

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 24/02/2024.



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



Carmélia Isabel Vitorino Lobo

Eficácia de compostos com alvos distintos no controle de biofilmes de
Streptococcus mutans* e *Candida albicans

Araraquara

2022



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



Carmélia Isabel Vitorino Lobo

**Eficácia de compostos com alvos distintos no controle de biofilmes de
Streptococcus mutans e *Candida albicans***

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutora em Reabilitação Oral, na Área de Prótese

Orientadora: Marlise Inêz Klein Furlan

Araraquara

2022

L799e Lobo, Carmélia Isabel Vitorino
Eficácia de compostos com alvos distintos no controle de
biofilmes de Streptococcus mutans e Candida albicans / Carmélia
Isabel Vitorino Lobo. -- Araraquara, 2022
111 p.: il.; tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Marlise Inêz Klein Furlan

1. Biofilme. 2. Streptococcus mutans. 3. Candida albicans. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos
pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Carmélia Isabel Vitorino Lobo

**Eficácia de compostos com alvos distintos no controle de biofilmes de
Streptococcus mutans e *Candida albicans***

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutora em Reabilitação Oral

Presidente e orientadora: Dra. Marlise Inêz Klein Furlan

2ª Examinador: Profa. Dra Livia Nordi Dovigo

3ª Examinadora: Profa. Dra. Cristiane Duque

4ª Examinadora: Profa. Dra. Carolina Patrícia Aires

Araraquara, 24 de fevereiro de 2022

DADOS CURRICULARES

Carmélia Isabel Vitorino Lobo

NASCIMENTO: 25 de fevereiro de 1989 – Cidade de Maputo – Maputo

FILIAÇÃO: Josethe Maria Amado Vitorino e Augusto Francisco Lobo

2006/2010 – Licenciatura em Medicina Dentária pelo Instituto Superior de Ciências e Tecnologia de Moçambique – Moçambique

2011/2014 – Atuação como Médica Dentista no Hospital Rural de Angoche; Responsável de Saúde Oral e Escolar do Distrito de Angoche – Ministério da Saúde de Moçambique

2014/2016 – Atuação como Médica Dentista no Hospital Central de Nampula - Ministério da Saúde de Moçambique (atualmente com licença para a realização do doutorado)

2016/2018 – Mestrado acadêmico em Reabilitação Oral, na área de Prótese pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita e Filho”, Faculdade de Odontologia de Araraquara - Brasil

2017/2019 – Especialização em Prótese Dentária pela Sociedade Educacional Herrero, Faculdade Herrero Unidade de Pós-graduação Araraquara – Brasil

À minha Família! Meu porto seguro, meu alicerce e meu combustível para seguir realizando os meus sonhos. Muito obrigada, a minha Dge (Gertrudes) (minha tia, mãe, amiga e incentivadora), obrigada por me ensinares o amor, por cuidares de mim desde que nasci e por estares comigo até os meus 30 (sinto falta dos nossos momentos, mas ao mesmo tempo a tua presença segue viva nos meus pensamentos); a avó Chica (Francisca) pelas orações, pelo amor, pela conexão que criamos (tão forte que te fez esperar que eu voltasse a Moçambique depois do mestrado, para que pudesses me dar a última benção antes da tua partida para o céu), só agradeço; a avó Belinha (Isabel) (minha primeira mamã) pelo amor infinito, por todo cuidado e proteção que me deste desde que nasci (sou grata pela acolhida e criação como se fosse a tua filha e isso não tem preço, te amo infinito); ao avô Luíz obrigada por teres sido exemplo de integridade e força (99 anos é uma marca alcançada por poucos), por todos ensinamentos partilhados e por cuidares tão bem de toda a família; meu avô Albano, sou grata pelo cuidado e educação que me deste e pelas nossas conversas (sempre cheias de emoção e saudade), quero te dizer que sigo firme e já já estarei ai para te abraçar; aos meus pais Josethe e Augusto agradeço por sempre presarem pela minha educação, por me apoiarem e por todo amor e cuidado; as minhas irmãs Erica e Lorraine sou grata pela parceria, pela amizade; e ao meu sobrinho Jonathan que me enche de coragem e amor (e que eu não vejo a hora de abraçar).

Obrigada por tudo,

Amo vocês

AGRADECIMENTOS

A Deus que está sempre comigo e nunca me falta;

Aos meus pais Josethe Maria Amado Vitorino e Augusto Francisco Lobo por terem garantido a minha educação e por todo o suporte;

Aos meus avós Francisca Elvira de Sousa Pinto, Isabel Maria Amado Vitorino, Luíz de Gonzaga Lobo e Albano João Vitorino por todo amor, cuidado, pela orientação e ensinamentos;

As minha irmãs Erica Célia Jessen e Lorraine Masego Segokgo Lobo por todo amor e parceria;

A minha tia Gertrudes da Conceição Amado Vitorino, agradeço por todo amor, cuidado, força, incentivo e pela torcida;

A minha tia Liege Maria Amado Vitorino, pelo cuidado, incentivo e pela torcida.

Ao meu sobrinho, o pequeno Jonathan Jessen Mujovo que mesmo de longe sempre me alegra e me enche de amor, obrigada por todos os sorrisos meu pequenino.

Ao meu cunhado Joel Mujovo pelo apoio e amizade.

À minha orientadora Marlise Inêz Klein Furlan, agradeço pela confiança, pela orientação desde o mestrado, por toda a paciência e profissionalismo. Foi uma honra ser 'team Marlise' e aprender a pesquisar com uma profissional tão dedicada e de excelência. Obrigada por todos estes anos de orientação e pela sua amizade. Tem a minha eterna gratidão, o meu carinho, respeito e admiração.

A professora Ana Cláudia Pavarina, pela carta de aceite ao Programa;

Aos professoras Ewerton Garcia de Oliveira Mima e Livia Nordi Dovigo por terem participado das minhas bancas de Pré-qualificação e Qualificação;

As professoras Carolina Patrícia Aires, Cristiane Duque e Livia Nordi Dovigo, por terem gentilmente aceitado fazer parte da minha banca de defesa;

Aos Professores Ewerton Garcia de Oliveira Mima, Karin Hermana Neppelenbroek e Marlus Chorilli, por terem aceitado compor a banca como suplentes;

Ao Dr. António Paulino Rodrigues por ter me recebido, mediado e assinado o meu pedido de continuação de estudos;

Ao Hospital Central de Nampula, Direção Provincial de Nampula e Ministério da Saúde de Moçambique pela permissão da minha continuação de estudos;

A Faculdade de Odontologia de Araraquara, por toda a sua estrutura e pelo acolhimento;

Ao Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara;

Ao Laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara pela disponibilidade de utilização do espaço e equipamentos;

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia do Campus de Araraquara pela disponibilidade de utilização do espaço e equipamentos;

Ao Laboratório de Microscopia de Fluorescência Confocal da Faculdade de Odontologia de Araraquara pela disponibilidade de utilização do Microscópio de Fluorescência Confocal;

Ao Laboratório de Cultura Celular do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara pela disponibilidade de utilização do espaço e equipamentos;

Ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara pela disponibilidade de utilização do espectrofotômetro;

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade de Odontologia de Araraquara pela disponibilidade de utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura.

Aos professores; técnicos e funcionários de toda Faculdade de Odontologia de Araraquara (em especial aos do Programa de Reabilitação Oral), por partilharem seus conhecimentos, pela formação de excelência e pela colaboração;

Aos Professores José Maurício dos Santos Reis e Lígia Antunes Pereira Pinelli por terem me aceitado como estagiária nas disciplinas de Prótese Fixa Convencional e sobre Implantes I e II;

Ao José Alexandre Garcia, Tarcísio Rodrigues da Silva, Cristiano Lamounier e Renan César Palomino pelas orientações e suporte;

A todos os meus colegas do 'team Marlise' pela troca, colaboração e parcerias, em especial à Ana Carolina Urbano, Elkin Jahir Florez Salamanca, Guilherme Roncari Rocha, Sabrina Marcela Ribeiro, Érick Dante de Oliveira Fratucelli e Jaqueline Colin;

As colegas Natalie Aparecida Rodrigues Fernandes e Cláudia Jordão por toda a ajuda e colaboração;

A Paula Aboud Barbugli pela colaboração e parceria;

Aos meus queridos amigos Beatriz Panariello, Jéssica Katarine de Abreu Silva, Lucas Portela, Mónica Tinajero, Stephania Caroline Rodolfo Silva, obrigada por todos os momentos que partilhamos, pela vossa amizade e suporte, vocês são muito mais do que amigos e estão no meu coração;

As queridas amigas Bruna Pimentel, Luana Dias, Maria Inês Carlos, Paula Masseti, pelo carinho e amizade;

Aos queridos amigos gringos de Araraquara, em especial a Maria Isabel Amaya, Jefferson Trigo, Eric Hernán Coaguila, Juan Francisco Mariscal, Juan Pablo Tamayo, Uxua Zuta, Danny Mendonza, Laura Gonzales, Victor Ochoa, Kasandra Yupanqui Barrius pela amizade e momentos partilhados;

A todos os meus familiares, amigos moçambicanos e estrangeiros espalhados pelo mundo que partilharam da minha jornada, agradeço pela força.

Aos voluntários que gentilmente doaram a saliva para a execução do projeto, o meu agradecimento especial.

Ao CNPq:

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo nº 409668/2018-4, chamada Universal 2018), essencial para realização dessa pesquisa.

À CAPES:

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

Ao CNPq:

O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq (Processo nº 141316/2020-9), essencial para realização dessa pesquisa.

Lobo CIV. Eficácia de compostos com alvos distintos no controle de biofilmes de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

A doença cárie é um problema de saúde pública mundial, causada por biofilme patogênico modulado por uma dieta rica em açúcares (principalmente, sacarose). A associação de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* tem sido encontrada em biofilmes de lesões clínicas de cárie da infância. O biofilme misto dessas duas espécies é mais tolerante à tratamentos tópicos com agentes que controlam e diminuem a virulência de biofilme simples de *S. mutans*. Portanto, avaliou-se as atividades antimicrobiana, antibiofilme e citotóxica de seis compostos com possíveis alvos em *S. mutans* e *C. albicans*: terpenóide (*tt*-farnesol ou Far), flavonoide (mirecetina ou Mir), três hidroxichalconas (2' hidroxichalconas: AGN e R815; 4' hidroxichalcona: C135) e um agente modulador da síntese de ácido lipoteicóico (composto 1771). Assim, determinou-se o potencial antimicrobiano (antibacteriano e antifúngico) e antibiofilme (modelos em placas de poliestireno: biofilmes iniciais de 24h e pré-formados de 48h) dos compostos isolados contra os microrganismos isolados. Após, combinou-se os compostos e concentrações promissoras entre si e com e sem flúoreto de sódio (F) para avaliação antibiofilme contra biofilmes mistos (iniciais e pré-formados). Posteriormente, avaliou-se a eficácia da aplicação tópica (5 min) dos compostos promissores contra biofilmes mistos formados em discos de hidroxiapatita com película salivar em 28h (expressão gênica) e 43h [população microbiana, biomassa, proteínas na porção insolúvel, componentes da matriz extracelular (exopolissacarídeos solúveis em água e em álcali, eDNA e proteínas), estrutura 3D e microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biofilme]. Ainda, determinou-se o efeito citotóxico dos tratamentos usados para a aplicação tópica sobre monocamada de queratinócitos orais. Os testes estatísticos consideraram $\alpha=0,05$. Dentre os agentes avaliados, C135, Far, Mir e 1771 foram promissores para as atividades antimicrobiana e antibiofilme sobre biofilme simples de cada espécie (24 e 48h). Esses compostos combinados com e sem flúor foram eficazes contra as duas espécies microbianas (biofilme misto inicial); entretanto C135+Far+Mir, C135+Far+F e todos compostos combinados foram eficazes contra biofilmes mistos pré-formados. Os biofilmes mistos tratados topicamente com C135+Far+F apresentaram menor expressão gênica para genes de *C. albicans* associados à síntese (BGL2, FKS1) e remodelagem de β -glucanos (XOG1, PHR1, PHR2) (componentes da matriz extracelular), estresse oxidativo (SOD1), efluxo de fármacos (CDR1, ERG11) e maior expressão do gene de *S. mutans nox1* (tolerância à estresses oxidativo e ácido); já C135+Far resultou em menor quantidade de exopolissacarídeos insolúveis (quantificação bioquímica), biomassa e proteínas na porção insolúvel dos biofilmes, e redução de expressão de BGL2, ERG11, SOD1 e PHR2. A quantificação dos microrganismos e exopolissacarídeos a partir da microscopia confocal mostrou menor biovolume e porcentagem de cobertura da estrutura 3D para C135+F, C135+Far+F e C135; e nas imagens de MEV, C135+Far e C135+Far+F mostraram *C. albicans* apenas na forma de levedura. A exposição aos tratamentos por 30 min, mostrou citotoxicidade moderada para C135+F e C135 enquanto todos tratamentos contendo Far e a clorexidina (0,12%) foram altamente citotóxicos. Portanto, as formulações avaliadas afetaram alvos distintos dos biofilmes simples e misto de *S. mutans* e *C. albicans*; com efeito mais pronunciado contra o fungo em biofilmes mistos.

Palavras – chave: Biofilmes. *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*.

Lobo CIV. Efficacy of compounds with distinct targets in the control of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* biofilms.[Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Dental caries is a worldwide public health problem caused by a pathogenic biofilm modulated by a diet rich in sugars (mainly sucrose). *Candida albicans* has been found in association with *Streptococcus mutans* in biofilms of clinical childhood dental caries lesions. Dual-species biofilms of these two species are more tolerant to topical treatments with agents that can control and decrease the virulence of single-species *S. mutans* biofilm. Therefore, the antimicrobial, antibiofilm, and cytotoxic activity of six compounds with possible targets in *S. mutans* and *C. albicans* were evaluated: a terpenoid (*tt*-farnesol or Far), a flavonoid (myricetin or Mir), three hydroxychalcones (2'-hydroxychalcones: AGN and R815; 4'-hydroxychalcone: C135) and a lipoteichoic acid synthesis modulating agent (compound 1771). Thus, the antimicrobial (antibacterial and antifungal) and antibiofilm (polystyrene model plates: initial 24h and 48h pre-formed biofilms) potential of the isolated compounds against isolated microorganisms were determined. Afterward, the promising compounds and concentrations were combined with each other and with or without sodium fluoride (F) for antibiofilm evaluation against dual-species biofilms (initial and pre-formed). After, the effectiveness of topical application (5 min) of the promising compounds with and without F against dual-species biofilms formed on hydroxyapatite discs with salivary pellicle was evaluated via different analyzes at 28h (gene expression) and 43h [microbial population, biomass, proteins of the insoluble portion, extracellular matrix components (water- and alkali-soluble exopolysaccharides, eDNA, and proteins), 3D structure and scanning electron microscopy (SEM) of the biofilm]. Also, the cytotoxicity of treatments used for topical application on oral keratinocytes (monolayer) was determined. Statistical tests followed $\alpha=0.05$. Among the agents evaluated, C135, Far, Mir, and 1771 were promising for antimicrobial and antibiofilm activities on single-species biofilms of both species (24 and 48h). Combined compounds with and without fluoride were effective against both microbial species (initial dual-species biofilm); C135+Far+Mir, C135+Far+F and all compounds combined were effective against pre-formed dual-species biofilms. The topical treatments on dual-species biofilms with C135+Far+F showed lower gene expression for *C. albicans* genes associated with synthesis (BGL2, FKS1) and remodeling of β -glucans (XOG1, PHR1, PHR2) (extracellular matrix components), oxidative stress (SOD1), drug efflux (CDR1, ERG11) and increased expression of the *S. mutans* gene *nox1* (tolerance to oxidative and acidic stress). C135+Far resulted in a lower amount of insoluble exopolysaccharides (biochemical quantification), biomass, and proteins in the insoluble portion of the biofilms and reduced the expression of BGL2, ERG11, SOD1, and PHR2. However, the quantification of microorganisms and exopolysaccharides from confocal microscopy showed lower biovolume and percentage of coverage of the 3D structure for C135+F, C135+Far+F, and C135. For SEM, biofilms treated with C135+Far e C135+Far+F presented *C. albicans* only as yeast form. The exposure to treatments (30 min) demonstrated moderate cytotoxicity for C135+F and C135, while treatments containing Far or chlorhexidine (0.12%) were highly cytotoxic. Therefore, the evaluated formulations affected different targets in single- and dual-species biofilm of *S. mutans* and *C. albicans*, with a more pronounced effect against *C. albicans* cells in dual-species biofilms.

Keywords: Biofilms. *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 PROPOSIÇÃO	11
2.1 Objetivos Específicos.....	11
3 PUBLICAÇÕES	12
3.1 Artigo 1.....	13
3.2 Artigo 2.....	39
4 DISCUSSÃO	75
5 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXO A.....	85
ANEXO B	86
ANEXO C	87
APÊNDICE A	88
APÊNDICE B	95
APÊNDICE C	103

1 INTRODUÇÃO

Muitas doenças infecciosas humanas são causadas por biofilmes virulentos, incluindo os biofilmes orais. Os biofilmes são comunidades de células microbianas altamente dinâmicas, estruturadas e organizadas, em que as células estão cobertas e imersas em uma matriz extracelular (MEC) tridimensional (3D) de substâncias poliméricas tais como exopolissacarídeos (EPS)¹. A MEC serve como um esqueleto 3D para o desenvolvimento do biofilme, ajudando a moldar a heterogeneidade espacial e metabólica, e contribuindo para a criação de microambientes (nichos) que favorecem o crescimento e a proliferação dos microrganismos²⁻⁴.

Dentre as doenças causadas por biofilmes, a cárie dentária é um problema de saúde pública mundial, afetando crianças e adultos^{5,6}. A cárie dentária resulta de interações complexas entre organismos orais específicos, fatores do hospedeiro e dieta (rica em carboidratos, principalmente sacarose), que promovem o estabelecimento de um biofilme cariogênico na superfície dos dentes⁷. Ainda, a cárie da infância ou *ECC* (do inglês *early childhood caries*) é uma forma agressiva da doença, que se não tratada, pode resultar na rápida e extensiva cavitação dos dentes e outras complicações⁸; além disso, é dolorosa e onerosa para tratar, podendo afetar o bem-estar e o desenvolvimento integral das crianças⁹.

A construção do biofilme cariogênico é orquestrado pela espécie *Streptococcus mutans*, através da formação da MEC, composta principalmente por EPS¹⁰, mas também DNA extracelular (eDNA), ácidos lipoteicóicos e proteínas também estão presentes¹¹. *S. mutans* é o principal produtor de MEC e modula a formação de biofilme cariogênico quando a sacarose e o amido da dieta do hospedeiro estão disponíveis^{12,13}, embora não seja a espécie mais numerosa e existam outros microrganismos igualmente acidogênicos e acidúricos na cavidade bucal^{14,15}. As exoenzimas de *S. mutans* denominadas glicosiltransferases (Gtfs) e frutossiltransferases (Ftfs) utilizam a sacarose como substrato e os hidrolisados de amido como aceptores para a síntese de EPS (glicanos e frutanos)¹⁰; Gtfs também se adsorvem na superfície de outros microrganismos orais convertendo os mesmos em produtores de glicano¹⁰. Adicionalmente, *S. mutans* apresenta tolerância ao ambiente ácido^{16,17}, principalmente através atividade da bomba de prótons F0F1-ATPase (codificada pelos genes do operon *atpCDGAHF*, dos quais *atpD* apresenta a maior

expressão)¹⁸. A resposta de *S. mutans* à acidificação do ambiente também torna esse microrganismo mais tolerante ao estresse oxidativo, especialmente via uma NADH oxidase (codificada por *nox1*)¹⁹.

C. albicans é um dos microrganismos aos quais as Gtfs se ligam e onde as Gtfs formam quantidades elevadas de EPS²⁰. Este fungo é acidogênico e acidúrico²¹; também produz MEC de composição variada, contendo eDNA, β glicanos, mananas, proteínas²²⁻²⁵; e essa matriz tem sido associada à resistência contra antifúngicos^{26,27}. Ainda, a biogênese da matriz produzida por *C. albicans* é coordenada extracelularmente, refletindo ações de cooperação na comunidade do biofilme²⁷.

C. albicans produz polissacarídeos do tipo β -glicanos que estão presentes na parede celular e na matriz extracelular com ligações β -1,3 e β -1,6. A presença desses polissacarídeos é fator importante para aos antifúngicos^{23,26}, bem como eDNA também pode estar relacionado a proteção contra difusão de antifúngicos²⁵. Em biofilmes maduros, os genes BGL2 (codifica beta-1,3- glicosiltransferase) PHR1 (codifica uma glicosidase), FKS1 (β -1,3 sintase de glicano) e XOG1 (codificador de β -1,3 exoglicanase) de *C. albicans* fazem a modificação e distribuição de carboidratos na matriz do biofilme maduro conferindo e reforçando a barreira contra os antifúngicos²⁶. Ainda, o gene ERG11 esta relacionado com a síntese de ergosterol (principal esteroide das membranas fungicas e análogo do colesterol nos mamíferos), e a sua expressão aumentada deste gene é associada a resistência antifúngica²⁸. Ainda, o gene ERG11 esta relacionado com o crescimento filamentar, invasivo e virulência de *C. albicans*; assim como reduz a capacidade fúngica de adaptação ao estresse oxidativo; e dessa forma as vias da biosíntese de ergosterol também podem estar envolvidas na transição morfológica de *C. albicans*²⁹. A expressão de BGL2 está relacionada a formação de EPS na matriz via biosíntese da parede celular e as funções do biofilme; PHR1 desempenha papel importante na estrutura da parede celular (*crosslinking* de β -1,3 e β -1,6 glicanos)³⁰ e na virulência de infecções quando o pH ≥ 5.5 (interferindo na morfologia do fungo). A expressão aumentada de PHR2 quando o pH < 5 (codifica uma glicosidase que também atua na ligação cruzada dos beta-glicanos fúngicos)³⁰ pode ajudar a reforçar a proteção da parede celular³¹.

As modalidades terapêuticas contemporâneas para o controle e modulação da formação de biofilme dental são limitadas. Por exemplo, a clorexidina é um agente antimicrobiano de amplo espectro que suprime os níveis de estreptococos do grupo

mutans na saliva, mas não é muito efetiva contra biofilmes maduros e seu uso preventivo e ou terapêutico (diário e contínuo) não é adequado³²; e o flúor apesar de ser o padrão ouro para a prevenção da cárie (relacionado ao processo de remineralização), oferece proteção incompleta contra a doença³³.

Assim, uma estratégia atraente e superior seria o uso e/ou a inclusão de outros agentes bioativos, incluindo substâncias naturais³⁴⁻³⁸ ou compostos sintéticos derivados de tais substâncias, que afetem a virulência e/ou a habilidade dos microrganismos desenvolverem biofilmes patogênicos. Nesse sentido, devem ser considerados os agentes inibitórios não biocidas, por preservarem a microbiota natural na boca e serem menos propensos ao desenvolvimento de resistência à terapia, como tem revelado os estudos com flavonoides e terpenóides³⁴⁻³⁷.

Dentre os agentes promissores, *tt*-farnesol é um agente que tem como alvo a membrana celular, afetando a tolerância de *S. mutans* ao ácido; e mirecetina inibe a síntese de EPS *in situ*. Ambos agentes não têm efeito biocida pronunciado^{35,36}, mas sua combinação com flúor resulta em menos lesões de cárie, com menor severidade³⁶. Ainda, farnesol é um derivado da via de biosíntese de esterol em células eucarióticas, e uma molécula de *quorum sensing* de *C. albicans*³⁸, mas aparenta não ter efeito contra *S. mutans* nas concentrações produzidas quando ambos microrganismos são co-cultivados em biofilmes^{39,40}. Além disso, a combinação de *tt*-farnesol, mirecetina e flúor mostrou-se promissora em afetar o desenvolvimento do biofilme misto⁴¹, entretanto, esta estratégia precisa ser aperfeiçoada (*e.g.*, aumentando a concentração dos agentes ou combinando-os com outros para potencializar seu efeito combinado) para o melhor controle desses biofilmes.

Farnesol em concentrações acima do *threshold* (*i.e.*, concentração fisiológica da espécie) é capaz de induzir apoptose em células de *C. albicans* em culturas planctônicas⁴². Farnesol é um composto lipofílico que se conjuga com glutadiona, um antioxidante importante para a detoxificação celular contra compostos que podem causar danos à célula. Conjugados de glutadiona agem como substratos para transportadores do tipo ABC (do inglês *ATP-binding cassette*, onde ATP é a abreviação do inglês *adenosine triphosphate*, que em português é o trifosfato de adenosina), que são transportadores de membrana dependentes de ATP; esses conjugados de glutadiona são transportados para fora das células por esses transportadores. Um estudo usando concentrações distintas de farnesol em contato com células por

tempos diferentes, demonstrou o envolvimento de efluxo de glutadiona mediado por CDR1 como o mecanismo precedente do processo apoptótico induzido por farnesol em *C. albicans*⁴³. Adicionalmente, os genes SOD (do inglês *superoxide dismutase*), que codificam as enzimas superóxido dismutases primárias responsáveis pela defesa contra o estresse oxidativo, são induzidos [especialmente *superoxide dismutase 1* (SOD1)], sem gerar mudança na expressão de CDR1⁴³.

Além dos supracitados, as hidroxichalconas são intermediários metabólicos precursores de flavonoides e isoflavonoides e podem inibir a atividade de Gtfs⁴⁴. Ainda, interferir na biologia dos ácidos lipoteicóicos (ALT) afetaria o desenvolvimento dos biofilmes, visto que ALT presentes na parede celular de espécies Gram positivas também estão presentes na MEC de biofilmes cariogênicos de *S. mutans*, e interagem com EPS durante o desenvolvimento e a maturação dos biofilmes¹¹. Portanto, como o alvo do composto 1771 é a proteína LtaS (do inglês *lipoteichoic acid synthase*) que é a enzima sintetase de ALT em *S. aureus*⁴⁵, o seu efeito sobre *S. mutans* e sobre o desenvolvimento dos biofilmes pode ser promissor⁴⁶⁻⁴⁸.

Assim, foram investigados compostos selecionados (com alvos distintos nas células e vias metabólicas de *S. mutans* e *C. albicans*) para identificar agentes seletivos antibiofilme que podem ter aplicações potenciais na prevenção da cárie dentária onde as duas espécies estão presentes.

5 CONCLUSÃO

Os compostos testados apresentaram eficácia antimicrobiana e antibiofilme contra diferentes alvos para *S. mutans* e *C. albicans*. Especificamente:

Os compostos C135, *tt*-farnesol, mirecetina e 1771 foram promissores e apresentaram efeito antimicrobiano contra *S. mutans* e os compostos C135 e *tt*-farnesol apresentaram potencial antimicrobiano contra *C. albicans*.

Os compostos C135, *tt*-farnesol, mirecetina e 1771 isolados, inibiram a formação de biofilmes iniciais simples de *C. albicans* e de *S. mutans* (24h); C135 isolado eliminou os biofilmes pré-formados simples das duas espécies (48h) e *tt*-farnesol eliminou os biofilmes pré-formados de *S. mutans*. Ainda, a combinação dos agentes selecionados com e sem flúor, foi efetiva contra os biofilmes mistos iniciais e a combinação de todos os compostos com flúor, C135 + *tt*-farnesol + mirecetina e C135+*tt*-farnesol+flúor, inibiu o crescimento das duas espécies microbianas em biofilmes mistos pré-formados de 48h.

A aplicação tópica por 5 minutos de formulações contendo C135 + *tt*-farnesol (com ou sem flúor) afetou a acidogenicidade, capacidade de resposta oxidativa e a produção de exopolissacarídeos dos biofilmes misto de *S. mutans* e *C. albicans*, além de interferir na morfologia filamentar das células de *C. albicans*.

Os tratamentos (formulações) C135 e C135+F, apresentaram citotoxicidade moderada e todos os tratamentos contendo *tt*-farnesol foram altamente citotóxicos quando aplicados por 30 min sobre o modelo de monocamada de queratinócitos orais.

REFERÊNCIAS*

1. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(9):623-3.
2. Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6:199-210.
3. Mann EE, Wozniak DJ. Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012; 36(4):893-916.
4. Wozniak DJ, Parsek MR. Surface-associated microbes continue to surprise us in their sophisticated strategies for assembling biofilm communities. *F1000Prime Rep.* 2014; 6:26.
5. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, et al. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res.* 2015; 94(5):650-8.
6. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, et al. GBD 2015 Oral Health Collaborators. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res.* 2017; 96(4):380-7.
7. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet.* 2007; 369(9555):51-9.
8. Casamassimo PS, Thikkurissy S, Edelstein BL, Maiorini E. Beyond the dmft: the human and economic cost of early childhood caries. *J Am Dent Assoc.* 2009; 140(6):650-7.
9. Hajishengallis E, Parsaei Y, Klein MI, Koo H. Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. *Mol Oral Microbiol.* 2017; 32(1):24-34.
10. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans* derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011; 45:69-86.
11. Castillo Pedraza MC, Novais TF, Faustoferri RC, Quivey RG Jr, Terekhov A, Hamaker BR, et al. Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of *Streptococcus mutans* biofilms. *Biofouling.* 2017; 33(9):722-40.
12. Klein MI, DeBaz L, Agidi S, Lee H, Xie G, Lin AHM, et al. Dynamics of *Streptococcus mutans* transcriptome in response to starch and sucrose during biofilm development. *PLoS One.* 2010; 5(10):e13478.
13. Duarte S, Klein MI, Aires CP, Cury JA, Bowen WH, Koo H. Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23:206-12.
14. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011; 90: 294-303.

* 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. Mattos-Graner RO, Klein MI, Smith DJ. Lessons learned from clinical studies: roles of mutans streptococci in the pathogenesis of dental caries. *Curr Oral Health Rep.* 2014; 1:70–8.
16. Lemos JA, Burne RA. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology (Reading)*. 2008; 154(Pt11):3247-55.
17. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA. The biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr.* 2019; 7(1):10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018.
18. Kuhnert WL, Zheng G, Faustoferri RC, Quivey RG Jr. The F-ATPase operon promoter of *Streptococcus mutans* is transcriptionally regulated in response to external pH. *J Bacteriol.* 2004; 186(24):8524-8.
19. Derr AM, Faustoferri RC, Betzenhauser MJ, Gonzalez K, Marquis RE, Quivey RG Jr. Mutation of the NADH oxidase gene (*nox*) reveals an overlap of the oxygen- and acid-mediated stress responses in *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(4):1215-27.
20. Gregoire S, Xiao J, Silva BB, Gonzalez I, Agidi PS, Klein MI, et al. Role of glucosyltransferase B in the interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and experimental pellicle formed on hydroxyapatite surface. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(18):6357-67.
21. Klinker T, Kneist S, de Soet JJ, Kuhlisch E, Mauersberger S, Forster A, et al. Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *Caries Res.* 2009; 43(2):83-91.
22. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol.* 2006; 55:999–1008.
23. Lal P, Sharma D, Pruthi P, Pruthi V. Exopolysaccharide analysis of biofilm-forming *Candida albicans*. *J Appl Microbiol.* 2010; 109(1):128-36.
24. 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(1):171-5.
25. Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt, et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio.* 2014; 5(4):e01333-14.
26. Taff HT, Nett JE, Zarnowski R, Ross KM, Sanchez H, Cain MT, et al. A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. *PLoS Pathog.* 2012; 8(8): e1002848.
27. 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.
28. White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(6):1704-13.
29. Wu Y, Wu M, Wang Y, Chen Y, Gao J, Ying C. ERG11 couples oxidative stress adaptation, hyphal elongation and virulence in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2018; 18(7). doi: 10.1093/femsyr/foy057.

30. Fonzi WA. PHR1 and PHR2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. *J Bacteriol.* 1999; 181(22):7070-9.
31. Vedyappan G, Rossignol T, D'enfert C. Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(5):2096-111.
32. Mattos-Graner RO, Klein MI, Smith DJ. Lessons Learned from Clinical Studies: Roles of Mutans Streptococci in the Pathogenesis of Dental Caries. *Curr Oral Health Rep.* 2014; 1:70–8.
33. Ten Cate JM. Novel anticaries and remineralizing agents: prospects for the future. *J Dent Res.* 2012; 91(9):813-5.
34. Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA, et al. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. *J Dent Res.* 2005; 84(11):1016-20.
35. Jeon JG, Klein MI, Xiao J, Gregoire S, Rosalen PL, Koo H. Influences of naturally occurring agents in combination with fluoride on gene expression and structural organization of *Streptococcus mutans* in biofilms. *BMC Microbiol.* 2009; 9:228.
36. Falsetta ML, Klein MI, Lemos JA, Silva BB, Agidi S, Scott-Anne KK, et al. Novel antibiofilm chemotherapy targets exopolysaccharide synthesis and stress tolerance in *Streptococcus mutans* to modulate virulence expression in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(12):6201-11.
37. Feng G, Klein MI, Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Koo H. The specific degree-of-polymerization of A-type proanthocyanidin oligomers impacts *Streptococcus mutans* glucan-mediated adhesion and transcriptome responses within biofilms. *Biofouling.* 2014; 29(6):629-40.
38. Hall RA, Turner KJ, Chaloupka J, Cottier F, De Sordi L, Sanglard, et al. Action in *Candida albicans* dodecanol operate via distinct modes of farnesol/homoserine lactone and the quorum-sensing molecules. *Eukaryotic Cell.* 2011; 10(8):1034.
39. 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.
40. Lobo CIV, Rinaldi TB, Christiano CMS, Leite LS, Barbugli PA, Klein MI. Dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* exhibit more biomass and are mutually beneficial compared with single-species biofilms. *J. Oral Microbiol.* 2019; 11(1):1581520.
41. Rocha GR, Florez Salamanca EJ, de Barros AL, Lobo CIV, Klein MI. Effect of tt-farnesol and myricetin on in vitro biofilm formed by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *BMC Complement Altern Med.* 2018; 18(1):61.
42. Shirliff ME, Krom BP, Meijering RAM, Peters BM, Zhu J, Scheper A, et al. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(6):2392-401.
43. Zhu J, Krom BP, Sanglard D, Intapa C, Dawson CC, Peters BM, et al. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans* is mediated by Cdr1-p extrusion and depletion of intracellular glutathione. *PLoS ONE.* 2011; 6(12):e28830.

44. Nijampatnam B, Casals L, Zheng R, Wu H, Velu SE. Hydroxychalcone inhibitors of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases and biofilms as potential anticaries agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016; 26(15):3508-13.
45. Reichmann NT, Gründling A. Location, synthesis and function of glycolipids and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria of the phylum Firmicutes. *FEMS Microbiol Lett*. 2011; 319(2):97-105.
46. Castillo Pedraza MC, De Oliveira Fratucelli ED, Ribeiro SM, Florez Salamanca EJ, da Silva Colin J, Klein MI. Modulation of lipoteichoic acids and exopolysaccharides prevents *Streptococcus mutans* biofilm accumulation. *Molecules*. 2020; 25(9):2232.
47. Lobo CIV, Lopes ACUA, Klein MI. Compounds with distinct targets present diverse antimicrobial and antibiofilm efficacy against *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*, and combinations of compounds potentiate their effect. *J Fungi*. 2021; 7(5):340.
48. Rocha GR, Sims Jr KR, Xiao B, Klein MI, Benoit DSW. Nanoparticle carrier codelivery of complementary antibiofilm drugs abrogates dual species cariogenic biofilm formation in vitro. *J. Oral Microbiology*. 2021; 14(1):1997230.
49. Xiao J, Moon Y, Li L, Rustchenko E, Wakabayashi H, Zhao X, et al. *Candida albicans* carriage in children with severe childhood caries (S-ECC) and maternal relatedness. *PLoS One*. 2016; 11(10):e0164242.
50. Chávez-Andrade GM, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, Gomes-Cornélio AL, Faria G, Bernardi MIB, et al. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial activity of poly(vinyl alcohol)-coated silver nanoparticles and farnesol as irrigating solutions. *Arch Oral Biol*. 2017; 84:89-93.
51. Nikoomanesh F, Roudbarmohammadi S, Khoobi M, Haghghi F, Roudbary M. Design and synthesis of mucoadhesive nanogel containing farnesol: investigation of the effect on HWP1, SAP6 and Rim101 genes expression of *Candida albicans* in vitro. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2019; 47(1):64-72.
52. Horev B, Klein MI, Hwang G, Li Y, Kim D, Koo H, et al. pH-activated nanoparticles for controlled topical delivery of farnesol to disrupt oral biofilm virulence. *ACS Nano*. 2015; 9(3):2390-404.