

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 11/03/2021.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Thaís Soares Bezerra Santos Nunes

Efeito da N-acetilcisteína em biofilme de *Candida albicans*

Araraquara

2019



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Thaís Soares Bezerra Santos Nunes

Efeito da N-acetilcisteína em biofilme de *Candida albicans*

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral, na área de Prótese Dentária.

Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

Araraquara

2019

Nunes, Thaís Soares Bezerra Santos

Efeito da N-acetilcisteína em biofilme de *Candida albicans* / Thaís Soares Bezerra Santos Nunes. --

Araraquara: [s.n.], 2019

116 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) –
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

1. Acetilcisteína 2. Biofilmes 3. Matriz extracelular
4. *Candida albicans* 5. Farmacorresistência fúngica I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Jorge, CRB-8/5036
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Thaís Soares Bezerra Santos Nunes

Efeito da N-acetilcisteína em biofilme de *Candida albicans*

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do título de mestre em Reabilitação Oral

Presidente e orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

2º Examinador: Profa. Dra. Lívia Nordi Dovigo

3º Examinador: Prof. Dr. Valentim Adelino Ricardo Barão

Araraquara, 11 de março de 2019

DADOS CURRICULARES

Thaís Soares Bezerra Santos Nunes

NASCIMENTO: 07/08/1991 Maceió, Alagoas

FILIAÇÃO: José Helder Pessoa Nunes
Betania Soares Bezerra Santos Nunes

2010-2014 Graduação pela Universidade Federal de Alagoas- UFAL

2013-2014 Bolsista CNPq pelo projeto de iniciação científica na disciplina de Dentística restauradora da Universidade Federal de Alagoas- UFAL.
Monitoria em Prótese Fixa pela Universidade Federal de Alagoas- UFAL.

2015-2016 Experiência profissional em clínicas odontológicas

2016-2017 Especialização em Prótese dentária pela Universidade de São Paulo- USP Bauru

2017-2017 Estágio docência na disciplina de Prótese Parcial Removível II na Faculdade de Odontologia de Araraquara- FOAR.

2018-2018 Estágio docência na disciplina de Prótese Parcial Removível I na Faculdade de Odontologia de Araraquara- FOAR.

Dedico este trabalho

À Deus, por ser tão presente em minha vida, por guiar meus atos e me proteger. E por me ensinar que o mais importante em uma grande conquista não é o fim, mas sim as pessoas com quem você compartilhou o caminho.

Aos meus pais, Betania e Helder, pelo amor incondicional. Obrigada por acreditarem no meu potencial e dividirem esse sonho comigo. Vocês são meus maiores exemplos de caráter, honestidade, simplicidade e persistência. Poder contar com vocês nos momentos mais difíceis me fez uma pessoa mais forte e segura. À vocês dedico mais essa conquista.

À minha irmã, Tainá, por ter sido a primeira a apoiar a minha decisão de estudar fora do meu estado. Por ser um exemplo de disciplina e força de vontade. Obrigada por ser essa irmã tão maravilhosa em minha vida.

Ao meu amor, Pedro, por viver comigo esse sonho e me apoiar em todas as decisões. Por entender minha ausência e sempre me dar forças para continuar. Obrigada por ser o melhor namorado e amigo do mundo, e nunca polpar esforços para me ver feliz, eu te amo!

À voinha, Odete, por ser meu anjo aqui na terra. Meu maior exemplo de ser iluminado, de fé, espiritualidade, caridade, simplicidade e amor por onde passa!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” por me acolher tão bem, e pela oportunidade de concluir meu tão sonhado curso de mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima, pela dedicação, paciência e por compartilhar comigo seus conhecimentos. Obrigada por confiar no meu trabalho, e na minha capacidade de pesquisadora, essa experiência foi fundamental para meu amadurecimento profissional e pessoal. Sou imensamente grata por todo o apoio cedido no decorrer da pesquisa.

À minha amiga Marcela Dantas, irmã que Araraquara me presenteou. Está comigo desde a busca do apartamento perfeito, primeiro supermercado, até os últimos momentos do mestrado. Compartilhar com você todas as angústias, dúvidas e ansiedade do desconhecido foi algo muito mais leve e saudável. Obrigada por tornar minha rotina e nosso convívio tão agradável e especial.

Ao meu amigo Diego Dantas, por ser um amigo fiel. Compartilhando comigo bons momentos e sempre disposto a ajudar nas horas difíceis. Sempre carinhoso e atencioso. Chegou de mansinho, mas logo pude perceber o quão especial é a sua amizade.

À minha amiga Déborah Laurindo, por ter sido minha anfitriã em Araraquara e me receber tão bem em seu lar. Obrigada por todo o carinho, e por todos os momentos de descontração.

Às minhas amigas da UFAL, Amanda Palmeira e Izadora Quintela. Obrigada por serem verdadeiras amigas-irmãs, por entenderem minha ausência e sempre me incentivar na busca dos meus sonhos e objetivos.

Ao meu grupo de pesquisa, Jefferson Trigo, Vinícius Sakima e Yuliana Vega. Meu muito obrigada pela confiança, pela ajuda, dúvidas sanadas nos momentos difíceis e por cada “Oi thaís, tudo bem? Está dando certo sua pesquisa?”. Vocês foram fundamentais nessa caminhada. **À Letícia, Gabriela, Carol e Ana Cláudia**, obrigada por todo apoio e ajuda nessa caminhada.

Ao “Cursinho da Bruna”, Bruna Pimentel e Luana Dias. Vocês tornaram momentos cansativos e confusos em momentos de risos, amadurecimento e companheirismo. As considero muito, e tenho um carinho enorme pelas duas.

Aos meus amigos de turma. Mônica Tinajero, Camila Jabor, Bruna Valerrini, Carlos Moura, Laís Cardoso, Fernanda Mercante e Mariana Citta, por todo o aprendizado e companheirismo nas aulas e clínicas.

Aos amigos do laboratório de microbiologia. Sabrina Ribeiro e Erick Dante pelo companheirismo e auxílio nas atividades; **Cláudia Jordão, Camila Tasso, Lucas Portela, Elkin Florez, María Isabel, Geisi Bueno, Bruna Novelli, Carmélia Lobo, Jaqueline Colin**, por tornarem meus dias mais leves, divertidos e por toda a contribuição ao longo desses dois anos; **Midian Castillo**, especialmente na etapa final da pesquisa, que com muita paciência compartilhou seus conhecimentos com muita dedicação.

À Paula Barbugli, por toda a atenção e dedicação na etapa final da pesquisa. Por contribuir para interpretação dos meus dados com resultados mais fidedignos.

À professora Marlise Klein e ao professor Carlos Alberto, por toda assistência, zelo e sugestões que contribuíram para o benefício deste trabalho ao longo da minha pré-qualificação e qualificação.

Aos professores da banca, por aceitarem o convite e dedicarem sua atenção e conhecimentos para o crescimento deste trabalho.

Aos professores do departamento de Prótese Dentária, obrigada pela dedicação diária em transitar seus conhecimentos e paciência ao ensinar.

À CAPES, pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)- Código de financiamento 001.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2018/02513-9) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente no meu curso de mestrado, os meus sinceros agradecimentos e toda a minha gratidão!

“Que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois...

A vida é construída nos sonhos e concretizada no amor”

Chico Xavier*

*Chico Xavier. Oração: Que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente.

Nunes TSBS. Efeito da N-acetilcisteína em biofilme de *Candida albicans* [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

RESUMO

Candida albicans (Ca) é o principal fungo patógeno humano, responsável por infecções como a candidose orofaríngea e a candidemia. Essas infecções estão fortemente associadas com a formação de biofilmes. O uso abusivo de antifúngicos tem levado ao desenvolvimento de resistência fúngica. As terapias direcionadas aos biofilmes, principalmente contra a matriz extracelular (MEC), são relevantes para o desenvolvimento de novos tratamentos mais eficazes. Um dos agentes que tem demonstrado ação antibiofilme é a N-acetilcisteína (NAC). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação da NAC em biofilmes in vitro de *C. albicans* susceptível (CaS) e resistente ao fluconazol (CaR). Culturas planctônicas de CaS e CaR foram cultivadas e submetidas ao teste de susceptibilidade à NAC. Foram determinadas também a curva de inativação de ambas as cepas sob ação da NAC, seu efeito na formação do biofilme e no biofilme maduro. Por fim, foi avaliada a ação NAC na composição da MEC do biofilme, por meio da quantificação de peso seco total e do precipitado, polissacarídeos solúveis em água (WSP) e álcali (ASP), proteínas do sobrenadante e do precipitado e DNA extracelular (eDNA). Os dados obtidos foram analisados descritivamente e pelos testes ANOVA/Welch e Tukey/Gomes-Howell ou Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$). A concentração inibitória mínima da NAC com redução de 90% (CIM₉₀) foi de 25 mg/mL para ambas as cepas. Apesar de não ter sido encontrado nenhum valor de concentração fungicida mínima (CFM), a NAC reduziu ($p \leq 0,001$) a viabilidade fúngica em 1,81 a 4,06 log₁₀ em ambas as cepas avaliadas. Na curva de inativação, apenas as concentrações \geq CIM reduziram o crescimento fúngico durante 24 h, essa ação fungistática foi mais evidente entre 8-10h. Concentrações $<$ CIM aumentaram o crescimento fúngico. Em biofilmes em formação, concentrações $>$ CIM (100 e 50 mg/mL) inibiram a viabilidade (redução de 1,41 a 2,77 log₁₀) e a biomassa (redução de 39 a 88%), e para CaS a NAC 25 e 12,5 mg/mL também reduziu biomassa em 77 e 34%, respectivamente. Esse efeito inibitório também foi observado em diferentes fases da formação do biofilme (24, 12 e 6 h). Já em biofilmes maduros, apenas a NAC 100 mg/mL reduziu a viabilidade (1,12 a 2,30 log₁₀) em ambas as cepas, e em CaR 50 e 25 mg/mL de NAC reduziram 1,26 e 0,64 log₁₀, respectivamente. Na biomassa, a NAC 100 mg/mL reduziu 69-72% para ambas as cepas, e em CaR a NAC 50 e 25 mg/mL também reduziu em 64 e 48%, respectivamente. NAC 12,5 mg/mL também aumentou ($p < 0,001$) a viabilidade de CaS do biofilme maduro e em formação. Na análise dos componentes da matriz dos biofilmes, foi observada uma tendência da NAC 100 mg/mL (biofilmes maduros) e 50 mg/mL (biofilmes em formação) em diminuir o peso seco do precipitado, proteínas do sobrenadante, WSP, ASP e eDNA. Assim, a NAC apresentou efeito fungistático contra as CaS e CaR, com um efeito concentração-dependente. O efeito antibiofilme da NAC foi decorrente de sua ação fungistática, uma vez que somente as concentrações que inibiram a viabilidade fúngica reduziram a biomassa. Houve uma tendência da NAC em diminuir os componentes solúveis da matriz. Este foi um estudo experimental in vitro inicial, que visa futuramente a aplicabilidade clínica da NAC como um coadjuvante no controle de biofilme de Ca sobre a superfície de próteses dentárias.

Palavras – chave: Acetilcisteína. Biofilmes. Matriz extracelular. *Candida albicans*. Farmacorresistência fúngica.

Nunes TSBS. Effect of N-acetylcysteine on *Candida albicans* biofilm [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

ABSTRACT

Candida albicans is the main fungal pathogen in humans, responsible for local and systemic infections, such as oropharyngeal candidiasis and candidemia. These fungal infections are associated with biofilm formation. The abusive use of antifungals has led to the development of fungal resistance. The therapies towards the biofilms, mainly against the matrix, are relevant for the development of more effective new treatments. One of the agents that have demonstrated antibiofilm action is N-acetylcysteine (NAC). Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect in vitro of NAC on biofilms of *C. albicans* susceptible (CaS) and resistant to fluconazole (CaR). CaS and CaR were submitted to the susceptibility test to NAC. The time-kill curves of NAC and its effect on biofilm formation and mature biofilms were also determined for both strains. Finally, the effect of NAC on the composition of the biofilms matrix was evaluated [total and pellets's dry weight, water (WSP) and alkali soluble polysaccharides (ASP), supernatant and pellet's proteins, and extracellular DNA (eDNA)]. The data were descriptively analyzed and submitted to the ANOVA/Welch and Tukey/Gomes-Howell or Kruskal-Wallis tests ($\alpha= 0.05$). The minimum inhibitory concentration of NAC with 90% of reduction (MIC_{90}) was 25 mg/mL. Although no minimum fungicidal concentration (MFC) value was found, NAC reduced ($p\leq 0,001$) the fungal viability by 1.81 to 4.06 \log_{10} for both strains. In the time-kill curves, only concentrations $\geq MIC$ reduced the fungal growth for 24 h, this fungistatic action was most evident between 8-10 h. Concentrations $< MIC$ increased the fungal growth. For biofilm formation, concentrations $> MIC$ (100 and 50 mg/mL) inhibited the viability (reduction of 1.41 to 2.77 \log_{10}) and the biomass (reduction of 39 to 88%) for both strains, and for CaS NAC at 25 and 12.5 mg/mL reduced the biomass in 77 and 34%, respectively. This inhibitory effect of NAC was also observed in different stages of biofilm formation (24, 12, and 6h). For mature biofilms, only NAC at 100 mg/mL reduced the viability (1.12 to 2.30 \log_{10}) of both strains, and for CaR 50 and 25 mg/mL of NAC reduced 1.26 and 0.64 \log_{10} , respectively. NAC 100 mg/mL reduced the biomass in 69-72% for both strains, and for CaR NAC at 50 and 25 mg/mL also reduced the biomass in 64 and 48%, respectively. NAC 12.5 mg/mL also increased ($p< 0.001$) the CaS viability during biofilm formation and for mature biofilm. For the components of biofilms matrix, NAC at 100 mg/mL (mature biofilms) and 50 mg/mL (biofilm formation) seems to show a tendency in decreasing the pellet's dry weight, supernatant's proteins, WSP, ASP, and eDNA. Therefore, NAC showed a fungistatic effect against CaS and CaR, with a concentration-dependent effect. The antibiofilm effect was due to its fungistatic action, since only concentrations that inhibited fungal viability reduced the biofilms biomass. NAC seems to reduce the soluble components of the biofilms matrix. This is an initial in vitro study, which will drive the future clinical application of NAC as a coadjuvant in the control of Ca biofilm on the surface of dental prostheses.

Keywords: Acetylcysteine. Biofilms. Extracellular matrix. *Candida albicans*. Fungal drug resistance.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 PROPOSIÇÃO | 18 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 19 |
| 3.1 <i>Candida albicans</i>..... | 19 |
| 3.2 Biofilme..... | 21 |
| 3.3 Matriz do Biofilme e sua Composição..... | 25 |
| 3.4 Agentes Antifúngicos Convencionais..... | 31 |
| 3.5 N-acetilcisteína (NAC)..... | 33 |
| 4 MATERIAL E MÉTODO | 42 |
| 4.1 Material | 42 |
| 4.1.1 Material de consumo..... | 42 |
| 4.1.2 Instrumentais..... | 43 |
| 4.1.3 Equipamentos..... | 44 |
| 4.2 Métodos | 44 |
| 4.2.1 Micro-organismos e condições de cultivo..... | 44 |
| 4.2.2 Avaliação antifúngica da NAC..... | 45 |
| 4.2.3 Curvas de inativação..... | 46 |
| 4.2.4 Efeito da NAC na formação do biofilme..... | 46 |
| 4.2.5 Avaliação do tempo de ação no biofilme..... | 47 |
| 4.2.6 Efeito da NAC em biofilme maduro..... | 48 |
| 4.2.7 Efeito da NAC na composição da matriz do biofilme..... | 49 |
| 4.2.7.1 <i>Unidade formadora de colônia (UFC/mL)</i>..... | 51 |
| 4.2.7.2 <i>Análise do peso seco total</i>..... | 51 |
| 4.2.7.3 <i>Análise do peso seco do pellet</i>..... | 51 |
| 4.2.7.4 <i>Análise de proteínas do sobrenadante</i>..... | 51 |
| 4.2.7.5 <i>Análise de proteínas do pellet</i> | 53 |
| 4.2.7.6 <i>Análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP)</i>..... | 54 |
| 4.2.7.7 <i>Análise de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP)</i>..... | 56 |
| 4.2.7.8 <i>Análise de eDNA</i>..... | 59 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.7.9 Normalização das amostras para quantificação dos componentes da matriz..... | 59 |
| 4.3 Análise Estatística | 59 |
| | |
| 5 RESULTADOS | 61 |
| 5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) | 61 |
| 5.2 Concentração Fungicida Mínima (CFM)..... | 62 |
| 5.3 Curvas de Inativação..... | 63 |
| 5.4 Efeito da NAC na Formação do Biofilme de 48 h | 65 |
| 5.5 Menor tempo de Ação da NAC sobre Biofilme em Formação .. | 66 |
| 5.6 Efeito da NAC sobre Biofilme Maduro..... | 71 |
| 5.7 Efeito da NAC na Composição da Matriz do biofilme | 73 |
| 5.7.1 Unidade formadora de colônia (UFC/mL)..... | 74 |
| 5.7.2 Análise do peso seco total | 74 |
| 5.7.3 Análise do peso seco do <i>pellet</i> | 75 |
| 5.7.4 Análise das proteínas do sobrenadante..... | 76 |
| 5.7.5 Análise das proteínas do <i>pellet</i> | 76 |
| 5.7.6 Análise dos polissacarídeos solúveis em água (WSP) | 77 |
| 5.7.7 Análise dos polissacarídeos solúveis em álcali (ASP) | 78 |
| 5.7.8 Análise de eDNA..... | 78 |
| | |
| 6 DISCUSSÃO | 80 |
| | |
| 7 CONCLUSÃO | 86 |
| | |
| REFERÊNCIAS | 87 |
| | |
| APÊNDICE A | 96 |
| APÊNDICE B | 105 |
| APÊNDICE C | 111 |

1 INTRODUÇÃO

Biofilme é o nome dado a uma comunidade complexa de micro-organismos incorporados em uma matriz extracelular (MEC), aderida a uma superfície inerte ou viva¹⁻³. A formação do biofilme é dividida em algumas fases e organizada de forma cíclica e contínua³. A estrutura de um biofilme maduro proporciona vantagens para os micro-organismos em comparação com sua forma planctônica, pois a organização em comunidade facilita a captação de nutrientes, maior proteção contra desidratação e resistência a antimicrobianos⁴. Os biofilmes são responsáveis por boa parte das infecções humanas e têm ligação com a exacerbação ou amenização dos sintomas, tornando as infecções persistentes difíceis de serem eliminadas por antimicrobianos e pelo sistema imunológico¹.

A candidíase é a infecção fúngica que mais acomete os seres humanos, sendo causada por fungos do gênero *Candida*, principalmente pela espécie *Candida albicans*, que é a mais prevalente¹. *C. albicans* vive como um micro-organismo comensal nas mucosas oral e genital, trato digestivo e pele na maioria dos indivíduos saudáveis. Entretanto, sob certas condições, pode ocorrer a transição de fungo comensal para patógeno oportunista, podendo invadir tecidos e provocar infecções⁵. A capacidade de *C. albicans* mudar sua morfologia de levedura (comensal) para forma filamentosa de hifas ou pseudohifas (invasiva, infecciosa) é conhecida como polimorfismo⁶. Outro importante fator de virulência desse fungo é a sua flexibilidade de adaptação e capacidade de adesão em sítios variados, principalmente a formação de biofilme⁷. Infecções microbianas de uma forma geral, o que inclui a candidíase bucal, estão fortemente associadas a biofilmes⁸.

Dentre os fatores de risco para o desencadeamento da candidíase orofaríngea está o uso de próteses dentárias (conhecida como estomatite protética), antibióticos por tempo prolongado, terapias imunossupressoras, diabetes, má nutrição e a debilidade decorrente do tratamento do câncer (químico e radioterapia)^{9,10}. Devido à forte ligação da infecção fúngica com o estado imunológico do paciente, a candidíase já foi considerada um indicador do desenvolvimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) antes do surgimento dos antirretrovirais¹¹. Em determinados casos, a infecção bucal pode se prolongar para o trato gastrointestinal inferior ou para a corrente sanguínea, gerando um quadro de fungemia⁸. Mais de 90% dos casos de fungemia são provocados pelo

gênero *Candida* (candidemia), e essa infecção sistêmica em pacientes imunossuprimidos pode evoluir para o óbito em 40% a quase 80% dos casos^{8,12,13}. Nas últimas décadas houve um crescimento considerável dos casos de infecções nosocomiais geradas por fungos, aumentando conseqüentemente o índice de mortalidade; até 60% dos óbitos provenientes dessas infecções hospitalares são causadas por fungos¹⁴. *Candida* spp. vêm se destacando nesse contexto, pois corresponde a até 80% das infecções fúngicas de origem hospitalar e corresponde a quarta causa de infecção da corrente sanguínea¹⁴, geralmente associadas a uso de cateter⁷. Essas infecções são sérias, pois células organizadas em biofilme são resistentes a antifúngicos, sendo necessárias novas terapias para eliminar o biofilme⁷.

Um importante componente do biofilme é a MEC, que é responsável pela arquitetura tridimensional do biofilme e propriedades mecânicas, como força adesiva, coesão e rigidez, além de permitir agregação ou agregados de células organizadas (microcolônias)¹⁵. Esse ambiente modula a expressão gênica, o metabolismo e a sinalização celular por moléculas que influenciam o comportamento microbiano (*quorum sensing*)¹⁵. De maneira geral, a MEC do biofilme é composto por carboidratos (β -glucanos e mananas), proteínas, lipídios e DNA extracelular (eDNA)¹⁶. Entretanto, apesar desta vasta variedade na sua composição, a função de cada componente presente na MEC de *C. albicans* ainda não é conhecida¹⁶. Uma vez que a MEC protege as células dentro do biofilme e atua como uma barreira física aos agentes externos, como antimicrobianos¹⁷, novas terapias direcionadas para a desestruturação da MEC podem ser potencialmente promissoras.

Tradicionalmente a candidíase é tratada por medicamentos tópicos ou sistêmicos¹⁸. A terapia medicamentosa tópica muitas vezes têm resultados efetivos, porém sua concentração na cavidade bucal torna-se reduzida a valores subterapêuticos devido aos efeitos diluentes da saliva e à ação de limpeza da musculatura bucal, necessitando de múltiplas doses do medicamento e cooperação do paciente¹⁹. A terapia medicamentosa sistêmica, por sua vez, pode promover efeitos colaterais hepatotóxicos e/ou nefrotóxicos, o que exige muita cautela durante sua prescrição¹⁹, além do risco de desenvolver cepas resistentes devido ao uso indiscriminado dos agentes antifúngicos²⁰. Clinicamente, a resistência aos antifúngicos provoca a falha de determinada terapia antifúngica, resultando na persistência ou até progressão da infecção²¹. Em termos laboratoriais, a resistência

antifúngica é mensurada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou seja, a concentração mínima do fármaco necessária para inibir o crescimento do micro-organismo²². A partir da CIM, por meio de protocolos padrões, se estabelece uma série de concentrações do agente antimicrobiano ao longo de um período de tempo definido. Atualmente, a resistência microbiana é uma ameaça mundial e uma das maiores preocupações da área da saúde²³.

Devido às limitações apresentadas atualmente pelos tratamentos disponíveis para infecções microbianas, outros métodos antimicrobianos estão sendo pesquisados. Uma alternativa terapêutica é a N-acetilcisteína (NAC), um derivado do aminoácido L-cisteína^{24,25}. A NAC é um agente mucolítico com ampla margem de segurança e bastante difundido na prática médica²⁶⁻³¹, comercialmente conhecido como Fuimucil/Flumucil, Bromuc, etc. Sua fração ativa, sítio tiol (-sh), desempenha um papel na eliminação de radicais livres e destruição das ligações de dissulfeto intermolecular ou intramolecular em proteínas, o que reduz a viscosidade das secreções^{32,33}. A NAC é um potente antioxidante, atuando contra radicais livres oxidantes nas células do tecido pulmonar²⁵, sendo administrado na medicina por vias inalatória, intravenosa¹ e principalmente oral e intramuscular³⁴.

A NAC tem múltiplas aplicações terapêuticas, sendo mais frequentemente usada para reduzir a viscosidade do muco em bronquite crônica^{25,26,28-30,35}, em pacientes com comprometimento pulmonar, incluindo pacientes pediátricos com fibrose cística³⁰, e como desintoxicante para overdose de paracetamol^{24,29,31,36,37}. Já existem evidências de que a NAC, isolada ou em associação com antibiótico, pode diminuir o risco da intensificação de bronquite crônica, doença pulmonar obstrutiva e rinosinusite³⁴. Os bons resultados da NAC na medicina pulmonar têm despertado certo interesse em estudar seu efeito em outras doenças mediadas por biofilme²⁷. Por exemplo, na agricultura, já foi demonstrada a capacidade da NAC em controlar bactérias que atacam citrus, oliveiras, tomates e hortaliças³⁸. A bactéria *Xylella fastidiosa* forma um biofilme no xilema das plantas, que compromete o fluxo de água e sais minerais. Sob forma de pulverizador, a NAC, além de regredir a doença, possibilitou aumento na produtividade, e os frutos apresentaram maior diâmetro³⁸. Essas investigações de novas indicações de medicamentos que originalmente são designados para outra proposta são conhecidas como “reaproveitamento de medicamento” (*drug repurposing*), cujas vantagens incluem menor tempo e menor

custo de investigação, como aqueles despendidos para a avaliação clínica de segurança do medicamento³⁹.

A NAC é um composto não antibiótico que tem sido investigada com relação a suas propriedades antimicrobianas^{27,29,30}. Foi demonstrado que a NAC diminuiu a produção de polissacarídeos extracelulares, rompeu biofilmes maduros e reduziu a adesão das bactérias a superfícies^{27,31}. Na área odontológica, a NAC tem se mostrado eficiente na redução da formação dos biofilmes em uma variedade de patógenos endodônticos clinicamente importantes^{27,29}. Pesquisas recentes exploraram a capacidade da NAC em aumentar os efeitos dos antibióticos convencionais⁴⁰, seu uso na inibição da adesão de bactérias às células epiteliais e superfície de dispositivos médicos^{31,36}, e sua ação na formação de biofilme de uma gama de bactérias importantes na área da saúde, tais como: *Pseudomonas aeruginosa*^{30,41}, *Escherichia coli*⁴², *Staphylococcus epidermidis*⁴³, *Staphylococcus aureus*³¹ e *Streptococcus pneumoniae*⁴⁰.

Pesquisas in vitro sugerem que a NAC tem uma atividade antibiofilme promissora, com atividade antimicrobiana contra diferentes micro-organismos^{27,31,40-43}. Porém, ainda são desconhecidos os mecanismos dessa atividade antimicrobiana e antibiofilme da NAC, necessitando de mais pesquisas para entender melhor o potencial dessa substância nas infecções relacionadas a biofilmes. Existem algumas hipóteses para explicar o mecanismo da atividade antimicrobiana da NAC: 1. inibição competitiva da utilização de cisteína; 2. reação do grupo sulfidril da NAC com proteínas bacterianas; e 3. desorganização do equilíbrio *redox* intracelular com potenciais efeitos indiretos no metabolismo celular e vias de transdução de sinal intracelular^{41,44}. Já a atividade da NAC na dispersão do biofilme pré-formado pode ser devido à perturbação da fisiologia microbiana, ou devido a um efeito direto da NAC na arquitetura da MEC do biofilme (por quelação de cálcio e magnésio ou interação com componentes cruciais na MEC)^{41,44}.

Alguns estudos avaliaram a ação da NAC sobre *C. albicans*⁴⁵⁻⁴⁷, porém em apenas um deles foi utilizado cepas padrões⁴⁶, os outros trabalharam com isolados clínicos. Sabe-se que cepas de isolados clínicos apresentam diferenças fenotípicas que podem afetar seu comportamento, como virulência e capacidade de formação de biofilme, e por isso é importante avaliar cepas padrões. Adicionalmente, a ação da NAC contra cepas resistentes a antifúngicos ainda não foi avaliada, e, caso efetiva, pode indicar a NAC como uma alternativa aos antifúngicos convencionais.

Também não foram encontrados estudos sobre o efeito da NAC na composição da matriz do biofilme fúngico. Assim, a hipótese do presente estudo *in vitro* é que a NAC pode apresentar efeito antifúngico e/ou antibiofilme contra cepas padrões de *C. albicans* susceptível (CaS) e resistente (CaR) ao fluconazol.

Este estudo visa a possibilidade da aplicação clínica da NAC como uma solução auxiliar no controle do biofilme de Ca sobre a superfície de próteses dentárias e outros dispositivos médicos que apresentam formação de biofilme de Ca, podendo atuar na prevenção e/ou tratamento da candidíase associada ao uso de prótese (estomatite protética).

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, a presente investigação concluiu que:

- 1- A NAC apresentou apenas efeito fungistático, mas não fungicida, contra CaS e CaR. Foi observado um efeito concentração-dependente, sendo que a concentração subCIM de 12,5 mg/mL apresentou um efeito oposto às concentrações acima e igual à CIM;
- 2- A NAC só apresentou efeito antibiofilme para CaS nos biofilmes em formação de 48h. Nos outros biofilmes, esse efeito foi decorrente de sua ação fungistática, uma vez que somente as concentrações que inibiram a viabilidade fúngica reduziram a biomassa tanto de biofilmes maduro como de biofilmes em formação em tempos reduzidos para ambas as cepas.
- 3- Nos componentes da matriz dos biofilmes, apesar de não ter sido possível realizar uma análise inferencial, observou-se uma tendência de redução dos componentes da matriz (WSP, ASP, proteínas e eDNA) dos biofilmes tratados com a NAC para ambas as cepas, com efeito mais evidente sobre os componentes solúveis da matriz.

REFERÊNCIAS*

1. Rautemaa R, Ramage G. Oral candidosis: clinical challenges of a biofilm disease. *Crit Rev Microbiol*. 2011; 37(4): 328-36.
2. Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol*. 2011; 49(2): 171-7.
3. Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9(2): 109-18.
4. Chandra J, Mukherjee PK. *Candida* biofilms: development, architecture, and resistance. *Microbiol Spectr*. 2015; 3(4): 1-24.
5. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013; 62(1):10-24.
6. Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9(10): 737-48.
7. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol*. 2006; 55(8): 999-1008.
8. Costa SF, Marinho I, Araújo EA, Manrique AE, Medeiros EA, Levin AS. Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. *J Hosp Infect*. 2000; 45(1): 69-72.
9. Samaranayake LP. Nutritional factors and oral candidosis. *J Oral Pathol*. 1986; 15(2): 61-5.
10. Telles DR, Karki N, Marshall MW. Oral fungal infections: diagnosis and management. *Dent Clin North Am*. 2017; 61(2): 319-49.
11. Patuwo C, Young K, Lin M, Pardi V, Murata RM. The changing role of HIV-associated oral candidiasis in the era of HAART. *J Calif Dent Assoc*. 2015; 43(2): 87-92.
12. Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: a narrative review. *Eur J Intern Med*. 2016; 34: 21-8.
13. Pfaller MA, Castanheira M. Nosocomial candidiasis: antifungal stewardship and the importance of rapid diagnosis. *Med Mycol*. 2016; 54(1): 1-22.
14. Hota B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin Infect Dis*. 2004; 39(8): 1182-9.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

15. Koo H, Yamada KM. Dynamic cell–matrix interactions modulate microbial biofilm and tissue 3D microenvironments. *Curr Opin Cell Biol.* 2016; 42: 102-12.
16. Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt J, et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio.* 2014; 5(4): 1-13.
17. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(9): 623-33.
18. Vergani CE, Sanitá PV, Mima EG, Pavarina AC, Machado AL. Oral candidiasis: conventional and alternative treatment options. In: Contreras F, Fluentes P. *Candidiasis: epidemiology, symptoms and treatment options.* Hauppaug: Nova Science Publishers; 2013. p. 85-116.
19. Appleton, SS. *Candidiasis: pathogenesis, clinical characteristics, and treatment.* Calif Dent Assoc. J. 2000; 28(12): 942-8.
20. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011; 75(2): 213-67.
21. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11(2): 382–402.
22. Rex JH, Alexander BD, Andes D, Arthington-Skaggs B, Brown SD, Chaturvedi V, et al, editors. M27-A3: reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved Standard. 3rd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
23. Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavalieri M, Coenen S, et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect.* 2015; 6: 22–9.
24. Millea PJ. N-acetylcysteine: multiple clinical applications. *Am Fam Physician.* 2009; 80(3): 265–9.
25. Stey C, Steurer J, Bachmann S, Medici TC, Tramèr MR. The effect of oral N-acetylcysteine in chronic bronchitis: a quantitative systematic review. *Eur Respir J.* 2000; 16(2): 253-62.
26. Henke MO, Ratjen F. Mucolytics in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev.* 2007; 8(1): 24–9.
27. Quah SY, Wu S, Lui JN, Sum CP, Tan KS. N-acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2012; 38(1): 81-5.
28. Rasmussen K, Nikrad J, Reilly C, Li Y, Jones RS. N-Acetyl-l-cysteine effects on multi-species oral biofilm formation and bacterial ecology. *Lett Appl Microbiol.* 2016; 62(1): 30-8.

29. Moon JH, Choi YS, Lee HW, Heo JS, Chang SW, Lee JY. Antibacterial effects of N-acetylcysteine against endodontic pathogens. *J Microbiol.* 2016; 54(4): 322-9.
30. Onger ME, Gocer H, Emir D, Kaplan S. N-acetylcysteine eradicates *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in bone cement. *Scanning.* 2016; 38(6): 766-70.
31. Eroshenko D, Polyudova T, Korobov V. N-acetylcysteine inhibits growth, adhesion and biofilm formation of Gram-positive skin pathogens. *Microb Pathog.* 2017; 105: 145-52.
32. Sevier CS, Kaiser CA. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(11): 836-47.
33. Buijtels PC, Petit PL. Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J Microbiol Methods.* 2005; 62(1): 83-8.
34. Blasi F, Page C, Rossolini GM, Pallecchi L, Matera MG, Rogliani P, et al. The effect of N-acetylcysteine on biofilms: Implications for the treatment of respiratory tract infections. *Respir Med.* 2016; 117: 190-7.
35. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [homepage na internet]. Molécula usada como mucolítico pode combater doenças bacterianas em culturas agrícolas [acesso em 11 out 2018]. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/molecula-usada-como-mucolitico-pode-combater-doencas-bacterianas-em-culturas-agricolas/28918/>
36. Aiassa V, Zoppi A, Becerra MC, Albesa I, Longhi MR. Enhanced inhibition of bacterial biofilm formation and reduced leukocyte toxicity by chloramphenicol:β-cyclodextrin:N-acetylcysteine complex. *Carbohydr Polym.* 2016; 152: 672-8.
37. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine-a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol.* 2007; 7: 355–9.
38. Muranaka LS, Giorgiano TE, Takita MA, Forim MR, Silva LF, Coletta-Filho HD, et al. N-acetylcysteine in agriculture, a novel use for an old molecule: focus on controlling the plant-pathogen *Xylella fastidiosa*. *PLoS One.* 2013; 8(8): 1-14.
39. Corsello SM, Bittker JA, Liu Z, Gould J, McCarren P, Hirschman JE, et al. The drug repurposing hub: a next-generation drug library and information resource. *Nat Med.* 2017; 23(4): 405-8.
40. del Prado G, Ruiz V, Naves P, Rodríguez-Cerrato V, Soriano F, del Carmen Ponte M. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* strains and effects of human serum albumin, ibuprofen, N-acetyl-L-cysteine, amoxicillin, erythromycin, and levofloxacin. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010; 67(4): 311-8.
41. Zhao T, Liu Y. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 140.

42. Marchese A, Bozzolasco M, Gualco L, Debbia EA, Schito GC, Schito AM. Effect of fosfomycin alone and in combination with N-acetylcysteine on *E. coli* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2003; 22(2): 95-100.
43. Perez-Giraldo C, Rodriguez-Benito A, Moran F, Hurtado C, Blanco MT, Gomez-Garcia AC. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother*. 1997; 39(5): 643–6.
44. Olofsson AC, Hermansson M, Elwing H. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69(8): 4814-22.
45. El-Baky RMA, El Ela DMMA, Gad GFM. N-acetylcysteine inhibits and eradicates *Candida albicans*. *Biofilms Am J Infect Dis Microbiol*. 2014; 2(5): 122-30.
46. Venkatesh M, Rong L, Raad I, Versalovic J. Novel synergistic antibiofilm combinations for salvage of infected catheters. *J Med Microbiol*. 2009; 58(7): 936-44.
47. Aslam S, Darouiche RO. Role of antibiofilm-antimicrobial agents in controlling device-related infections. *Int J Artif Organs*. 2011; 34(9): 752-8.
48. Dignani M-C, Solomkin JS, Anaissie EJ. *Candida* clinical mycology. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2009. p. 197–229.
49. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20(1): 133-63.
50. Ohshima T, Ikawa S, Kitano K, Maeda N. A proposal of remedies for oral diseases caused by *Candida*: A mini review. *Front Microbiol*. 2018; 9: 1522.
51. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2012; 36(2): 288–305.
52. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. SCOPE Participant Group. Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998; 30(2): 121-9.
53. Colombo A, Guimarães T, Camargo LF. Brazilian guidelines for the management of candidiasis: a joint meeting report of three medical societies. *Braz J Infect Dis* 2013; 17(3): 283–312.
54. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 10(2): 112–22.
55. Odds FC. *Candida* and candidosis: a review and bibliography. 2nd ed. London: Bailliere Tindal; 1988. 476 p.

56. Crampin H, Finley K, Gerami-Nejad M, Court H, Gale C, Berman J, et al. *Candida albicans* hyphae have a Spitzenkorper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae. *J Cell Sci.* 2005; 118: 2935-47.
57. Leberer E, Harcus D, Dignard D, Johnson L, Ushinsky S, Thomas DY, et al. Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 2001; 42(3): 673-87.
58. Moyes DL, Richardson JP, Naglik JR. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence.* 2015; 6: 338–46.
59. Paramonova E, Krom BP, Van der Mei HC, Busscher HJ, Sharma PK. Hyphal content determines the compression strength of *Candida albicans* biofilms. *Microbiology.* 2009; 155: 1997–2003.
60. Pierce CG, Vila T, Romo JA, Montelongo-Jauregui D, Wall G, Ramasubramanian A, et al. The *Candida albicans* biofilm matrix: composition, structure and function. *J Fungi (Basel).* 2017; 3(1): 1-9.
61. Harriott MM, Noverr MC. Importance of *Candida* bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol.* 2011; 19: 557–63.
62. Han TL, Cannon RD, Villas-Bôas SG. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genet Biol.* 2011; 48(8): 747-63.
63. Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res.* 2010; 89(3): 205-18.
64. Kucharíková S, Tournu H, Lagrou K, Van Dijck P, Bujdáková H. Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. *J Med Microbiol.* 2016; 60(9): 1261-9.
65. Ramage G, VandeWalle K, Lopez-Ribot JL, Wickes BL. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; 214: 95–100.
66. Li F, Palecek SP. Distinct domains of the *Candida albicans* adhesin Eap1p mediate cell-cell and cell-substrate interactions. *Microbiology.* 2008; 154: 193–203.
67. Nobile CJ, HA Schneider, JE Nett, DC Sheppard, SG Filler, DR Andes, et al. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol.* 2008; 18: 1017–24.
68. Nobile CJ, Nett JE, Hernday AD, Homann OR, Deneault JS, Nantel A, et al. Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. *PLoS Biol.* 2009; 7(6): 1-15.

69. Uppuluri P, Pierce CG, Thomas DP, Bubeck SS, Saville SP, Lopez-Ribot JL. The transcriptional regulator Nrg1p controls *Candida albicans* biofilm formation and dispersion. *Eukaryot Cell*. 2010; 9(10): 1531-7.
70. Klotz SA, Chasin BS, Powell B, Gaur NK, Lipke PN. Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007; 59: 401–6.
71. Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol*. 2013; 28(2): 83-101.
72. Adam B, Baillie GS, Douglas LJ. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol*. 2002; 51: 344–9.
73. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun*. 2014; 82(5): 1968-81.
74. Pammi M, Liang R, Hicks JM, Barrish J, Versalovic J. Farnesol decreases biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and exhibits synergy with nafcillin and vancomycin. *Pediatr Res*. 2011; 70: 578–83.
75. Hall RA, Turner KJ, Chaloupka J, Cottier F, De Sordi L, Sanglard D, et al. The quorum-sensing molecules farnesol/homoserine lactone and dodecanol operate via distinct modes of action in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2011; 10: 1034–42.
76. Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog*. 2010; 6(4): 1-4.
77. Uppuluri P, Chaturvedi AK, Srinivasan A, Banerjee M, Ramasubramaniam AK, Köhler JR, Kadosh D, Lopez-Ribot JL. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog*. 2010; 6(3): 1-13.
78. Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. Fungal super glue: The biofilm matrix and its composition, assembly, and functions. *PLoS Pathog*. 2016; 12(9): 1-6.
79. Hynes RO, Yamada KM, Editors. *Extracellular matrix biology*. Cold Spring Harbor: Laboratory Press; 2012. 387 p.
80. Peterson BW, He Y, Ren Y, Zerdoum A, Libera MR, Sharma PK, et al. Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. *FEMS Microbiol Rev*. 2015; 39: 234-45.
81. Zarnowski R, Sanchez H, Andes DR. Large-scale production and isolation of *Candida* biofilm extracellular matrix. *Nat Protoc*. 2016; 11(12): 2320-7.
82. Mitchell KF, Zarnowski R, Sanchez H, Edward JA, Reinicke EL, Nett JE, et al. Community participation in biofilm matrix assembly and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(13): 4092-7.

83. Nett JE, Sanchez H, Cain MT, Andes DR. Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan. *J Infect Dis.* 2010; 202: 171–5.
84. Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, Cleary IA, Henriques M, Lopez-Ribot JL, et al. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia.* 2010; 169: 323–31.
85. Panariello BHD, Klein MI, Mima EGO, Pavarina AC. Fluconazole impacts the extracellular matrix of fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *J Oral Microbiol.* 2018; 10(1):1-12.
86. Scully C, El-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1994; 5(2): 125–57.
87. Anibal PC, Sardi JCO, Peixoto IT, Moraes JJC, Höfling JF. Conventional and alternative antifungal therapies to oral candidiasis. *Braz J Microbiol.* 2010; 41(4): 824-31.
88. Lee W, Lee DG. A novel mechanism of fluconazole: fungicidal activity through dose-dependent apoptotic responses in *Candida albicans*. *Microbiology.* 2018; 164(2): 194-204.
89. Ghannoum M, Roilides E, Katragkou A, Petratis V, Walsh TJ. The role of echinocandins in *Candida* biofilm-related vascular catheter infections: in vitro and in vivo model systems. *Clin Infect Dis.* 2015; 61(6): 618-21.
90. Sheppard D, Lampiris HW. *Farmacologia básica e clínica: agentes antifúngicos.* Porto Alegre: McGraw-Hill; 2008. p. 707-14.
91. Girmenia C. New generation azole antifungals in clinical investigation. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009; 18(9): 1279-95.
92. Walsh TJ, Azie N, Andes DR. Development of new strategies for echinocandins: progress in translational research. *Clin Infect Dis.* 2015; 61(6): 601-3
93. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, et al. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(2): 510-20.
94. Odds FC. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungal. *J Antimicrob. Chemother.* 1993; 31(4): 463-71.
95. Walker LA, Gow NA, Munro CA. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol.* 2010; 47(2): 117-26.
96. Baek YU, Kim YR, Yim HS, Kang SO. Disruption of gamma-glutamylcysteine synthetase results in absolute glutathione auxotrophy and apoptosis in *Candida albicans*. *FEBS Lett.* 2004; 556(3): 47-52.

97. Lappas M, Permezel M, Rice GE. N-Acetyl-cysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and nuclear factor-kappa B deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(4):1723-9.
98. Dall L, Herndon B. Quantitative assay of glycocalyx produced by viridans group streptococci that cause endocarditis. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 2039–41.
99. Quishida CC, Mima EG, Dovigo LN, Jorge JH, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using Photodithazine(®) and LED light after one and three successive applications. *Lasers Med Sci.* 2015; 30(9): 2303-12.
100. Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol.* 2014; 12(5): 405.
101. Moon JH, Jang EY, Shim KS, Lee JY. In vitro effects of N-acetyl cysteine alone and in combination with antibiotics on *Prevotella intermedia*. *J Microbiol.* 2015; 53(5): 321-9.
102. Kwok K, Chang J, Lo S, Giap A, Lim B, Wu B. A novel adjunctive cleansing method to reduce colony-forming units on duodenoscopes. *Endosc Int Open.* 2016; 4(11): 1178–82.
103. Aiassa V, Zoppi A, Becerra MC, Albesa I, Longhi MR. Enhanced inhibition of bacterial biofilm formation and reduced leukocyte toxicity by chloramphenicol: β -cyclodextrin:N-acetylcysteine complex. *Carbohydr Polym.* 2016; 152: 672-8.
104. Kashef N, Karami S, Djavid GE. Phototoxic effect of hypericin alone and in combination with acetylcysteine on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015; 12(2): 186-92.
105. Ercan UK, Smith J, Ji HF, Brooks AD, Joshi SG. Chemical changes in nonthermal plasma-treated N-acetylcysteine (NAC) solution and their contribution to bacterial inactivation. *Sci Rep.* 2016; 6: 2-13.
106. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc.* 2008; 3(12): 1909-24.
107. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2000; 40(2):175-9.
108. 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(1): 1385372.
109. Chiba A, Sugimoto S, Sato F, Hori S, Mizunoe Y. A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability. *Microb Biotechnol.* 2015; 8(3): 392-403.

110. Combrouse T, Sadovskaya I, Faille C, Kol O, Guérardel Y, Midelet-Bourdin G. Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilms of different phylogenic lineages with optimization of culture conditions. *J Appl Microbiol.* 2013; 114(4): 1120-31.
111. Andersson S, Dalhammar G, Kuttuva Rajarao G. Influence of microbial interactions and EPS/polysaccharide composition on nutrient removal activity in biofilms formed by strains found in wastewater treatment systems. *Microbiol Res.* 2011; 166(6): 449-57.
112. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248–54.
113. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 1956; 28: 350–6.
114. Rice KC, Mann EE, Endres JL, Weiss EC, Cassat JE, Smeltzer MS, et al. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(19): 8113-8.
115. Frings CS, Fendley TW, Dunn RT, Queen CA. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Clin Chem.* 1972; 18(7): 673-4.