



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

JULIANA MARIA MACIEL

ATIVIDADE ANTI-BIOFILME DE PROTEINASE K E DNASE I E DE
ANTIMALÁRICOS SOBRE BIOFILMES DUO-ESPÉCIE DE *Candida albicans* E
Streptococcus mutans

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M138a Maciel, Juliana Maria.

Atividade anti-biofilme de Proteinase K e DNase I e de antimaláricos sobre
Biofilmes duo-espécie de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* / Juliana Maria Maciel. – 2022.
97 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Raimunda Samia Nogueira Brilhante.

Coorientação: Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage.

1. Biofilmes orais. 2. Proteinase K. 3. DNase I. 4. Cloroquina. 5. Primaquina. I. Título.

CDD 610

JULIANA MARIA MACIEL

ATIVIDADE ANTI-BIOFILME DE PROTEINASE K E DNASE I E DE
ANTIMALÁRICOS SOBRE BIOFILMES DUO-ESPÉCIE DE *Candida albicans* E
Streptococcus mutans

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Medicina

Orientadora: Prof. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

Coorientadora: Prof. Dra. Lidiany Karla A. R. Gerage

JULIANA MARIA MACIEL

ATIVIDADE ANTI-BIOFILME DE PROTEINASE K E DNASE I E DE
ANTIMALÁRICOS SOBRE BIOFILMES DUO-ESPÉCIE DE *Candida albicans* E
Streptococcus mutans

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Medicina.

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dra. Germana Costa Paixão
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

À Deus, à minha família e ao meu esposo por
me darem forças para concluir esse projeto.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, ao CNPq e à FUNCAP pelo apoio financeiro e concessão da bolsa para a realização desta pesquisa.

Ao Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) e a Universidade Federal do Ceará (UFC) pelo apoio, oportunidade e disponibilização do espaço físico e equipamentos.

Ao Laboratório de Microbiologia do Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGO) pelo apoio em disponibilizar equipamentos.

A Central Analítica da UFC pela possibilidade de obtenção das imagens de microscopia.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, pelo empenho em manter o CEMM como referência em pesquisa.

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, pelo seu caráter e postura como professor, sempre disposto a nos ajudar a desbravar caminhos.

À minha professora orientadora Prof. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, por me apresentar o mundo da pesquisa, por me dar oportunidade de trilhar os caminhos do universo acadêmico e pela confiança de acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava. Grata por suas contribuições e lições de vida.

À Prof. Dra. Glaucia Morgana de Melo Guedes, Dr. Jonathas Sales de Oliveira e Dra. Silviane Praciano Bandeira pelos valorosos conselhos, pelo acolhimento, apoio e ajuda.

À Prof. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage, por oferecer o espaço do seu laboratório para apoiar este estudo, e oferecer seu conhecimento e disponibilidade.

À Terezinha de Jesus, por todo o carinho, paciência, escuta e pelos conselhos nas horas difíceis.

Às amigas que o CEMM me deu: Lana Garcia, Gleiciane Rocha, Gêssica Araújo. Não sei como agradecer-las por tudo o que fizeram por mim. Palavras não serão capazes de expressar. Obrigada pelas ajudas nos incansáveis experimentos, pelos conselhos, afeto, risadas, por me acolherem nos momentos de aflição e fraqueza. À Raissa Lopes, a amiga que fiz na graduação, me acompanhou durante a iniciação científica, no mestrado e na vida.

Aos demais colegas e ex-colegas do CEMM: Feynman Dias, Anderson Costa, Mirele Fernandes, Lívia Galdino, Raquel Colares, Lara de Aguiar, Lucilene Queiroz, Vandbergue Santos, Jaiane Alves, Felipe Magalhães e aos demais. Grata por tornarem o caminho menos árduo.

Aos colegas do Laboratório do PPGO que me auxiliaram, disponibilizaram tempo e conhecimento e fizeram me sentir acolhida: Wanessa, Ruan e Rúlio.

Às secretárias do PPGCM, Ivone e Rita que sempre se mostraram atenciosas e prestativas. Aos demais funcionários e colaboradores do Centro de Biomedicina pelo “bom dia” acolhedor e pelos sorrisos de cada dia.

À minha família, em especial aos meus pais: Jurandir e Ana Lúcia, e à minha irmã: Júlia por me incentivar e apoiar em toda a minha trajetória, de todas as formas. Sem vocês eu não teria conseguido.

Ao meu esposo Lucas, pela compreensão, pelo apoio em todos os momentos, por segurar a minha mão e não me deixar desistir deste sonho.

Gratidão também à Tânia, Cleiton, Isabele e Isadora, minha segunda família que mais uma vez me acolheram como parte do seu lar.

E a todos que torcem pelo meu sucesso e felicidade, gratidão.

À Deus por me permitir chegar até aqui e por todas as bênçãos em minha vida.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

Candida albicans é um fungo comensal com capacidade de interagir com bactérias como *Streptococcus mutans* comumente associadas a cárie dentária devido a sua capacidade de metabolizar a sacarose e favorecer a coadesão com outros microrganismos. Estes microrganismos também podem ocasionar outras patologias orais associadas a doenças negligenciadas, como a malária. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito anti-biofilme de proteinase K e DNase I e dos antimaláricos cloroquina e primaquina em biofilmes duo-espécie de *C. albicans* e *S. mutans*. Os valores da menor concentração capaz de inibir 50% do biofilme em comparação ao controle foram determinados através dos testes de microdiluição em caldo com 8 cepas de *C. albicans*, incluindo a cepa de *C. albicans* ATCC 10231 em combinação com 1 cepa de *S. mutans* ATCC 25175. Após o tratamento com as concentrações de 4 a 128µg/mL para proteinase K e DNase I e 32 a 1.024µg/mL para cloroquina e primaquina, os biofilmes foram avaliados quanto à biomassa através do método de coloração com cristal violeta e a atividade metabólica através do ensaio de redução do MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difenil tetrazólio]. Posteriormente foram realizadas as imagens microscópicas através da microscopia confocal (proteinase K e DNase I) e microscopia eletrônica de varredura (proteinase K, DNase I, cloroquina e primaquina). A proteinase K reduziu ($P < 0,001$) a biomassa e a atividade metabólica dos biofilmes atingindo inibições máximas de 58,66% e 71,33% nas concentrações a partir de 16 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente. A DNase I reduziu ($P < 0,001$) a biomassa e atividade metabólica dos biofilmes atingindo o máximo de inibição em 49,63% e 55,62%, nas concentrações a partir de 32 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente. A cloroquina reduziu ($P < 0,001$) a atividade metabólica dos biofilmes em 49,8% na menor concentração testada de 32µg/mL e 74,9% na maior concentração testada de 1.024 µg/mL. A primaquina em sua menor concentração testada de 32 µg/mL, inibiu 35,91% da atividade metabólica e na maior concentração de 1.024 µg/mL houve inibição de 74,2%. Também foram realizados testes associando cloroquina e primaquina 32 µg/mL de cada droga. A associação das drogas inibiu 33,84% da atividade metabólica quando comparado ao controle. As imagens demonstraram o efeito anti-biofilme (proteinase k e DNase I) e antimicrobiano (primaquina e cloroquina) das drogas em estudo.

Palavras-chave: Biofilmes orais; Proteinase K; DNase I; Cloroquina; Primaquina.

ABSTRACT

Candida albicans is a commensal fungus capable of interacting with bacteria such as *Streptococcus mutans* commonly associated with dental caries due to its ability to metabolize sucrose and favor coadhesion with other microorganisms. These microorganisms can also cause other oral pathologies associated with neglected diseases, such as malaria. The aim of this study was to evaluate the anti-biofilm effect of proteinase K and DNase I and the antimalarials chloroquine and primaquine on duo-species biofilms of *C. albicans* and *S. mutans*. The values of the lowest concentration capable of inhibiting 50% of the biofilm compared to the control were determined by microdilution tests in broth with 8 strains of *C. albicans*, including the strain of *C. albicans* ATCC 10231 in combination with 1 strain of *S. mutans* ATCC 25175. After treatment with concentrations of 4 to 128 μ g/mL for proteinase K and DNase I and 32 to 1,024 μ g/mL for chloroquine and primaquine, the biofilms were evaluated for biomass using crystal violet staining and metabolic activity by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium] reduction assay. Subsequently, microscopic images were performed using confocal microscopy (proteinase K and DNase I) and scanning electron microscopy (proteinase K, DNase I, chloroquine and primaquine). Proteinase K reduced ($P < 0.001$) the biomass and metabolic activity of biofilms reaching maximum inhibitions of 58.66% and 71.33% at concentrations from 16 μ g/mL and 4 μ g/mL, respectively. DNase I reduced ($P < 0.001$) the biomass and metabolic activity of biofilms, reaching the maximum inhibition of 49.63% and 55.62%, at concentrations from 32 μ g/mL and 4 μ g/mL, respectively. Chloroquine reduced ($P < 0.001$) the metabolic activity of biofilms by 49.8% at the lowest tested concentration of 32 μ g/mL and 74.9% at the highest tested concentration of 1024 μ g/ml. Primaquine at its lowest tested concentration of 32 μ g/mL, inhibited 35.91% of the metabolic activity and at the highest concentration of 1,024 μ g/mL there was an inhibition of 74.2%. Tests were also performed associating chloroquine and primaquine 32 μ g/mL of each drug. The combination of drugs inhibited 33.84% of the metabolic activity when compared to the control. The images demonstrated the anti-biofilm (proteinase k and DNase I) and antimicrobial (primaquine and chloroquine) effect of the drugs under study.

Keywords: Oral biofilms; Proteinase K; DNase I; Chloroquine; Primaquine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Características da macro e micromorfologia de <i>C. albicans</i>	17
Figura 2 –	Relação filogenética de 55 espécies de <i>Streptococcus</i>	21
Figura 3 –	Macromorfologia das colônias de <i>S. mutans</i> cultivado em ágar mitis salivarius.....	23
Figura 4 –	Etapas de formação do biofilme.....	26
Figura 5 –	Mapa do Brasil que destaca as áreas de risco para malária, de acordo com os diferentes níveis de incidência parasitária anual – IPA –, em 2018.....	31
Figura 6 –	Sensibilidade <i>in vitro</i> de biofilmes duo-espécie de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i> expostos à Proteinase K e DNase I.....	43
Figura 7 –	Imagens de microscopia confocal de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes duo-espécie de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i>	44
Figura 8 –	Sensibilidade <i>in vitro</i> de biofilmes duo-espécie de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i> expostos à cloroquina e primaquina.....	47
Figura 9 -	Sensibilidade <i>in vitro</i> de biofilmes duo-espécie de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i> expostos à associação de cloroquina e primaquina.....	48
Figura 10 –	Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do biofilme duo-espécie de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i> após 24 horas de incubação com cloroquina e primaquina.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentração Inibitória Mínima de Proteinase K ou DNase I contra biofilmes duo-espécie de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i>	45
Tabela 2 -	Concentração Inibitória Mínima de Cloroquina e Primaquina em biofilmes duo-espécie de <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Candida albicans</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS - *Acquired immunodeficiency syndrome*

AMB – Anfotericina B

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI - *Brain Heart Infusion*

CDC - *Center for Disease Control*

CFU/UFC – Unidade Formadora de Colônia

CO₂ - Dióxido de carbono

CPI - Cárie da Primeira Infância

DIU – Dispositivo Intrauterino

DMSO - Dimetilsufóxido

eDNA – DNA extracelular

EI – Endocardite Infecciosa

EPS – Polissacarídeos extracelulares

EUA – Estados Unidos da América

FLC – Fluconazol

Gbps – Proteínas de Ligação ao Glucano

GMS – Metenamina de prata de Grocott-Gomori

GTF - Glucosiltransferase

HE – Hematoxilina-eosina

HIV - *Human immunodeficiency vírus*

IFN – Interferon

IL - Interleucina

ITU – Infecção do Trato Urinário

MTT - [3- (4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difenil tetrazólio

PAS - Ácido periódico de Schiff

PAVM - Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

Th2 – Linfócito T do tipo Th2

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

YNB - Base de nitrogênio de levedura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Gênero <i>Candida</i>.....	16
2.1.1 <i>Candida albicans</i>.....	17
2.2 Gênero <i>Streptococcus</i>.....	19
2.2.1 <i>Streptococcus mutans</i>.....	21
2.3 Biofilmes.....	25
2.4 Relação entre <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i> na cárie dentária.....	28
2.5 Relação entre biofilmes orais, doenças periodontais, cárie e malária.....	29
2.6 Drogas.....	31
2.6.1 <i>Proteinase K</i>	31
2.6.2 <i>DNase I</i>.....	31
2.6.3 <i>Cloroquina</i>.....	32
2.6.4 <i>Primaquina</i>.....	33
3 HIPÓTESES.....	35
4 OBJETIVOS.....	36
4.1 Objetivo geral.....	36
4.2 Objetivos específicos.....	36
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
5.1 Local de estudo.....	37
5.2 Microrganismos.....	37
5.3 Drogas.....	37
5.4 Formação do biofilme duo-espécie.....	38
5.5 Sensibilidade do biofilme duo-espécie.....	38
5.6 Avaliação da biomassa e atividade metabólica.....	38
5.7 Microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura.....	39
5.8 Análise estatística.....	40
6 RESULTADOS.....	41
6.1 Resultados de <i>Proteinase K</i> e <i>DNase I</i>.....	41
6.2 Resultados de <i>Cloroquina</i> e <i>Primaquina</i>.....	43
7 DISCUSSÃO.....	47
8 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO.....	63
APÊNDICE B – ARTIGO SUBMETIDO	64
APÊNDICE C – ARTIGO SUBMETIDO COM OS RESULTADOS DA DISSERTAÇÃO	89

1 INTRODUÇÃO

O microbioma oral é formado por microrganismos, que vivem em simbiose com o hospedeiro, como *Candida albicans*, levedura oportunista associada a afecções orais, e *Streptococcus mutans*, bactéria Gram-positiva relacionada a doenças dentárias (BOUDAREL *et al.*, 2018). Esses microrganismos produzem fatores de virulência que facilitam a infecção, como a formação de biofilme das duas espécies em conjunto (PHILIP; SUNEJA; WALSH, 2018).

A cárie dentária, por exemplo, é causada por um conjunto de microrganismos capazes de formar biofilme como *C. albicans* e *S. mutans*, tratando-se assim de uma doença biofilme dependente (PHILIP; SUNEJA; WALSH, 2018). *C. albicans* é frequentemente encontrada em crianças com cárie na primeira infância (XIAO *et al.*, 2017). *S. mutans* tem um alto potencial cariogênico (LEMOS *et al.*, 2019). Diante dos muitos fatores de virulência de ambas as espécies, a resistência antimicrobiana se constitui uma ameaça séria, especialmente por causa da escassez de opções de antimicrobianos no mercado, e por isso, novas abordagens anti-biofilme são urgentemente necessárias (HEMMINGSEN *et al.*, 2021).

Existem alguns fatores de risco para o desenvolvimento de doenças periodontais, como: genética, uso de tabaco e álcool, má higiene bucal, idade, sexo, disfunção nutricional e infecções, como a malária (NEWCOMB; DARBY; COOPER, 2009). A malária é uma patologia que parece ter correlação com doenças orais como a pericoronite (OWOTADE *et al.*, 2006) e predispõe a infecções oportunistas através da supressão imunológica capaz de levar a uma diminuição qualitativa e quantitativa de linfócitos T (SHUAI *et al.*, 2020; NEWCOMB *et al.*, 2009).

Apesar dos avanços direcionados a prevenção da cárie dentária, principalmente associada ao uso de flúor, o controle de biofilmes cariogênicos continua sendo desafiador. As abordagens adotadas atualmente são limitadas a antimicrobianos tradicionais e de amplo espectro que não são capazes de degradar a matriz extracelular e modificar aspectos físico-químicos do biofilme (LIU *et al.*, 2018).

Tendo em vista a importância do DNA extracelular na matriz e na formação de biofilme, este torna-se um alvo potencial para o desenvolvimento de estratégias anti-biofilme usando enzimas degradantes de matriz como proteinase K e DNase I, assim como a relevância do uso de drogas antimaláricas em pacientes com manifestações orais de malária, que é uma doença negligenciada e fator de risco para cárie e doenças dentárias.

Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos dos degradantes de matriz, proteinase K e DNase I, e os antimaláricos, cloroquina e primaquina, frente ao biofilme duo-espécie de *C. albicans* e *S. mutans*.

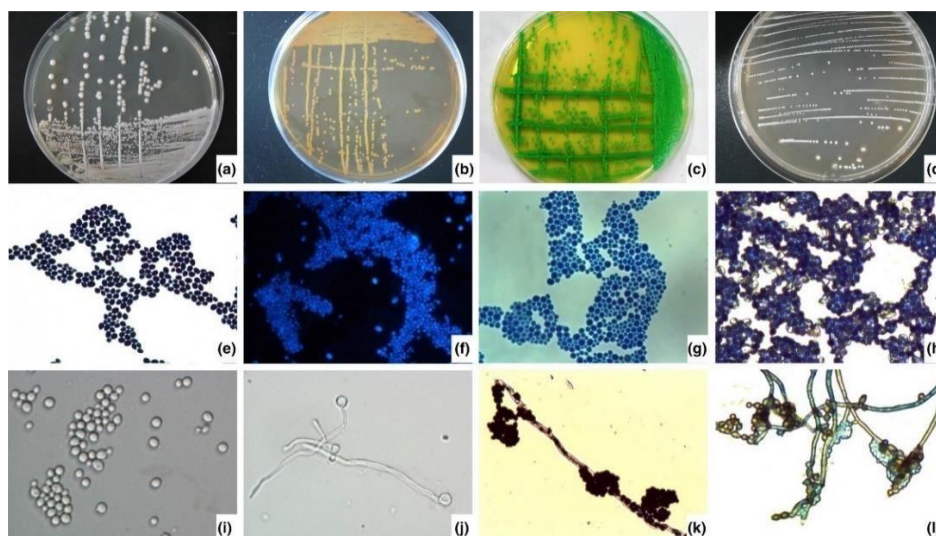
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Candida*

Candida spp. pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales e família Saccharomycetacea (LEVETIN *et al.*, 2016). Existem em torno de 80 espécies de *Candida*, dentre elas *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida lusitanae*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata* que já foram isoladas como causadoras de doença além de *Candida auris* relatada pela primeira vez em 2009 (MEZZARI; FUENTEFRIA, 2012; JEFFERY-SMITH *et al.*, 2018) dentre as espécies mais prevalentes no mundo tem-se *C. albicans*, em seguida *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (FERRÃO *et al.*, 2020).

As espécies de *Candida* na sua micromorfologia apresentam-se com formato de células leveduriformes ovais (3 a 5 µm) que produzem blastoconídios e brotamentos (FIGURA 1). Todas as espécies de *Candida*, com exceção de *C. glabrata*, produzem hifas verdadeiras ou pseudo-hifas. Na sua macromorfologia as colônias cultivadas no meio Sabouraud apresentam-se como colônias de textura glabrosa, relevo convexo e coloração branca-amarelada (SIDRIM; ROCHA, 2004). Com relação à histologia, são fracamente coradas com hematoxilina-eosina (HE) e coram-se melhor com ácido periódico de Schiff (PAS) e prata metenamina (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

Figura 1: Características da macro e micromorfologia de *C. albicans*.



Legenda: (a), (b), (c) e (d) representam as características da macromorfologia da colônia de *Candida albicans* (e) Micromorfologia - Coloração de Gram (f) Calcofluor White Strain mostrou que as células fúngicas apresentam fluorescência azul sob luz ultravioleta. (g) Coloração com azul de toluidina (h) Lactofenol azul de algodão (i) Células de levedura ovais e clamidoconídios. (j) Tubo germinativo formado pela extensão externadas células de levedura. (k / l) Hifas com clamidoconídios foram observadas por exame microscópico de esfregaço em meio ágar de milho. Fonte: WHANG *et al*, 2021.

Infecções por *Candida* são responsáveis por 75-88% de todas infecções fúngicas nos Estados Unidos da América (BERKOW; LOCKHART, 2017) e por 80% de todas as infecções fúngicas sistêmicas no mundo, além de ser a quarta, sexta e sétima causas principais de infecções nosocomiais e infecções da corrente sanguínea nos EUA, Europa e Brasil, respectivamente (CANELA *et al.*, 2017). Esse gênero é responsável pela terceira causa de septicemias em todo o mundo (PAPPAS *et al.*, 2018). Na América Latina, a espécie *C. albicans* correspondeu a 51,8% dos isolados, em seguida *C. tropicalis* com 13,2%, *C. parapsilosis* com 10,3%, *C. glabrata* 7,2% e *C. krusei* com 1,4% de ocorrência, se constituindo como um patógeno humano importante em ambientes clínicos, principalmente em pacientes imunossuprimidos e transplantados, pessoas vivendo com HIV/AIDS e pacientes em uso de quimioterapia antineoplásica (SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2007).

Os antifúngicos utilizados para tratar infecções causadas por espécies do gênero *Candida*, são divididos em quatro classes: azólicos, polienos, equinocandinas e alilaminas, atuando em diferentes alvos moleculares (PAPPAS *et al.*, 2016). Este gênero possui a espécie *C. krusei* que dispõe de características de resistência intrínseca a antifúngicos amplamente prescritos como fluconazol (FLC) (JAMIU *et al.*, 2020).

2.1.1 *Candida albicans*

Em 1839, Langenbeck foi o primeiro a observar esta levedura em aftas bucais de um paciente com tifo, considerando este microrganismo como agente etiológico da doença de forma equivocada. Em 1842, David Gruby definiu a candidíase oral, classificando o microrganismo como pertencente ao gênero *Sporotrichum*. Porém, somente no ano de 1923, Berkhout transferiu a espécie para o gênero *Candida* e criando a espécie *C. albicans* (SIDRIM; ROCHA, 2004).

C. albicans é um microrganismo que compõe a microbiota, colonizando vários sítios do organismo humano de forma assintomática, entretanto em razão de desequilíbrio deste ambiente como mudanças de pH e de conteúdo nutricional, pode haver crescimento desordenado causando infecção (NOBILE; JHONSON, 2015) para isso, depende de fatores de virulência sendo eles: transição morfológica entre leveduras e hifas, expressão de adesinas e invasinas na superfície da célula, timotropismo, formação de biofilme, troca fenotípica e secreção de enzimas hidrolíticas (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

Para adentrar nos tecidos, *C. albicans* que é uma espécie polimórfica, se apresenta na sua forma de levedura que está relacionada a capacidade de aderir a célula do hospedeiro, e posteriormente para invadir o tecido do hospedeiro pode haver expressão de hifas verdadeiras ou pseudohifas que medeiam a endocitose induzida (SUDBERY, 2011; THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011; Mayer; Wilson, HUBE, 2013; TALAPKO *et al.*, 2021). Foi evidenciado que existe uma toxina presente nas hifas de *C. albicans*, a candidalisina que é um fator crucial para a ocorrência de candidíase. A candidalisina é um citolítico anfipático α -helicoidal de 31 aminoácidos essencial para danificar as células hospedeiras (TALAPKO *et al.*, 2021).

C. albicans é capaz de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas. As principais infecções relacionadas ao fungo, incluem: candidíase oral, vaginite, endocardite, estomatite dentária, infecções por queimadura e em feridas. Vários dispositivos médico-hospitalares como: cateteres, marcapassos, enxertos, dispositivos intrauterinos (DIUs), dispositivos relacionados ao sistema nervoso central, lentes de contato e implantes dentários podem ser colonizados com facilidade (RAUT *et al.*, 2017). Podem haver múltiplas apresentações clínicas de candidíase, podendo ter como agente etiológico uma ou mais espécies de *Candida*, causando infecção isolada ou mista (FARAH; LYNCH; MCCULLOUGH, 2010; REINHARDT *et al.*, 2019).

Nos biofilmes formados *in vitro*, a presença de *C. albicans* modifica consideravelmente o ambiente, influenciando no aumento da biomassa e na produção de exopolissacarídeos (EPS), promovendo acúmulo de biofilme (HE *et al.*, 2017).

Pesquisas que descrevem o transcriptoma, proteoma e lipidômica do desenvolvimento dos biofilmes de *C. albicans*, análises comparativas deste mesmo biofilme com células planctônicas, auxiliaram na compreensão dos mecanismos de resistência e patogenicidade do estilo de vida do biofilme (LATTIF *et al.*, 2008; SENEVIRATNE *et al.*, 2008).

A cavidade oral abriga um número vasto de espécies bacterianas que em determinadas situações podem interagir com *C. albicans* na formação de biofilmes (DONGARI-BAGTZOGLU *et al.*, 2009) frequentemente encontrada em associação com *S. mutans* (BACHTIAR; BACHTIAR, 2018) e sendo *C. albicans* um dos microrganismos predominantes na placa dental, associado com lesões de cárie (SHINO *et al.*, 2016) e superfícies abióticas como prótese total removível, cateteres e outros dispositivos (CREMER *et al.*, 2015).

C. albicans está associada a cárie dentária principalmente em crianças, sendo isolada frequentemente de amostras de saliva ou de placa dental supra gengival, porém seu papel na cárie em relação a iniciação ou progressão da doença permanece incerto (MORAGA *et al.*, 2016) secreta proteinases que liberam agentes tóxicos ou antigênicos que podem perdurar a inflamação do tecido e acionar a resposta imunológica (DE-LA-TORRE *et al.*, 2018).

Estudos direcionados a reduzir a incidência de cárie na infância, pesquisaram sobre abordagens terapêuticas para prevenir ou reduzir os níveis de *C. albicans* em lesões de cárie, incluindo agentes antifúngicos como azóis e polienos, e também clorexidina que tem amplo espectro antimicrobiano e é utilizado como suplemento terapêutico tópico (SHINO *et al.*, 2016).

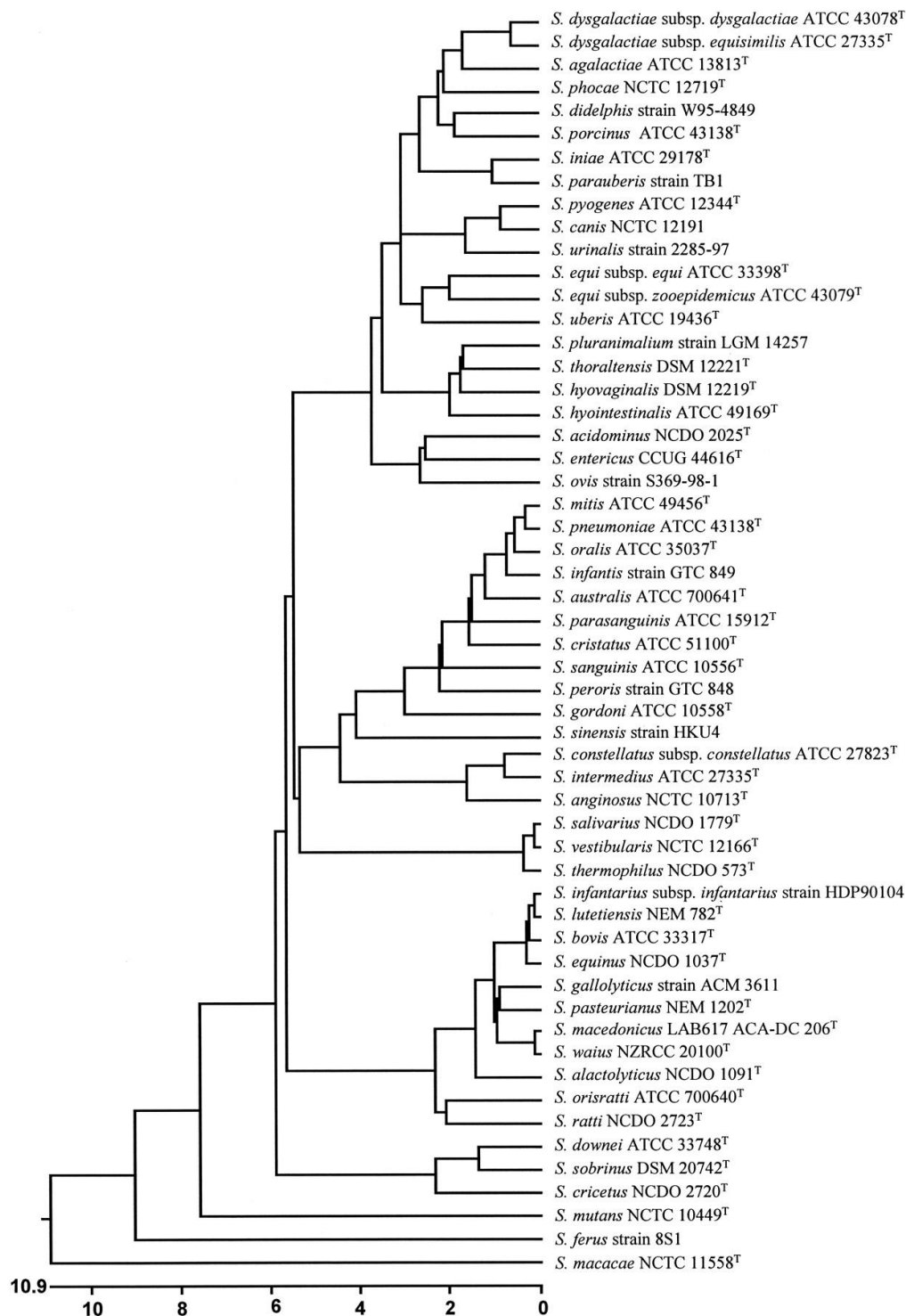
2.2 Gênero *Streptococcus*

Streptococcus spp. são bactérias gram positivas, com formato esférico ou oval que comumente aparecem em cadeias. São complexos do ponto de vista taxonômico (FIGURA 2), possivelmente responsáveis por maior percentual de infecções, em números e causando uma maior variedade de doenças do que qualquer outro grupo de bactérias da ordem Lactobacillales (TORTORA *et al.*, 2017).

A classificação destes microrganismos não adota um padrão universal podendo ser confusa. Um dos sistemas de classificação adotados se baseiam em características hemolíticas, fisiológicas e antigênicas. Desta forma, os *Streptococcus* são classificados como β -hemolíticos ou não β -hemolíticos, sendo este último podendo ser subdividido por α -hemolíticos e gama ou não-hemolíticos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

Os *Streptococcus* não são capazes de realizar o metabolismo respiratório aeróbio. Foram encontrados no genoma do microrganismo genes responsáveis por transporte e metabolismo de glicose, frutose, lactose, sacarose, manose, galactose, celobiose, trealose, β -glucosídeos, maltose/maltodextrose, rafinose, ribulose, melibiose, isomaltossacarídeos, amido e, sorbose (MAY *et al.*, 2016).

A maioria das espécies de *Streptococcus* podem ser consideradas comensais, geralmente encontradas em superfícies mucosas da cavidade oral, trato respiratório superior e trato gastrointestinal, todavia sobre determinadas condições podem causar infecções locais ou sistêmicas. *S. pyogenes* e *S. pneumoniae* são os principais patógenos de importância clínica (WHILEY; HARDIE, 2015).

Figura 2: Relação filogenética de 55 espécies de *Streptococcus*.

Fonte: FACKLAM, 2002.

2.2.1 *Streptococcus mutans*

S. mutans pertence ao filo Firmicutes, em termos taxonômicos: ordem Lactobacillales, família Streptococcaceae. A maioria das cepas isoladas é α -hemolítica ou não-

hemolítica (HAMADA; SLADE, 1980) e as cepas de *S. mutans* podem ser classificadas em quatro grupos ou sorotipos (C, E, F e K), de acordo com a composição do polissacarídeo da superfície celular, 75% das cepas isoladas de cárie dentária pertencem ao sorotipo C, 20% pertencem ao sorotipo E o restante, 5% classificados como sorotipo F ou K (LEMOS *et al.*, 2018).

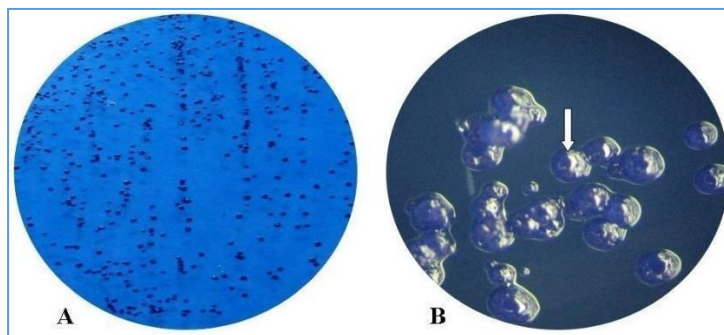
São anaeróbios facultativos, embora o crescimento da maioria das espécies seja estimulado por um aumento de CO₂, são homofermentadores, ou seja, o único produto de fermentação da glicose é o ácido lático. São catalase-negativos e oxidase-negativos (KONEMAN, *et al.*, 2018).

S. mutans faz parte do grupo *Streptococcus viridans*, que inclui também *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus mitis*, essas bactérias são responsáveis por cerca de 40-60% dos casos de endocardite infecciosa, sendo o *S. mutans* representando um quinto dos casos (NILSSON *et al.*, 2019) pois os *Streptococcus* orais como fazem parte da cárie dentária, podem adentrar na corrente sanguínea causando bacteremia através de hábitos como escovar os dentes ou mastigar (CARINCI *et al.*, 2018). O acúmulo de placa dentária também está associado ao uso de aparelhos ortodônticos, modificando o microambiente através da mudança de pH, aumentando a colonização de *S. mutans* favorecendo a desmineralização do esmalte dentário e a ocorrência de doenças bucais relacionadas à biofilme (DIAS *et al.*, 2018).

Em 1924, J. Kilian Clarke foi o primeiro a propor que o *S. mutans* (FIGURA 3) tinha papel no desenvolvimento da cárie dentária (BANAS; DRAKE, 2018) e denominando-o de estreptococos mutantes, devido ao seu formato de célula ovalado diferenciando-o dos estreptococos já conhecidos até então (LEMOS *et al.*, 2013). *S. mutans* é um componente essencial da microbiota oral, e sua participação como agente etiológico da cárie é indiscutível (CARDOSO *et al.*, 2011).

Diversos microrganismos podem coexistir em comunidades polimicrobianas associadas a cárie dental, dentre eles: *S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. intermedius*, *S. vestibulares*. Sendo o *S. mutans* considerado o principal patógeno cariogênico, embora *S. sobrinus* seja também isolado frequentemente, mas *S. mutans* é mais cariogênico devido a proteínas específicas que auxiliam na fixação primária a superfície dentária como GbpA e GbpB que auxiliam na ligação ao glucano (YADAV; PRAKASH, 2017).

Figura 3: Macromorfologia de *S. mutans*.



Legenda: Macromorfologia das colônias de *S. mutans* cultivado em ágar mitis salivarius. A: aumento de 30x, B: aumento de 50x; a seta indica uma gota de polissacarídeos extracelulares. Fonte: COTA; ALVIM, 2018.

S. mutans é considerado um colonizador e agente etiológico primário para o desenvolvimento da cárie dentária, uma vez que estimula a síntese de matriz extracelular insolúvel através de glucanos para aderir de forma irreversível as superfícies (MATHEW *et al.*, 2020). Estes glucanos são sintetizados pela bactéria através da ação das glucosiltransferases (GTFs) e medeiam a adesão das células à superfície dentária (MATSUMOTO-NAKANO, 2018).

S. mutans é o microrganismo mais comumente associado a Cárie da Primeira Infância (CPI) que é um problema de saúde bucal que afeta principalmente pessoas em situação economicamente desfavorecida. Metaboliza açúcares para a produção de ácidos, que contribuem para a desmineralização da estrutura dentária. Essas bactérias podem ser transmitidas da mãe para o filho (ANIL; ANAND, 2017). É uma das espécies mais acidogênicas e acidúricas que desempenham papel importante no acúmulo de biofilme (BUD *et al.*, 2021).

Essa bactéria induz a formação de cárie dentária quando há presença de dieta rica em sacarose. É presente em todas as populações humanas, embora 50% dos portadores de *S. mutans* não desenvolverão lesões de cárie em até dois anos de acompanhamento. A capacidade deste microrganismo de promover doença depende de uma série de fatores, incluindo: 1) a virulência da cepa em questão; 2) a resposta imunológica do hospedeiro no momento em que a infecção é estabelecida; 3) condições endógenas (exemplo, microbiota oral) e condições externas (exemplo, consumo de sacarose) (MATTOS-GRANER; KLEIN; SMITH, 2013).

S. mutans é um dos microrganismos responsáveis pela “iniciação da doença”, porém há uma grande comunidade bacteriana envolvida no processo de desenvolvimento da cárie, pois essa patologia é uma doença de natureza polimicrobiana. Associações bacteriano-fúngicas

aumentam sinergicamente a virulência do biofilme cariogênico, especificamente associações entre *S. mutans* e *C. albicans* (PHILIP; SUNEJA; WALSH, 2018).

S. mutans é a espécie dominante com maior capacidade de produzir biomassa em biofilmes dentais humanos do que outras espécies de *Streptococcus* devido a sua tolerância ao ácido, e, portanto, sua capacidade de se adaptar e viver em um ambiente de baixo pH. Expressa múltiplas exoenzimas, as glucosiltransferases (Gtfs) que o torna o principal sintetizador de polissacarídeos extracelulares (EPS) na cavidade oral (WHANG; REN, 2017). A cárie dentária é a infecção de cavidade oral associada a biofilme mais prevalente no mundo, impactando negativamente a vida das pessoas (DIAS *et al.*, 2018).

A matriz extracelular do biofilme de *S. mutans* consiste em polissacarídeos de glucano, DNA extracelular (eDNA) e proteínas (RAINEY *et al.*, 2019). *S. mutans* secreta três tipos de glucosiltransferases (Gtfs): GtfB, GtfC e GtfD. As Gtfs fazem a lise da molécula de sacarose em glicose e frutose. A GtfB sintetiza glucano insolúvel em água, a GtfC sintetiza glucanos tanto solúveis, quanto insolúveis em água e a GtfD sintetiza glucanos solúveis em água. A síntese desses glucanos promovem a adesão e coesão das bactérias, modulando inicialmente o processo de formação do biofilme cariogênico (KOO *et al.*, 2010; NGUYEN *et al.*, 2014).

Este microrganismo produz ao menos quatro proteínas de ligação ao glucano (Gbps): GbpA, GbpB, GbpC e GbpD. GbpA é a primeira proteína a se ligar ao glucano, está envolvida no processo de aderência celular às superfícies dentárias e vem demonstrando contribuir significativamente para a cariogenicidade de *S. mutans*, *in vitro* e *in vivo*, participa do desenvolvimento da placa dentária, minimizando o estresse da população bacteriana. Tem um papel relevante na ligação de proteínas e EPS na formação e manutenção de um ambiente equilibrado para o biofilme. A deficiência desta proteína acarreta em perda de ligação a matriz de EPS, resultando em um biofilme fraco (MATSUMOTO-NAKANO, 2017). GbpB, outra proteína de ligação também tem importância na cariogenicidade de *S. mutans*, sugere uma relação funcional entre genes envolvidos na manutenção da forma e da parede celular (KOO *et al.*, 2010; NGUYEN *et al.*, 2014).

Sobre o biofilme de *S. mutans*, os determinantes de sua patogenicidade podem estar relacionados a descoberta de estruturas longas, filamentosas observadas nas superfícies de bactérias. Tais estruturas exibem propriedades adesivas que desempenham papel relevante na adesão celular e aos tecidos do hospedeiro (KRZYŚCIAK *et al.*, 2014).

2.3 Biofilmes

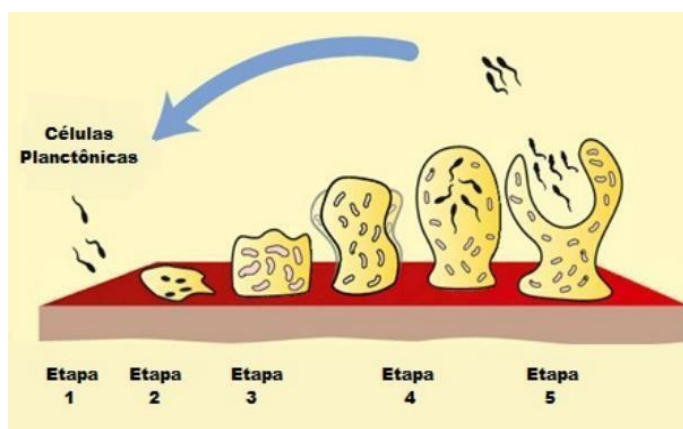
Anthony van Leeuwenhoek (1632-1723) observou e descreveu biofilmes utilizando um microscópio primitivo, extraindo matéria de sua própria boca onde viu agregados de micróbios na superfície dos dentes e de fragmentos raspados de sua língua (HØIBY, 2017). Todavia, a primeira definição de biofilme foi feita por John William Costerton, e descrita em sua publicação “*how bacteria stick*” em 1978. Tal estrutura foi definida como: comunidade estruturada de células bacterianas envoltas em uma matriz polimérica autoproduzida e aderente a uma superfície viva ou inanimada (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978).

Biofilmes podem ser definidos como sistemas complexos, que compreendem um conjunto de microrganismos vivendo em comunidade, imersos em uma matriz extracelular tridimensional (BOUDAREL *et al.*, 2018). A formação de biofilme é um processo de desenvolvimento que se inicia por microrganismos planctônicos que formam agregados, e que após concluir o processo de formação da estrutura, as células se dispersam para retornar ao seu crescimento planctônico e formar novos biofilmes (RUMBAUGH; SAUER, 2020).

No ano de 2007, o *Center for Disease Control* (CDC) mostrou que cerca de 1,7 milhões de infecções nosocomiais foram devido a biofilmes, levando a um grande impacto econômico de U \$ 11 bilhões apenas nos Estados Unidos (BANERJEE *et al.*, 2018).

A formação de biofilme é um processo composto por estágios (FIGURA 4) que inicia com a adesão microbiana, e posteriormente com produção e acúmulo de matriz extracelular, que é composta por substâncias poliméricas, tais como: polissacarídeos, proteínas, substâncias húmicas, DNA extracelular, e também moléculas envolvidas na comunicação célula a célula (AZEREDO *et al.*, 2016) este processo de comunicação entre microrganismos depende da densidade populacional e de mudanças na expressão de proteínas patterns (CARDOSO *et al.*, 2011).

Figura 4: Etapas de formação do biofilme



Fonte: BANERJEE *et al.*, 2018.

Ao contrário das células planctônicas, os biofilmes conferem proteção contra agentes ambientais estressores, produtos químicos e mecânicos, além do estresse (BOUDAREL *et al.*, 2018) são um ambiente que confere segurança para as células microbianas e podem ser considerados como reservatórios para fontes persistentes de infecções (WALL *et al.*, 2019).

Além de fungos e bactérias, os biofilmes podem conter archaea, vírus e parasitas que infectam os epitélios orais. Na mucosa oral os biofilmes modulam o sistema imunológico fazendo com que o hospedeiro os tolere (CHEVALIER *et al.*, 2017). Os microrganismos podem se associar em diversas superfícies com a finalidade de formar biofilmes mono ou polimicrobianos. Superfícies biológicas, domésticas, industriais são alguns exemplos de superfícies que podem ser colonizados por biofilmes (RODRIGUES; GOMES; RODRIGUES, 2020).

A matriz extracelular do biofilme tem seu peso constituído por 3% de proteínas, DNA extracelular, polissacarídeos e lipídios e o restante, 97% composto por água (NARAYANA; SHIHARI, 2019). O DNA extracelular (e-DNA) é considerado um fator de estabilidade estrutural dos biofilmes em muitas espécies bacterianas, inclusive de bactérias Gram positivas a exemplo de *Gardnerella vaginalis* (HYMES *et al.*, 2013) e a sua prevalência na matriz do biofilme foi encontrada em diversos microrganismos, Gram positivos e gram negativos. A liberação do e-DNA é mediada pela morte celular programada (apoptose) e pelos vacúolos e vesículas da membrana celular, contribuindo para as interações célula-célula e célula-superfície, transferência de genes, integridade, viscosidade e elasticidade da matriz do biofilme (SHARMA; SINGH, 2018).

Células de biofilme possuem características fenotípicas diferenciadas comparado com as células planctônicas. Um exemplo é o biofilme de *C. albicans* que foi demonstrado uma alteração nos componentes de carboidratos de suas paredes celulares com um aumento no conteúdo de β -glucanos que representam cerca de 50-60% da parede celular (DONGARI-BAGTZOGLOU *et al.*, 2009).

Podem estar associados a infecções resistentes animais, incluindo os humanos e também em plantas, além da contaminação de dispositivos médicos como implantes e cateteres. A formação da matriz é um processo dinâmico que depende da disponibilidade de nutrientes, da síntese de material extracelular, competição e tensão de cisalhamento (FLEMMING *et al.*, 2016).

Biofilmes multiespécies da mesma comunidade fornecem benefícios mútuos no intercâmbio de material genético, cooperação metabólica, compartilhamento de sistema detector de *quorum*, desenvolvimento de resistência passiva, virulência, modulação

imunológica do hospedeiro e influências dos subprodutos que concedem vantagens competitivas as espécies envolvidas (KIFELEW; MITCHELL; SPECK, 2019).

Muitos agentes antimicrobianos que têm atividade contra células planctônicas mostraram-se ineficazes contra as mesmas bactérias crescendo em biofilme. As células de biofilme exibem sensibilidades diferentes a uma certa concentração antimicrobiana (CARDOSO *et al.*, 2011). Bactérias vivendo em biofilme são inerentemente mais resistentes a antibióticos que as mesmas células vivendo como planctônicas (VERDEROSA; TOTSIKA; FAIRFULL-SMITH, 2019). A maioria das infecções envolvem biofilmes multiespécies (KIFELEW; MITCHELL; SPECK, 2019). Quando os microrganismos interagem e formam biofilmes como estes, sua resistência a terapia antimicrobiana é maior comparado com a sua condição formando biofilme monoespécie (KIM; KIM; OH, 2021).

As células sésseis são protegidas do ambiente pela matriz extracelular autoproduzida que a recobre, tornando isso um fator chave para o mecanismo de resistência as drogas, portanto, as infecções relacionadas à biofilme são de difícil tratamento e controle, visto que as células sésseis são de 10 a 1.000 vezes mais resistente que as planctônicas (RODRIGUES; GOMES; RODRIGUES, 2020). Tal resistência aos antibióticos deve-se ao aumento da transmissão de marcadores de resistência, bombas de efluxo e resistência adquirida, além dos biofilmes possuírem propriedades estruturais dinâmicas que sofrem rápidas alterações em sua expressão gênica, resultando em mudança nos antígenos de superfície (BANERJEE *et al.*, 2018).

Acredita-se que a tolerância a antibióticos de biofilme envolva mecanismos alternativos para a resistência bacteriana aos antimicrobianos, sendo definida como a capacidade das bactérias que residem no biofilme sobreviverem ao tratamento antimicrobiano, utilizando seus complementos de genes (VERDEROSA; TOTSIKA; FAIRFULL-SMITH, 2019).

As infecções clínicas mais comumente associadas à adesão bacteriana e implantes são cáries dentárias, periodontite, otite média crônica, infecção pulmonar por complicações de fibrose cística, rinosinusite crônica, infecção do trato urinário (ITU), feridas crônicas, amigdalite recorrente e infecções relacionadas à dispositivos médicos (NARAYANA; SHIHARI, 2019) e os tratamentos convencionais para biofilmes incluem remoção mecânica, antissépticos e antibioticoterapia (FREITAS *et al.*, 2016).

2.4 Relação entre *C. albicans* e *S. mutans* na cárie dentária

A compreensão dos mecanismos de interação entre espécies microbianas é de extrema relevância para entender a patogênese de diversas doenças humanas. Interações ecológicas entre *C. albicans* e bactérias orais, como o *S. mutans* tornaram-se um fator de interesse científico (BARBOSA *et al.*, 2016).

Na cavidade oral *C. albicans* é frequentemente encontrada com altas concentrações de *S. mutans*, devido a sua capacidade de interagir com microrganismos comensais, formando biofilmes em diversas superfícies como mucosas e acrílicas. A coadesão destes microrganismos é fortemente aumentada quando há presença de sacarose, favorecendo a formação do biofilme. Estudos demonstraram que as Gtfs presentes no *S. mutans* são essenciais para a ligação das bactérias à superfície fúngica de forma ativa. Quando há sacarose disponível, as exoenzimas de superfície produzem quantidades consideráveis de EPS na superfície fúngica, fornecendo sítios aprimorados de ligação para *S. mutans* (KIM *et al.*, 2017).

O sinergismo entre *C. albicans* e *S. mutans* já foi amplamente explorado, tal biofilme está envolto por uma matriz composta grande parte por α -glucanos extracelulares sintetizados a pela atividade das Gtfs, principalmente a GtfB secretada por *S. mutans* (ČERNÁKOVÁ; JORDAO; BUJDÁKOVÁ, 2018).

A capacidade de *S. mutans* de degradar rapidamente a sacarose permite que *C. albicans* utilize os produtos da degradação da sacarose, como a frutose promovendo a morfogênese de hifas de *Candida*, e em contrapartida o fungo aumenta a disponibilidade de sítios de ligação para a adesão da bactéria (PHILIP; SUNEJA; WALSH, 2018).

A cavidade oral é um nicho para mais de 700 espécies de microrganismos que se acumulam principalmente nas superfícies dentárias para formar a placa (biofilme oral), onde encontram-se bactérias cariogênicas envolvidas no desenvolvimento da cárie. Mudanças ecológicas envolvidas nesse processo resultam em desmineralização mais rápida que a remineralização dentária (QIU *et al.*, 2020; LIANG *et al.*, 2020).

A cárie da primeira infância é uma doença altamente prevalente, tendo o *S. mutans* como principal agente etiológico. A cárie é uma doença multifatorial e polimicrobiana com microrganismos atuando sinergicamente ou antagonicamente. *C. albicans* é um fungo oportunista que age em sinergismo com *S. mutans* e está frequentemente associada a lesões cariosas graves em crianças (HUFFINES; SCOFFIELD, 2020).

É a doença crônica de maior prevalência entre as doenças infecciosas da cavidade oral, é a causa mais predominante de perda dentária entre crianças e adultos jovens e também atinge idosos sendo a principal causa de ruptura da raiz dentária nesse grupo (QIU *et al.*, 2020).

Tanto em dentições primárias como permanentes a presença da cárie pode levar a dor tanto pela infecção em si como pelo tratamento convencional (GRINDEFORD *et al.*, 2018).

O tratamento envolve a terapia medicamentosa que tem um papel relevante na inibição do crescimento microbiano e na resposta inflamatória, e assim, promover a regeneração tecidual. Devido aos efeitos indesejados do tratamento sistêmico, como resistência antimicrobiana e efeitos adversos, o tratamento local ainda é o mais considerado para doenças infecciosas orais. (LIANG *et al.*, 2020).

2.5 Relação entre malária, biofilmes orais, doenças periodontais e cárie.

A malária humana é causada por pelo menos cinco espécies diferentes do gênero *Plasmodium*: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Na maioria das regiões endêmicas a infecção se dá principalmente por *P. vivax* e *P. falciparum* (RECHT *et al.*, 2017). As manifestações orais em casos de malária por *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* esporadicamente se manifestam.

As principais manifestações orais são: sangramento gengival, glossite, palidez na língua e na mucosa oral, traumas dentários, xerostomia e halitose, embora outros estudos tragam manifestações como: úlcera oral, pericoronite e gengivoestomatite (SHUAI *et al.*, 2020). Assim, a falta de saliva relacionado a terapia medicamentosa e suas imunoglobulinas associadas, eletrólitos e benefícios de proteção, facilita o desenvolvimento do biofilme oral, o que causa doenças nas gengivas e perda de dentes (ENWONWU; SALAKO, 2012; NEWCOMB; DARBY; COOPER, 2009).

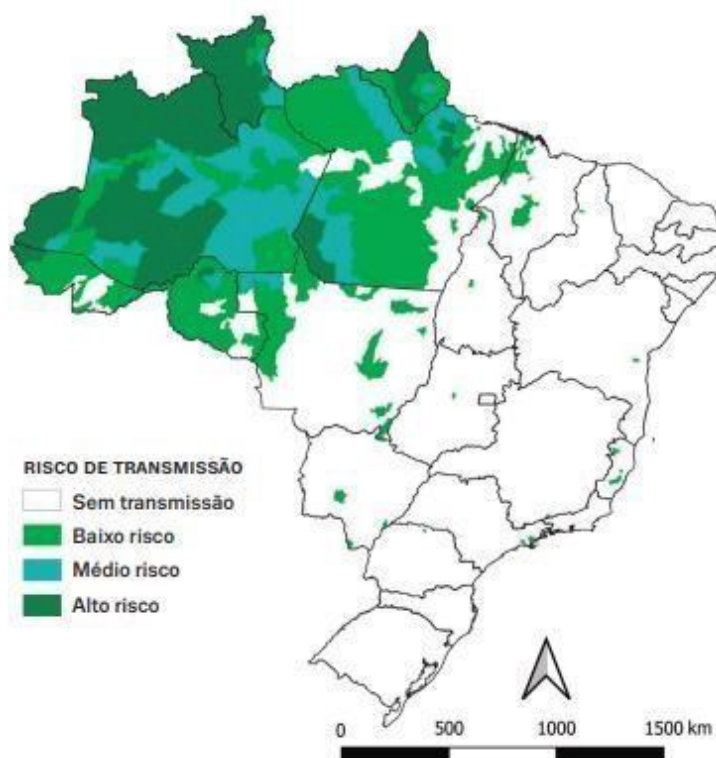
É uma patologia conhecida por predispor a infecções oportunistas através do comprometimento do sistema imunológico e da depleção de linfócitos T e produção de óxido nítrico. Parte da resposta imunológica da malária se dá através da resposta Th2 que é predominante na fase mais tardia da infecção, que é inibitória da produção de c-IFN e IL-2, ambos importantes para o controle da doença. (OWOTADE; GREENSPAN, 2008).

A malária se configura um problema de saúde pública com relevância em países tropicais com fragilidade no sistema de saúde (LANDIER *et al.*, 2016), é a doença com etiologia parasitária mais prevalente do mundo, sendo 93% dos casos situados no continente africano (GOMES *et al.*, 2020). Na América do Sul, a maioria dos casos se concentram na Região Amazônica (99,7%) (GOMES *et al.*, 2020). No Brasil (FIGURA 5), em 2018 foram notificados 190.000 casos da doença, na Região Nordeste, no estado da Paraíba, foram reportados 175 casos suspeitos de malária entre 1994-2018, e em 2019 foram notificados 20 casos no município de

Conde/Paraíba (GOMES *et al.*, 2020). Na América, a maioria dos casos são causados por *Plasmodium vivax* (GOMES *et al.*, 2020), e o tratamento recomendado pelo Ministério da Saúde para este protozoário é a associação de Cloroquina e Primaquina, por 3 e 7 dias, respectivamente (BRASIL, 2021).

As doenças periodontais são distúrbios que podem ter vários fatores envolvidos com o seu aparecimento como fatores genéticos, inflamatórios ou de origem metabólica dando origem a periodontite resultando em destruição do ligamento periodontal e osso alveolar. Tais condições podem surgir a partir de uma resposta imune exacerbada no hospedeiro a agentes infecciosos presentes no biofilme oral, a exemplo, a periodontite é uma doença inflamatória crônica, multifatorial associada a biofilme disbiótico e caracterizada e degradação progressiva do aparato de inserção dental, caracterizada por perda de inserção em dois ou mais sítios interproximais não adjacentes sendo a sua gravidade classificada de acordo com estágio e grau (STEFFENS; MARCANTONIO, 2018, ENWONWU; SALAKO, 2012).

Figura 5: Mapa do Brasil que destaca as áreas de risco para malária, de acordo com os diferentes níveis de incidência parasitária anual – IPA –, em 2018



Fonte: BRASIL, 2021.

Carvalho (2020) apresentou um estudo preliminar na região amazônica que é endêmica para a malária, que associa uma doença infecciosa como a malária que ocorreu em algum momento da vida como fator predisponente para risco de cárie e perda dentária, principalmente em casos graves. Neste estudo, a malária é tida como um fator biológico de exposição em algum momento que culminou posteriormente em agravos como cárie, doença periodontal e perdas dentárias.

2.6 Drogas e compostos

2.6.1 *Proteinase K*

Foi isolada pela primeira vez e purificada por Ebeling e colaboradores em 1974. No ano de 1986, Jany e colaboradores sequenciaram os aminoácidos da proteinase K. A primeira estrutura cristalina da proteinase K foi conhecida em 1988 através de difração de raios-X, e atualmente, sabe-se da existência de 113 estruturas cristalinas (REN *et al.*, 2019).

A proteinase K é uma serino-protease semelhante a subtilisina, capaz de hidrolisar a queratina. É tida como uma protease de grande espectro com elevada atividade proteolítica contra proteínas nativas e não-nativas, preferindo a clivagem o lado carboxil de alguns aminoácidos (REN *et al.*, 2019).

Essa enzima tem múltiplas utilizações, uma delas é quando adicionada a detergentes para degradar moléculas proteicas, melhorando a eficiência de descontaminação (REN *et al.*, 2019). O tratamento enzimático de biofilme com proteinase K foi utilizado para induzir a degradação de proteínas na matriz, aumentando assim a descarga de ácidos nucleicos como mecanismo compensatório (KARYGIANNI; ATTIN; THURNHEER, 2020).

Proteinase K é uma enzima proteolítica que tem sido utilizada em estudos como degradante de matriz extracelular dissolvendo biofilmes de bactérias como: *S. aureus* e *G. vaginalis*, por exemplo (NIAZI *et al.*, 2014).

2.6.2 *DNase I*

A desoxirribonuclease I (DNase I) é uma endonuclease que cliva o DNA de fita simples e dupla de forma não específica (VILLARREAL *et al.*, 2013). O efeito anti-biofilme desta DNase foi estudado para microrganismos como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Haemophilus influenzae* e *Klebsiella pneumoniae*. A maioria destes estudos foram conduzidos utilizando a DNase I mais comercializada (derivada de pâncreas bovino). A aplicabilidade deste composto na formação

de biofilme foi avaliada no pré-tratamento de bactérias, pós tratamento de biofilmes, e tratamento duplo (SHARMA; SINGH, 2018) embora não seja uma estratégia para prevenção da formação de biofilmes. O pré-tratamento com a enzima envolve exposição de bactérias de forma contínua a DNase I, o pós-tratamento envolve a penetração da DNase I no biofilme (SWARTJES *et al.*, 2013).

As enzimas DNase podem destruir o DNA extracelular (e-DNA) e inibir a formação e maturação de biofilmes (KIM *et al.*, 2017). Ao ser direcionada a atuar no e-DNA, a enzima DNase I também foi eficaz na utilização como tratamento auxiliar na eliminação de biofilmes relacionados à fibrose cística por antibióticos (KARYGIANNI; ATTIN; THURNHEER, 2020).

A utilização de DNase I com antimicrobianos pode desfazer a matriz extracelular a aumentar a morte de células pela ação sinérgica das drogas (TAN *et al.*, 2018). Em 2013, Swartjes e colaboradores relataram que a DNase revestida com polimetacrilato inibe a adesão de *S. aureus* em 95% e *P. aeruginosa* em 99% além de prevenir nestes casos, a formação do biofilme (YE *et al.*, 2017). Tratamentos de biofilme utilizando DNase I demonstraram melhorar a ação dos antibióticos (MOHAMMED *et al.*, 2013).

2.6.3 Cloroquina

A cloroquina (CQ) foi desenvolvida em 1930 a partir de outra droga, a quinacrina (HARRISON; GRIFFIN; LEVITZ, 2000) e tem sido usada contra a malária mundialmente há quase 70 anos, sendo ainda droga de primeira escolha em muitos países como: Indonésia, Índia, Papua Nova Guiné, Mianmar, Guiana e também na América do Sul. Acredita-se que tem como alvo farmacológico a polimerização de ferriprotoporfirina IX (porção heme), gerando substâncias tóxicas dentro do *Plasmodium* spp. resultando em morte celular. Devido ao aparecimento de resistência por parte de algumas cepas de *Plasmodium falciparum* e *P. vivax*, pensou-se em direcionar o uso dessa molécula para novos alvos terapêuticos, sendo realizado ensaios clínicos testando uma possível ação antirretroviral em pessoas infectadas com HIV. Também foi encontrada atividade antifúngica, em espécies de *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* (WEBER *et al.*, 2000; KHAN *et al.*, 2005). *Saccharomyces cerevisiae* quando testado em altas concentrações (FINKELSTEIN, STRAUSBERG, 1979; DELLING, RAYMOND, SCHURR, 1998) e atividade antibacteriana contra *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa* (ALEKSIĆ *et al.*, 2017).

Em *C. neoformans* e *H. capsulatum* a atividade antifúngica pode ser devido ao acúmulo da substância no vacúolo fúngico, e Cloroquina sendo quimicamente uma base fraca,

pode levar ao aumento do pH endocítico e lisossomal de células eucarióticas (HENRIET *et al.*, 2013). Para fungos como *C. neoformans* a ação antifúngica de cloroquina varia desde a inibição do crescimento do fungo até a facilitação no processo de captura e morte das leveduras por macrófagos (COELHO; CASADEVALL, 2016).

Dias-Melicio e colaboradores, 2007 evidenciaram através de estudos em laboratório que a cloroquina inibe a sobrevivência intracelular de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis* em macrófagos humanos influenciando na obtenção de ferro pelo fungo (DIAS-MELICIO *et al.*, 2007). Outros estudos demonstraram que cloroquina inibe o transporte de tiamina em leveduras, assim como em células humanas (ISLAHUDIN *et al.*, 2013). Acredita-se que a cloroquina tenha como alvo a polimerização da porção heme da ferriprotoporfirina IX que gera um ambiente de toxicidade dentro do parasita resultando na morte celular do *Plasmodium* spp. Tal mecanismo de ação também foi proposto para a atividade antifúngica desta droga. O pH extracelular mais elevado em relação ao pH intracelular culminou em aumento do dano fúngico sob uma concentração constante de cloroquina, sugerindo aumento da taxa de difusão da droga nas células fúngicas, além da inibição do transporte de tiamina em leveduras (THOMÉ *et al.*, 2013; ROSSATO *et al.*, 2020).

2.6.4 Primaquina

A primaquina (PQ) é um antimalárico que inibe o desenvolvimento do parasita de forma latente no fígado, tais parasitas são responsáveis pelas recaídas da malária por *Plasmodium vivax* e *P. ovale*. Também possui atividade contra gametócitos de todas as espécies de parasitas do gênero *Plasmodium* causadores de malária em humanos, incluindo as espécies resistentes à cloroquina (VLAINIC *et al.*, 2018).

Além da primaquina, outros antimaláricos como: cloroquina, artemisina, artesunato e tetraciclina possuem significativa atividade anti-câncer, principalmente no uso como quimioterapia adjuvante. Além da atividade antitumoral, primaquina e seus derivados demonstraram atividade antimicobacteriana para três espécies de *Mycobacterium* demonstrando atividade mais eficiente que drogas utilizadas para tratamento da tuberculose (VLAINIC *et al.*, 2018).

Originalmente a primaquina e seus análogos (tafenoquina e pamaquina) foram desenvolvidas com potencial antimalárico, contudo foi encontrada atividade contra várias espécies de bactérias e fungos (MUSIOL *et al.*, 2010). Madu e colaboradores, 2021 utilizou primaquina como um fotossensibilizador com potencial de inibir células de *Cryptococcus* spp. altamente aeróbias assim como células de *Plasmodium* spp.

O mecanismo de ação da primaquina ainda não foi completamente elucidado, embora acredita-se que a atividade seja relacionada à interferência no DNA do parasita, na modificação da estrutura e ruptura das membranas mitocondriais. Outro potencial alvo farmacológico seria o estresse oxidativo dentro de eritrócitos causado pela geração de espécies reativas de oxigênio que suprime a defesa celular (BASSO *et al.*, 2011; LALÈVE *et al.*, 2016).

3 HIPÓTESES

- Proteinase K e DNase I reduzem a biomassa e a viabilidade das células do biofilme duo-espécie de *C. albicans* e *S. mutans* devido a ação anti-biofilme dos compostos.

- Cloroquina e primaquina inibem a atividade metabólica do biofilme duo-espécie *C. albicans* e de *S. mutans* por meio da atividade antimicrobiana das drogas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito anti-biofilme de proteinase K e DNase I e dos antimaláricos, cloroquina e primaquina, em biofilme duo-espécie de *Candida albicans* e *S. mutans*.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima em biofilme (SMIC50) de proteinase K, DNase I, cloroquina e primaquina em biofilmes duo-espécie de *C. albicans* e *S. mutans*.

- Avaliar os efeitos da exposição do biofilme duo-espécie de *C. albicans* e *S. mutans* à proteinase K, DNase I, cloroquina e primaquina sobre a morfologia e viabilidade celular dos biofilmes.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Local de estudo

A pesquisa foi executada no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará (UFC) em parceria com o Laboratório de Microbiologia do Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGO) da UFC, com participação da Central Analítica da UFC para a obtenção das imagens de microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura.

5.2 Microrganismos

Neste estudo foram utilizadas 09 cepas. Sendo 07 cepas clínicas de *C. albicans*, 01 cepa ATCC de *C. albicans* (ATCC 10231) e 01 cepa ATCC de *S. mutans* (ATCC 25175) todas as cepas foram obtidas da Micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). As cepas ao serem tiradas da micoteca passaram por processo de reativação em que foram incubadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (KASVI, Brasil) a 37°C por 18h em microaerofilia (atmosfera de CO₂ a 5%) e em seguida foram submetidas a identificação através da macro e micromorfologia. Antes de cada experimento, foram isoladas colônias de cepas de *C. albicans* cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose (KASVI, Brasil) e *S. mutans* em ágar Mitis Salivarius Agar Base (HIMEDIA, India) foram semeadas e incubadas a 37 °C por 48 horas. *S. mutans* foi colocado em microaerofilia (atmosfera de CO₂ a 5%).

5.3 Drogas e compostos

Proteinase K e DNase I foram reconstituídas em solução própria conforme as recomendações dos fabricantes, estocadas em freezer a -20°C e diluídas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (KASVI, Brasil) no momento do uso. Foram utilizadas nas concentrações de 4 a 128µg/mL baseado em artigos. Cloroquina e primaquina foram maceradas e reconstituídas em água destilada estéril a uma concentração de 20.000 µg/mL e estocadas em freezer a -20°C e diluídas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (KASVI, Brasil) no momento do uso. Ambas as drogas foram utilizadas nas concentrações de 32 a 1.024 µg/mL.

5.4 Formação do biofilme duo-espécie

Após semeadura dos microrganismos em ágar Sabouraud Dextrose (KASVI, Brasil) (*C. albicans*) e ágar Mitis Salivarius Agar Base (HIMEDIA, Índia) (*S. mutans*) por 48h, foram coletadas cinco colônias de espécies de *C. albicans* e inseridas em tubo cônico tipo Falcon® contendo meio de base de nitrogênio de levedura (YNB) (Difco, Detroit, MI, EUA) suplementado com glicose 100 mM e *S. mutans* em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (KASVI, Brasil) e ambos incubados a 37 ° C durante 18h. *S. mutans* foi colocado em microaerofilia (PANARIELLO *et al.*, 2017) com adaptações. Após as 18h os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm durante 10 minutos por três vezes e lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril por duas vezes. As células lavadas foram ressuspensas em 10 mL de caldo BHI (KASVI, Brasil) e ajustado para uma densidade de 10⁶ ufc/ ml de *C. albicans* e 10⁸ ufc/ml de *S. mutans* (PANARIELLO *et al.*, 2016; PANARIELLO *et al.*, 2017) com adaptações. Para a formação do biofilme de *C. albicans* e *S. mutans* 100 µL de cada inóculo foi depositado em placa de microdiluição de 96 poços de fundo chato. As placas foram então incubadas a 37 °C por 48 horas em microaerofilia (atmosfera de CO₂ a 5%), para permitir o crescimento do biofilme.

5.5 Sensibilidade do biofilme duo-espécie

Os biofilmes foram formados como descritos na sessão anterior. Após a formação do biofilme, os poços da placa foram lavados duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril e foram adicionados em cada poço 200 µL das drogas: proteinase K, DNase I, cloroquina ou primaquina diluídas em caldo BHI.

Proteinase K e DNase I foram testadas em concentrações variando de 4 a 128 µg/mL (KARYGIANNI, 2020), através de diluição seriada. As placas foram incubadas novamente a 37°C por mais 24 horas microaerofilia (atmosfera de CO₂ a 5%) (MARTINS *et al.*, 2010). Cloroquina e primaquina, foram testados em concentrações variando de 32 a 1024 µg/mL, através de diluição seriada (SHINDE *et al.*, 2013; SELEEM *et al.*, 2020). As placas de todas as drogas foram incubadas novamente a 37°C por mais 24 horas microaerofilia (atmosfera de CO₂ a 5%).

5.6 Avaliação da biomassa e atividade metabólica

A biomassa foi quantificada por coloração com cristal violeta (BRILHANTE *et al.*, 2018). Os biofilmes formados em poços de placas de microdiluição foram lavados duas vezes com PBS e, em seguida, desidratados com metanol por aproximadamente 5 minutos.

Subsequentemente, 200 µl de cristal violeta a 0,3% foram adicionados a cada poço. Após 20 minutos, o corante foi removido e os poços foram lavados duas vezes com água destilada. Após a lavagem, o corante impregnado no material celular foi removido pela adição de 200 µl de ácido acético a 33% (v/v) durante 5 minutos. As amostras do sobrenadante foram transferidas para novas placas de microdiluição e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm.

A quantificação da atividade metabólica foi realizada pelo ensaio de redução do brometo de [3- (4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difenil tetrazólio (MTT) (Sigma Aldrich, EUA). (REDDY; NANCHARAI, 2020). Os poços da microplaca foram lavados com PBS e, em seguida, preenchidos com 125 µl de solução de MTT (0,5 mg ml⁻¹) solubilizada em PBS estéril com glicose a 2%. As placas foram incubadas por 4h em *overnight* a 35 °C. Após este período, as soluções foram removidas e 150 µl de DMSO 100% foram adicionados a cada poço durante 30 minutos para extrair o sal de formazan. Após a extração, 100 µl do sobrenadante foram transferidos para cada poço de uma nova placa de microdiluição e lidos em espectrofotômetro a 540 nm. Os dados obtidos foram utilizados para determinar a concentração inibitória mínima do biofilme capaz de inibir 50% da atividade metabólica dos biofilmes (SMIC₅₀), quando comparada ao controle livre de fármaco (BRILHANTE *et al.* 2019).

5.7 Microscopia confocal e Microscopia Eletrônica de Varredura

A proteinase K, DNase I, cloroquina e primaquina tiveram seus efeitos avaliados na estrutura e morfologia dos biofilmes. Os biofilmes foram formados conforme descrito anteriormente (PANARIELLO *et al.* 2017), com adaptação, para formação em lâminas Thermanox™ (Thermo Fisher Scientific, New York, EUA) na presença e ausência das drogas, e avaliados por microscopia confocal de varredura a laser (proteinase K e DNase I) e microscopia eletrônica de varredura (proteinase K, DNase I, cloroquina e primaquina) (BRILHANTE *et al.* 2019). No primeiro caso, os biofilmes foram analisados com um microscópio Nikon C2 a 488 nm para detecção de corante fluorescente SYTO 9, que identifica células vivas, e a 561 nm para detecção de iodeto de propídio, que identifica células mortas ou danificadas (BRILHANTE *et al.* 2019).

No último caso, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão cacodilato (0,15 M, pH 7,2) e, em seguida, cobertos com glutaraldeído [2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,15 M (pH 7,2) com azul de alcian 0,1%] e incubados a 25 ° C por 4 h. Em seguida, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão cacodilato e as lamínulas desidratadas em série ascendente de etanol (30, 50, 70, 80, 95 e 100%) por 10 min cada, repetindo a desidratação na

última concentração (etanol 100%). A seguir, os biofilmes foram expostos para secagem à temperatura ambiente e cobertos com hexametildisilazano (HMDS) (Polysciences Europe, Alemanha) por 30 min. Posteriormente, o HMDS foi removido e os biofilmes foram secos *overnight* em um dessecador. As lâminas foram revestidas com 12 nm de ouro (Emitech Q150T) e analisadas com um microscópio eletrônico de varredura Quanta 450-FEG em modo de alto vácuo a 20 kV (BRILHANTE *et al.* 2019).

5.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Todos os testes foram realizados em duplicata. Nas comparações entre dois grupos de dados que apresentaram simetria foi utilizado o Teste T de *Student* e para dados com distribuição assimétrica foi utilizado o Teste de *Wilcoxon*. Nas comparações realizadas entre 3 ou mais grupos de dados foi utilizado o Teste de *Friedman*, seguida do pós-teste de Dunn para a comparação entre pares, dada a assimetria observadas nos dados do controle. Foi realizada uma segunda comparação entre 3 ou mais grupos de dados através do Teste ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. Em todas as situações, o nível de significância máximo, adotado para conclusões afirmativas, foi de 5%.

6 RESULTADOS

6.1 Resultados de *Proteinase K* e *DNase I*

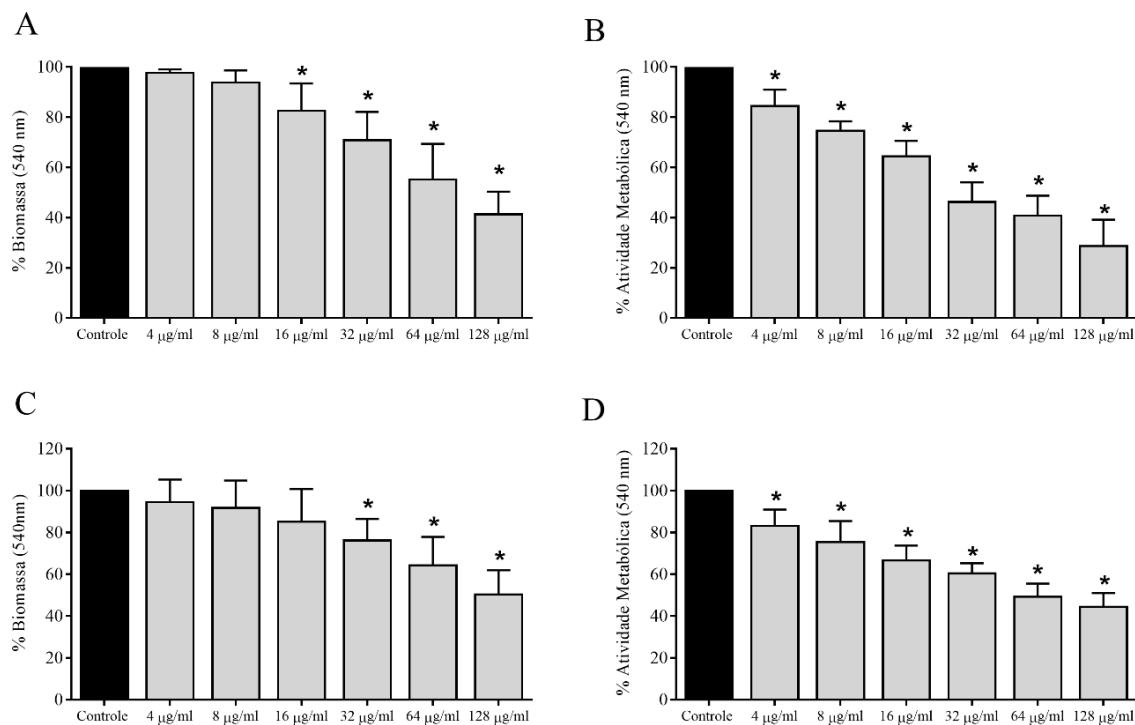
Os valores SMIC50 de proteinase K e DNase I para os biofilmes de *S. mutans* e *C. albicans* estão listados na Tabela 1. O SMIC50 da proteinase K variou entre 32 a 64 $\mu\text{g/mL}$, com média de 38,4 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a DNase I apresentou concentrações inibitórias variando de 64 a 128 $\mu\text{g/mL}$, com média de 89,6 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima de proteinase K ou DNase I contra biofilmes duo-espécie de *C. albicans* e *S. mutans*.

Espécies	Concentração Inibitória Mínima no biofilme ($\mu\text{g/mL}$)	
	Proteinase K	DNase I
<i>S. mutans</i> ATCC 700610 + <i>C. albicans</i> ATCC 10231	32	128
<i>S. mutans</i> ATCC 700610 + <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-095	64	64
<i>S. mutans</i> ATCC 700610 + <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-091	32	128
<i>S. mutans</i> ATCC 700610 + <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-094	32	64
<i>S. mutans</i> ATCC 700610 + <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-096	32	64

A exposição de biofilme duo-espécie de *C. albicans* e *S. mutans* à proteinase K (Figuras 6A e 6B) reduziu ($P < 0,001$) a biomassa dos biofilmes a partir da concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$ e a atividade metabólica a partir de 4 $\mu\text{g/mL}$, atingindo inibições máximas de 58,66% da biomassa e 71,33% da atividade metabólica na concentração de 128 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 6: Sensibilidade *in vitro* de biofilmes duo-espécie de *C. albicans* e *S. mutans* expostos à Proteinase K e DNase I.



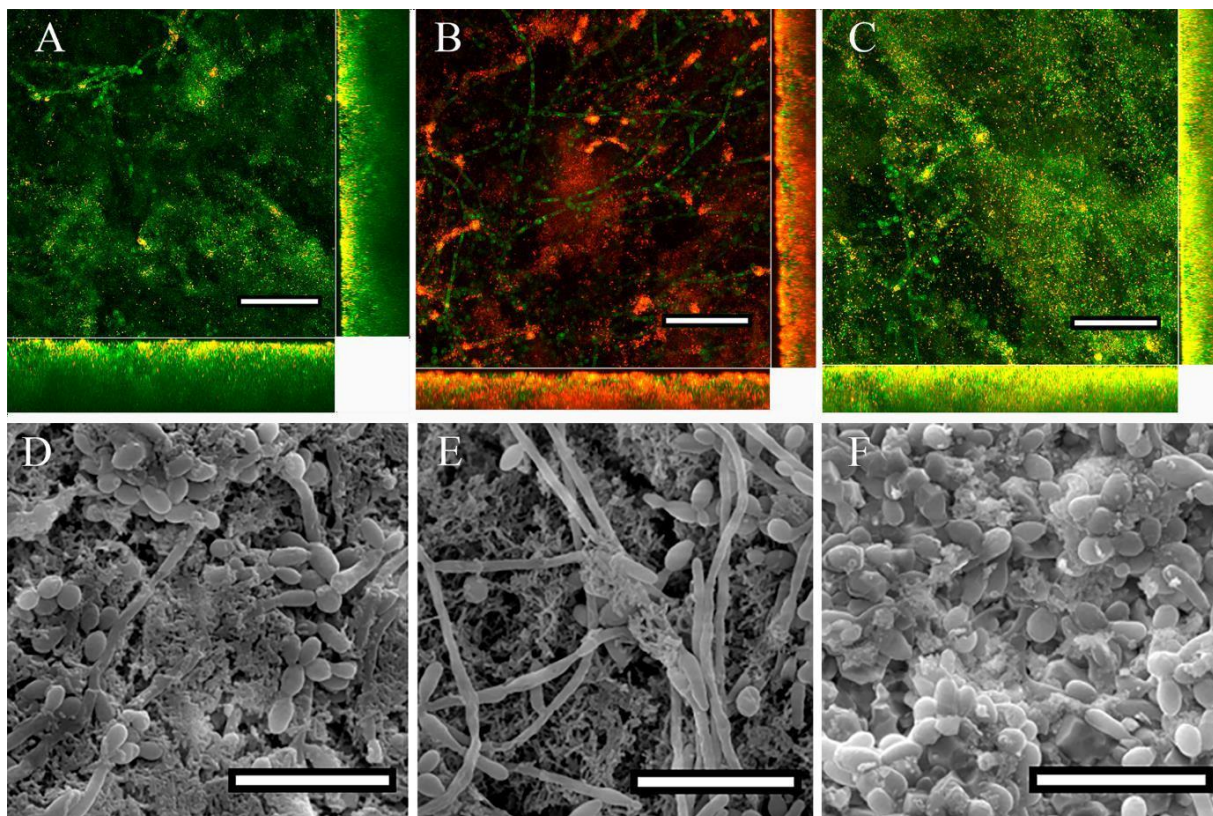
Legenda: Sensibilidade *in vitro* de biofilmes de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* maduros à proteinase K (A e B) e DNase I (C e D). Dados apresentados em porcentagem (%) dos parâmetros de crescimento do biofilme após a exposição às drogas (barras cinzas) em comparação com o controle de crescimento do biofilme sem drogas (barras pretas). Atividade metabólica (MTT): leitura a 540 nm. Biomassa (CV): leitura a 540 nm.

Quando os biofilmes foram expostos à DNase I (Figuras 6C e 6D), também foi observada redução dos parâmetros avaliados, com redução ($P < 0,001$) na biomassa dos biofilmes a partir da concentração de 32 µg/mL e da atividade metabólica a partir de 4 µg/mL, atingindo inibições máximas de 49,63% da biomassa e 55,62% da atividade metabólica na concentração de 128 µg/mL.

A análise das imagens de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal mostrou redução nos biofilmes tratados com proteinase K ou DNase I, tanto em termos de densidade celular quanto espessura do biofilme (Figura 7).

No entanto, o tratamento com proteinase K causou predominantemente dano celular à população bacteriana (Figura 7B), enquanto o tratamento com DNase I não causou dano celular semelhante (Figura 7C), demonstrando que seu efeito redutor não está relacionado à morte celular. Além disso, o tratamento com DNase I causou reduções no filamento de *C. albicans* (Figura 7F).

Figura 7: Imagens de microscopia confocal de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes duo-espécie de *C. albicans* e *S. mutans*



Legenda: A e D: Biofilmes sem tratamento (controles). B e E: Biofilmes tratados com 128 µg/ml de proteinase K. C e F: Biofilmes tratados com 128 µg/ml de DNase I. Após exposição dos biofilmes à proteinase K, houve redução na biomassa e células viáveis, principalmente células bacterianas, uma vez que a DNase I causou redução no biofilme com aparente redução do filamento de *C. albicans*, sem efeito sobre a viabilidade celular. Ampliação: 5.000 × (A, B e C) e 610 × (D, E F). Escala: 200 µm (A, B e C), 50 µm (D, E F). Lasers: 488 nm para detecção de SYTO9 (colore células viáveis em verde) e 561 nm para detecção de iodeto de propídio (colore células de membrana mortas ou danificadas em vermelho).

6.2 Resultados de Cloroquina e Primaquina

Os valores da concentração inibitória mínima do biofilme capaz de inibir 50% da atividade metabólica dos biofilmes (SMIC50) quando comparada ao controle livre de drogas de cloroquina e primaquina para os biofilmes de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* estão listados na Tabela 2. A cloroquina atingiu SMIC50 em concentrações que variaram de 32 a 256 µg/mL enquanto a primaquina apresentou concentrações inibitórias variando de 32 a 512 µg/mL.

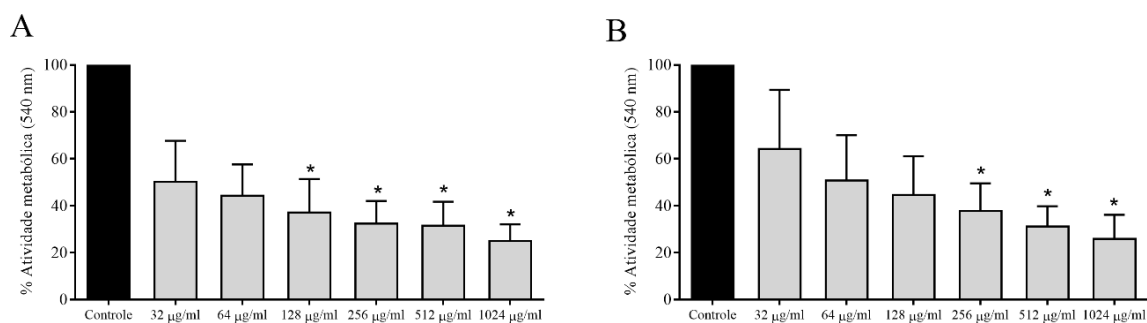
Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima de cloroquina e primaquina em biofilmes duo-espécie de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*.

Combinação de cepas	Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$)	
	Cloroquina	Primaquina
<i>S. mutans</i> ATCC 700610 + <i>C. albicans</i> ATCC 10231	128	128
<i>S. mutans</i> ATCC 700610 + <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-091	32	128
<i>S. mutans</i> ATCC 700610 + <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-092	32	32
<i>S. mutans</i> ATCC 700610 + <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-093	256	256
<i>S. mutans</i> ATCC 700610 + <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-094	64	128
<i>S. mutans</i> ATCC 700610 + <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-095	128	512
<i>S. mutans</i> ATCC 700610 + <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-096	64	64
<i>S. mutans</i> ATCC 700610 + <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-097	64	256

A exposição de biofilmes duo-espécie de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* à cloroquina (FIGURA 8A) reduziu a atividade metabólica dos biofilmes. Na concentração inicial de 32 $\mu\text{g/mL}$, foi observada redução de 49,8% em relação ao controle de crescimento livre de drogas. Na maior concentração testada 1.024 $\mu\text{g/mL}$ houve maior redução da atividade atingindo o máximo de inibição de 74,9% da atividade metabólica em relação ao controle de crescimento livre de drogas.

Quando os biofilmes foram expostos à primaquina (FIGURA 8B), também foi observada redução da atividade metabólica em todas as concentrações (32-1.024 $\mu\text{g/mL}$), na menor concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$ inibiu 35,91% da atividade metabólica em relação ao controle de crescimento livre de drogas, atingindo o máximo percentual de inibição de 74,2% na maior concentração 1.024 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao controle de crescimento.

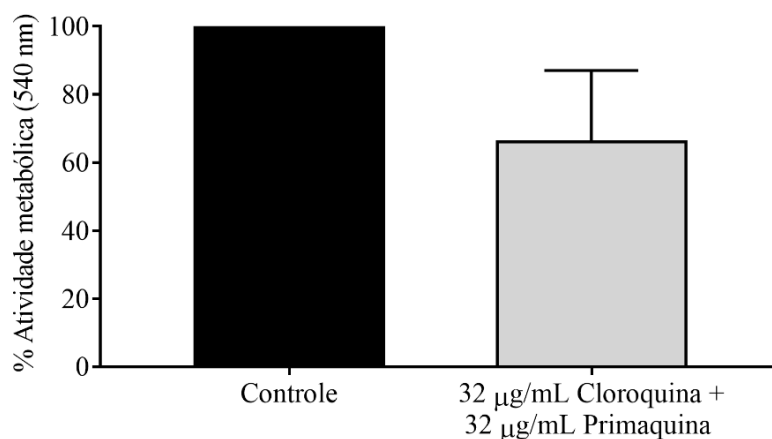
Figura 8: Sensibilidade *in vitro* de biofilmes duo-espécie de *C. albicans* e *S. mutans* expostos à Cloroquina e Primaquina.



Legenda: Sensibilidade *in vitro* de biofilmes de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* maduros à cloroquina (A) e primaquina (B). Dados apresentados em porcentagem (%) dos parâmetros de crescimento do biofilme após a exposição às drogas (barras cinzas) em comparação com o controle de crescimento do biofilme sem drogas (barras pretas). Atividade metabólica (MTT): leitura a 540 nm.

Foram realizados testes associando ambas as drogas, cloroquina e primaquina (32 µg/mL) de cada. A associação das drogas foi capaz de reduzir a atividade metabólica, porém inibiu apenas 33,84% do crescimento fúngico quando comparado com o controle de crescimento livre de drogas (FIGURA 11).

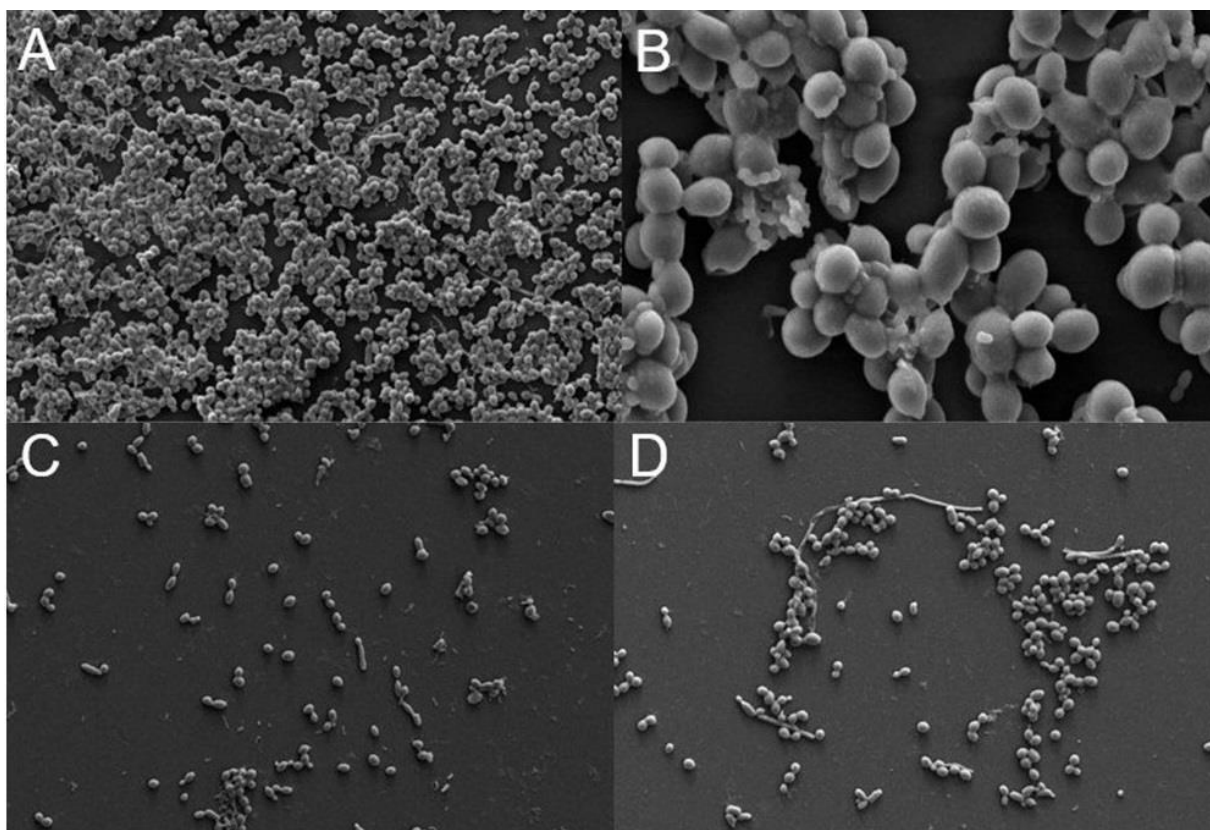
Figura 9: Sensibilidade *in vitro* de biofilmes duo-espécie de *C. albicans* e *S. mutans* expostos à associação de cloroquina e primaquina.



Legenda: Sensibilidade *in vitro* de biofilmes de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* maduros à cloroquina e primaquina associadas. Dados apresentados em porcentagem (%) dos parâmetros de crescimento do biofilme após a exposição às drogas (barra cinza) comparado ao controle de crescimento do biofilme sem drogas (barra preta). Atividade metabólica (MTT): leitura a 540 nm.

A análise das imagens de microscopia eletrônica de varredura evidenciou a densidade dos biofilmes (FIGURAS 10A e 10B) e redução da população microbiana nos biofilmes tratados com cloroquina ou primaquina (FIGURAS 10C E 10D) quando comparados ao controle de crescimento livre de drogas, mostrando a ação antimicrobiana dos compostos em questão.

Figura 10: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do biofilme duo-espécie de *C. albicans* e *S. mutans* após 24 horas de incubação com cloroquina e primaquina.



Legenda: (A) Biofilme maduro não tratado (controle). Ampliação: 2.000x. (B) Biofilme maduro não tratado (controle). Ampliação: 10.000x (C) Biofilme formado tratado com 128µg/ml de primaquina. Ampliação: 2.000x. (D) Biofilme formado com adição de 64 µg/mL de cloroquina. Ampliação: 2.000x. Após exposição dos biofilmes a cloroquina e primaquina houve redução da viabilidade celular quando comparado ao controle sem adição de drogas.

7 DISCUSSÃO

Os biofilmes formados na superfície dentária já foram reconhecidos como um fator de virulência para espécies causadoras de doenças infecciosas da cavidade oral, incluindo a cárie dentária, periodontite e infecções endodônticas (KARYGIANNI; ATTIN; THURNHEER, 2020).

Diversas estratégias antimicrobianas têm sido aplicadas para a dispersão de biofilmes em odontologia, especialmente em relação à desinfecção do canal radicular (GONÇALVES *et al.*, 2016; SASANAKUL *et al.*, 2019; BALLAL *et al.*, 2019). No entanto, devido a várias limitações dos antimicrobianos, como a baixa eficácia contra biofilmes maduros, os protocolos de tratamento podem ser complementados com métodos enzimáticos. Enzimas como proteinases e DNAses podem permitir a degradação de EPS e, assim, fazer com que os antimicrobianos tenham acesso as camadas profundas de biofilme (FLEMING e RUMBAUGH, 2017; SAGGU *et al.*, 2019).

Uma vez que proteínas e polissacarídeos são os principais constituintes dos EPSs, várias proteases, como a proteinase K, demonstram ter um alto potencial de degradação da matriz e, portanto, remoção de biofilme (LISTER e HORSWILL, 2014). Em estudos pregressos, o tratamento com proteinase K induziu a uma degradação significativa de biofilmes ricos em proteínas (GILAN e SIVAN, 2013; SHUKLA e RAO, 2013). Da mesma forma, 200 µg/ml de proteinase K desencadeou a dispersão completa de biofilmes de *Listeria monocytogenes* (NGUYEN e BURROWS, 2014).

Niazi et al (2014), investigaram a dinâmica da degradação do biofilme utilizando proteinase K em um modelo de biofilme multiespécies endodôntico. Imagens de microscopia confocal de biofilmes mostraram que proteinase K foi eficaz na eliminação de bactérias dos biofilmes (NIAZI *et al.*, 2014). Outro estudo usando proteinase K evidenciou que ela induz mudanças na composição e integridade estrutural de biofilmes orais multiespécies (KARYGIANNI *et al.*, 2021). Neste estudo, as técnicas microscópicas mostraram claramente que o tratamento de biofilmes com proteinase K causou danos significativos na membrana celular bacteriana que constitui os biofilmes. Além disso, o tratamento com proteinase K resultou em biofilmes menos densos em comparação com o biofilme controle.

A DNase I é uma das principais endonucleases séricas que degradam o eDNA na matriz extracelular (SHARMA e PAGEDAR, 2018), e tem sido combinada com antibióticos (TETZ *et al.*, 2009) ou aplicada clinicamente para dispersar biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística (SURI, 2005). No presente estudo, utilizou-se a

DNase I com foco na degradação do eDNA na matriz do biofilme de biofilmes de *S. mutans* e *C. albicans* e observou-se um impacto na biomassa e na atividade metabólica desses biofilmes. Este efeito possivelmente pode ser atribuído ao papel ativo do eDNA na transferência de genes, que é facilitada pela proximidade das células microbianas dentro do biofilme (LI *et al.*, 2001). O fato de a DNase I afetar negativamente o crescimento de biofilmes de *C. albicans* e *S. mutans* pode estar relacionado à função do eDNA como fonte de nutrientes para células de biofilme (KARYGIANNI *et al.*, 2020). Como a formação de biofilmes orais reflete o equilíbrio ecológico entre diferentes micróbios que colonizam o mesmo microambiente, no estudo descrito demonstrou que o tratamento com DNase I pode desbalancear esse equilíbrio. Este efeito pode, portanto, ser relevante para algumas aplicações clínicas combinadas contra biofilmes. Embora a detecção de *quórums* em biofilmes multiespécies ainda não tenha sido totalmente elucidada, é possível que um mecanismo ainda desconhecido para a detecção de *quorum* desencadeie uma mudança na composição dos biofilmes após o tratamento com DNase I, acelerando a instabilidade mecânica causada pela ausência de eDNA (BROWN *et al.*, 2015; BRACKMAN *et al.*, 2016).

Enquanto o uso do método de cristal violeta e o ensaio de redução de MTT permitiram a quantificação da biomassa e da atividade metabólica dos biofilmes, após a inibição enzimática do crescimento do biofilme, as técnicas microscópicas foram utilizadas para examinar a topografia dos biofilmes e a estrutura tridimensional. A aplicação de proteinase K e DNase I também afetou a estrutura do biofilme, pois induziu biofilmes mais compactos em relação aos não tratados.

Whitchurch *et al.* (2002) descreveram a capacidade da DNase I de prevenir a formação de biofilme de *P. aeruginosa*, e os autores indicaram que este tratamento enzimático pode ser benéfico como medida profilática precoce para prevenir o estabelecimento de biofilmes. Em nosso estudo, os biofilmes pós formados foram submetidos a presença de DNase I, o que resultou em rompimento e redução do crescimento, sem prejuízo significativo à viabilidade das células remanescentes. Resultados semelhantes foram relatados anteriormente em (YU *et al.*, 2019) quando a DNase foi aplicada a biofilmes de *Enterococcus faecalis* em um sistema de canais radiculares *in vitro*, onde o tratamento com DNase mostrou afetar a microestrutura do biofilme, causando uma redução no volume de EPS (YU *et al.*, 2019).

O papel do eDNA e das exoproteínas na formação de biofilme de *Lactobacillus plantarum* usando proteinase K e DNase I também foi investigado (GEORGE e HALAMI, 2019). Os biofilmes não tratados apresentaram uma população significativamente mais densa de células viáveis, em comparação com uma diminuição considerável na densidade de biofilmes

tratados com proteinase K e DNase I. Os autores concluíram que os biofilmes examinados eram compostos de eDNA e exoproteínas e que esses componentes da matriz são constituintes vitais de biofilmes (GEORGE e HALAMI, 2019).

Deve-se notar que o tratamento com DNase I não teve impacto na viabilidade das células remanescentes no biofilme. Isso implica que a DNase I provavelmente interage apenas com o eDNA, sem penetrar nas membranas celulares microbianas intactas, interferindo apenas na integridade estrutural dos biofilmes. Em contraste, a proteinase K interfere apenas na viabilidade celular. Todavia, apesar do fato de que a DNase I e a proteinase K podem efetivamente degradar biofilmes, elas devem ser combinadas com agentes antimicrobianos convencionais tanto para eficácia microbiana quanto para dispersão de biofilme.

Além da cárie dentária, outras patologias orais como a periodontite também estão relacionadas a formação de biofilme. Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento da periodontite, um deles é a malária. A malária predispõe a infecções oportunistas através da supressão imunológica capaz de levar a uma diminuição qualitativa e quantitativa de linfócitos T, sugerindo que ela predispõe a doenças orais como a pericoronite (OWOTADE *et al.*, 2006) e outras lesões orais como traumas e perdas dentárias (SHUAI *et al.*, 2020; NEWCOMB *et al.*, 2009).

Malária é uma doença infecciosa grave que representa um importante problema de saúde pública de grande incidência e de difícil controle. Outros fatores envolvidos são as condições sociais e acesso a serviços de saúde de qualidade (WOLFARTH-COUTO; SILVA; FILIZOLA, 2019). A xerostomia é uma condição clínica associada a manifestações orais da malária (NEWCOMB; DARBY; COOPER, 2009) e é um fator de risco para cárie radicular (NIKLANDER *et al.*, 2016) quando não tratada aumenta o risco de desenvolvimento de cárie dentária, doença periodontal e outras manifestações orais (NUGRAHA *et al.*, 2019).

O tratamento de malária envolve o uso de drogas como cloroquina e primaquina. Cloroquina é um medicamento de baixo custo e utilizado há anos contra infecções por *Plasmodium vivax* (ISLAHUDIN *et al.*, 2013). No Brasil, o tratamento com cloroquina é direcionado contra *P. vivax* e *P. ovale* juntamente com a primaquina para as formas de malária não complicada (BRASIL, 2021). Primaquina é um dos antimaláricos mais amplamente utilizados e é o único atualmente que combate as recaídas da doença (BARROS *et al.*, 2021). Para tratamento em casos por *P. falciparum* e infecções mistas a recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS) é o uso de primaquina com algum derivado de artemisinina (ACT) (BRASIL, 2021).

O efeito do tratamento com cloroquina e primaquina no biofilme formado foi avaliado através da atividade metabólica que evidenciou redução da absorvância de forma acentuada mesmo em baixas concentrações (32 µg/mL) para cloroquina e primaquina. Em estudos anteriores a adição de 250µg/mL de cloroquina inibiu o desenvolvimento do biofilme monoespécie de *C. albicans* (SHINDE *et al.*, 2013) em outro estudo, a concentração de 100 µM de cloroquina aumentou em 75% a atividade antifúngica de células polimorfonucleares (PMNs) saudáveis contra *Aspergillus fumigatus* (HENRIET *et al.*, 2013).

Acredita-se que a cloroquina tenha como alvo a polimerização da porção heme da ferriprotoporfirina IX que gera um ambiente de toxicidade dentro do parasita resultando na morte celular do *Plasmodium* spp. Tal mecanismo de ação foi proposto para a atividade antifúngica desta droga. O pH extracelular mais elevado em relação ao pH intracelular culminou em aumento do dano fúngico sob uma concentração constante de cloroquina, sugerindo aumento da taxa de difusão da droga nas células fúngicas, além da inibição do transporte de tiamina em leveduras (THOMÉ *et al.*, 2013; ROSSATO *et al.*, 2020). Rajic *et al.* (2013) evidenciou em bactérias gram-positivas, especialmente *S. pneumoniae* e *S. aureus* ATCC, sensibilidade a 4b-f, um derivado de primaquina (RAJIC, 2018).

O mecanismo de ação da primaquina ainda não foi completamente elucidado, embora acredita-se que a atividade seja relacionada à interferência no DNA do parasita, na modificação da estrutura e ruptura das membranas mitocondriais. Outro potencial alvo farmacológico seria o estresse oxidativo dentro de eritrócitos causado pela geração de espécies reativas de oxigênio que suprime a defesa celular (BASSO *et al.*, 2011; LALÈVE *et al.*, 2016).

8 CONCLUSÃO

- A aplicação de proteinase K e DNase I provoca desintegração da estrutura do biofilme com consequente redução de biomassa e atividade metabólica.
- Cloroquina e primaquina possuem ação antimicrobiana sobre biofilmes duo- espécie *de C. albicans e S. mutans*.

REFERÊNCIAS

- ALEKSIĆ, I *et al.* Enhanced anticryptococcal activity of chloroquine in phosphatidylserine containing liposomes in a murine model. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 00, p. 223-228, 2005.
- ANIL, Sukumaran; ANAND, Pradeep S. Early Childhood Caries: Prevalence, Risk Factors, and Prevention. **Frontier in Pediatrics**, v. 5, n. 157, p. 1-7, 18 jul. 2017.
- AZEREDO, Joana *et al.* Critical review on biofilm methods. **Critical Reviews In Microbiology**, [S.L.], v. 43, n. 3, p. 313-351, 21 nov. 2016. Informa UK Limited.
- BACHTIAR, Endang W.; BACHTIAR, Boy M.. Relationship between *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in early childhood caries, evaluated by quantitative.
- BANAS, Jeffrey A; DRAKE, David R. Are the mutans streptococci still considered relevant to understanding the microbial etiology of dental caries?. **BMC Oral Health**, v. 18, n. 129, p. 1-8, 31 jul. 2018.
- BANERJEE, D. *et al.* A Review on Basic Biology of Bacterial Biofilm Infections and Their Treatments by Nanotechnology-Based Approaches. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* v. 90, n. 0, p. 243-259, 03 jan. 2019.
- BARBOSA, J. O.; ROSSONI, R. D.; VILELA, S. F. G.; DE ALVARENGA, J. A.; VELLOSO, M.; DOS S., PRATA, M. C. DE A.; JUNQUEIRA, J. C. *Streptococcus mutans* Can Modulate Biofilm Formation and Attenuate the Virulence of *C. albicans*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1-16, 2016.
- BASSO L. G. *et al.* Effects of the antimalarial drug primaquine on the dynamic structure of lipid model membranes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1808, n. 1, jan. 2011.
- BERKOW, Elizabeth L; LOCKHART, Shawn R. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and Drug Resistance**, v. 10, n. 0, p. 237-245, 31 jul. 2017.
- BEUS, Maja *et al.* Chloroquine fumardiamides as novel quorum sensing inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 30, n. 16, p. 127336, ago. 2020. Elsevier BV.
- BOUDAREL, Héloïse *et al.* Towards standardized mechanical characterization of microbial biofilms: analysis and critical review. **Npj Biofilms And Microbiomes**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-15, 20 ago. 2018. Springer Science and Business Media LLC.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de tratamento da malária no Brasil**. Brasília, 2021.
- BRILHANTE R.S.N. *et al.* In vitro effects of promethazine on cell morphology and structure

and mitochondrial activity of azole-resistant *Candida tropicalis*. *Medical Mycology*, v. 56, n. 1, p. 1012–1022.

BRILHANTE R.S.N. *et al.* Terpinen-4-ol inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents. *Future Microbiology*, v. 14, n. 01, p. 1221–1233, set. 2019.

BUD, Eugen S. *et al.* Observational Study Regarding the Relationship between Nutritional Status, Dental Caries, Mutans Streptococci, and Lactobacillus Bacterial Colonies. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 18, n. 3551, p. 1-12, 29 mar. 2021.

CANELA, H.M.S. *et al.* Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. *Mycoses*, v. 61, n. 1, p. 1-11, 22 ago. 2017.

CARDOSO, Tarciano R. *et al.* Metabolic activity of *Streptococcus mutans* biofilms after treatment with different mouthwash formulations. *Braz J Oral Sci*, v. 10, n. 1, p. 74-78, 22 mar. 2011.

CARINCI, F *et al.* Focus on periodontal disease and development of endocarditis. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, v. 32, n. 2, p. 143-147, mar. 2018.

CARVALHO, Lucas Cromo. **Associação entre cárie dentária, doença periodontal e perdas dentárias com a malária: um estudo preliminar**. 2020. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, Universidade de São Paulo, Bauru, 2020.

COELHO, Carolina; CASADEVALL, Arturo. Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and the promising. *Cellular Microbiology*, [S.L.], v. 18, n. 6, p. 792-799, 8 abr. 2016. Wiley.

COSTERTON, J.W; GEESEY, G.G.; CHENG, K.J. How Bacteria Stick. *Scientific American*, v.238, n.1, p. 86-95, jan. 1978.

COTA, A. L. S.; ALVIM, R. G. Effect of storage temperature on *Streptococcus mutans* viability. *Rev Odontol UNESP*, v. 47, n. 2, p. 74-78, 5 jan. 2021.

CREMER, Kaat de *et al.* Combinatorial drug approaches to tackle *Candida albicans* biofilms. *Expert Review Of Anti-Infective Therapy*, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 973-984, 12 jun. 2015. Informa UK Limited.

DE-LA-TORRE, J. *et al.* Oral *Candida* colonization in patients with chronic periodontitis. Is there any relationship? *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 35, n. 3, p. 134-139, 03 ago. 2018.

- DELLING, U. RAYMOND, M. SCHURR, E. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes conferring resistance to quinoline ring-containing antimalarial drugs. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 00, p. 1034-1041, 1998.
- DIAS, Ana Paula *et al.* Antimicrobial action of chlorhexidine digluconate in self-ligating and conventional metal brackets infected with *Streptococcus mutans* biofilm. **Clinical, Cosmetic And Investigational Dentistry**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 69-74, abr. 2018. Informa UK Limited.
- DIAS-MELICIO, Luciane Alarcão *et al.* Chloroquine is therapeutic in murine experimental model of paracoccidioidomycosis. **Fems Immunology & Medical Microbiology**, [S.L.], v. 50, n. 1, p. 133-143, jun. 2007. Oxford University Press (OUP).
- DONGARI-BAGTZOGLU, Anna *et al.* Characterization of Mucosal *Candida albicans* Biofilms. **Plos One**, [S.L.], v. 4, n. 11, p. 1-9, 24 nov. 2009. Public Library of Science (PLoS).
- ENWONWU, Cyril O.; SALAKO, Nathanael. The periodontal disease-systemic health-infectious disease axis in developing countries. **Periodontology 2000**, [S.L.], v. 60, n. 1, p. 64-77, 22 ago. 2012. Wiley.
- FARAH, C. S.; LYNCH, N.; MCCULLOUGH, M. J. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. **Australian dental journal**, v. 55, n. 1, p. 48–54, 2010.
- FERRÃO, Simone K. *et al.* Antifungal activity of essential oils against *Candida* spp.. **Brazilian Journal of health review**. V. 3, n. 1, p. 100-113, 07 jan. 2020.
- FINKELSTEIN, D. B; STRAUSBERG, S. Metabolism of alpha factor by a mating type cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 254, n. 00, p. 796-803, 1979.
- FLEMMING, H.-C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 9, p. 563, 2016.
- GIAOURIS, Efstathios D. *et al.* Intra-and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in microbiology**, v. 6, n. 841, p. 1-26, 20 ago. 2015.
- GOMES, Elaine Christine de Souza *et al.* Outbreak of autochthonous cases of malaria in coastal regions of Northeast Brazil: the diversity and spatial distribution of species of anopheles. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-11, 14 dez. 2020. Springer Science and Business Media LLC.
- GRINDEFORD, M. *et al.* Dental treatment and caries prevention preceding treatment under general anaesthesia in healthy children and adolescents: a retrospective cohort study. **European Archives of Paediatric Dentistry**, v. 19, n. 0, p. 99-105, 26 fev. 2018.

- HAMADA, S; SLADE, H. D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev**, 1980, v. 44, n. 2, p. 331-384.
- HARRISON, Thomas S.; GRIFFIN, George E.; LEVITZ, Stuart M.. Conditional Lethality of the Diprotic Weak Bases Chloroquine and Quinacrine against *Cryptococcus neoformans*. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 182, n. 1, p. 283-289, jul. 2000. Oxford University Press (OUP).
- HE, Jinzhi *et al.* RNA-Seq Reveals Enhanced Sugar Metabolism in *Streptococcus mutans* Co-cultured with *Candida albicans* within Mixed-Species Biofilms. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 8, n. 1036, p. 1-15, 8 jun. 2017. Frontiers Media SA.
- HEMMINGSEN, Lisa Myrseth *et al.* Liposomes-in-chitosan hydrogel boosts potential of chlorhexidine in biofilm eradication in vitro. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 262, n. 1, p. 117939, jun. 2021. Elsevier BV.
- HENRIET, Stefanie S. V. *et al.* Chloroquine Modulates the Fungal Immune Response in Phagocytic Cells From Patients With Chronic Granulomatous Disease. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 207, n. 12, p. 1932-1939, 12 mar. 2013. Oxford University Press (OUP).
- HØIBY, Niels. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. **Apms**, [S.L.], v. 125, n. 4, p. 272-275, abr. 2017. Wiley.
- JAMIU, A.T *et al.* Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. **Medical Mycology**, v. 00, n. 00, p. 1-17, abr. 2020.
- JEFFERY-SMITH, Anna *et al.* *Candida auris*: a review of the literature. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 1-18, jan. 2018. American Society for Microbiology.
- KHAM, M.A *et al.* Enhanced anticryptococcal activity of chloroquine in phosphatidylserine-containing liposomes in a murine model. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 00, p. 223-228, 2005.
- KARYGIANNI, Lamprini; ATTIN, Thomas; THURNHEER, Thomas. Combined DNase and Proteinase Treatment Interferes with Composition and Structural Integrity of Multispecies Oral Biofilms. **Journal Of Clinical Medicine**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 983, 1 abr. 2020. MDPI AG.
- KIFELEW, Legesse; MITCHELL, James; SPECK, Peter. Mini-review: efficacy of lytic bacteriophages on multispecies biofilms. **Biofouling**, v. 35, n. 4, p. 1-10, 30 mai. 2019.

- KIM, Se-Hun *et al.* Biofilm formation of *Campylobacter* strains isolated from raw chickens and its reduction with DNase I treatment. **Food Control**, [S.L.], v. 71, p. 94-100, jan. 2017. Elsevier BV.
- KIM, Unji; KIM, Jin-Hee; OH, Se-Wook. Review of multi-species biofilm formation from foodborne pathogens: multi-species biofilms and removal methodology. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [S.L.], p. 1-11, 5 mar. 2021. Informa UK Limited.
- KOO H, BOWEN WH. *C. albicans* and *Streptococcus mutans*: a potential synergistic alliance to cause virulent tooth decay in children. **Future microbiology**, v. 9, n. 12, p. 1295–7, 2014.
- KOO, H.; XIAO, J.; KLEIN, M.I.; JEON, J.G. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 12, p. 3024-3032, 2010
- KOO, Hyun; ANDES, David R.; KRYSAN, Damian J.. *Candida*–*streptococcal* interactions in biofilm-associated oral diseases. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 14, n. 12, p. 1-7, 13 dez. 2018. Public Library of Science (PLoS).
- KRZYŚCIAK, W., JURCZAK, A., KOŚCIELNIAK, D., BYSTROWSKA, B., & SKALNIAK, A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 33, n. 4, p. 499-515, 2014.
- LALÈVE, A. *et al.* The antimalarial drug primaquine targets Fe–S cluster proteins and yeast respiratory growth. **Redox Biology**, v. 7, n. 0, p. 21-19, 2016.
- LANDIER, Jordi *et al.* The role of early detection and treatment in malaria elimination. **Malaria Journal**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 1-8, 15 jul. 2016. Springer Science and Business Media LLC.
- LATTIF, A.A *et al.* Proteomics and Pathway Mapping Analyses Reveal Phase-Dependent Over-Expression of Proteins Associated with Carbohydrate Metabolic Pathways in *Candida albicans* Biofilms. **Open Proteomics**, v. 01, n. 00, p. 5-26, 2008.
- LEMOS, José A. *et al.* *Streptococcus mutans*: a new gram-positive paradigm?. **Microbiology**, [S.L.], v. 159, n. 3, p. 436-445, 1 mar. 2013. Microbiology Society.
- LEMOS, J.A. *et al.* The Biology of *Streptococcus mutans*. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-18, 8 fev. 2019. American Society for Microbiology.
- LEVETIN, E. *et al.* Taxonomy of Allergenic Fungi. **J Allergy Clin Immunol Pract**, v. 4, n. 3, p. 375-385, 24 dez. 2015. doi: 10.1016/j.jaip.2015.10.012
- LIU, Y. *et al.* Therapeutic Strategies Targeting Cariogenic Biofilm Microenvironment. **Advances In Dental Research**, [S.L.], v. 29, n. 1, p. 86-92, 22 jan. 2018. SAGE Publications.

- MADU, Uju L. *et al.* The Repurposing of the Antimalaria Drug, Primaquine, as a Photosensitizer to Inactivate Cryptococcal Cells. **Photochem**, [S.L.], v. 1, n. 2, p. 275-286, 7 set. 2021. MDPI AG.
- MARSH, P. D.; ZAURA, Egija. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. **Journal Of Clinical Periodontology**, [S.L.], v. 44, n. 18, p. 12-22, mar. 2017. Wiley.
- MARTINS, M. *et al.* Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. **Mycopathologia**, v. 169, n. 5, p. 323-331, mai. 2010.
- MATHEW, Mebin George *et al.* Evaluation of adhesion of *Streptococcus mutans*, plaque accumulation on zirconia and stainless steel crowns, and surrounding gingival inflammation in primary molars: randomized controlled trial. **Clinical Oral Investigations**, [S.L.], v. 24, n. 9, p. 3275-3280, 18 jan. 2020. Springer Science and Business Media LLC.
- MATTOS-GRANER, Renata O.; KLEIN, Marlise I.; SMITH, Daniel J.. Lessons Learned from Clinical Studies: roles of *mutans streptococci* in the pathogenesis of dental caries. **Current Oral Health Reports**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 70-78, 21 dez. 2013. Springer Science and Business Media LLC.
- MATSUMOTO-NAKANO, Michiyo. Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. **Japanese Dental Science Review**, [S.L.], v. 54, n. 1, p. 22-29, fev. 2018. Elsevier BV.
- MAY, Ali *et al.* MetaModules identifies key functional subnetworks in microbiome-related disease. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 32, n. 11, p. 1678-1685, 5 set. 2015. Oxford University Press (OUP).
- MAYER, François L.; WILSON, Duncan; HUBE, Bernhard. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 119-128, 15 fev. 2013. Informa UK Limited.
- MOHAMMED, Marwan Mansoor Ali *et al.* Characterization of extracellular polymeric matrix, and treatment of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* biofilms with DNase I and proteinase K. **Journal Of Oral Microbiology**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 20015, 1 jan. 2013. Informa UK Limited.
- MORAGA, Carla Paola Lozano *et al.* Prevalence of *Candida albicans* and carriage of *Candida non-albicans* in the saliva of preschool children, according to their caries status. **Acta Odontologica Scandinavica**, [S.L.], v. 75, n. 1, p. 30-35, 31 out. 2016. Informa UK Limited.
- MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A.. **Microbiologia Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 1694 p.

- MUSIOL, R. *et al.* Quinoline-Based Antifungals. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 18, p. 1960-1973, 30 mar. 2010.
- NARAYANA, P. S. V. V. S; SRIHARI, P. S. V. V. Biofilm Resistant Surfaces and Coatings on Implants: A Review. **Materials Today: Proceedings**, v. 18, n. 0, p. 4847-4853, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.07.475>
- NEWCOMB TL, DARBY ML, COOPER RA. Malaria and the dental hygienist. **Dimensions of Dental Hyg** 2009; 7: 40–43.
- NIAZI, S. A. *et al.* The effectiveness of enzymic irrigation in removing a nutrient-stressed endodontic multispecies biofilm. **International Endodontic Journal**, [S.L.], v. 47, n. 8, p. 756-768, 9 jan. 2014. Wiley.
- NGUYEN, Phuong M. N. *et al.* a-Mangostin Disrupts the Development of Streptococcus mutans Biofilms and Facilitates Its Mechanical Removal. **Plos One**, v. 9, n. 10, p. 1-12, 28 out. 2014.
- NGUYEN, Uyen T.; BURROWS, Lori L.. DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 187, p. 26-32, set. 2014. Elsevier BV.
- NILSSON, Martin *et al.* Oxidative stress response plays a role in antibiotic tolerance of *Streptococcus mutans* biofilms. **Microbiology**, [S.L.], v. 165, n. 3, p. 334-342, 1 mar. 2019. Microbiology Society.
- NOBILE, Clarissa J.; JOHNSON, Alexander D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annual Review Of Microbiology**, [S.L.], v. 69, n. 1, p. 71-92, 15 out. 2015. Annual Reviews.
- OTOWADE, Foluso J *et al.* Is malaria a predisposing factor for third molar pericoronitis in the tropics? **Journal of Infection**, v. 56, n.0, p. 56-59, 02 nov. 2005. Elsevier.
- PANARIELLO, B. H. D. *et al.* Effect of mechanical toothbrushing combined with different denture cleansers in reducing the viability of a multispecies biofilm on acrylic resins. **American Journal of Dentistry**, v. 29, n. 3, jun. 2016.
- PANARIELLO, B. H. D. *et al.* Inactivation of genes *TEC1* and *EFG1* in *Candida albicans* influences extracellular matrix composition and biofilm morphology. **J Oral Microbiol**, v. 9, n. 01, p. 1-11, 17 out. 2017.
- PAPPAS, Peter G. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-20, 11 maio 2018. Springer Science and Business Media LLC.

- PAPPAS, P. G., KAUFFMAN, C. A., ANDES, D. R., CLANCY, C. J., MARR, K. A., OSTROSKY-ZEICHNER, L., SOBEL, J. D. Clinical practice guideline for the management of candidiasis Infectious Diseases Society of America. v. 62, n. 4, p. 1-50, 2016. Clinical Infectious Diseases, PCR. **F1000Research**, [S.L.], v. 7, n. 1645, p. 1-15, 6 dez. 2018. F1000 Research Ltd.
- PERKOVIĆ, I. *et al.* Novel urea and bis -urea primaquine derivatives with hydroxyphenyl or halogenphenyl substituents: synthesis and biological evaluation. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 124, p. 622-636, nov. 2016. Elsevier BV.
- PEREIRA, Dfa *et al.* Is the oral fungal pathogen *Candida albicans* a cariogen? **Oral Diseases**, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 518-526, 13 jun. 2017. Wiley.
- PFALLER, M. A. *et al.* Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of candida species to fluconazole and voriconazole as determined by clsi standardized disk diffusion. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 48, n. 4, p. 1366-1377, abr. 2010. American Society for Microbiology.
- PHILIP, N.; SUNEJA, B.; WALSH, L. Beyond *Streptococcus mutans*: clinical implications of the evolving dental caries aetiological paradigms and its associated microbiome. **British Dental Journal**, [S.L.], v. 224, n. 4, p. 219-225, fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC.
- POLKE, Melanie; HUBE, Bernhard; JACOBSEN, Ilse D.. *Candida* Survival Strategies. **Advances In Applied Microbiology**, [S.L.], v. 91, n. 1, p. 139-235, 2015. Elsevier.
- POULAIN, Daniel. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. **Critical Reviews In Microbiology**, [S.L.], v. 41, n. 2, p. 208-217, 20 ago. 2013. Informa UK Limited.
- QIU, W. *et al.* Application of Antibiotics/Antimicrobial Agents on Dental Caries. **BioMed Research International**, p. 1-11, 31 jan. 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/5658212>
- RAUT, Jayant S. *et al.* Activity of Allyl Isothiocyanate and Its Synergy with Fluconazole against *Candida albicans* Biofilms. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 27, n. 4, p.685-693, 31 jan. 2017.
- RECHT, Judith *et al.* Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. **Malaria Journal**, v. 16, n. 273, p. 1-18, 04 jul. 2017.
- REINHARDT, L. C. *et al.* Sensitivity to antifungals by *Candida* spp samples isolated from cases of chronic atrophic candidiasis (CAC). **Brazilian Journal of Biology Instituto Internacional de Ecologia**, 4 jul. 2019.

- REN, Yaxin *et al.* Improving the catalytic performance of Proteinase K from *Parengyodontium album* for use in feather degradation. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 154, n. 0, p. 1586-1595, jul. 2020. Elsevier BV.
- RIBEIRO, F. C. *et al.* Action mechanisms of probiotics on *Candida* spp. and candidiasis prevention: an update. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 0, p. 175-185, 30 out. 2019.
- ROCHA, Wilva R.V. *et al.* Gênero *Candida* - Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Society and Development**, v. 10, n. 4, p. 1-14, 17 abr. 2021.
- RODRIGUES, Maria E; GOMES, Fernanda; RODRIGUES, Célio F. *Candida* spp./Bacteria Mixed Biofilms. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 5, p. 1-29, 20 dez. 2019.
- ROSSATO L. *et al.* Alternative treatment of fungal infections: Synergy with non-antifungal agents. **Mycoses**, v. 64, n. 3, p. 232-244, 05 nov. 2020.
- RUMBAUGH, Kendra P; SAUER, K. Biofilm dispersion. **Nature Reviews Microbiology**. v. 18, n. 0, p. 571-586, 12 jun. 2020.
- SELEEM, Noura M. *et al.* Drugs with new lease of life as quorum sensing inhibitors: for combating mdr acinetobacter baumannii infections. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [S.L.], v. 39, n. 9, p. 1687-1702, 23 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC.
- SENEVIRATNE, C.J; JIN, L; SAMARANAYAKE, L.P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral diseases**, v. 14, n. 0, p. 582-590, 26 ago. 2007.
- SENEVIRATNE C.J *et al.* *Candida albicans* biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities. **Proteomics**, v. 08, n. 00, p. 2936-2947, 2008.
- SHARMA, Komal; SINGH, Ankita Pagedar. Antibiofilm Effect of DNase against Single and Mixed Species Biofilm. **Foods**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 42, 19 mar. 2018. MDPI AG.
- SHINDE, Ravikumar Bapurao *et al.* Chloroquine sensitizes biofilms of *Candida albicans* to antifungal azoles. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 395-400, jul. 2013. Elsevier BV.
- SHINO, Beena *et al.* Comparison of Antimicrobial Activity of Chlorhexidine, Coconut Oil, Probiotics, and Ketoconazole on *Candida albicans* Isolated in Children with Early Childhood Caries: an in vitro study. **Scientifica**, [S.L.], v. 2016, n. 1, p. 1-5, 2016. Hindawi Limited.
- SHUAI, Yi; LIU, Bingyao; ZHOU, Guilong; RONG, Liang; NIU, Chunzi; JIN, Lei. Oral manifestations related to malaria: a systematic review. **Oral Diseases**, [S.L.], v. 27, n. 7, p. 1616-1620, 2 ago. 2020. Wiley.

- SIDRIM, José Júlio Costa; ROCHA, Marcos Fábio Gadelha. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 396 p.
- SUDBERY, Peter E.. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 9, n. 10, p. 737-748, 16 ago. 2011. Springer Science and Business Media LLC.
- SOUZA, Luana Carneiro Diniz *et al.* Association between pathogens from tracheal aspirate and oral biofilm of patients on mechanical ventilation. **Brazilian Oral Research**, [S.L.], v. 31, n. 38, p. 1-9, 21 mar. 2017. FapUNIFESP (SciELO).
- STEFFENS, J.P; MARCANTONIO, R.A.C. Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares 2018: guia Prático e Pontos-Chave. **Rev Odontol UNESP**, v. 47, n. 4, p. 189-197, 2018.
- SWARTJES, Jan J. T. M. *et al.* A Functional DNase I Coating to Prevent Adhesion of Bacteria and the Formation of Biofilm. **Advanced Functional Materials**, [S.L.], v. 23, n. 22, p. 2843-2849, 16 jan. 2013. Wiley.
- SZTAJER, H., SZAFRANSKI, S. P., TOMASCH, J., RECK, M., NIMTZ, M., ROHDE, M., WAGNER-DÖBLER, I. Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *C. albicans*. **The ISME journal**, v. 8, n. 11, p. 2256, 2014.
- TALAPKO, J. *et al.* *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 79, p. 1-19, 2021.
- TAN, Yulong *et al.* Enhancing antibiofilm activity with functional chitosan nanoparticles targeting biofilm cells and biofilm matrix. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 200, p. 35-42, nov. 2018. Elsevier BV.
- THOMÉ, R. *et al.* Chloroquine: Modes of action of an undervalued drug, **Immunology Letters**, v.153, n. 2, p. 50-57, 2013.
- THOMPSON, Delma S.; CARLISLE, Patricia L.; KADOSH, David. Coevolution of Morphology and Virulence in *Candida* Species. **Eukaryotic Cell**, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 1173-1182, set. 2011. American Society for Microbiology.
- TSUI, Christina; KONG, Eric F.; JABRA-RIZK, Mary Ann. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens And Disease**, [S.L.], v. 74, n. 4, p. 1-13, 9 mar. 2016. Oxford University Press (OUP).
- VERDEROSA, A.D; TOTSIKA, M. FAIRFULL-SMITH, K. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. 824, p. 1-17, 28 nov. 2019.
- VILLARREAL, Jessica Varela *et al.* DNase I and Proteinase K eliminate DNA from injured or dead bacteria but not from living bacteria in microbial reference systems and natural




- drinking water biofilms for subsequent molecular biology analyses. **Journal Of Microbiological Methods**, [S.L.], v. 94, n. 3, p. 161-169, set. 2013. Elsevier BV.
- VLAINIĆ, Josipa *et al.* Insights into biological activity of ureidoamides with primaquine and amino acid moieties. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 376-382, 1 jan. 2018. Informa UK Limited.
- WALL, Gina *et al.* Candida albicans biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Current Opinion In Microbiology**, [S.L.], v. 52, n. 1, p. 1-6, dez. 2019. Elsevier BV.
- WANG, Hao; REN, Dacheng. Controlling Streptococcus mutans and Staphylococcus aureus biofilms with direct current and chlorhexidine. **AMB Express**, v. 7, n. 204, p. 1-9, 2017.
- WANG, Hongzhi *et al.* Isolation, identification and genotyping of Candida albicans from Landes geese. **Transbound Emerg Dis**, v. 0, n. 0, p. 1-11, 2021.
- WEBER, S.M *et al.* Chloroquine and the fungal phagosome. **Curr Opin Microbiol.**, v. 03, n. 00, p. 349-353, 2000.
- WHILEY, Robert A; HARDIE, Jeremy M. Streptococcus. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, 14 set. 2015.
- XIAO, Jin *et al.* Candida albicans and Early Childhood Caries: a systematic review and meta-analysis. **Caries Research**, [S.L.], v. 52, n. 1-2, p. 102-112, 21 dez. 2017. S. Karger AG.
- YADAV, Khushbu; PRAKASH, Satyam. Dental Caries: a microbiological approach. **Journal Of Clinical Infectious Diseases & Practice**, [S.L.], v. 02, n. 01, p. 1-16, 2017. OMICS Publishing Group.
- YE, Jing *et al.* Effects of DNase I coating of titanium on bacteria adhesion and biofilm formation. **Materials Science And Engineering: C**, [S.L.], v. 78, p. 738-747, set. 2017. Elsevier BV.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO



Volume 167, Issue 2

Atypical chlamydoconidium-producing *Trichophyton tonsurans* strains from Ceará State, Northeast Brazil: investigation of taxonomy by phylogenetic analysis and biofilm susceptibility

Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante¹, Germana Costa Paixão¹, Vandbergue Santos Pereira¹, Jonathas Sales de Oliveira¹ , Juliana Maria Maciel¹, Waldemiro de Aquino Pereira-Neto¹, Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto² , Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco¹, Rossana de Aguiar Cordeiro¹, José Júlio Costa Sidrim¹ , Marcos Fábio Gadelha Rocha^{1,3}

 [View Affiliations](#)

Published: 11 January 2021

Chlamydoconidium-producing *Trichophyton tonsurans* strains isolated in Northeastern Brazil have morphological features different from the classic description of this dermatophyte species. This study investigated the phylogenetic relationship of chlamydoconidium-producing *T. tonsurans* strains isolated in Northeastern Brazil. Also, the effect of terbinafine and farnesol on mature biofilms of *T. tonsurans* strains was evaluated. The mass spectra of *T. tonsurans* strains were investigated by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The ITS and LSU loci regions of rDNA and the partial β -tubulin gene were sequenced and the phylogenetic tree was analysed. The effects of terbinafine and farnesol on mature *T. tonsurans* biofilms were evaluated through the analysis of metabolic activity, quantification of biomass and observation by scanning electron microscopy. MALDI-TOF MS spectra of the chlamydoconidium-producing *T. tonsurans* strains differed from the spectrum of the control strain (ATCC 28942), presenting an intense ion peak at m/z 4155 Da. Phylogenetic tree analysis showed that the chlamydoconidium-producing strains isolated in Northeastern Brazil are allocated to a single cluster, differing from strains isolated from other countries. As for mature *T. tonsurans* biofilms, farnesol reduced biomass and metabolic activity by 64.4 and 65.9%, respectively, while terbinafine reduced the biomass by 66.5% and the metabolic activity by 69%. Atypical morphological characteristics presented by chlamydoconidium-producing *T. tonsurans* strains result from phenotypic plasticity, possibly for adaptation to environmental stressors. Also, farnesol had inhibitory activity against *T. tonsurans* biofilms, demonstrating this substance can be explored for development of promising anti-biofilm drugs against dermatophytes.

Received: 14/08/2020 Accepted: 19/12/2020 Published Online: 11/01/2021

Keyword(s): biofilm , chlamydoconidia , farnesol , mass spectrometry , *T. tonsurans* and terbinafine

Funding

APÊNDICE B – ARTIGO SUBMETIDO**Antibiofilm activity of proteinase K and DNase I on dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans***

Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante¹, Vandbergue Santos Pereira¹, Wanessa Fernandes Matias Regis², Fábio Ruan Louzeiro Lima², Juliana Maria Maciel³, Augusto Feynman Dias Nobre³, Maria Gleiciane Rocha⁴, Marcos Fábio Gadelha Rocha^{4*}, José Julio Costa Sidrim¹, Simone Duarte⁵, Lidiany Karla Azevedo Rodrigues²

¹ Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceará. Rua Cel. Nunes de Melo, 1315 - Rodolfo Teófilo - CEP: 60430-275, Fortaleza, Ceará, Brazil;

² Department of Operative Dentistry, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará-UFC, Rua Cap. Francisco Pedro S/N - 60430-170 Fortaleza-CE, Brazil

³ Postgraduate Program in Medical Sciences, Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceará. Rua Cel. Nunes de Melo, 1315 - Rodolfo Teófilo - CEP: 60430-275, Fortaleza, Ceará, Brazil;

⁴ Postgraduate Program in Veterinary Sciences, College of Veterinary, State University of Ceará. Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, CEP: 60714-903, Fortaleza, Ceará, Brazil.

⁵ Department of Cariology, Operative Dentistry and Dental Public Health, Indiana University School of Dentistry, Indianapolis, IN, USA.

***Corresponding author:** Rua Coronel Nunes de Melo, 1315, Rodolfo Teófilo. CEP: 60420-270, Fortaleza, CE, Brazil. E-mail: mfgrocha@gmail.com

Running title: Proteinase K and DNase I on oral dual-species biofilms

Abstract

Biofilms are recognized as a virulence factor in several oral diseases. This study evaluated the activity of proteinase K (PRK) and DNase I (DNS) against biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. The strains *S. mutans* ATCC 25175 and *C. albicans* ATCC 1023 were used, in addition to four clinical isolates of *C. albicans*. The biofilms were formed in 96-well plates, in BHI broth medium, for 48 h and treated with concentrations of 4 to 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of PRK and DNS for 24 h. The effects of PRK and DNS were evaluated by crystal violet staining, MTT reduction assay and microscopy. PRK caused average of 38.4 $\mu\text{g ml}^{-1}$, while DNS had average inhibitory concentration of 89.6 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Maximum reductions were obtained when biofilms were exposed to 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ($p < 0.001$) of each drug, with 71.33% and 55.62% metabolic activities of biofilms ($p < 0.001$) treated with PRK and DNS, respectively. Microscopy showed PRK caused a reduction in biofilm formation by damaging membranes of sessile cells, while DNS reduced biofilm formation without cell damage. Enzymatic degradation of components of the extracellular matrix of biofilms promoted by PRK and DNS is a promising strategy for the control of biofilm-related diseases.

Keywords: Bacteria. Yeast. Biofilm. Matrix. Endopeptidase. Deoxyribonuclease I.

Introduction

Streptococcus mutans (*S. mutans*) is a facultative anaerobic gram-positive bacterium found in the oral cavity and dental biofilms and is one of the numerous etiological factors of dental caries. *Candida albicans* (*C. albicans*) is a common opportunistic pathogenic fungus in humans. It can infect mucosal membranes, causing candidiasis, and form biofilms on mucosal membranes as well as on implants. Biofilm growth and virulence of *C. albicans* are linked to its transition from the yeast to the hyphal form, which is a fundamental step towards pathogenicity.

A symbiotic relationship exists between *C. albicans* and *S. mutans*. This relationship allows the microorganisms to produce enhanced biofilms, *in vitro* and *in vivo*. Animals infected by both *C. albicans* and *S. mutans* have shown higher levels of infection and microbial carriage in plaque biofilms compared to animals infected with either species alone. Coinfection has been found to augment the virulence of the biofilm, leading to the development of rampant caries (Falsetta *et al.* 2014).

The most common inter-kingdom interaction in oral cavity infections is the co-infection of *C. albicans* with *S. mutans* (Fernandes *et al.* 2018). The presence of extracellular matrices on the tooth surface, e.g. *S. mutans* biofilms, favors the adhesion of *C. albicans* and consequent colonization of this area. This interaction dramatically increases the microbial load and the extracellular matrix production, and finally the extensive mixed-kingdom biofilm leads to severe tooth decay (Koo *et al.* 2018).

Biofilm-related diseases occur as a result of dynamic interactions between microorganisms and the host, from microbial colonization of oral surfaces to the establishment of pathogenic biofilms (Marsh and Zaura 2017). Biofilms formed on tooth surfaces or other dental materials are known as oral biofilms and have been clearly recognized as a virulence

factor in several oral diseases, including dental caries, periodontitis and endodontic infections (Mira *et al.* 2017).

Biofilms are formed by cell aggregates incorporated in a self-produced matrix of extracellular polymeric substances (EPSs). These EPSs consist of polysaccharides, nucleic acids (DNA and RNA), proteins and lipids (Flemming *et al.* 2016). The composition and structure of EPSs varies according to the host, presence of nutrients/substrates and type of microorganism (Flemming 2016).

The most prominent functions of EPSs include adhesion, mechanical stability, protection and cell dispersion. In addition, EPSs also increase the biofilm's resistance to various antimicrobials, acting as a limiting barrier to drug diffusion, resulting in reduced drug access to deep layers of the biofilm, therefore causing low antimicrobial efficacy (Nett 2020).

Over the years, several studies in the field of dentistry have provided of useful information on disinfection of root canals by eliminating only pathogens (Sasanakul *et al.* 2019; Ballal *et al.* 2019). However, the fundamental role of the biofilm matrix in combating biofilm-related diseases is still a poorly studied. The need to develop antibiofilm therapies targeting EPSs is crucial, since biofilm-related diseases often do not respond to conventional antimicrobial treatment (Liu *et al.* 2018; Koo *et al.* 2017). The extracellular DNA (eDNA), which is actively secreted or produced by controlled cell lysis and associated with microbial competition (Panariello *et al.* 2019), has an prominent role in establishing mechanical stability in biofilms, as highlighted in recent reports (Florez and Klein 2018; Rainey *et al.* 2019). The importance of proteins and eDNA in microbial biofilms has been widely explored (Taglialegna *et al.* 2016; Okshevsky and Meyer 2015).

Modification of the composition and structure of the oral biofilm matrix may lead to new treatment approaches in cariology and periodontology (Karygianni 2020). In this study, therefore, we focused on new antibiofilm strategies, including those that target vital structural

and functional characteristics in EPSs, with emphasis on proteins and eDNA. The specific aim of this study was to evaluate the antibiofilm activity of different concentrations of proteinase K and DNase I against dual-species *in vitro* biofilms of *S. mutans* and *C. albicans* through enzymatic treatment.

Material and methods

Microorganisms

We used the standard strains of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *Candida albicans* ATCC 10231. In addition, we employed four clinical isolates collected from human mucosa: *C. albicans* CEMM 03-03-091; *C. albicans* CEMM 03-03-095; *C. albicans* CEMM 03-03-094; and *C. albicans* CEMM 03-03-096. Before each experiment, isolated colonies from strains grown in mitis salivarius agar (*S. mutans*) and Sabouraud agar (*C. albicans*) were streaked and incubated at 37 °C for 48 h.

Formation of dual-species biofilms

For the formation of the biofilms of *S. mutans* and *C. albicans*, inocula in BHI broth were adjusted to densities of 10^8 cfu ml⁻¹ of *S. mutans* and 10^6 cfu/ml⁻¹ of *C. albicans* (Panariello *et al.* 2017). Each adjusted inoculum (100 µl) was pipetted into a 96-well flat-bottomed microdilution plate. The plate was then incubated at 37 °C for 48 h to allow biofilm growth.

Susceptibility of dual-species biofilms

After biofilm formation, the plate wells were washed twice with sterile PBS and 200 µl of either proteinase K or DNase I, both diluted in BHI broth, was added to each well. Both compounds were tested in concentrations ranging from 4 to 128 µg ml⁻¹ (Karygianni 2020), by means of serial dilution. The plates were then incubated again in the same conditions described

above, for an additional 24 h (Martins *et al.* 2010). The antimicrobial effect of the molecules was evaluated using the crystal violet staining techniques to quantify the biomass and the [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) bromide reduction assay to assess metabolic activity.

Quantification of biomass and metabolic viability

The biomass was quantified by crystal violet staining (Brilhante *et al.* 2018). Biofilms formed in microtiter plate wells were washed twice with PBS and then dehydrated with methanol for approximately 5 min. Subsequently, 200 μ l of 0.3% crystal violet was added to each well. After 20 min, the dye was removed and the wells were washed twice with distilled water. After washing, the dye impregnated in the cell material was removed by adding 200 μ l of 33% acetic acid (v/v) for 5 min. The supernatant samples were transferred to new microtiter plates and the absorbance was read with a spectrophotometer at 540 nm.

The quantification of metabolic activity was performed by the MTT reduction assay (Sigma Chemical Corporation, USA) (Reddy and Nancharaiah 2020). The microplate wells were washed with PBS and then filled with 125 μ l of MTT solution (0.5 mg ml⁻¹) solubilized in sterile PBS with 2% glucose. The plates were incubated for 5 h in the dark at 35 °C. After this period, the solutions were removed and 150 μ l 100% DMSO was added to each well for 45 min to extract formazan salt. After extraction, 100 μ l of the supernatant was transferred to each well of a new microtiter plate and read with a spectrophotometer at 540 nm. The data obtained were used to determine the minimum inhibitory concentration of biofilm capable of inhibiting 50% of the metabolic activity of biofilms (SMIC₅₀), when compared to the drug-free control (Brilhante *et al.* 2019).

Structure and morphology of biofilms

The proteinase K and DNase I were evaluated for their effects on the biofilms' structure and morphology. Biofilms were formed as previously described (Panariello *et al.* 2017), with adaptation, for formation on Thermanox™ slides (Thermo Fisher Scientific, New York, USA) in the presence and absence of proteinase K or DNase I, and evaluated by laser scanning confocal microscopy and scanning electron microscopy (Brilhante *et al.* 2019). In the former case, the biofilms were analyzed with a Nikon C2 microscope at 488 nm for detection of SYTO 9 fluorescent dye, which identifies live cells, and at 561 nm for detection of propidium iodide, which identifies dead or damaged cells (Brilhante *et al.* 2019). In the latter case, biofilms were washed twice with cacodylate buffer (0.15 M, pH 7.2), and then covered with glutaraldehyde [2.5% in 0.15 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) with 0.1% alcian blue] and incubated at 25 °C for 4 h. Then the biofilms were washed twice with cacodylate buffer and the coverslips were dehydrated in an ascending ethanol series (30, 50, 70, 80, 95 and 100%) for 10 min each, repeating dehydration at the last concentration (100% ethanol). Next, the biofilms were dried at room temperature and covered with hexamethyldisilazane (HMDS) (Polysciences Europe, Germany) for 15 min. Afterward, HMDS was removed and biofilms were dried overnight in a desiccator. Slides were coated with 12 nm of gold (Emitech Q150T) and analyzed with a Quanta 450-FEG scanning electron microscope in high vacuum mode at 20 kV (Brilhante *et al.* 2019).

Statistical analysis

All assays were performed in triplicate on two different occasions. For data with normal distribution and similar variances, Student's t-test was used, and for data with asymmetric distribution, the nonparametric Wilcoxon test was used. In comparisons between 3 or more groups of data that showed symmetry, ANOVA was used, followed by the Tukey post-test for pairwise comparisons. For data with asymmetric distribution, the Friedman test was applied, followed by the Dunn post-test for comparison between pairs. In all situations, the maximum

significance level adopted for affirmative conclusions was 5%. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

The exposure of dual-species biofilms of *S. mutans* and *C. albicans* to proteinase K (Figures 1A and 1B) reduced ($P < 0.001$) the biomass of biofilms starting at the concentration of $16 \mu\text{g ml}^{-1}$ and the metabolic activity as of $4 \mu\text{g ml}^{-1}$, reaching maximum inhibitions of 58.66% of biomass and 71.33% of metabolic activity at a concentration of $128 \mu\text{g ml}^{-1}$.

When biofilms were exposed to DNase I (Figures 1C and 1D), reduction of the evaluated parameters was also observed, with a decline ($P < 0.001$) in the biomass of the biofilms starting at the concentration of $32 \mu\text{g ml}^{-1}$ and the metabolic activity starting from $4 \mu\text{g ml}^{-1}$, reaching maximum inhibitions of 49.63% of biomass and 55.62% of metabolic activity at a concentration of $128 \mu\text{g ml}^{-1}$.

The SMIC₅₀ values of proteinase K and DNase I for the biofilms of *S. mutans* and *C. albicans* are listed in Table 1. The results are expressed as mean \pm standard deviation. proteinase K caused SMIC₅₀ ranging from 32 to $64 \mu\text{g ml}^{-1}$, with an average of $38.4 \mu\text{g ml}^{-1}$, while DNase I showed inhibitory concentrations ranging from 64 to $128 \mu\text{g ml}^{-1}$, with average of $89.6 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Analysis of SEM and MCVL images showed a negative effect on the biofilms treated with proteinase K or DNase I, both in terms of cell density and biofilm thickness (Figure 2). However, the treatment with proteinase K predominantly caused cell damage to the bacterial population (Figure 2B), while the treatment with DNase I did not cause similar cell damage (Figure 2C), demonstrating that its reducing effect is not linked to cell death. In addition, treatment with DNase I appeared to cause reductions in the filament of *C. albicans* (Figure 2F).

Discussion

The effect of enzymatic treatment of biofilms with proteinase K and DNase I was quantified by the determination of biomass and metabolic activity. Visualization of biofilms using microscopic techniques revealed the degradation of the matrix, leading to loss of structural integrity and alteration of the spatial distribution of biofilms after treatment with either proteinase K or DNase I.

So far, many antimicrobial strategies have been applied for the dispersion of biofilms in dentistry, especially in relation to root canal disinfection (Gonçalves *et al.* 2016; Sasanakul *et al.* 2019; Ballal *et al.* 2019). However, due to several limitations of antimicrobials, such as low efficacy against mature biofilms, chemical treatment protocols can be complemented with enzymatic methods. Enzymes such as proteinases and DNases can allow degradation of EPS and thus provide access of antimicrobials to deep biofilm layers, which are typically colonized by the most resistant microbial cells (Fleming and Rumbaugh 2017; Saggiu *et al.* 2019).

Since proteins and polysaccharides are both main constituents of EPSs, several proteases, such as proteinase K, seem to have a high potential for matrix degradation and thus biofilm removal (Lister and Horswill 2014). In previous studies, treatment with proteinase K induced a significant detachment of protein-rich biofilms (Gilan and Sivan 2013; Shukla and Rao 2013). Likewise, 200 µg/ml of proteinase K triggered the complete dispersion of *Listeria monocytogenes* biofilms (Nguyen and Burrows 2014). In our study, we detected a 50% reduction in the metabolic activity of dual-species biofilms of *S. mutans* and *C. albicans*, with treatment of 32 µg ml⁻¹. This can be attributed to the fact that proteinase K presumably inhibits peptides in general, including peptides that may be involved in streptococcal proliferation (Takahashi 2015; Willenborg and Goethe 2016).

Niazi *et al.* (2014) investigated the dynamics of biofilm breakdown using proteinase K in an endodontic multispecies biofilm model. Confocal images of biofilms stained with

live/dead dye showed that proteinase K was effective in eliminating bacteria from the biofilms (Niazi *et al.* 2014). Another study using proteinase K showed that it induces changes in the composition and structural integrity of multispecies oral biofilms (Karygianni *et al.* 2021). In our study, the microscopic techniques clearly showed that the treatment of biofilms with proteinase K caused significant membrane damage in the bacterial population constituting biofilms. Also, treatment with proteinase K resulted in less dense biofilms compared to the control biofilm.

DNase I is one of the main serum endonucleases that degrade eDNA in the extracellular matrix (Sharma and Pagedar 2018), and has been combined with antibiotics (Tetz *et al.* 2009) or applied clinically to disperse *P. aeruginosa* biofilms in patients with cystic fibrosis (Suri 2005). In the present study, we used DNase I with a focus on eDNA degradation in the biofilm matrix of *S. mutans* and *C. albicans* biofilms and observed an impact on the biomass and metabolic activity of these biofilms, and thus on the spatial distribution of microbial species. This effect can possibly be attributed to the active role of eDNA in gene transfer, which is facilitated by the proximity of microbial cells within the biofilm (Li *et al.* 2001). The fact that DNase I negatively affects the growth of *S. mutans* and *C. albicans* biofilms may be related to the eDNA function as a source of nutrients for immobilized biofilm cells (Karygianni *et al.* 2020). Since the formation of oral biofilms reflects the ecological balance between different microbes that colonize the same microenvironment, our study showed that treatment with DNase I can disturb this balance. This effect may therefore be relevant for some combined clinical applications against biofilms. Although the detection of quorums in multispecies biofilms has not been fully investigated yet, it is possible that a still unknown mechanism for the quorum detection triggers a change in composition within biofilms after treatment with DNase I, hastening the mechanical instability caused by the absence of eDNA (Brown *et al.* 2015; Brackman *et al.* 2016).

While the use of the colorimetric method with crystal violet and the XTT reduction assay allowed the quantification of biomass and metabolic activity of biofilms, after enzymatic inhibition of biofilm growth, SEM and CLSM microscopic techniques were used to examine the biofilms' topography and three-dimensional (3D) structure. The application of proteinase K and DNase I also affected the biofilm structure, as it induced more compact biofilms compared to the untreated ones. Whitchurch et al. (2002) described the ability of DNase I to prevent the formation of *P. aeruginosa* biofilm, and the authors indicated that this enzymatic treatment may be beneficial as an early prophylactic measure to prevent the establishment of biofilms. In our study, biofilms were grown in the presence of DNase I, which resulted in disruption and reduced growth, without significant damage to the viability of the remaining cells. Similar results were previously reported (Yu *et al.* 2019), when DNase was applied to *E. faecalis* biofilms in an *in vitro* root canal system, where treatment with DNase was shown to affect the biofilm microstructure, causing a reduction in the volume of exopolysaccharides (Yu *et al.* 2019).

The role of eDNA and exoproteins in biofilm formation in mature *Lactobacillus plantarum* biofilms using proteinase K and DNase I was also investigated (George and Halami 2019). The untreated biofilms presented a significantly denser population of viable cells, compared to a considerable decrease in density of biofilms treated with proteinase K and DNase I. The authors concluded that the biofilms examined were composed of eDNA and exoproteins and that these matrix components are vital constituents of biofilms (George and Halami 2019).

Chlorhexidine (CHX) is currently considered the gold standard among oral antiseptics, and due to its effect on dental plaque and gingivitis, it is also used to prevent and treat caries (Gomes *et al.* 2013; Karygianni *et al.* 2020). In this respect, some studies have shown an interaction between CHX and proteinase K and CHX with DNase I. That study was performed with supragingival multispecies biofilms of *S. mutans*, *Streptococcus oralis*, *Actinomyces oris*

and *C. albicans*, and the authors observed that the use of CHX in low concentrations was more effective when used in conjunction with proteinase K or DNase I, indicating new possibilities for caries treatment from the use of CHX together with proteinase K and DNase I (Granicher *et al.* 2021). Another study, carried out with biofilms of *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mitis* and *Enterococcus faecalis*, indicated that treatment with CHX together with proteinase K was significantly more effective compared to treatment with CHX alone, reinforcing the need for further studies of their combined use (Niazi *et al.* 2015).

It would be interesting to evaluate whether treatment of these biofilms with proteinase K and with DNase I has synergistic effects with antimicrobial agents. This, however, still needs to be elucidated in future studies.

It should be noted that treatment with DNase I did not have a negative impact on the viability of the remaining cells in the biofilm. This implies that DNase I probably interacts only with eDNA, without penetrating intact microbial cell membranes, interfering only with the structural integrity of biofilms. In contrast, proteinase K only interferes with cell viability. Therefore, despite the fact that DNase I and proteinase K can effectively degrade biofilms, they must be combined with conventional antimicrobial agents for both microbial efficacy and biofilm dispersion.

We can conclude that the application of proteinase K and DNase I causes disintegration of the biofilm structure with consequent reduction of biomass and metabolic activity. Future studies in *ex vivo* and *in vivo* models are necessary to validate this effect and analyze the degradation of components of the extracellular matrix of biofilms, as a strategy to combat oral biofilms.

Acknowledgments

We thank the Analytical Center UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pro-Equipment CAPES for technical support to obtain microscopic images.

Funding

This work was supported by the Brazilian agencies National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Grant 305024/2017-5) and Office for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; Brazil; Grant 88881.168799/2018-01/CAPES-Print Program; Brazil).

Conflicts of Interest

None.

REFERENCES

- Marsh P.D., Zaura E. (2017) Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol* **44**, 12–22.
- Mira A., Simon-Soro A., Curtis M.A. (2017) Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. *J Clin Periodontol* **44**, 23–38.
- Flemming H.C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S. (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* **14**, 563.
- Flemming H.C. (2016) EPS—then and now. *Microorganisms* **4**, 41.
- Nett J.E., Andes D.R. (2020) Contributions of the biofilm matrix to *Candida* pathogenesis. *J Fungi* **6**, 21.
- Sasanakul P., Ampornaramveth R.S., Chivatxaranukul P. (2019) Influence of adjuncts to irrigation in the disinfection of large root canals. *J Endod* **45**, 332–7.
- Ballal N.V., Gandhi P., Shenoy P.A., *et al.* (2019) Safety assessment of an etidronate in a sodium hypochlorite solution: randomized double-blind trial. *Int Endod J* **52**, 1274–82.
- Liu Y., Ren Z., Hwang G., Koo H. (2018) Therapeutic strategies targeting cariogenic biofilm microenvironment. *Adv Dent Res* **29**, 86–92.
- Koo H., Allan R.N., Howlin R.P., Stoodley P., Hall-Stoodley L. (2017) Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol* **15**, 740.
- Panariello B.H.D., Klein M.I., Alves F., Pavarina A.C. (2019) DNase increases the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida albicans* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **27**, 124–31.
- Florez S.E.J., Klein M.I. (2018) Extracellular matrix influence in *Streptococcus mutans* gene expression in a cariogenic biofilm. *Mol Oral Microbiol* **33**, 181–93.
- Rainey K., Michalek S.M., Wen Z.T., Wu H. (2019) Glycosyltransferase-mediated biofilm matrix dynamics and virulence of *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol* **85**.

Taglialegna A., Navarro S., Ventura S., *et al.* (2016) Staphylococcal Bap proteins build amyloid scaffold biofilm matrices in response to environmental signals. *PLoS Pathog* **12**, e1005711.

Okshevsky M., Meyer R.L. (2015) The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit Rev Microbiol* **41**, 341–52.

Panariello B.H.D., Klein M.I., Pavarina A.C., Duarte S. (2017) Inactivation of genes TEC1 and EFG1 in *Candida albicans* influences extracellular matrix composition and biofilm morphology. *J Oral Microbiol* **9**, 1385372.

Brilhante R.S.N., de Oliveira J.S., Evangelista A.J. de J., *et al.* (2018) In vitro effects of promethazine on cell morphology and structure and mitochondrial activity of azole-resistant *Candida tropicalis*. *Med Mycol* **56**, 1012–22.

Reddy G., Nancharaiah Y.V. (2020) Alkylimidazolium Ionic Liquids as Antifungal Alternatives: Antibiofilm Activity Against *Candida albicans* and Underlying Mechanism of Action. *Front Microbiol* **11**, 730.

Brilhante R.S.N., Pereira V.S., Oliveira J.S. *et al.* (2019) Terpinen-4-ol inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents. *Future Microbiol* **14**, 1221–33.

Gonçalves L.S., Rodrigues R.C.V., Junior C.V.A., Soares R.G., Vettore M.V. (2016) The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine as irrigant solutions for root canal disinfection: a systematic review of clinical trials. *J Endod* **42**, 527–32.

Fleming D., Rumbaugh K.P. (2017) Approaches to dispersing medical biofilms. *Microorganisms* **5**, 15.

Saggu S.K., Jha G., Mishra P.C. (2019) Enzymatic degradation of biofilm by metalloprotease from *Microbacterium* sp. SKS10. *Front Bioeng Biotechnol* **7**, 192.

Lister J.L., Horswill A.R. (2014) *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front Cell Infect Microbiol* **4**, 178.

- Gilan I., Sivan A. (2013) Effect of proteases on biofilm formation of the plastic-degrading actinomycete *Rhodococcus ruber* C208. *FEMS Microbiol Lett* **342**, 18–23.
- Shukla S.K., Rao T.S. (2013) Dispersal of Bap-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm by proteinase K. *J Antibiot (Tokyo)* **66**, 55–60.
- Nguyen U.T., Burrows L.L. 2014 DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. *Int J Food Microbiol* **187**, 26–32.
- Takahashi N. (2015) Oral microbiome metabolism: from “who are they?” to “what are they doing?” *J Dent Res* **94**, 1628–37.
- Willenborg J., Goethe R. (2016) Metabolic traits of pathogenic streptococci. *FEBS Lett* **590**, 3905–19.
- Niazi S.A., Clark D., Do T., *et al.* (2014) The effectiveness of enzymic irrigation in removing a nutrient-stressed endodontic multispecies biofilm. *Int Endod J* **47**, 756–68.
- Sharma K., Pagedar S.A. (2018) Antibiofilm effect of dnase against single and mixed species biofilm. *Foods* **7**, 42.
- Tetz G.V., Artemenko N.K., Tetz V.V. (2009) Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 1204–9.
- Suri R. (2005) The use of human deoxyribonuclease (rhDNase) in the management of cystic fibrosis. *BioDrugs* **19**, 135–44.
- Li Y-H., Lau P.C.Y., Lee J.H., Ellen R.P., Cvitkovitch D.G. (2001) Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J Bacteriol* **183**, 897–908.
- Brackman G., Breyne K., De Rycke R., *et al.* (2016) The quorum sensing inhibitor hamamelitannin increases antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms by affecting peptidoglycan biosynthesis and eDNA release. *Sci Rep* **6**, 1–14.
- Brown H.L., Hanman K., Reuter M., Betts R.P., Van Vliet A.H.M. (2015) *Campylobacter jejuni*

biofilms contain extracellular DNA and are sensitive to DNase I treatment. *Front Microbiol* **6**, 699.

Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C., Mattick J.S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science (80-)* **295**, 1487.

Yu M-K., Kim M-A., Rosa V., *et al.* (2019) Role of extracellular DNA in *Enterococcus faecalis* biofilm formation and its susceptibility to sodium hypochlorite. *J Appl Oral Sci* **27**.

George J., Halami P.M. (2019) Presence of extracellular DNA & protein in biofilm formation by gentamicin-resistant *Lactobacillus plantarum*. *Indian J Med Res* **149**, 257.

Falsetta, M.L. *et al.* (2014) Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infection and immunity* **5**, 1968.

Fernandes T., Bhavsar C., Sawarkar, S., D'SOUZA A. (2018) Current and novel approaches for control of dental biofilm. *Int. J. Pharm* **1**,199.

Koo H., Andes D.R., Krysan D.J. (2018) *Candida*–streptococcal interactions in biofilm-associated oral diseases. *PLoS Pathog* **14**, e1007342.

Martins M., *et al.* (2010) Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia* **169**, 323.

Gomes B.P.F.A., *et al.* (2013) Chlorhexidine in endodontics. *Brazilian dental jornal* **24**, 89.

Karygianni L., Attin T., Thurnheer T. (2020) Combined DNase and proteinase treatment interferes with composition and structural integrity of multispecies oral biofilms. *Journal of clinical medicine* **9**, 983.

Gränicher, K.A., *et al.* (2021) Low Concentrations of Chlorhexidine Inhibit the Formation and Structural Integrity of Enzyme-Treated Multispecies Oral Biofilms. *Frontiers in Microbiology* **1**, 2781.

Niazi, S.A. *et al.* (2015) Synergistic effect of 2% chlorhexidine combined with proteolytic enzymes on biofilm disruption and killing. *International endodontic jornal* **12**, 1157.

Karygianni L., Paqué P.N., Attin T., Thurnheer, T. (2021). Single DNase or Proteinase Treatment Induces Change in Composition and Structural Integrity of Multispecies Oral Biofilms. *Antibiotics* **10**, 400.

Table 1 - Minimum inhibitory concentration of proteinase K or DNase I against dual-species biofilms of *S. mutans* and *C. albicans*.

Species	Minimum Inhibitory Concentration of Biofilm ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	
	Proteinase K	DNase I
<i>S. mutans</i> ATCC 700610 + <i>C. albicans</i> ATCC 10231	32	128
<i>S. mutans</i> ATCC 700610 + <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-095	64	64
<i>S. mutans</i> ATCC 700610 + <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-091	32	128
<i>S. mutans</i> ATCC 700610 + <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-094	32	64
<i>S. mutans</i> ATCC 700610 + <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-096	32	64

Control biofilm: Mono-species biofilm of *S. mutans* ATCC 700610 was inhibited by 4 and 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of proteinase K; mono-species biofilm of *C. albicans* ATCC 10231 was inhibited by 4 and 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of DNase I.

**APÊNDICE C – ARTIGO SUBMETIDO COM OS RESULTADOS DA
DISSERTAÇÃO**

Antimalarial cloroquine and primaquine against dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*

Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante¹, Juliana Maria Maciel², Maria Gleiciane da Rocha³, Lana Glerieide da Silva¹, Marcos Fábio Gadelha Rocha³, José Julio Costa Sidrim¹

¹ Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceará. Rua Cel. Nunes de Melo, 1315 - Rodolfo Teófilo - CEP: 60430-275, Fortaleza, Ceará, Brazil;

² Postgraduate Program in Medical Sciences, Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceará. Rua Cel. Nunes de Melo, 1315 - Rodolfo Teófilo - CEP: 60430-275, Fortaleza, Ceará, Brazil;

³ Postgraduate Program in Veterinary Sciences, College of Veterinary, State University of Ceará. Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, CEP: 60714-903, Fortaleza, Ceará, Brazil.

***Corresponding author:** Rua Coronel Nunes de Melo, 1315, Rodolfo Teófilo. CEP: 60420-270, Fortaleza, CE, Brazil. E-mail:

Abstract

Streptococcus mutans is a microorganism commonly associated with dental caries due to its ability to metabolize sucrose, favoring coadhesion with microorganisms such as *Candida albicans*. Such microorganisms can manifest in oral pathologies associated with neglected diseases, such as malaria. The aim of this study was to evaluate the effect of the antimalarial drugs, chloroquine and primaquine, on duo-species biofilms of *C. albicans* and *S. mutans*. Methods: Strains of *S. mutans* ATCC 25175, *C. albicans* ATCC 10231 and clinical strains of *C. albicans* were used. The tests were performed in 96-well plates in BHI broth for 48h, and then treated with concentrations of 32-1,024 μ g/ml for both drugs. The action of chloroquine and primaquine was evaluated by the MTT reduction assay and scanning electron microscopy. Results: Chloroquine reduced the metabolic activity of biofilms by 49.8% at the lowest tested concentration of 32 μ g/mL and 74.9% at the highest tested concentration of 1,024 μ g/mL. Primaquine at its lowest tested concentration of 32 μ g/mL, inhibited 35.91% of the metabolic activity and at the highest concentration of 1,024 μ g/mL there was an inhibition of 74.2%. Microscopy showed the effect on the reduction of viable cells, demonstrating the antimicrobial action of the drugs under study. Conclusions: Thus, this study demonstrated the antibiofilm effect of the compounds in question, opening a perspective for the control of dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*.

Keywords: Biofilme; *Streptococcus mutans*; *Candida albicans*.

Introduction

The oral microbiota is formed by microorganisms, which live in symbiosis with the host, such as *Candida albicans*, an opportunistic yeast associated with oral diseases, and *Streptococcus mutans*, a Gram-positive bacterium related to dental diseases (BOUDAREL et al., 2018). These microorganisms produce virulence factors that facilitate infection, such as biofilm formation of the two species together (PHILIP; SUNEJA; WALSH, 2018).

Despite the commensal relationship between these microorganisms and the host, changes in the oral microenvironment can generate dysbiosis (MARSH; ZAURA, 2016), increasing the risk of developing dental disease (ENWONWU; SALAKO, 2012). For this, there are risk factors for the development of periodontal diseases, such as: genetics, tobacco and alcohol use, poor oral hygiene, age, sex, nutritional dysfunction and infections, such as malaria (NEWCOMB; DARBY; COOPER, 2009).

One of the infections related to dental trauma and periodontitis is malaria (SHUAI et al., 2020). Malaria is a relevant public health problem in tropical countries with fragility in the health system (LANDIER et al, 2016), being the most prevalent disease with parasitic etiology in the world. In South America, most cases are concentrated in the Amazon region (99.7%) and are caused by *Plasmodium vivax* (GOMES et al., 2020), and the treatment recommended by the Ministry of Health for this protozoan is the association of chloroquine and primaquine, for 3 and 7 days, respectively (BRASIL, 2021).

In addition to antimalarial activity, it has already been reported in the literature that chloroquine has antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, and *Candida albicans* in association with classic antifungals (SHINDE et al., 2013; WEBER et al., 2000; KHAN et al., 2005). In addition, primaquine and some of its metabolites have antimicrobial potential against fungi, viruses and bacteria such as *Staphylococcus aureus*,

Streptococcus pneumoniae and *Acinetobacter baumannii* (RAJIć et al., 2018) and the ability to eradicate biofilms already reported in studies (VLAINIć et al., 2018).

Thus, because malaria predisposes the occurrence of dental diseases and this population is submitted to treatment with antimalarials, this study aimed to investigate the antimicrobial and antibiofilm activity of antimalarial drugs in duo-species biofilms of *C. albicans* and *S. mutans*. Thus, the aim of this study was to test the action of the antimalarial chloroquine and primaquine against dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*.

Material and methods

Microorganisms

We used the standard strains of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *Candida albicans* ATCC 10231. In addition, we employed seven clinical isolates collected from human mucosa: *C. albicans* CEMM 03-03-091, *C. albicans* CEMM 03-03-092, *C. albicans* CEMM 03-03-093, *C. albicans* CEMM 03-03-094, *C. albicans* CEMM 03-03-095, *C. albicans* CEMM 03-03-096 e *C. albicans* CEMM 03-03-097. Before each experiment, isolated colonies from strains grown in mitis salivarius agar (*S. mutans*) and Sabouraud agar (*C. albicans*) were streaked and incubated at 37 °C for 48 h.

Formation of dual-species biofilms

For the formation of the biofilms of *S. mutans* and *C. albicans*, inocula in BHI broth were adjusted to densities of 10^8 cfu ml⁻¹ of *S. mutans* and 10^6 cfu ml⁻¹ of *C. albicans* (PANARIELLO *et al.* 2017). Each adjusted inoculum (100 µl) was pipetted into a 96-well flat-bottomed microdilution plate. The plate was then incubated at 37 °C for 48 h to allow biofilm growth.

Susceptibility of dual-species biofilms

After biofilm formation, the plate wells were washed twice with sterile PBS and 200 μ l of either Chloroquine or Primaquine, both diluted in BHI broth, was added to each well. Both compounds were tested in concentrations ranging from 32 to 1024 μ g ml⁻¹ (SHINDE *et al.*, 2013; SELEEM *et al.*, 2020), by means of serial dilution. The plates were then incubated again in the same conditions described above, for an additional 24 h (Martins *et al.* 2010). The antimicrobial effect of the molecules was evaluated using [3- (4,5-dimethylthiazol-2yl) -2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) bromide reduction assay to assess metabolic activity.

Quantification of metabolic viability

The quantification of metabolic activity was performed by the MTT reduction assay (Sigma Chemical Corporation, USA) (Reddy and Nancharaiiah 2020). The microplate wells were washed with PBS and then filled with 125 μ l of MTT solution (0.5 mg ml⁻¹) solubilized in sterile PBS with 2% glucose. The plates were incubated for 5 h in the dark at 35 °C. After this period, the solutions were removed and 150 μ l 100% DMSO was added to each well for 45 min to extract formazan salt. After extraction, 100 μ l of the supernatant was transferred to each well of a new microtiter plate and read with a spectrophotometer at 540 nm. The data obtained were used to determine the minimum inhibitory concentration of biofilm capable of inhibiting 50% of the metabolic activity of biofilms (SMIC₅₀), when compared to the drug-free control (BRILHANTE *et al.* 2019).

Structure and morphology of biofilms

The chloroquine and primaquine were evaluated for their effects on the biofilms' structure and morphology. Biofilms were formed as previously described (PANARIELLO *et al.* 2017), with adaptation, for formation on Thermanox™ slides (Thermo

Fisher Scientific, New York, USA) in the presence and absence of Chloroquine or Primaquine, and evaluated by scanning electron microscopy (BRILHANTE *et al.* 2019). Biofilms were washed twice with cacodylate buffer (0.15 M, pH 7.2), and then covered with glutaraldehyde [2.5% in 0.15 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) with 0.1% alcian blue] and incubated at 25 °C for 4 h. Then the biofilms were washed twice with cacodylate buffer and the coverslips were dehydrated in an ascending ethanol series (30, 50, 70, 80, 95 and 100%) for 10 min each, repeating dehydration at the last concentration (100% ethanol). Next, the biofilms were dried at room temperature and covered with hexamethyldisilazane (HMDS) (Polysciences Europe, Germany) for 15 min. Afterward, HMDS was removed and biofilms were dried overnight in a desiccator. Slides were coated with 12 nm of gold (Emitech Q150T) and analyzed with a Quanta 450-FEG scanning electron microscope in high vacuum mode at 20 kV (BRILHANTE *et al.* 2019).

Statistical analysis

All assays were performed in duplicate on two different occasions. For data with normal distribution and similar variances, Student's t-test was used, and for data with asymmetric distribution, the nonparametric Wilcoxon test was used. In comparisons between 3 or more groups of data that showed symmetry, ANOVA was used, followed by the Tukey post-test for pairwise comparisons. For data with asymmetric distribution, the Friedman test was applied, followed by the Dunn post-test for comparison between pairs. In all situations, the maximum significance level adopted for affirmative conclusions was 5%. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

The values of the minimum inhibitory concentration of the biofilm capable of inhibiting 50% of the metabolic activity of the biofilms (SMIC50) when compared to the drug-free control of chloroquine and primaquine for the *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* biofilms are listed in Table 1. Chloroquine reached SMIC50 at concentrations ranging from 32 to 256 $\mu\text{g/ml}$ while primaquine showed inhibitory concentrations ranging from 32 to 512 $\mu\text{g/ml}$.

Exposure of duo-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* to chloroquine (Figure 1A) reduced the metabolic activity of biofilms at all concentrations tested (32-1,024 $\mu\text{g/ml}$). At the initial concentration of 32 $\mu\text{g/ml}$, a reduction of 49.8% was observed in relation to the drug-free growth control. At the highest concentration tested, 1,024 $\mu\text{g/ml}$, there was a greater reduction in activity, reaching the maximum inhibition of 74.9% of the metabolic activity in relation to the drug-free growth control.

When biofilms were exposed to primaquine (Figure 1B), a reduction in metabolic activity was also observed at all concentrations (32-1024 $\mu\text{g/mL}$), at the lowest concentration of 32 $\mu\text{g/mL}$ it inhibited 35.91% of the metabolic activity compared to to the drug-free growth control, reaching the maximum percentage of inhibition of 74.2% at the highest concentration of 1,024 $\mu\text{g/ml}$ in relation to the growth control.

Tests were also performed associating both drugs, chloroquine and primaquine (32 $\mu\text{g/ml}$) of each. The combination of drugs was able to reduce metabolic activity, but inhibited only 33.84% of fungal growth when compared to drug-free growth control (Figure 2).

The analysis of the scanning electron microscopy images showed the robustness and density of the biofilms (Figures 3A and 3B) and the reduction of the microbial population in the biofilms treated with chloroquine or primaquine (Figures 3C and 3D) when compared to the drug-free growth control, showing the antimicrobial action of the compounds in question.

Discussion

Biofilms formed on the tooth surface have already been recognized as a virulence factor for infectious diseases of the oral cavity, including dental caries, periodontitis and endodontic infections. tumor (SHUAI et al., 2020). An example of a disease is malaria that predisposes to opportunistic infections through immune suppression capable of leading to a qualitative decrease in T lymphocytes, suggesting that it predisposes to oral diseases such as pericoronitis (OWOTADE et al, 2006) and other oral injuries such as trauma. and tooth loss (SHUAI et al., 2020; NEWCOMB et al., 2009).

Malaria is a serious infectious disease that represents an important public health problem of high incidence and difficult to control. Other factors involved are social conditions and access to quality health services (WOLFARTH-COUTO; SILVA; FILIZOLA, 2019). Xerostomia resulting from drug therapy is a clinical condition associated with oral manifestations of malaria (NEWCOMB; DARBY; COOPER, 2009) and is a risk factor for root caries (NIKLANDER et al., 2016). of dental caries, periodontal disease and other oral manifestations (NUGRAHA et al., 2019).

The treatment of malaria involves the use of drugs such as chloroquine and primaquine. Chloroquine is a low-cost drug that has been used for years against *Plasmodium vivax* infections (ISLAHUDIN et al., 2013). In Brazil, chloroquine treatment is directed against *P. vivax* and *P. ovale*, along with primaquine for uncomplicated malaria (BRASIL, 2021). Primaquine is one of the most widely used antimalarials, being the only one currently that fights relapses of the disease (BARROS et al., 2021). For treatment of *P. falciparum* cases and mixed infections, the World Health Organization (WHO) recommendation is the use of primaquine with some artemisinin derivative (ACT) (BRASIL, 2021).

The effect of treatment with chloroquine and primaquine on the biofilm formed was evaluated through the metabolic activity that showed a marked reduction in absorbance even at

low concentrations (32 µg/mL) for chloroquine and primaquine. In another study, the concentration of 100 µM of chloroquine increased the antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* by 75% (HENRIET et al., 2013).

Chloroquine is believed to target the polymerization of the heme portion of ferriprotoporphyrin IX which generates an environment of toxicity within the parasite resulting in the cell death of *Plasmodium* spp. Such a mechanism of action has been proposed for the antifungal activity of this drug. The higher extracellular pH in relation to the intracellular pH would culminate in an increase in fungal damage under a constant concentration of chloroquine, suggesting an increase in the rate of diffusion of the drug in fungal cells, in addition to the inhibition of thiamine transport in yeasts (THOMÉ et al., 2013; ROSSATO et al., 2020). Rajic et al. (2013) showed sensitivity to 4b-f, a primaquine derivative, in Gram-positive bacteria, especially *S. pneumoniae* and *S. aureus* ATCC (RAJIC, 2018). Possibly the mechanism of action is the same for *S. mutans* as it is also a gram-positive bacterium.

The primaquine's mechanism of action has not yet been fully elucidated, although it is believed that the activity is related to interference in the parasite's DNA, in the modification of the structure and disruption of mitochondrial membranes. Another potential pharmacological target would be oxidative stress within erythrocytes caused by the generation of reactive oxygen species that activate cellular defense (BASSO et al., 2011; LALÈVE et al., 2016). The SMIC₅₀ of chloroquine for all strains tested ranged from 32 to 256 µg/mL and for primaquine it ranged from 32 to 512 µg/mL, evidencing the efficacy of both drugs that even at low concentrations show action.

Conclusions

Thus, the antimicrobial action of chloroquine and primaquine in vitro on duo-species biofilms is evidenced. Further studies should be carried out later, opening a perspective for the control of duo-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*.

Declarations Ethics approval and consent to participate

Not applicable

Consent for publication

Not applicable

Availability of data and materials

Not applicable

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was supported by the Brazilian agencies National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Grant 305024/2017-5), Office for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; Brazil; Grant 88881.168799/2018-01/CAPES-Print Program; Brazil) e Ceará Foundation for Support to Scientific and Technological Development (FUNCAP)

Authors contributions

Acknowledgments

We thank the Analytical Center UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pro-Equipment CAPES for technical support to obtain microscopic images.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. In vitro sensitivity of *C. albicans* and *S. mutans* duo-species biofilms exposed to Chloroquine and Primaquine. Both graphs represent the metabolic activity of biofilms treated with Chloroquine (A) and Primaquine (B). The black bars represent biofilm growth without drug addition (control). The gray bars represent the biofilms treated with different concentrations of the compounds.

Figure 2. In vitro sensitivity of duo-species biofilms of *C. albicans* and *S. mutans* exposed to the association of chloroquine and primaquine. The black bar represents biofilm growth without drug addition (control). The gray bar represents the biofilm treated with both compounds.

Figure 3. Images obtained by scanning electron microscopy of the duo-species biofilm of *C. albicans* and *S. mutans* after 24 hours of incubation with chloroquine and primaquine. (A) Untreated mature biofilm (control). Magnification: 2000x. (B) Biofilm formed with the addition of primaquine. Magnification: 2000x. (C) Biofilm formed with the addition of chloroquine. Magnification: 2000x. (D) Untreated mature biofilm (control). Magnification: 10,000x. (E) Biofilm formed with the addition of primaquine. Magnification: 10,000x. (F) Biofilm formed with the addition of chloroquine. Magnification: 10,000x.

Table 1- Minimum Inhibitory Concentration in duo-species biofilms of *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*.

	Minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	
	Chloroquine	Primaquine
<i>S. mutans</i> ATCC 700610		
+ <i>C. albicans</i> ATCC 10231	128	128
<i>S. mutans</i> ATCC 700610		
+ <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-091	32	128
<i>S. mutans</i> ATCC 700610		
+ <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-092	32	32
<i>S. mutans</i> ATCC 700610		
+ <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-093	256	256
<i>S. mutans</i> ATCC 700610		
+ <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-094	64	128
<i>S. mutans</i> ATCC 700610		
+ <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-095	128	512
<i>S. mutans</i> ATCC 700610		
+ <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-096	64	64
<i>S. mutans</i> ATCC 700610		
+ <i>C. albicans</i> CEMM 03-03-097	64	256

REFERENCES

- Boudarel, H, Mathias J, Blaysat B, Grédiac M. Towards standardized mechanical characterization of microbial biofilms: analysis and critical review. *Npj Biofilms And Microbiomes*. 2018;4(1):1-15.
- Philip N, Suneja B, Walsh, L. Beyond *Streptococcus mutans*: clinical implications of the evolving dental caries aetiological paradigms and its associated microbiome. *British Dental Journal*. 2018;224(4):219-225.
- Koo H, Andes DR, Krysan DJ. *Candida*–streptococcal interactions in biofilm-associated oral diseases. *Plos Pathogens*. 2018;14(12):1-7.
- Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *Journal Of Clinical Periodontology*. 2016;44:12-22
- Enwonwu CO, Salako N. The periodontal disease-systemic health-infectious disease axis in developing countries. *Periodontology 2000*. 2012;60(1):64-77.
- Newcomb TL, Darby ML, Cooper RA. Malaria and the dental hygienist. *Dimensions of Dental Hyg* 2009;7:40–43.
- Shuai Y, Liu B, Zhou G, Rong L, Niu C, Jin L. Oral manifestations related to malaria: a systematic review. *Oral Diseases*. 2020;27(7):1616-1620.
- Landier J *et al*. The role of early detection and treatment in malaria elimination. *Malaria Journal*. 2016;15(1):1-8.
- Gomes, ECS *et al*. Outbreak of autochthonous cases of malaria in coastal regions of Northeast Brazil: the diversity and spatial distribution of species of anophelids. *Parasites & Vectors*. 2020;13(1):1-11.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de tratamento da malária no Brasil**. Brasília, 2021.

Shinde RB *et al.* Chloroquine sensitizes biofilms of *Candida albicans* to antifungal azoles. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2013;17(4):395-400.

Rajić Z *et al.* Asymmetric Primaquine and Halogenaniline Fumardiamides as Novel Biologically Active Michael Acceptors. *Molecules*. 2018;23(7):17-24.

Vlainić J *et al.* Insights into biological activity of ureidoamides with primaquine and amino acid moieties. *Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry*. 2018;33(1):376-382.

Panariello BHD, Klein MI , Pavarina AC , Duarte S. Inactivation of genes TEC1 and EFG1 in *Candida albicans* influences extracellular matrix composition and biofilm morphology. *J Oral Microbiol*. 2017;9.

Seleem, NM, Latif HK, El Abd, Shaldam M, El-Ganiny A. Drugs with new lease of life as quorum sensing inhibitors: for combating mdr acinetobacter baumannii infections. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2020;39(9): 1687-1702.

Reddy G., Nancharaiah YV. Alkylimidazolium Ionic Liquids as Antifungal Alternatives: Antibiofilm Activity Against *Candida albicans* and Underlying Mechanism of Action. *Front Microbiol*. 2020;11: 730.

Brilhante RSN, Pereira VS, Oliveira JS *et al.* Terpinen-4-ol inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents. *Future Microbiol*. 2019;14: 1221–33.

Niklander S *et al.* Risk factors, hyposalivation and impact of xerostomia on oral health-related quality of life. *Brazilian Oral Research*. 2017; 31(14): 1-9.

Coelho CH, Doritchamou JYA, Zaidi I *et al.* Advances in malaria vaccine development: report from the 2017 malaria vaccine symposium. *npj Vaccines*. 2017;34(2).

Basso LG, Rodrigues RZ, Naal RM, Costa-Filho AJ. Effects of the antimalarial drug primaquine on the dynamic structure of lipid model membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1808(1):55-64.

Nugraha A, Savitri E, Diah, Harijanti K, Parmadiati, AE. Psychological stress induced xerostomia and hyposalivation: The case study in Indonesian female patient. *Journal of International Dental and Medical Research*. 2019;12: 216-219.

Wolfarth-Couto B, Silva RA, Filizola N. Variabilidade dos casos de malária e sua relação com a precipitação e nível d'água dos rios no Estado do Amazonas, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2019;35(10):1-15.

Rossato L, Camargo SM, Vitale RG, Hoog S, Ishida K. Alternative treatment of fungal infections: Synergy with non-antifungal agents. *Mycoses*. 2021;64(3):232-244.

Sampaio FC. *et al.* Dental caries prevalence, prospects, and challenges for Latin America and Caribbean countries: a summary and final recommendations from a Regional Consensus. *Braz. Oral Res*. 2021;35:56.

Lalève A *et al.* The antimalarial drug primaquine targets Fe–S cluster proteins and yeast respiratory growth. *Redox Biology*. 2016;7:21-29.

Thomé R *et al.* Chloroquine: Modes of action of an undervalued drug. *Immunology*. 2013; 153(1):50-57.

Weber, S.M *et al.* Chloroquine and the fungal phagosome. *Curr Opin Microbiol.*, v. 03, n. 00, p. 349-353, 2000.