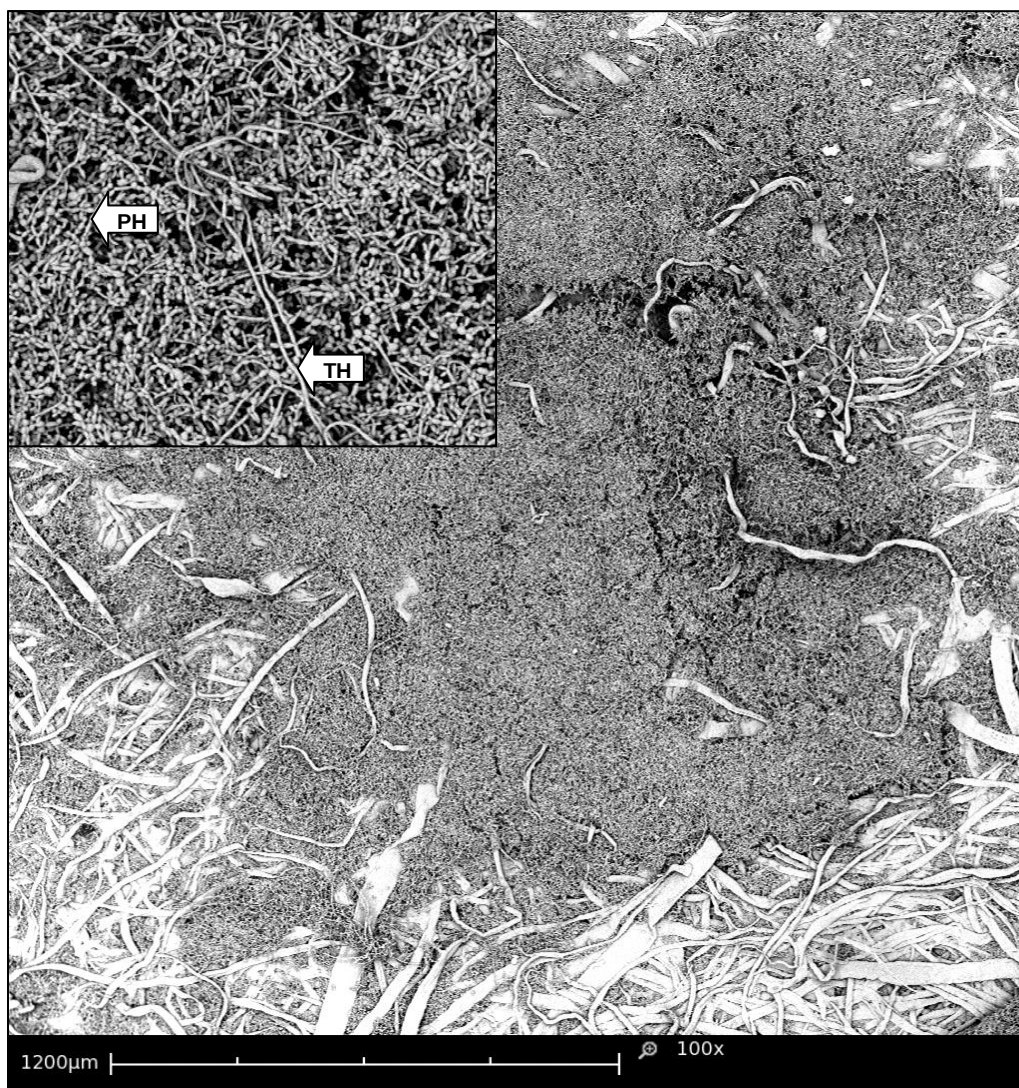


Figura 4. Visão panorâmica do biofilme de *C. albicans* SC5314 formado sobre o disco de antibiograma. No detalhe, visão ampliada mostrando o intenso crescimento de pseudohifas (PH) e poucas hifas verdadeiras (TH).



Figura 5. Visão da interface disco de antibiograma/papel-filtro mostrando o intenso crescimento de pseudohifas (PH) e de hifas verdadeiras (TH).

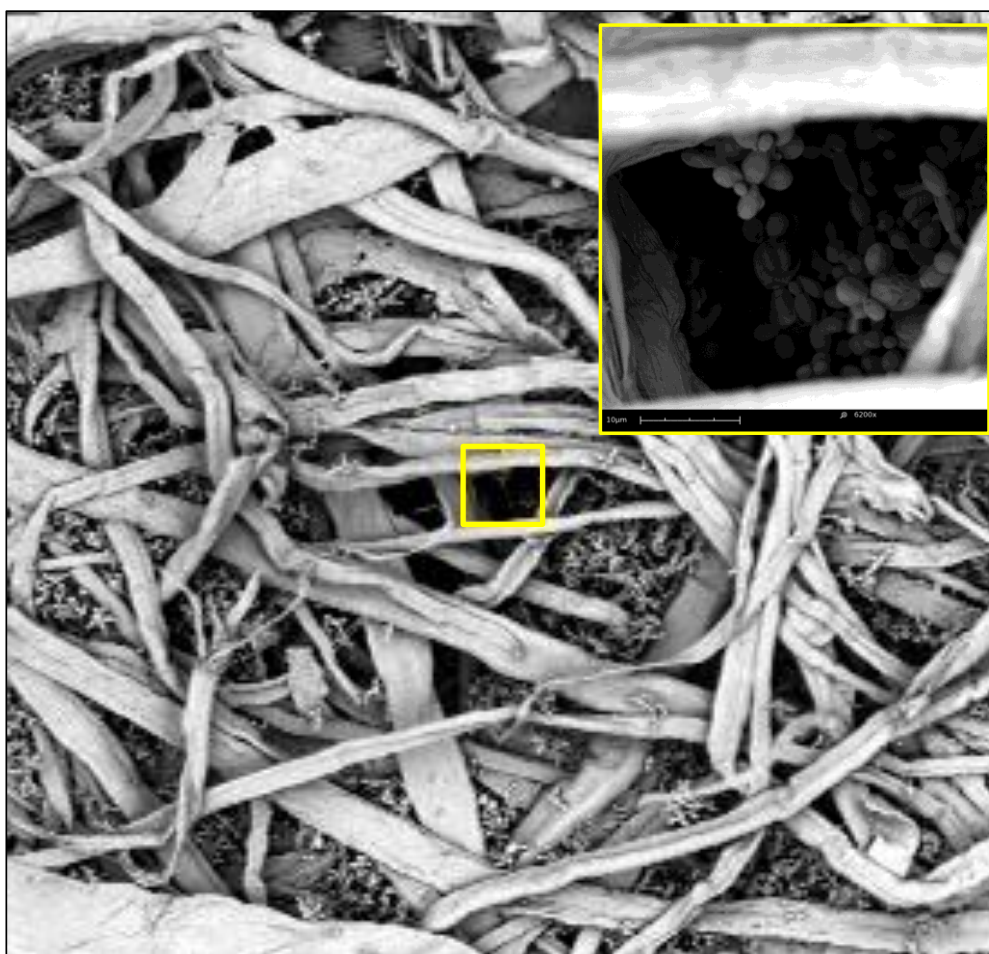


Figura 6. Visão da interface disco de antibiograma/papel-filtro mostrando crescimento de pseudohifas no interior da matriz do disco de antibiograma.

Artigo em Inglês

**Proposition of a bioreactor for *Candida albicans* biofilm growth
onto paper matrix**

ABSTRACT

It was developed and validated a stainless steel paper-embedded biofilm reactor (PEBR) for *Candida* spp. that permits confluent distribution of nutrient by capillary diffusion through ordinary lab filter paper. Antibiofilm discs were distributed along the filter paper rim and the PEBR received 0.1% or 0.01% crystal violet (CV) at 200 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 37 °C, for 48 h. CV was recovered from discs and measured at 540 nm. *Candida albicans* SC5314 was applied onto antibiofilm discs. The bioreactor was assembled and YEPD broth was admitted (200 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) at 37 °C, for 72 h. Biofilm growth was estimated by MTT reduction test. Controls were discs that received same treatments, excepting the fungus. The PEBR was considered high throughput-able, low costing, and feasible to grow *C. albicans* biofilms in a safe way.

Key words: *Candida albicans*, Biofilm, High-throughput, Paper substrate.

INTRODUCTION

Candida spp. biofilms are notably important and several protocols have been developed in an attempt to understand how they are formed, how they express their virulence potential, and how they can be controlled (Taff et al., 2012; Vialás et al., 2012; Mendes et al., 2007). Most of them, however, involve biofilms statically grown, which are not suitable to approach the clinical reality (Baboni et al., 2010). They fail to permit the development of invasive hyphae; the culture broths are exchanged after relative long periods of time with depletion of nutrients and accumulation of toxic metabolites; evaporation causes solute concentration leading to osmotic imbalances; pHs are not constant even using buffered broths; the possibility of cross-contamination among wells (in 12 to 96 well microtitration/culture plates) must be considered; etc.

Different designs for dynamic biofilms have been developed to contour such problems. Using shaken multi-well plates it has been showed that higher hydrodynamic flux of nutrients generates more cell containing biofilms with increased extracellular polymeric matrixes (Thein et al., 2007).

Modified Robbins devices have been used to grow bacterial and fungal biofilms under continuous flow (McCoy & Costerton, 1982; Ramage et al., 2008; De Pijck et al., 2010). Despite their robust performance, problems regarding to the absence of gas/biofilm interfaces difficult the extrapolation for mucosa or skin related infections.

Flow chambers attached to microscopes are very interesting once permit to follow biofilms growing “on time” (Bernhardt et al., 2011) and, even, onto living mucosal cells (Diaz et al., 2012); however, studies involving high throughput screenings are difficult to be conducted.

The obtaining of a slow laminar flow may be achieved by using drip-flow reactors. At-a-glance, those systems are very attractive once allow growing biofilms under low shear stress and suitable gas-liquid interface. Nevertheless, such systems rarely have been used to grow *C. albicans* biofilms (Carlson et al., 2008).

An inexpensive variation of drip-flow reactors was recently proposed (Uppuluri & Lopes-Ribot, 2010; Uppuluri et al., 2010). Despite its apparent simplicity, problems regarding to repeatability and low-throughput limit its use.

Nowadays, there is a tendency to employ microfluidics-based systems (Gottschamel et al., 2009). However, the implementation of such technologies demands considerable costs to acquire photolithography and argon plasma equipments, as well as it is laborious and time-consuming.

In order to contribute to obtaining a feasible high-throughputable and low-cost biofilm reactor for *C. albicans* (and non-*albicans Candida* spp.) we proposed a system based on the confluent distribution of nutrients through capillary diffusion in ordinary laboratory qualitative filter paper.

MATERIAL AND METHODS

Paper-Embedded Biofilm Reactor (PEBR)

The PEBR was assembled as presented in Figure 1. It consisted of a stainless steel pipe tube section [100 mm (Ø) × 70 mm (high) × 1 mm (thick)] eccentrically welded in a metal plate (150 mm × 120 mm × 2 mm). Four holes at the corners were used to adapt adjustable height buttons and a hole in bottom was used for broth drainage.

A glass table [90 mm (Ø) × 5 mm (thick)] was adapted inside the cylindrical jacket, avoiding any contact with its wall. Over the table, a 90 mm Ø disc of Whatman™ Qualitative Grade 3 filter paper (General Electric Co., Kent, UK) was laid on. This paper disk served as a matrix for nutrient diffusion. At five millimeters below the edge, 6 mm antibiogram paper discs (Cecon Ltd., São Paulo, Brazil) were distributed with a distance of 3-4 mm from one each other.

To complete the PEBR assembling, a PEXT0640® rubber U profile segment (PAR Group Co., Lancashire, UK) was tightly attached to the upper jacket's free edge in order to avoid any gas leakage/external contamination. A glass lid (120 mm × 120 mm × 4 mm) with a central hole (20 mm Ø) covered the jacket. A

culture broth admission system was built with a 20 mm Ø rubber stopper and a two-way air flow controller (Guandong Boyu Group Co. Ltd, Raoping, China) and a 121-D™ 100×20 stainless steel needle (Höppner Veterinary Products Ltd., São Paulo, Brazil).

The glass lid was firmly attached to jacket using stainless steel straps (120 mm × 20 mm × 2 mm) and bolts/nuts. Once assembled, the PEBR was sterilized at 121 °C, 1 atm.(cm²)⁻¹, and 15 min.

Capillary diffusion tests

The PEBR was connected to reservoirs containing either 0.1% or 0.01% crystal violet. One-liter Kitasato flasks served as reservoirs, to which silicone tubing (1 mm internal Ø) were adapted. Between reservoirs and PEBR, a P-1™ peristaltic pump (Pharmacia Biotech Co., Uppsala, Sweden) was placed to control the flow.

Reservoirs were filled with 800 mL of crystal violet solutions. The systems were assembled and solutions were dropped (200 µL.min⁻¹) in the central area of diffusion filter disks. These tests were carried out at 37 °C and normal atmosphere.

After 48 h, the systems were disassembled and the antibiogram paper discs were carefully collected with thin tip forceps. They were placed into wells of U bottomed microtitration plates. Such wells were filled with 200 µL of absolute ethanol and the absorbed dye was eluted for 5 min. No signals of non-partitioned dye remainings were observed in paper discs, what let us to infer that all CV was extracted from discs. Eluates were combined and transferred to flat bottomed plates. The OD_{540nm} were measured in a TP-Reader™ (ThermoPlate Co., Shenzhen, China).

Growing *C. albicans* biofilms

Candida albicans SC5314 was grown in Yeast Extract-Peptone-Glucose (YEPD) at 37 °C, normoxia, and 120 rpm up to achieve OD_{540nm} equal to 1.00. Aliquots of 10 µL of cell suspension were dropped onto sterile 6 mm pro-antibiogram paper discs. Prior to cell application, the discs had already been set

on sterile 90 mm Ø disc of Whatman™ Qualitative Grade 3 filter paper within the PEBR, as stated before. The bioreactor was assembled and connected to YEPD broth reservoir. The broth was admitted at a 200 µL.min⁻¹ flow rate and biofilms were aerobically grown at 37 °C (Figure 2).

After 72 h of continuous broth admission, the PEBR was dismantled and the antibiogram paper discs were carefully collected with sterile thin tip forceps. They were disposed into wells of U bottomed microtitration plates. Such wells were filled with 200 µL of 1 mg.mL⁻¹ MTT (in 150 mM PBS) (Hawser & Douglas, 1994). After incubation for 5 h at 37 °C, the MTT solution was removed, and the paper discs were carefully washed by immersion three times with 0.15 M PBS (2 mL each) to remove exceeding MTT. Absolute isopropanol (1 mL) was then added to solubilize the MTT formazan product. MTT formazan formation was measured at 540 nm. Thirty non-inoculated paper discs soaked in YEPD (72 h, 37 °C) served as controls. MTT processing was carried out as above stated.

Independent parallel experiments were carried out with 6 mm discs of 0.45 µm pore-sized Immobilon-P™ membrane (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and 6 mm discs of ordinary cellophane paper (Emblema Ltd., São Paulo, Brazil). The results of such tests were unsatisfactory once there was a great variation among repetitions ($\geq 312\%$). Thus, they were not followed out and results concerning to them are not presented here.

Scanning Electron Microscopy

Biofilms were grown onto twelve antibiogram paper discs following the protocol above stated. They were fixed with a fresh solution containing 4% paraformaldehyde and 100 mM cacodylate buffer (pH 6.2), for 4 h at room temperature. Samples were then dehydrated in a graded series of ethanol and critical-point dried in CO₂ (Mod. CPD-030 Critical Point Dryer, Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein). The samples were then mounted on aluminum stubs with silver paint. In this step, six out twelve discs were inverted mounted, i.e., with the paper-disc interfaces up exposed. Discs were sputter coated with gold (Mod. SCD030, Balzers AG, Balzers, Liechtenstein) and images were achieved in a Phenom™ Tabletop Scanning Electron Microscope (Phenom-World BV,

Eindhoven, Netherlands). The entire surface of each sample was examined, and images that were representative of the sample were taken.

Confocal Laser Scanning Microscopy

Biofilms were grown onto twelve antibiogram paper discs following the protocol above stated. They were fixed with a fresh solution containing 4% glutaraldehyde, for 2 h at room temperature. After several washings with 100 mM PBS (pH 7.0), fixed cells were made permeable by incubating with 0.1% Triton-X 100 in PBS for 5 min, and then washed with PBS. After blocking with 1% BSA-PBS, Alexa Fluor 488 phalloidin (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) was applied directly onto the glass slide and incubated for 1 h at 37 °C. After washing in PBS, discs were mounted onto a glass slide with a drop of mounting medium. Imaging was performed with a Confocal Radiance™ 2100 (BioRad Co, Hercules, CA) coupled to a Nikon E800 microscope (Nikon Instech Co., Kanagawa, Japan) with Plan-Apochromatic objectives (Sciences and Technologies Group Instruments Division, Melville, NY).

However, as no laser beam could pass through the thick paper matrix below biofilms, no images could be achieved and the CLSM was not carried out.

Statistics

For each test, descriptive statistics data (average, median, and standard deviation) were calculated. To test the data homogeneity it was determined the Pearson's coefficient of variation for each individual experiment. Finally, to test if data had normal distribution, it was applied the Kolmogorov-Smirnov normality test. Tukey HSD test was used to access differences between MTT reductive activities in biofilm-covered discs. A p value of 0.05 was considered as threshold to establish differences.

RESULTS

Capillary diffusion tests

Descriptive statistical data for capillary diffusion of crystal violet revealed mean OD_{540nm} values of 2.828 ± 0.070 for 0.1% CV and 0.597 ± 0.072 for 0.01% CV. Pearson's coefficients of variation were 2.467% and 8.055%, respectively, revealing that in both situations it had achieved good homogeneity of distribution. In both cases, Komogorov-Smirnov (K-S) test revealed normality of data distribution ($p > 0.05$).

Growing *C. albicans* biofilms

Mean values for MTT reduction were 1.638 ± 0.091 (*C. albicans*) and 0.113 ± 0.005 (Control). Pearson's coefficients of variation were 9.157% and 4.315%, respectively, revealing that in both situations it had achieved reasonable homogeneity of distribution. In both cases, the Komogorov-Smirnov (K-S) test revealed normality of data distribution ($p = 5.96E-9$). Tukey HSD test revealed significant higher reductive activity in biofilm-covered discs ($p < 0.0001$) (Figure 3).

Scanning Electron Microscopy

The inspection of upper surfaces of paper discs revealed the growing of *C. albicans* biofilm rich in pseudohyphae with few true hyphal cells (Figure 4). In the bottom paper disc surfaces, which remained in contact with the diffusive paper matrix, a great number of true hyphae was observed (Figure 5). Noteworthy, great amounts of budding yeast cells and pseudohyphae were seen inside the disc paper nets (Figure 6).

DISCUSSION

The necessity of a feasible system that generates biofilms under a constant nutrient flow with gas exchanging option seems to be very attractive. Before the development of PEBR, we had considered to grow biofilms onto Teflon covered fiber-glass screens (anti-mosquito screens) or synthetic fabrics. After this, it was evaluated the possibility of using sintered glass beads, which hypothetically could favor hyphal growth. However, none of such substrates were suitable to generate consistent candidal biofilms.

The idea of using thick filter paper discs was promptly tested, but the problem of discs immersion in the broth flow still remained. The system presented here supplies a laminar nutrient flow under low shear stress and mimics those situations in which nutrients come from the bottom layers of biofilms.

In the particular case of *C. albicans*, it is noteworthy to point out that hyphae can grow invading the paper discs bellow them. It may become useful when an investigator will be interested in to evaluate hyphal growth.

Another favorable point of such system is the possibility to grow biofilms under distinct atmospheric conditions. It is known that *Candida* spp. can grow in hypoxia (Synnott et al., 2010; Grahl et al., 2012) and anoxia (Rosa et al., 2008; Rymowicz et al., 2011), using parallel respiratory chain (Ruy et al., 2006) and fermentative pathways (Ogasawara et al., 2006). As the PEBR has a gas admission port, the headspace atmosphere can be easily changed as desired.

If the inner glass table is properly leveled, the “center-to-border” diffusion of fluids allows a proximate amount of nutrients that reach the antibiogram discs in a homogeneous manner. This is an advantage directly related to final biofilm biomasses. To evaluate the distribution of water-soluble molecules, crystal violet (CV) was used. CV is a cationic basic dye with molar mass of 407.98 g.mol⁻¹. (Patil et al., 2011) Its diffusion throughout the filter paper bed occurs without any “chromatographic-like arresting” in a way that CV molecules may flow freely through the paper matrix. It is interesting because many molecules used as nutrients for microbial growth as amino acids, sugars and vitamins are smaller than CV. Larger molecules that could be entrapped in the bed matrix can flow after

the paper saturation, a phenomenon noticeable after 2-3 hours post-broth admission. In favor of such thesis, we obtained final biofilm biomasses with variations not higher than 5.76%.

The SEM inspection revealed that candidal cells may grow through the paper substrate, what is very interesting. So far from the idea of mimicking living tissues, such evidence may be useful in future experiments in which “internally formed biofilms” were desired.

When handling with biofilms, high throughputness is among the most required features (Pettit et al., 2009; Kim et al., 2012; Kim et al., 2012). This system seems to be very robust in to offer such advantage once it is possible to grow up to 30 individual biofilms with low variation among their biomasses.

Besides the experimental advantages, it is also noteworthy to mention that its confection costs were inferior to US\$ 85.00 (without peristaltic pump and Kitasato flasks), with parts bought in local hardware stores. This is an important point of interest because an effective biofilm reactor with accessible costs becomes too attractive by research groups with low-budget.

The main negative point noticed is that handling greater amounts of microbial biomasses technical personnel must be aware of contamination risks. Thus it is imperative to avoid underestimating the possibility of environmental or personnel contamination or neglecting the standard rules of laboratory biosafety. Furthermore, despite such system can be used for microbes other than *Candida* spp., cellulolytic organisms will certainly solubilize the paper matrix and will not generate good biofilms.

Summarizing, we presented here an inexpensive, reliable and robust system that allows the obtaining of high-throughput biofilms with minor variations in biomasses due to the uniform nutrient diffusion in filter paper bed.

Acknowledgements

This study was granted by the Brazilian research agency Araucaria Foundation (Proc. 11524, Conv. 416/2009). Authors thank the cooperation of professors and technicians from the Electron Microscopy Centre and the Confocal Laboratory Facility of Federal University of Paraná.

REFERENCES

1. **Mendes A, Mores AU, Carvalho AP, Rosa RT, Samaranayake LP, Rosa EA.** 2007. *Candida albicans* biofilms produce more secreted aspartyl protease than the planktonic cells. Biol. Pharm. Bull. **30**:1813-1815.
2. **Taff HT, Nett JE, Zarnowski R, Ross KM, Sanchez H, Cain MT, Hamaker J, Mitchell AP, Andes DR.** 2012. A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. PLoS Pathog. **8**:e1002848.
3. **Vialás V, Perumal P, Gutierrez D, Ximénez-Embún P, Nombela C, Gil C, Chaffin WL.** 2012. Cell surface shaving of *Candida albicans* biofilms, hyphae, and yeast form cells. Proteomics. **12**:2331-2339.
4. **Baboni FB, Guariza-Filho O, Moreno AN, Rosa EA.** 2010. Influence of cigarette smoke condensate on cariogenic and candidal biofilm formation on orthodontic materials. Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop. **138**:427-434.
5. **Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP.** 2007. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. Arch. Oral Biol. **52**:761-767.
6. **McCoy WF, Costerton JW.** 1982. Fouling biofilm development in tubular flow systems. Dev. Indust. Microbiol. **23**:551-558.

7. **Ramage G, Wickes BL, López-Ribot JL.** 2008. A seed and feed model for the formation of *Candida albicans* biofilms under flow conditions using an improved modified Robbins device. *Rev. Iberoam. Micol.* **25**: 37-40.
8. **De Prijck K, De Smet N, Coenye T, Schacht E, Nelis HJ.** 2010. Prevention of *Candida albicans* biofilm formation by covalently bound dimethylaminoethylmethacrylate and polyethylenimine. *Mycopathologia.* **170**:213-221.
9. **Bernhardt H, Knoke M, Bernhardt J.** 2011. Efficacy of anidulafungin against biofilms of different *Candida* species in long-term trials of continuous flow cultivation. *Mycoses.* **54**:e821-827.
10. **Diaz PI, Xie Z, Sobue T, Thompson A, Biyikoglu B, Ricker A, Ikonomou L, Dongari-Bagtzoglou A.** 2012. Synergistic interaction between *Candida albicans* and commensal oral streptococci in a novel in vitro mucosal model. *Infect. Immun.* **80**:620-632.
11. **Carlson RP, Taffs R, Davison WM, Stewart PS.** 2008. Anti-biofilm properties of chitosan-coated surfaces. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* **19**:1035-1046.
12. **Uppuluri P, Chaturvedi AK, Lopez-Ribot JL.** 2009. Design of a simple model of *Candida albicans* biofilms formed under conditions of flow: development, architecture, and drug resistance. *Mycopathologia.* **168**:101-109.
13. **Uppuluri P, Lopez-Ribot JL.** 2010. An easy and economical in vitro method for the formation of *Candida albicans* biofilms under continuous conditions of flow. *Virulence.* **1**:483-487.
14. **Gottschamel J, Richter L, Mak A, Jungreuthmayer C, Birnbaumer G, Milnera M, Brückl H, Ertl P.** 2009. Development of a disposable microfluidic

- biochip for multiparameter cell population measurements. Anal. Chem. **81**:8503-8512.
15. **Hawser SP, Douglas LJ.** 1994. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. Infect. Immun. **62**:915-921.
16. **Grahl N, Shepardson KM, Chung D, Cramer RA.** 2012. Hypoxia and fungal pathogenesis: to air or not to air? Eukaryot. Cell. **11**:560-570.
17. **Synnott JM, Guida A, Mulhern-Haughey S, Higgins DG, Butler G.** 2010. Regulation of the hypoxic response in *Candida albicans*. Eukaryot. Cell. **9**:1734-1746.
18. **Rosa EA, Rached RN, Ignácio SA, Rosa RT, José da Silva W, Yau JY, Samaranayake LP.** 2008. Phenotypic evaluation of the effect of anaerobiosis on some virulence attributes of *Candida albicans*. J. Med. Microbiol. **57**:1277-1281.
19. **Rymowicz AU, Souza RD, Gursky LC, Rosa RT, Trevilatto PC, Groppo FC, Rosa EA.** 2011. Screening of reducing agents for anaerobic growth of *Candida albicans* SC5314. J. Microbiol. Methods. **84**:461-466.
20. **Ruy F, Vercesi AE, Kowaltowski AJ.** 2006. Inhibition of specific electron transport pathways leads to oxidative stress and decreased *Candida albicans* proliferation. J. Bioenerg. Biomembr. **38**:129-135.
21. **Ogasawara A, Odahara K, Toume M, Watanabe T, Mikami T, Matsumoto T.** 2006. Change in the respiration system of *Candida albicans* in the lag and log growth phase. Biol. Pharm. Bull. **29**:448-450.
22. **Patil S, Deshmukh V, Renukdas S, Patel N.** 2011. Kinetics of adsorption of crystal violet from aqueous solutions using different natural materials. Int. J. Environ. Sci. **1**:1116-1134.

23. **Kim J, Hegde M, Kim SH, Wood TK, Jayaraman A.** 2012. A microfluidic device for high throughput bacterial biofilm studies. *Lab Chip.* **12**:1157-1163.
24. **Kim J, Park HD, Chung S.** 2012. Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation. *Molecules.* **17**:9818-9834.
25. **Pettit RK, Weber CA, Pettit GR.** 2009. Application of a high throughput Alamar blue biofilm susceptibility assay to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **8**:28.

Table 1. Descriptive statistics for capillary diffusion tests

Parâmetro	0.1% Crystal violet	0.01% Crystal violet
Sampling size (n)	30	30
Average $\pm$ std dev	2.828 ± 0.070	0.597 ± 0.072 3
Pearson's variation coefficient	2.467%	12.065%
Normality (Komogorov-Smirnov)	$p > 0.05$ (normal)	$p > 0.05$ (normal)4

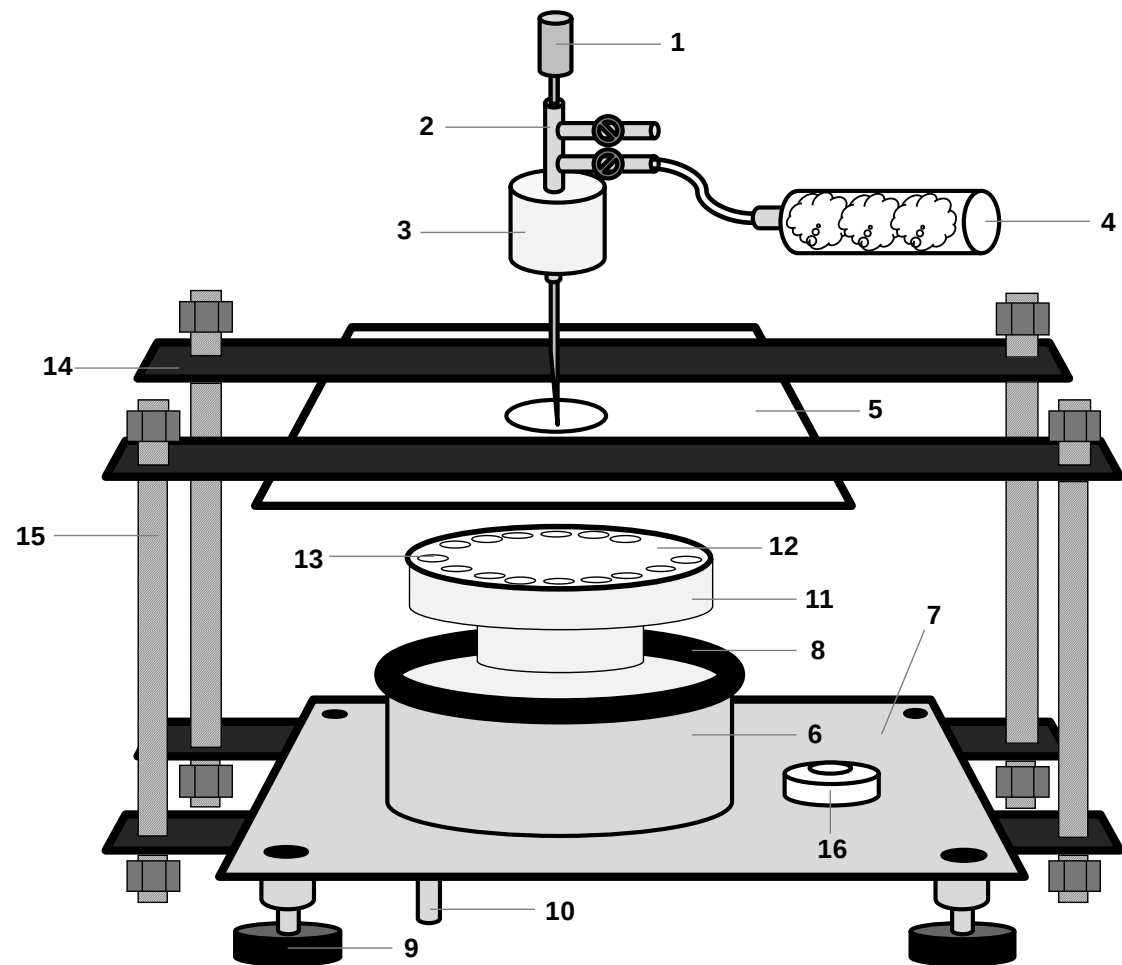


Figure 1. Compounding parts of the PEBR (details in the text). 1: Stainless steel needle; 2: Two-way controller; 3: Rubber stopper; 4: Syringe barrel with sterile cotton; 5: Glass lid with central hole; 6: Stainless steel cylinder; 7: Stainless steel base; 8: Rubber profile; 9: Screw level; 10: Sewage exit; 11: Glass table; 12: Diffusion matrix (filter paper); 13: Antibiogram disks with *C. albicans*; 14: Steel brackets; 15: Sealing nuts; 16: Removable level.

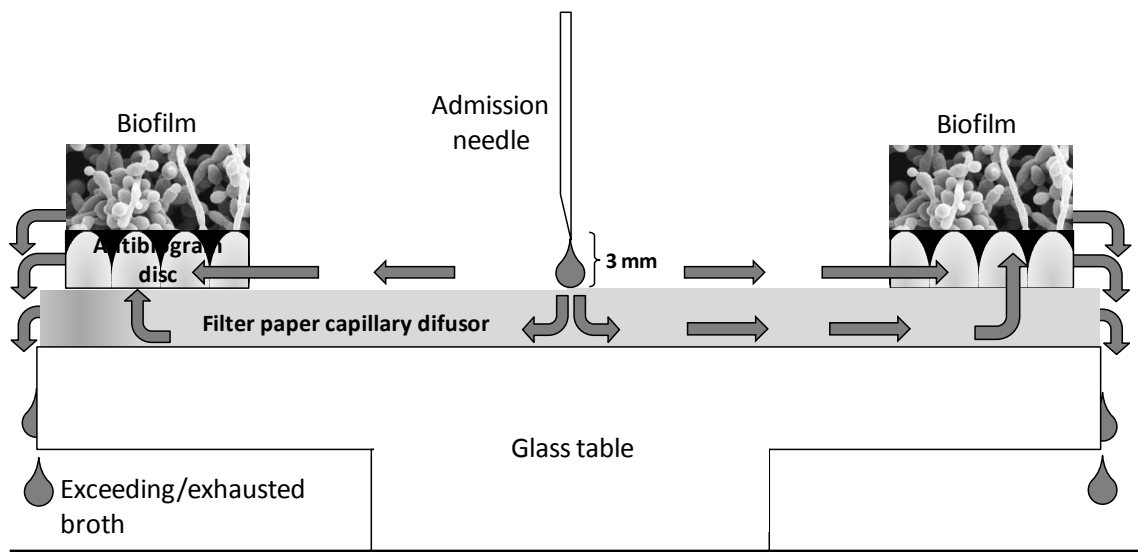


Figure 2. Putative events happening in PEER when working.

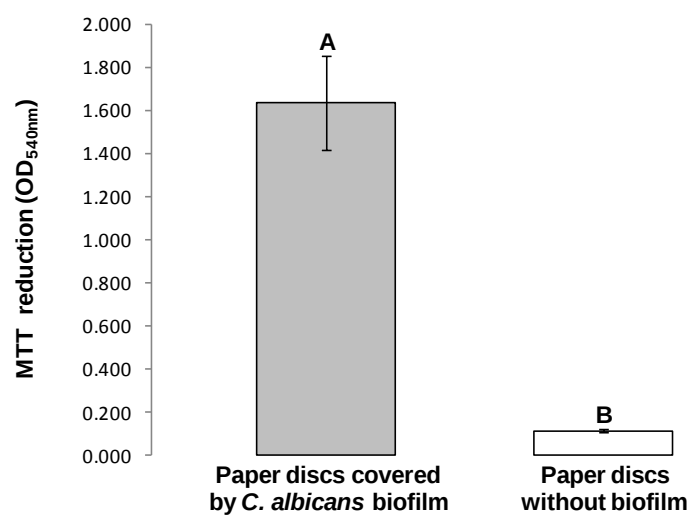


Figura 3. MTT reducing rate induced by *C. albicans* SC5314 biofilms grown using the PEBR. Error bars indicate the 95% confidence interval.

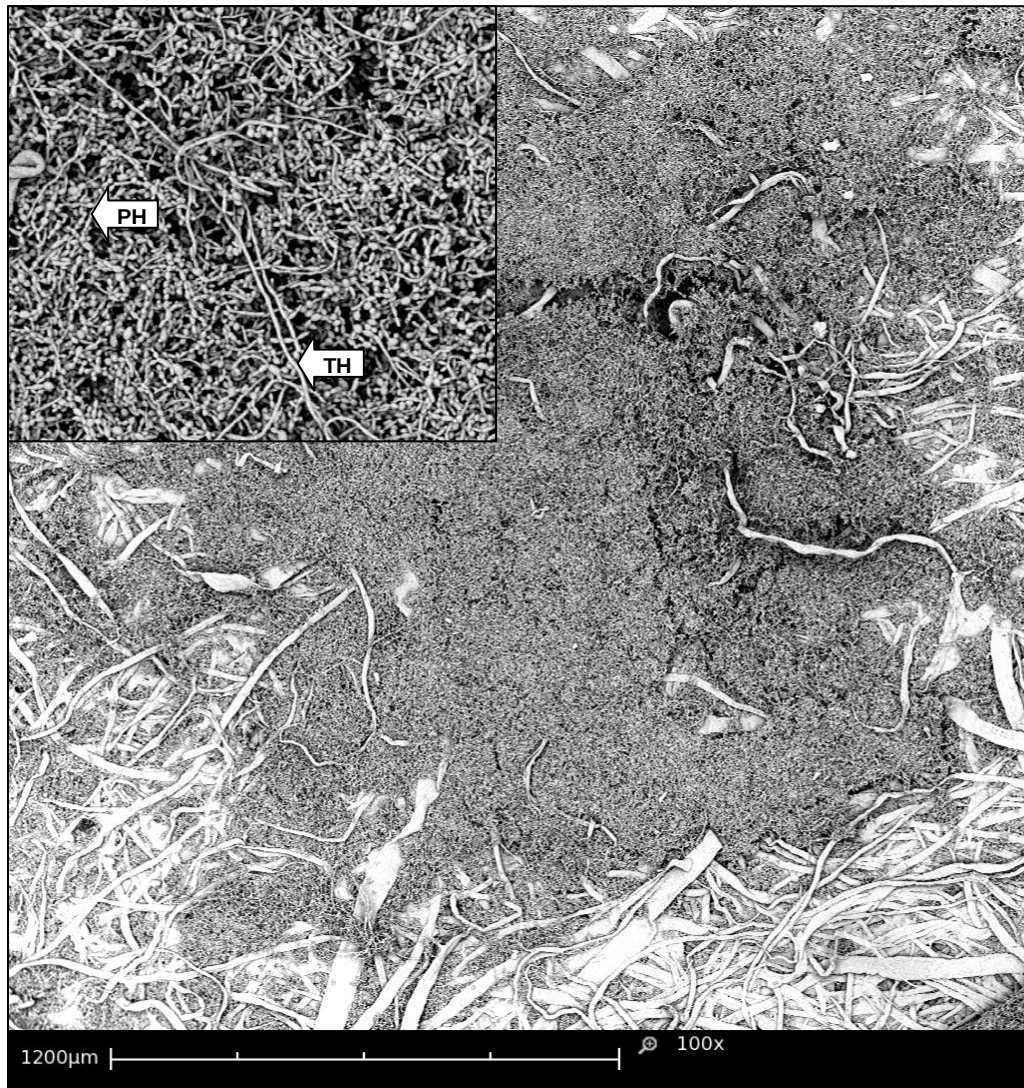


Figure 4. Panoramic view of *C. albicans* SC5314 biofilm grown over antibiogram disc. In detail, amplified view showing an intense growth of pseudohyphae (PH) and few true hyphae (TH).



Figure 5. Antibiofilm disc/filter paper interface showing an intense growth of pseudohyphae (PH) and true hyphae (TH).

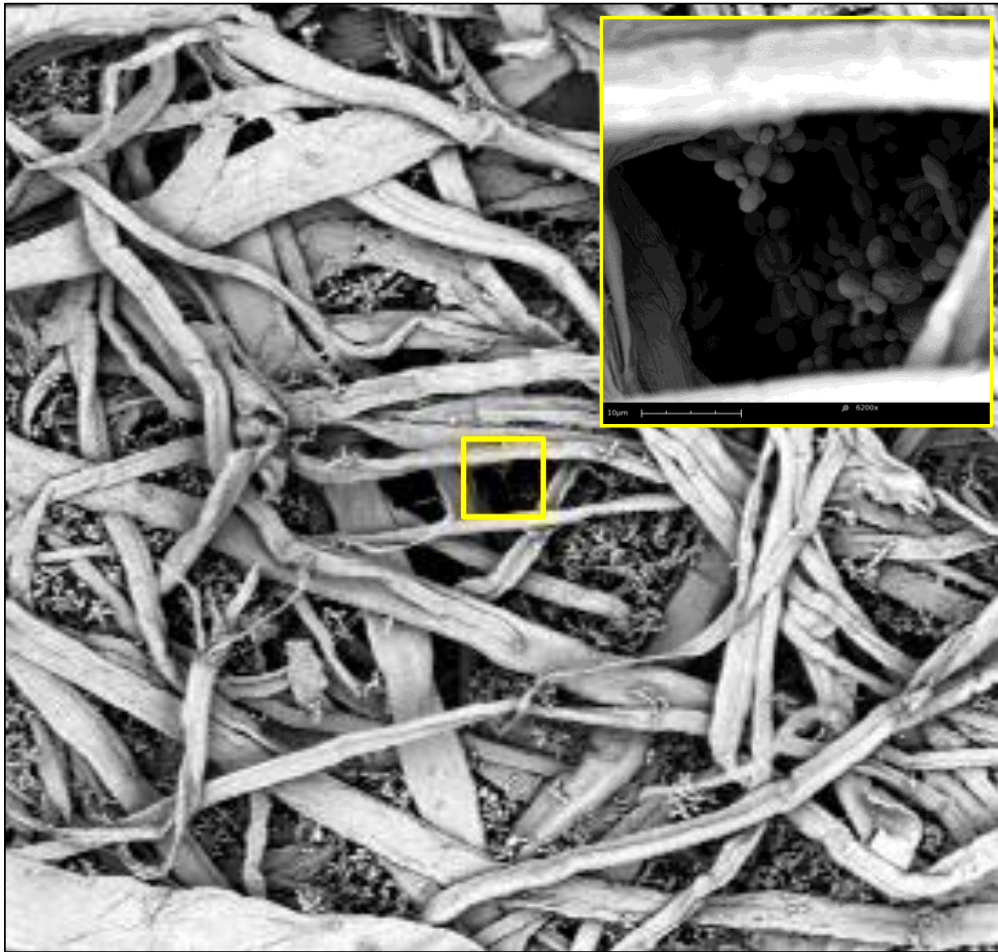


Figure 6. Antibiogram disc/filter paper interface showing an intense growth of pseudohyphae within the antibiogram disc matrix.