

Leonardo Perina Feresin

Influência da quantidade de matriz
extracelular na atividade antifúngica de
nanopartículas de prata contra biofilmes
de espécies de *Candida*

Leonardo Perina Feresin

Influência da quantidade de matriz extracelular na
atividade antifúngica de nanopartículas de prata
contra biofilmes de espécies de *Candida*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Faculdade de Odontologia de Araçatuba,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Bacharel
em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Ass. Dr^a. Débora de Barros
Barbosa

Araçatuba-SP

2014

Dedicatória

Dedico este trabalho

Aos meus pais, irmão, avós e a toda minha família. Mãe, agradeço o apoio de poder realizar esse sonho, seu símbolo de garra fez com que eu jamais desistisse. Pai, um homem de honra, princípios e acima de tudo um exemplo, jamais conseguiria sem seu apoio e dedicação. Ao meu irmão Guilherme, mesmo distante, sempre me apoiou e contribuiu muito, sendo um exemplo de que com esforço e capacidade atingimos nossos objetivos. E em especial à minha avó materna Mercedes, símbolo de humildade e bondade, não está mais presente hoje, mas fez parte dessa conquista.

Agradecimentos Especiais

A Deus, que iluminou meu caminho e me deu forças para sempre seguir adiante.

À minha orientadora, Professora Débora de Barros Barbosa, por sua dedicação, exemplo de pessoa e por ter confiado em mim. Serei eternamente grato pelas oportunidades e pelos ensinamentos transmitidos, sem a senhora com certeza esse sonho não poderia ser concretizado.

Ao meu grande amigo, Dr. Douglas Roberto Monteiro, homem digno, de caráter incrível, posso dizer concretamente um irmão para mim. Apoiou-me a todo momento, mostrou-me paciência, dedicação, e me guiou nos experimentos.

A todos os meus amigos da Turma 11, pela amizade, apoio e principalmente pela união. Vocês fizeram essa caminhada menos árdua e mais feliz, obrigado a todos!

Aos meus amigos de república, Denis, Bruno, Luiz Fernando, Guilherme e Pedro, com vocês convivi momentos maravilhosos que jamais serão esquecidos. Brincadeiras, risadas, churrascos, brigas, vocês foram minha família longe de casa.

A todos os meus amigos do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese e do departamento de Odontologia Infantil e Social, que sempre deram o suporte necessário para a realização deste trabalho.

Agradecimentos

À UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela oportunidade de realizar o curso de graduação em odontologia

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido. (Processo: 2011/21932-3)

A todos os meus Professores, pelos ensinamentos transmitidos, tornando-se importantes tanto em minha formação profissional como em meu amadurecimento pessoal.

Ao Prof. Adj. Alberto Carlos Botazzo Delbem, por permitir a utilização dos equipamentos do Laboratório de Microbiologia da Disciplina de Odontopediatria, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo e ao Dr. Luiz Fernando Gorup, pela síntese e caracterização das nanopartículas de prata e pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas no Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica do Departamento de Química - UFSCar, São Carlos/SP.

Epígrafe

“A persistência é o menor caminho ao êxito”

Charles Chaplin

*“Tenha coragem de caminhar contra corrente, e de não deixar que a
esperança lhes seja roubada por valores que lhe fazem mal”*

Papa Francisco

Sumário

1	INTRODUÇÃO	18
2	MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1	Síntese e caracterização do colóide de nanopartículas de prata	19
2.2	Saliva artificial	20
2.3	Cepas de microrganismos e as condições de crescimento	20
2.4	Obtenção dos espécimes de resina acrílica	21
2.5	Formação de biofilme e tratamento com NPs	22
2.6	Quantificação da biomassa total	22
2.7	Quantificação das células cultiváveis	22
2.8.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	23
2.9	Análise estatística	23
3	RESULTADOS	24
3.1	Quantificação da biomassa total	24
3.2	Quantificação das células cultiváveis	25
3.3	Estrutura dos biofilmes	26
4	DISCUSSÃO	27
5	REFERÊNCIAS	31

Influência da quantidade de matriz extracelular na atividade antifúngica de nanopartículas de prata contra biofilmes de espécies de *Candida*

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da quantidade de matriz extracelular na atividade antifúngica de nanopartículas de prata (NPs) contra biofilmes simples e mistos de *Candida albicans* e *Candida glabrata*. NPs foram sintetizadas através da redução do nitrato de prata pelo citrato de sódio e estabilizadas com amônia. Biofilmes simples e mistos das espécies de *Candida* foram formados (48 horas) sob agitação de 10 e 120 rpm (para formar menor e maior quantidade de matriz, respectivamente, sobre a superfície de espécimes de resina acrílica posicionados no interior de placas de microtitulação de 24 poços. Na sequência, os biofilmes foram tratados por 24 horas com NPs nas concentrações de 54 e 108 µg/mL. O digluconato de clorexidina (DC) na concentração de 108 µg/mL foi usado como controle positivo. Após o período de tratamento, os biofilmes foram avaliados por meio da quantificação da biomassa total (usando a coloração de cristal violeta) e das unidades formadoras de colônias (UFCs). Ainda, a estrutura dos biofilmes de *Candida* foi analisada por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados indicaram que a quantidade de matriz extracelular afetou a atividade antifúngica de NPs na redução da biomassa total de biofilmes simples e mistos dos isolados clínicos orais, com maiores reduções para os biofilmes formados sob agitação de 10 rpm. Por outro lado, comparando as diferentes condições de incubação (10 e 120 rpm) para uma mesma concentração de NPs, foi possível notar diferença significativa ($p < 0,05$) no número de UFCs somente para a cepa referência de *C. albicans* em biofilme misto tratado com NPs a 54 µg/mL. Por meio das imagens de MEV, os biofilmes tratados com NPs e DC apresentaram diferenças estruturais quando comparados aos seus respectivos controles. Portanto, no geral, a quantidade de matriz extracelular afetou diferentemente a biomassa total e o número de células cultiváveis dos biofilmes de *Candida*. Além disso, tendo em vista o efeito antifúngico das NPs na redução da biomassa e número de UFCs contra os biofilmes testados, seu uso como um tratamento alternativo para a candidose oral deve ser considerado em terapias futuras.

Palavras-chave: nanopartículas de prata, candidose oral, biofilmes, *Candida*.

Influence of the amount extracellular matrix on the antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* biofilms

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the influence of the amount of extracellular matrix on the antifungal activity of silver nanoparticles (SN) against single and mixed biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. SN were synthesized by silver nitrate reduction with sodium citrate and stabilized with ammonia. Single and mixed biofilms of *Candida* species were formed (48 hours) under agitation of 10 and 120 rpm to form lower and higher amounts of extracellular matrix, respectively on the surfaces of acrylic resin specimens inside 24-wells microtiter plates. Then, biofilms were exposed to different concentrations of SN (54 and 108 µg/mL) for 24 h. Chlorhexidine digluconate (CHG) in a concentration of 108 µg/mL was used as positive control. After the treatment period, biofilms were assessed by total biomass quantification (by crystal violet staining) and colony forming units (CFU) enumeration. The structure of *Candida* biofilms was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) images. The results indicated that the amount of extracellular matrix affected the antifungal activity of SN in decreasing total biomass of single and mixed biofilms of oral clinical isolates, with higher reductions for those formed at 10 rpm. Interestingly, the comparisons of different incubation conditions (10 and 120 rpm) at the same SN concentration showed statistical difference ($p < 0.05$) in the number of CFUs only to reference strain of *C. albicans* in mixed biofilms treated with SN at 54 µg/mL. By SEM, *Candida* biofilms treated with SN and CHG revealed structural differences, when compared to the negative control groups. In general, the amount of extracellular matrix affected differently the total biomass and the number of cultivable cells of *Candida* biofilms. Moreover, given the antifungal effect of SN in decreasing total biomass and number of CFUs against both single and dual species pre-formed biofilms, its use as an alternative treatment for oral candidosis should be considered in future therapies.

Keywords: silver nanoparticles, oral candidosis, biofilms, *Candida*.

1. Introdução

Biofilmes são comunidades microbianas estruturadas que colonizam superfícies vivas ou inertes¹, e sua formação ocorre como resultado de uma sequência de eventos, que incluem: adesão microbiana a uma superfície, proliferação celular, produção de matriz extracelular e desprendimento de algumas células que podem colonizar outras áreas². Em usuários de próteses totais, a formação de biofilmes por espécies de *Candida* contribui para o surgimento de um estado patológico conhecido como estomatite protética³. Esse processo patológico acomete principalmente a mucosa palatina dos usuários de próteses totais e é caracterizado pelos frequentes episódios de recorrência⁴. Ainda, alguns estudos mostram que, após *Candida albicans*, *Candida glabrata* é o microrganismo mais frequentemente associado com as candidoses orais^{5,6}.

Chandra *et al.*⁷ verificaram que biofilmes de *C. albicans* exibiram resistência à anfotericina B, nistatina, clorexidina e fluconazol, com apenas 50% de redução na atividade metabólica nas concentrações de 8, 16, 128 e > 64 µg/mL, respectivamente. Um dos fatores que podem estar associados à resistência antifúngica dos biofilmes de *Candida* é a presença da matriz extracelular, a qual pode limitar ou impedir o acesso das drogas aos microrganismos presentes nas camadas mais profundas dos biofilmes⁸.

De acordo com Flemming *et al.*⁹, as matrizes dos biofilmes ou substâncias poliméricas extracelulares são biopolímeros de origem microbiana com funções de nutrição e proteção das células dos biofilmes. Esta matriz é composta por uma variedade de proteínas, carboidratos, fósforo, glicose e DNA extracelular¹⁰⁻¹², e sua síntese durante a formação dos biofilmes é altamente dependente das condições de incubação. Em condições estáticas a síntese de matriz extracelular é mínima, enquanto em condições dinâmicas essa síntese é significativamente aumentada¹⁰.

Baillie & Douglas¹⁰ compararam a susceptibilidade de biofilmes de *C. albicans* formados em condições estáticas e dinâmicas frente a diferentes agentes antifúngicos. Esses autores verificaram que a quantidade de matriz formada não afetou a susceptibilidade dos biofilmes contra todas as drogas testadas. Os biofilmes formados com ou sem agitação foram resistentes à anfotericina B, flucitosina, fluconazol, itraconazol e cetoconazol. Provavelmente, a inativação dos agentes antifúngicos pela matriz dos biofilmes depende de fatores como a natureza da droga testada e a capacidade de ligação da mesma às substâncias poliméricas extracelulares¹³.

Diante da resistência dos biofilmes aos diferentes agentes antimicrobianos e ao possível papel da matriz extracelular neste processo, a nanoterapia tem sido proposta como uma alternativa para erradicar ou controlar a formação de biofilmes orais através da incorporação de nanopartículas em diversos materiais¹⁴⁻¹⁶. Neste contexto, nanopartículas de prata (NPs) têm sido usadas para combater bactérias¹⁷ e fungos¹⁸, e os mecanismos pelos quais elas agem como agentes antimicrobianos estão relativamente bem descritos na literatura^{14,15}. De acordo com Allaker¹⁵, como o mecanismo de ação das NPs é multifatorial, diversas mutações precisam ocorrer para que os microrganismos consigam resistir aos seus efeitos. Entretanto, o uso destas nanopartículas deve ser feito com cautela, já que as mesmas podem induzir citotoxicidade em células humanas, dependendo do tamanho e da concentração de partículas usadas¹⁹⁻²¹.

Assim, embora o efeito de NPs sobre células aderidas e biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata* tenha sido demonstrado²², a influência da quantidade de matriz extracelular na atividade destas nanopartículas contra biofilmes simples e mistos de espécies de *Candida* permanece desconhecida. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, através da quantificação da biomassa total e células cultiváveis, a influência da quantidade de matriz extracelular na atividade antifúngica de NPs contra biofilmes simples e mistos de *C. albicans* e *C. glabrata*. A hipótese de nulidade desta pesquisa foi de que não haveria diferença na atividade antifúngica das NPs contra biofilmes formados sob agitação de 10 (com menor produção de matriz) e 120 rpm (com maior produção de matriz). A avaliação da susceptibilidade desses biofilmes às NPs pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias que visam melhorar a saúde oral e a qualidade de vida dos usuários de próteses totais.

2. Materiais e Métodos

2.1. Síntese e caracterização do colóide de nanopartículas de prata

O método de síntese empregado foi baseado no proposto por Turkevich *et al.*²³. NPs coloidais foram sintetizadas através da redução de íons prata do AgNO₃ (nitrato de prata) (Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Alemanha) pelo Na₃C₆H₅O₇ (citrato de sódio)

(Merck KGaA) com relações estequiométricas de 1:3, respectivamente^{16,22,24}. Em um balão de fundo redondo, 100 mL de solução de AgNO₃ ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) foram aquecidos até a temperatura de 97°C e, em seguida, foram adicionados 20 mL de solução de citrato de sódio ($1,5 \times 10^{-2}$ mol/L) com pH entre 8,0 e 8,5. A mistura foi mantida sob agitação magnética e aquecimento a 97°C por cerca de 10 minutos, até o aparecimento da coloração amarelo âmbar, que evidencia qualitativamente a formação de NPs. Na sequência, foram adicionados ao sistema 7,5 mL de solução de amônia (1,4 mol/L) (NH₃ - Merck KGaA) com o intuito de estabilizar a suspensão coloidal. As suspensões coloidais de NPs foram caracterizadas por espectroscopia na região do Ultravioleta/Visível (Espectrofotômetro Shimadzu MultSpec-1501, Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão) e por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET; Microscópio Eletrônico FEG-VP Supra 35, Carl Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha). As suspensões coloidais obtidas mostraram espectros de absorção característicos de NPs, com picos de absorção em aproximadamente 430 nm²². As imagens de MET evidenciaram partículas predominantemente esféricas e com diâmetro médio de 5 nm²². Ainda, as concentrações de NPs usadas neste estudo (54 e 108 µg/mL) foram baseadas em sua eficácia contra biofilmes de *Candida* relatada em estudos prévios^{22,25,26}.

2.2. Saliva artificial

A saliva artificial foi preparada de acordo com o procedimento descrito por Lamfon *et al.*²⁷, com a seguinte composição para 1 L de água deionizada: 2 g de extrato de levedura (Sigma-Aldrich, EUA), 5 g de peptona bacteriológica (Liofilchem, Itália), 2 g de glicose (Sigma-Aldrich, EUA), 1 g de mucina (Sigma-Aldrich, EUA), 0,35 g de NaCl (Sigma-Aldrich, EUA), 0,2 g de CaCl₂ (Sigma-Aldrich, EUA) e 0,2 g de KCl (Sigma-Aldrich, EUA). O pH da solução foi ajustado com NaOH para 6,8.

2.3. Cepas de microrganismos e condições de crescimento

Duas espécies de *Candida* e duas diferentes cepas de cada espécie foram utilizadas neste estudo. Para *C. albicans*, uma cepa foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC 10231) e a outra foi um isolado clínico oral (cepa 324LA/94) obtido da coleção de culturas da Faculdade de Odontologia de Cardiff (Cardiff, UK). Para *C.*

glabrata, uma cepa também foi obtida a partir da *American Type Culture Collection*, ATCC 90030, e a outra foi um isolado oral (cepa D1) obtido a partir do Grupo de Biofilmes do Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho (Braga, Portugal). Culturas dos microrganismos mantidas a -70 °C em glicerina foram semeadas em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (Difco, Difco Laboratories, Becton, Dickinson and Company, França) e cultivadas por 24 h a 37 °C. Em seguida, uma alçada de cada cepa, obtida das placas de ASD, foi suspensa em 30 mL de caldo Sabouraud Dextrose (Difco, Difco Laboratories, Becton, Dickinson and Company, França) e incubada por 24 h a 37°C sob agitação de 120 rpm (Tecnal TE 420, Tecnal Equipamentos para Laboratórios Ltda, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Após o período de incubação, as células foram recuperadas por centrifugação a 8000 rpm por 5 minutos. Na sequência, o *pellet* de células foi lavado duas vezes com 30 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7) e a quantidade de leveduras foi ajustada para uma concentração de 10^7 células/mL em saliva artificial com auxílio de uma Câmara de Neubauer e um microscópio óptico.

2.4. Obtenção dos espécimes de resina acrílica

Para padronização dos espécimes de resina acrílica, uma matriz metálica de aço inoxidável com moldes internos dos espécimes (10 x 10 x 3 mm) foi fixada com cera utilidade (Wilson, São Paulo, Brasil) em uma placa de vidro com superfície rugosa (para mimetizar as rugosidades palatinas). O conjunto matriz metálica + placa de vidro foi incluído em mufla metálica com gesso pedra tipo III (Herodent, Vigodent S/A Ind. e Com., Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil). Após a presa do gesso, as muflas foram separadas, a cera removida e a matriz metálica e placa de vidro limpas com acetona pura (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, São Paulo, Brasil). A resina acrílica QC-20 (Dentsply Ind. e Com. Ltda, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil) foi proporcionada, prensada diretamente no interior dos moldes da matriz e polimerizada de acordo com as instruções do fabricante. Após a polimerização, a mufla foi resfriada sobre bancada por uma noite e os espécimes desincluídos. Foi dado acabamento nos espécimes com fresa de tungstênio para remoção de rebarbas de resina acrílica. Previamente aos ensaios microbiológicos, os espécimes foram lavados três vezes em

água deionizada, secos à temperatura ambiente, embalados em folhas de papel alumínio e esterilizados em autoclave.

2.5. Formação de biofilme e tratamento com NPs

Os biofilmes foram formados sobre a superfície dos espécimes de resina acrílica. Cada espécime foi posicionado no fundo dos poços de placas de microtitulação de 24 poços (Costar, Tewksbury, EUA) contendo 1,5 mL dos inóculos preparados conforme descrito no item 2.3, para os ensaios com biofilmes simples, e 750 µL da suspensão de cada cepa (2×10^7 células/mL de *C. albicans* + 2×10^7 células/mL de *C. glabrata*) para os ensaios com biofilmes mistos. Os biofilmes cresceram por 48 horas sob duas condições diferentes de agitação: 10 e 120 rpm, ambos a 37 °C. Os meios de cultura foram renovados a cada 24 horas. Após 48 horas, o meio de saliva artificial foi removido e os biofilmes foram lavados delicadamente com PBS para remover as células não aderidas à superfície dos espécimes. Posteriormente, as NPs foram diluídas no meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) para que se obtivessem concentrações finais de 54 e 108 µg/mL. Cada diluição (1,5 mL) foi adicionada aos poços da placa de microtitulação contendo os biofilmes pré-formados e as placas foram incubadas sob agitação de 10 e 120 rpm a 37 °C por 24 horas. Como controles negativo e positivo foram utilizados o meio de cultura RPMI 1640 sem NPs e digluconato de clorexidina (DC) na concentração de 108 µg/mL, respectivamente.

2.6. Quantificação da biomassa total

A biomassa total dos biofilmes foi quantificada através do ensaio de coloração com cristal violeta (CV)²². Após o período de tratamento com as NPs, o meio de cultura foi aspirado e as células não aderidas foram removidas por meio da lavagem dos espécimes de resina acrílica com PBS. Em seguida, os biofilmes foram fixados com 1,5 mL de metanol 99% (v/v) (Sigma-Aldrich), o qual foi removido após 15 minutos de contato. As placas de microtitulação contendo os espécimes de resina acrílica secaram na temperatura ambiente e 1,5 mL de CV (1% v/v) (Merck KGaA) foi adicionado a cada poço e as placas incubadas por 5 minutos. Após, os espécimes de resina foram lavados delicadamente com água deionizada e transferidos para novas placas de

microtitulação contendo 1,5 mL de ácido acético (33% v/v) (Sigma-Aldrich), o qual foi usado para liberar e remover a coloração dos biofilmes. A absorbância da solução obtida foi lida em um leitor de microplacas (Eon Microplate Spectrophotometer; BioTek, Winooski, VT, EUA) com comprimento de onda de 570 nm e padronizada de acordo com a área dos espécimes de resina acrílica (absorbância/cm²). Foram realizados pelo menos três ensaios independentes, cada um em triplicata.

2.7. Quantificação das células cultiváveis

Após 24 horas de tratamento com as suspensões coloidais de NPs, os espécimes de resina acrílica contendo os biofilmes foram lavados com PBS, imersos em 1 mL de PBS em tubos falcon e sonicados por 30 segundos a 40 W. As suspensões obtidas foram vigorosamente agitadas em vortex por 5 minutos e, então, diluições decimais seriadas (em PBS) foram plaqueadas em ASD (para biofilmes simples) e CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Paris, França) (para biofilmes mistos) e incubadas durante 24 horas a 37°C para permitir a contagem do número de colônias (log UFC/cm²). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em três ocasiões diferentes.

2.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV foi utilizada para examinar a estrutura dos biofilmes simples e mistos formados em diferentes condições de agitação sobre a superfície dos espécimes de resina acrílica e tratados com as suspensões coloidais de NPs. Após o período de incubação, os meios de cultura foram aspirados e os espécimes lavados com PBS. Os biofilmes foram desidratados com álcool (etanol 70% por 10 minutos, etanol 95% por 10 minutos e etanol 100% por 20 minutos) e secos ao ar por 20 minutos. Posteriormente, os espécimes de resina acrílica contendo os biofilmes foram montados em *stubs* de alumínio, revestidos com ouro e observados em um microscópio eletrônico de varredura (S-360, Leo, Cambridge, EUA).

2.9. Análise Estatística

A normalidade dos dados foi verificada através do Teste Shapiro-Wilk. Na sequência, análise estatística paramétrica foi realizada para cada teste usando ANOVA a dois fatores e o Teste *post-hoc* de Tukey, usando o software do Programa SPSS (SPSS - Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago). As diferentes condições de incubação (agitação a 10 e 120 rpm) e o tipo de tratamento foram considerados como fatores de variação. Todos os testes foram realizados com nível de confiança de 95%.

3. Resultados

3.1. Quantificação da biomassa total

Os resultados da Figura 1 mostram que NPs e DC não foram efetivos na redução da biomassa total dos biofilmes simples de *C. albicans* ATCC 10231 e misto das cepas de referência, independente da condição de incubação testada (10 e 120 rpm). Entretanto, para o biofilme simples de *C. glabrata* ATCC 90030 formado sob agitação de 10 rpm, DC a 108 µg/mL e NPs nas concentrações de 108 e 54 µg/mL mostraram reduções significativas na biomassa total de 30,3 ($p < 0,001$), 69,6 ($p < 0,001$) e 54,5% ($p < 0,001$), respectivamente, quando comparados ao controle negativo. Para o biofilme simples de *C. glabrata* ATCC 90030 formado a 120 rpm, somente o tratamento com NPs a 108 µg/mL foi capaz de promover uma redução significativa (46,6%; $p = 0,003$) na biomassa, comparado ao controle negativo. Curiosamente, as condições de agitação (10 e 120 rpm) não afetaram a ação das drogas na redução da biomassa dos biofilmes simples e mistos das cepas de referência ($p > 0,05$; Figura 1).

Para os biofilmes simples de *C. albicans* 324LA/94 formados a 10 rpm (Figura 2), foi possível notar que os tratamentos com DC e NPs a 108 e 54 µg/mL reduziram significativamente a biomassa total, com reduções de 25,9 ($p = 0,001$), 20,3 ($p = 0,004$) e 18,5% ($p = 0,006$), respectivamente. Ainda para esta cepa, a condição de incubação afetou significativamente ($p < 0,05$) o efeito de todas as drogas contra os biofilmes simples, com melhores resultados para aqueles formados a 10 rpm (Figura 2). Para biofilmes simples de *C. glabrata* D1 formados com agitação de 10 e 120 rpm, os tratamentos com NPs a 108 µg/mL reduziram significativamente (65,3% - $p < 0,001$, e 44,1% - $p = 0,001$, respectivamente) a biomassa total, quando comparados aos controles negativos. Também foi possível observar diferença significativa ($p = 0.013$) na biomassa

dos biofilmes simples de *C. glabrata* D1 formados a 10 e 120 rpm e tratados com NPs na concentração de 108 µg/mL (Figura 2). Finalmente, para os biofilmes mistos dos isolados clínicos orais formados a 10 e 120 rpm (Figura 2), as maiores reduções na biomassa ocorreram quando esses biofilmes foram tratados com NPs a 108 µg/mL (52,8%, $p = 0,003$) e DC na mesma concentração (37,8%, $p = 0,008$). Ainda, os controles negativos dos biofilmes mistos diferiram entre si ($p = 0,003$), sugerindo maior produção de matriz extracelular pelo biofilme formado a 120 rpm.

3.2. Quantificação das células cultiváveis

Para biofilmes simples de *C. albicans* ATCC 10231 formados a 10 e 120 rpm, todos os tratamentos promoveram reduções significativas ($p < 0,05$) no número de UFCs, com reduções iguais ou maiores que 1,29- $\log_{10}$, comparados aos controles negativos (Figura 3). Já para os biofilmes simples de *C. glabrata* ATCC 90030 formados a 10 e 120 rpm, a atividade das drogas foi similar, e reduções significativas no número de UFCs ($\sim 1,9$ - $\log_{10}$, $p < 0,05$) foram encontradas quando esses biofilmes foram tratados com NPs e DC a 108 µg/mL (Figura 3).

Em biofilme misto, *C. albicans* ATCC 10231 a 10 rpm mostrou reduções significantes no número de UFCs ($\sim 2,5$ - $\log_{10}$, $p < 0,05$), em comparação ao controle negativo, para todas as drogas testadas (Figura 3). Entretanto, a 120 rpm, esta redução (2,48- $\log_{10}$, $p = 0,001$) foi significativa somente quando o biofilme misto foi tratado com DC na concentração de 108 µg/mL. Para *C. glabrata* ATCC 90030 em biofilme misto formado a 10 rpm, os tratamentos com DC e NPs a 108 e 54 µg/mL resultaram em reduções nas UFCs de 2,04- $\log_{10}$ ($p = 0,005$), 2,76- $\log_{10}$ ($p = 0,001$) e 1,99- $\log_{10}$ ($p = 0,006$), respectivamente, comparados ao controle negativo (Figura 3). Entretanto, para *C. glabrata* ATCC 90030 em biofilme misto a 120 rpm, somente DC e NPs na concentração de 108 µg/mL promoveram reduções significativas no número de UFCs, com reduções de 2,49- $\log_{10}$ ($p = 0,004$) e 2,76- $\log_{10}$ ($p = 0,002$), respectivamente (Figura 3). Comparações entre as diferentes condições de incubação (10 e 120 rpm) mostraram diferença significativa no número de UFCs somente para *C. albicans* ATCC 10231 em biofilme misto tratado com NPs na concentração de 54 µg/mL ($p = 0,019$) (Figura 3), com número menor de UFCs para o biofilme formado a 10 rpm.

De acordo com a Figura 4 é possível observar que, para biofilmes simples de *C. albicans* 324LA/94 formados com agitação de 10 e 120 rpm, todos os tratamentos

causaram reduções no número de UFCs iguais ou maiores que $1,56\text{-log}_{10}$ ($p < 0,05$), comparados aos controles negativos, exceto para o biofilme formado a 10 rpm e tratado com DC a $108\text{ }\mu\text{g/mL}$. Para o biofilme simples de *C. glabrata* D1 formado a 10 rpm (Figura 4), somente o tratamento com DC a $108\text{ }\mu\text{g/mL}$ resultou em redução significativa no número de UFCs ($1,66\text{-log}_{10}$, $p = 0,04$), quando comparado ao controle negativo. Contudo, para o biofilme de *C. glabrata* D1 formado a 120 rpm, DC e NPs a $108\text{ }\mu\text{g/mL}$ mostraram reduções significantes no número de UFCs de $1,88$ ($p = 0,04$) e $1,56\text{-log}_{10}$ ($p = 0,011$), respectivamente (Figura 4).

Em biofilme misto, *C. albicans* 324LA/94 a 10 rpm mostrou reduções significantes no número de UFCs ($\geq 1,39\text{-log}_{10}$, $p < 0,05$) para todas as drogas testadas, em comparação ao controle negativo (Figura 4). Entretanto, a 120 rpm, essa redução foi significativa quando o biofilme foi tratado com DC ($2,44\text{-log}_{10}$, $p = 0,02$) e NPs a $108\text{ }\mu\text{g/mL}$ ($2,03\text{-log}_{10}$, $p = 0,005$). Por sua vez, *C. glabrata* D1 em biofilme misto formado a 10 rpm revelou reduções iguais ou maiores que $1,49\text{-log}_{10}$ ($p < 0,05$) para todas as drogas testadas, enquanto a 120 rpm somente DC foi capaz de reduzir significativamente o número de UFCs ($2,73\text{-log}_{10}$, $p < 0,001$) em comparação ao controle negativo (Figura 4). Finalmente, as condições de agitação (10 e 120 rpm) não afetaram a ação das drogas na redução do número de UFCs dos biofilmes simples e mistos dos isolados clínicos orais ($p > 0,05$; Figura 4).

3.3. Estrutura dos biofilmes

A Figura 5 mostra a estrutura dos biofilmes simples (sem tratamento) de *C. albicans* 324LA/94 e *C. glabrata* 90030 formados sob agitação de 10 e 120 rpm. Para *C. albicans* 324LA/94, foi possível notar maior quantidade de matriz extracelular no biofilme formado sob agitação de 120 rpm (Figura 5IIA), enquanto para *C. glabrata* 90030 as diferentes condições de incubação durante a formação de biofilme parecem não ter afetado a quantidade de matriz extracelular produzida (Figuras 5IB e IIB).

Como somente os biofilmes mistos dos isolados clínicos orais formados a 10 e 120 rpm exibiram diferença significativa na biomassa total entre os controles negativos (Figura 2), esses biofilmes foram escolhidos para serem analisados através da MEV após tratamento com DC e NPs. De acordo com a figura 6, os biofilmes mistos não tratados dos isolados clínicos orais (*C. albicans* 324LA/94 + *C. glabrata* D1) formados sob agitação de 10 (Figura 6IA) e 120 rpm (Figura 6IIA) mostraram uma rede densa de

células fúngicas ovais e alongadas presas na matriz extracelular. No entanto, o biofilme formado a 10 rpm (Figura 6IA) apresentou menor quantidade de matriz extracelular do que aquele formado a 120 rpm (Figura 6IIA). Quando os biofilmes mistos formados a 10 rpm foram tratados com DC (Figura 6IB), NPs a 108 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6IC) e NPs a 54 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6ID), os biofilmes resultantes mostraram uma camada mais fina de leveduras do que o grupo controle negativo, com poucas hifas e cobrindo parcialmente a superfície dos espécimes de resina.

No que diz respeito à estrutura dos biofilmes mistos formados a 120 rpm, foi possível notar que os tratamentos com DC (Figura 6IIB) e NPs a 108 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6IIC) resultaram em biofilmes ligeiramente menos compactos do que o controle negativo, sugerindo uma menor quantidade de matriz extracelular, e compostos por uma rede de leveduras e hifas cobrindo a superfície. Após o tratamento com NPs na concentração de 54 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6IID), as células fúngicas sintetizaram maiores quantidades de matriz extracelular e permaneceram presas nesta matriz, resultando em um biofilme mais compacto do que aqueles resultantes dos tratamentos com DC (Figura 6IIB) e NPs a 108 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6IIC).

4. Discussão

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos. Entre os mais importantes está a presença da matriz extracelular, a qual pode limitar ou impedir o acesso das drogas nas camadas mais profundas dos biofilmes. A síntese de matriz extracelular durante a formação de biofilme é altamente dependente das condições de incubação^{10,28}. Sob condições estáticas, a síntese de matriz é mínima, sendo realçada quando os biofilmes são formados sob condições dinâmicas²⁸. Assim, esses aspectos foram explorados para verificar se a quantidade de matriz extracelular interferiria na atividade antifúngica das NPs contra biofilmes simples e mistos de espécies de *Candida*. Nesse sentido, a susceptibilidade às NPs em diferentes concentrações foi comparada após formação dos biofilmes com agitação de 10 e 120 rpm, e os resultados não permitiram aceitar totalmente a hipótese de nulidade.

No presente estudo, o ensaio de coloração com CV foi usado para quantificar a biomassa total, já que NPs e DC podem ter agido diretamente sobre a matriz extracelular dos biofilmes. Os resultados mostraram que, para os biofilmes das cepas de referência (Figura 1), todas as drogas testadas causaram reduções significativas na biomassa total somente para o biofilme simples de *C. glabrata* ATCC 90030, principalmente a 10 rpm, com melhor efeito para as NPs em comparação ao DC. Como tem sido demonstrado em vários estudos^{29,30}, biofilmes de *C. glabrata* apresentam espessura reduzida, são desprovidos de hifas e menos complexos do que os biofilmes de *C. albicans*. Assim, essas características podem ter facilitado a ação das drogas na redução da biomassa total dos biofilmes simples de *C. glabrata* ATCC 90030. Apesar disso, a susceptibilidade às NPs dos biofilmes simples e mistos das cepas de referência não foi afetada pelas condições de incubação (10 e 120 rpm) (Figura 1). Este resultado pode ser confirmado pelos valores de biomassa total dos controles negativos dos biofilmes formados a 10 e 120 rpm, os quais não diferiram entre si (Figura 1). Desta forma, para as cepas de referência, a maior velocidade de agitação (120 rpm) não foi suficiente para produzir maior quantidade de matriz extracelular em comparação à menor velocidade de agitação (10 rpm). Ainda, a produção de matriz extracelular depende das espécies de cepas testadas. A Figura 5 mostra que a condição de incubação foi decisiva na quantidade de matriz produzida por *C. albicans* 324LA/94, enquanto para *C. glabrata* ATCC 90030 este fenômeno não foi observado.

Para os isolados clínicos orais (Figura 2), foi possível observar menor biomassa total para os controles negativos dos biofilmes simples e mistos formados a 10 rpm, comparados com aqueles formados a 120 rpm, embora somente para o biofilme misto tenha ocorrido diferença significativa entre as duas condições de incubação. Como consequência deste fato, certos tratamentos foram mais efetivos a 10 rpm do que a 120 rpm (Figura 2). Esses achados podem ser um indicativo de menor quantidade de matriz extracelular produzida pelos isolados orais a 10 rpm, o que estaria facilitando a penetração de NPs e DC dentro dos biofilmes. As substâncias poliméricas extracelulares comportam-se como verdadeiras barreiras para a difusão dos agentes antimicrobianos, com capacidade para se ligarem ionicamente a eles, reduzindo, consequentemente, a bio-disponibilidade dos mesmos³¹. No caso das NPs, interações entre partículas e microrganismos em biofilmes induzem agregação de nanopartículas²⁶. De acordo com Stewart & Franklin³², a concentração de oxigênio, o tipo de substrato, o pH e a

composição dos biofilmes podem influenciar a agregação de NPs e, consequentemente, sua difusão e efeito sobre os mesmos.

Com relação ao efeito das NPs e DC sobre as células cultiváveis, foi observado que, no geral, seus efeitos contra biofilmes simples e mistos das cepas de referência e dos isolados clínicos orais foram similares (Figuras 3 e 4). Isso corrobora os resultados encontrados para a estrutura dos biofilmes (Figura 6). Assim, embora as imagens de MEV não sejam representativas do total da amostra, elas sugerem que, independente da droga usada, o efeito sobre a estrutura dos biofilmes mistos dos isolados orais (formados a 10 e 120 rpm) foi similar. O DC age através do rompimento da membrana celular das leveduras, promovendo alteração na permeabilidade celular e perda dos constituintes intracelulares³³. Por outro lado, o mecanismo de ação das NPs é multifatorial. Essas nanopartículas podem se ligar a grupamentos sulfúricos presentes nas proteínas das membranas celulares causando defeitos (póros) nas mesmas, interagir com fosfatos da molécula de DNA (prevenindo a reprodução celular), e atacar enzimas da cadeia respiratória promovendo a morte celular^{14,34}. Além disso, a maior razão de área de superfície por volume das NPs proporciona melhor interação entre nanopartículas e células³⁵. Consequentemente, é possível que os efeitos semelhantes verificados para NPs e DC tenham ocorrido devido aos diferentes e similares locais de ação das drogas sobre as células dos biofilmes.

Outra constatação importante do presente estudo foi que as comparações das diferentes condições de incubação (10 e 120 rpm) durante a formação dos biofilmes não mostraram diferenças significativas na redução do número de UFCs para todos os biofilmes (Figuras 3 e 4), exceto para *C. albicans* ATCC 10231 em biofilme misto tratado com NPs na concentração de 54 µg/mL (Figura 3). Para investigar se a matriz extracelular desempenha um papel na resistência dos biofilmes aos agentes antifúngicos, Baillie & Douglas¹⁰ compararam o perfil de susceptibilidade de biofilmes de *Candida* formados estaticamente (com menor produção de matriz) com seus homólogos formados sob agitação (com maior produção de matriz). Esses autores verificaram que os biofilmes formados estaticamente ou sob agitação não diferiram em susceptibilidade aos agentes antifúngicos testados, sugerindo que a resistência dos biofilmes não está relacionada à quantidade de matriz extracelular produzida¹⁰. Contudo, estudos^{36,37} que utilizaram a formação dinâmica de biofilmes demonstraram que as células ressuspensas (com grande perda de matriz extracelular) foram 20% menos resistentes à anfotericina B do que os biofilmes intactos de *C. albicans*,

indicando que a matriz pode contribuir para a resistência às drogas. Acredita-se que o mecanismo pelo qual os microrganismos adquirem resistência seja multifatorial, incluindo, além da presença da matriz extracelular, a heterogeneidade, a atividade metabólica diminuída, a expressão alterada de alguns genes, a presença de células persistentes e a maior capacidade anti-oxidativa^{8,30,38}.

Por outro lado, o presente estudo mostrou que mesmo em biofilmes mistos de duas espécies, o número de células cultiváveis de cada espécie não foi afetado (Figuras 3 e 4). *C. glabrata* apresenta diferenças significantes em relação a *C. albicans*, incluindo o tamanho da célula, sua morfologia e bioquímica. As células de *C. glabrata* são menores (1-4 μm) do que as de *C. albicans* (4-6 μm), não formam hifas e têm um espectro mais estreito de utilização de carboidratos³⁹. Portanto, uma possível explicação para a ocorrência frequente de co-infecção com *C. albicans* e *C. glabrata* é que essas diferenças limitam a competição entre as espécies, permitindo que os microrganismos ocupem nichos orais similares. Este fato pode ter implicações clínicas importantes quanto ao potencial patogênico dessas espécies.

Finalmente, os resultados deste estudo permitem concluir que a quantidade de matriz extracelular afetou diferentemente a biomassa total e o número de células cultiváveis dos biofilmes de *Candida*. Para estas células, biofilmes formados sob diferentes condições de incubação (10 e 120 rpm) não apresentaram diferenças na susceptibilidade às NPs. Ainda, a quantidade de matriz produzida pode depender da velocidade de agitação durante a formação de biofilme e das espécies e cepas testadas. Tendo em vista o efeito inibitório das NPs contra os biofilmes simples e mistos das espécies de *Candida*, seu uso como um tratamento alternativo para prevenir ou controlar as candidoses orais (particularmente aquelas envolvendo biofilmes formados em resina acrílica) deve ser considerado em terapias futuras.

5- Referências

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318-1322.
2. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167-193.
3. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98:53-59.
4. Jeganathan S, Lin CC. Denture stomatitis – a review of the aetiology, diagnosis and management. *Aust Dent J* 1992;37:107-114.
5. Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res* 2007;86:204-215.
6. Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:377-383.
7. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, Ghannoum MA. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res* 2001;80:903-908.
8. Mah, TF, O'Toole, GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001;9:34-39.
9. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol* 2007;189:7945-7947.
10. Baillie GS, Douglas LJ. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:397-403.
11. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:588-594.

12. Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, Cleary IA, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia* 2010;169:323-331.
13. Brown MR, Gilbert P. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J Appl Bacteriol.* 1993;74 Suppl:87S-97S.
14. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, Ruvollo-Filho AC, de Camargo ER, Barbosa DB. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:103-110.
15. Allaker RP. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *J Dent Res* 2010; 89:1175-1186.
16. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, de Camargo ER, Ruvolo Filho AC, Barbosa DB. Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles. *J Prosthodont* doi: 2011;10.1111/j.1532-849X.2011.00772.x.
17. Sondi I, Sondi BS. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 2004;275:177-182.
18. Kim KJ, Sung WS, Suh BK, Moon SK, Choi JS, Kim JG, Lee DG. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biometals* 2009;22:235-242.
19. Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, Schlager JJ. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B* 2008;112:13608-13619.
20. AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 2009;3:279-290.
21. Costa CS, Ronconi JV, Daufenbach JF, Gonçalves CL, Rezin GT, Streck EL, Paula MM. In vitro effects of silver nanoparticles on the mitochondrial respiratory chain. *Mol Cell Biochem* 2010;342:51-56.

22. Monteiro DR, Gorup LF, Silva S, Negri M, de Camargo ER, Oliveira R, Barbosa DB, Henriques M. Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against *Candida albicans* and *Candida glabrata* adhered cells and biofilms. *Biofouling* 2011;27:711-719.
23. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc* 1951;11:55-75.
24. Gorup LF, Longo E, Leite ER, Camargo ER. Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich method. *J Colloid Interface Sci* 2011;360:355-358.
25. Monteiro DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, de Camargo ER, Oliveira R, Barbosa DB, Henriques M. Silver nanoparticles: influence of stabilizing agent and diameter on antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Lett Appl Microbiol* 2012;54:383-391.
26. Monteiro DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, de Camargo ER, Oliveira R, Barbosa DB, Henriques M. Silver colloidal nanoparticles: effect on matrix composition and structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *J Appl Microbiol* 2013;114:1175-1183.
27. Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Formation of *Candida albicans* biofilms on non-shedding oral surfaces. *Eur J Oral Sci* 2003;111:465-471.
28. Hawser SP, Baillie GS, Douglas LJ. Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol* 1998;47:253-256.
29. Samaranayake YH, Ye J, Yau JY, Cheung BP, Samaranayake LP. *In vitro* method to study antifungal perfusion in *Candida* biofilms. *J Clin Microbiol* 2005;43:818-825.
30. Seneviratne CJ, Wang Y, Jin L, Abiko Y, Samaranayake LP. Proteomics of drug resistance in *Candida glabrata* biofilms. *Proteomics* 2010;10:1444-1454.
31. Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol* 2011;3:5771.
32. Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:199-210.

33. Kuyyakanond T, Quesnel LB. The mechanism of action of chlorhexidine. FEMS Microbiol Lett 1992;79:211-215.
34. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnol Adv 2009;27:76-83.
35. Baker C, Pradhan A, Pakstis L, Pochan DJ, Shah SI. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. J Nanosci Nanotechnol 2005;5:244-249.
36. Baillie GS, Douglas LJ. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:1900-1905.
37. Baillie GS, Douglas LJ. Iron-limited biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to amphotericin B. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:2146-2149.
38. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. Eukaryot Cell 2005;4:633-638.
39. Fidel PL, Jr., Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clin Microbiol Rev 1999;12:80-96.

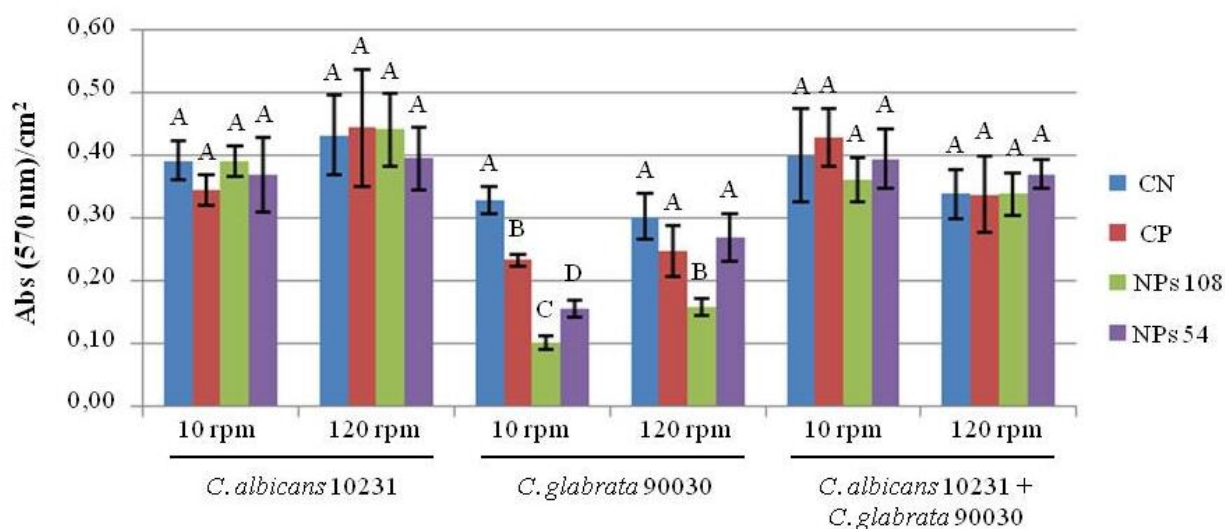


Figura 1. Valores médios de absorbância por cm^2 obtidos com o ensaio de cristal violeta para biofilmes simples e mistos das cepas de referência de *C. albicans* e *C. glabrata* formados sob agitação de 10 e 120 rpm, e tratados com nanopartículas de prata (NPs) nas concentrações de 108 (NPs 108) e 54 $\mu\text{g/mL}$ (NPs 54). CN = controle negativo (biofilmes expostos ao meio de cultura RPMI 1640 sem NPs). CP = controle positivo (biofilmes tratados com digluconato de clorexidina a 108 $\mu\text{g/mL}$). As barras de erros representam os desvios padrões das médias. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significantes ($p < 0,05$; teste de Tukey) no efeito das drogas para cada biofilme isolado

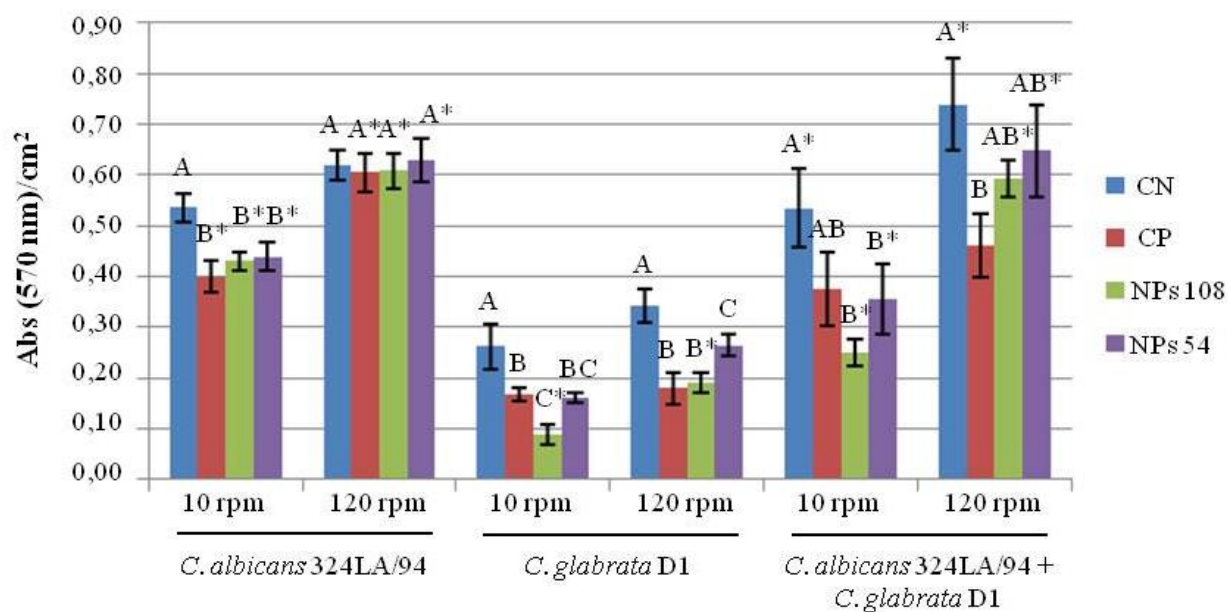


Figura 2. Valores médios de absorbância por cm² obtidos com o ensaio de cristal violeta para biofilmes simples e mistos dos isolados clínicos orais de *C. albicans* e *C. glabrata* formados sob agitação de 10 e 120 rpm, e tratados com nanopartículas de prata (NPs) nas concentrações de 108 (NPs 108) e 54 µg/mL (NPs 54). CN = controle negativo (biofilmes expostos ao meio de cultura RPMI 1640 sem NPs). CP = controle positivo (biofilmes tratados com digluconato de clorexidina a 108 µg/mL). As barras de erros representam os desvios padrões das médias. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significantes ($p < 0,05$; teste de Tukey) no efeito das drogas para cada biofilme isolado. *Diferença significativa, para um mesmo tratamento, quando os biofilmes formados a 10 e 120 rpm foram comparados

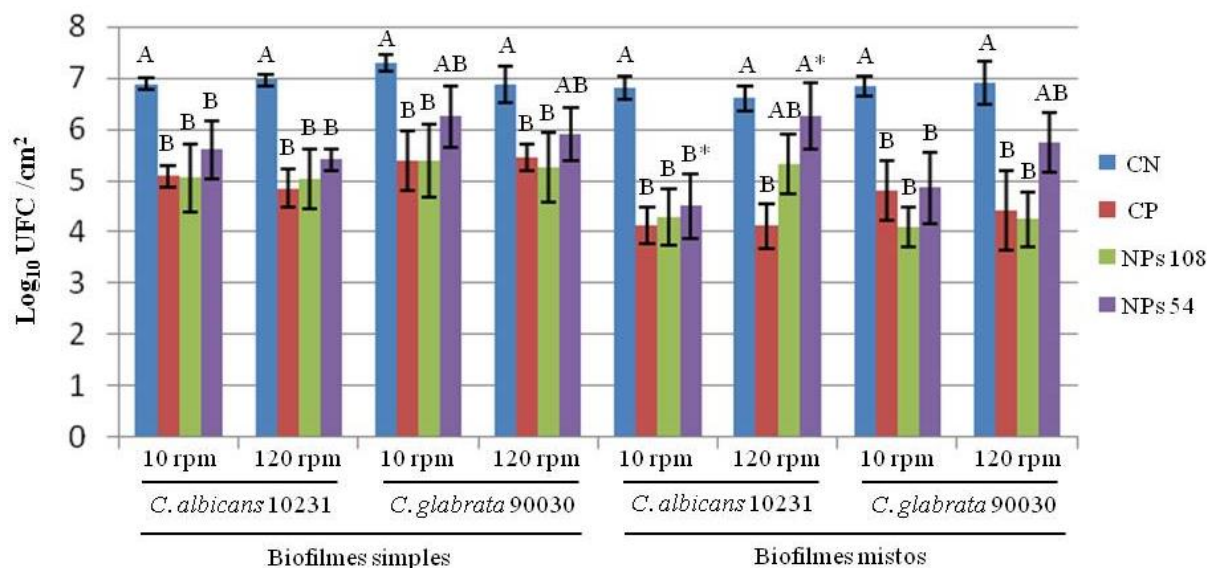


Figura 3. Valores médios do logaritmo das unidades formadoras de colônias (UFC) por cm² para os biofilmes simples e mistos das cepas de referência de *C. albicans* e *C. glabrata* formados sob agitação de 10 e 120 rpm, e tratados com nanopartículas de prata (NPs) nas concentrações de 108 (NPs 108) e 54 µg/mL (NPs 54). CN = controle negativo (biofilmes expostos ao meio de cultura RPMI 1640 sem NPs). CP = controle positivo (biofilmes tratados com digluconato de clorexidina a 108 µg/mL). As barras de erros representam os desvios padrões das médias. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significantes ($p < 0,05$; teste de Tukey) no efeito das drogas para cada biofilme isolado. *Diferença significativa, para um mesmo tratamento, quando os biofilmes formados a 10 e 120 rpm foram comparados

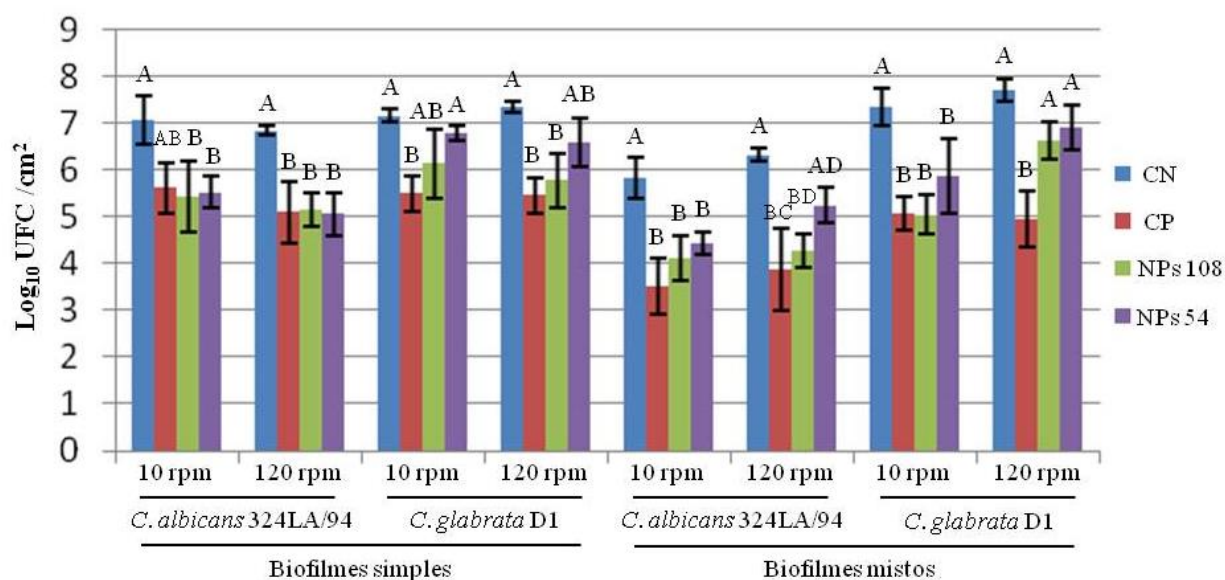


Figura 4. Valores médios do logaritmo das unidades formadoras de colônias (UFC) por cm² para os biofilmes simples e mistos dos isolados clínicos orais de *C. albicans* e *C. glabrata* formados sob agitação de 10 e 120 rpm, e tratados com nanopartículas de prata (NPs) nas concentrações de 108 (NPs 108) e 54 µg/mL (NPs 54). CN = controle negativo (biofilmes expostos ao meio de cultura RPMI 1640 sem NPs). CP = controle positivo (biofilmes tratados com digluconato de clorexidina a 108 µg/mL). As barras de erros representam os desvios padrões das médias. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significantes ($p < 0,05$; teste de Tukey) no efeito das drogas para cada biofilme isolado.

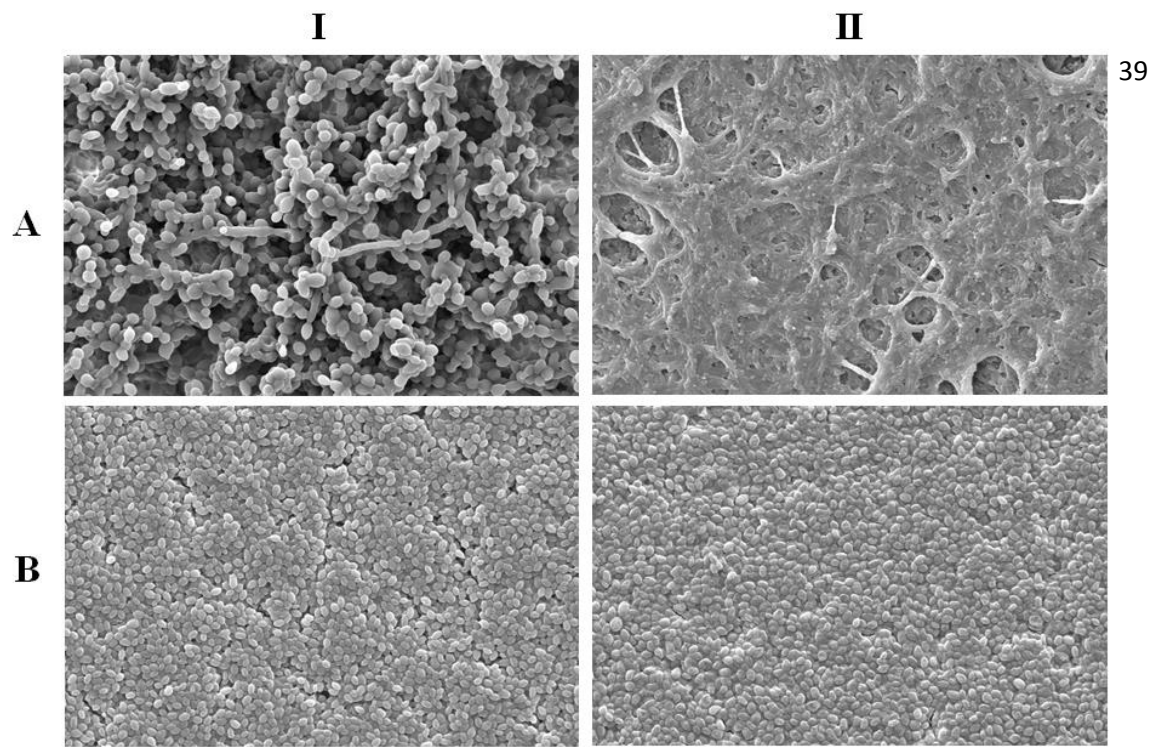


Figura 5. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da estrutura dos biofilmes de *C. albicans* 324LA/94 (A) e *C. glabrata* ATCC 90030 (B) formados sob agitação de 10 (I) e 120 rpm (II). Magnificação: x 1000

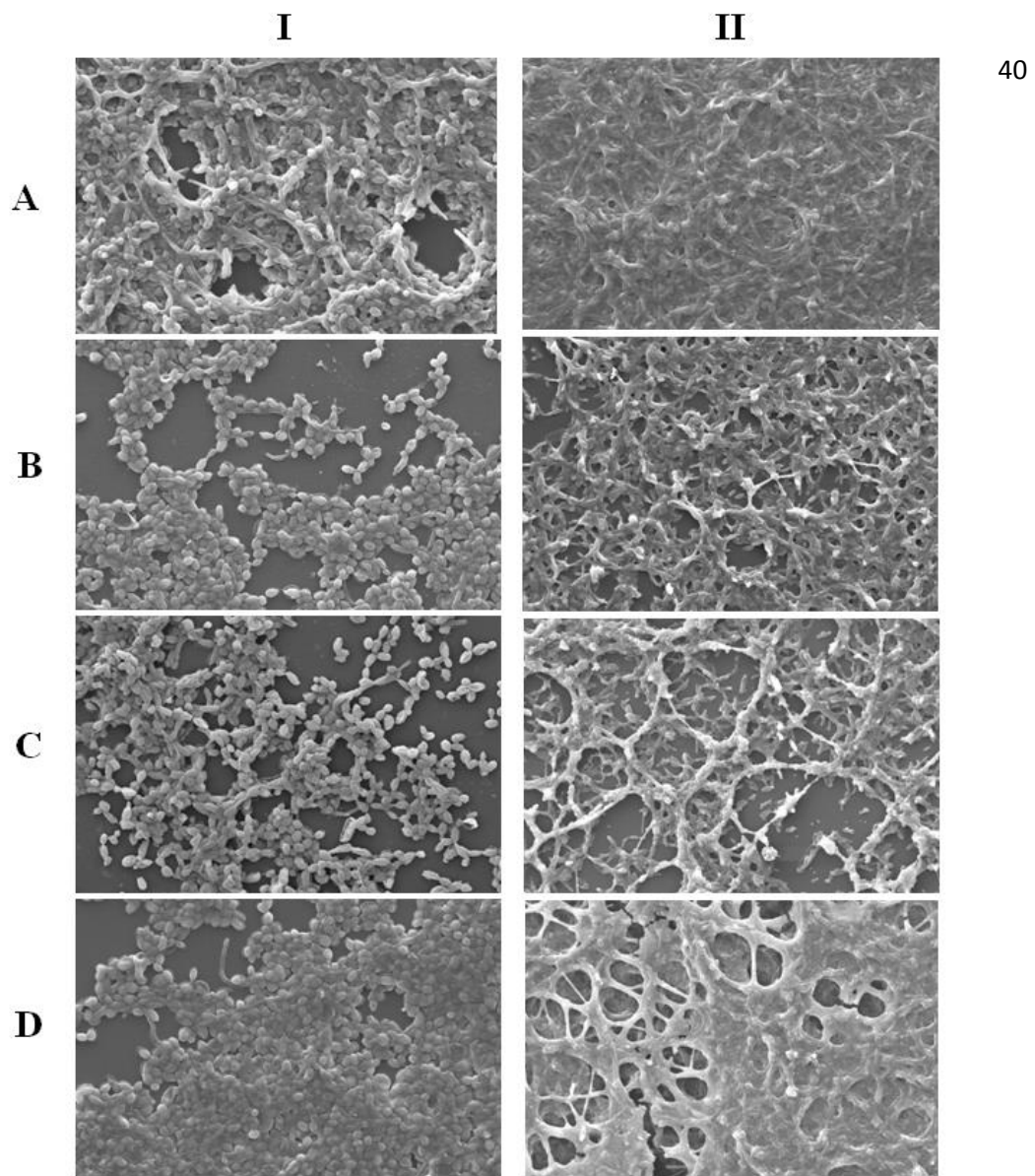


Figura 6. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da estrutura dos biofilmes mistos dos isolados clínicos orais (*C. albicans* 324LA/94 + *C. glabrata* D1) formados sob agitação de 10 (I) e 120 rpm (II). (A) controle negativo (biofilmes expostos ao meio de cultura RPMI 1640 sem nanopartículas de prata (NPs)). (B) controle positivo (biofilmes tratados com digluconato de clorexidina a 108 µg/mL). (C) biofilmes tratados com NPs a 108 µg/mL. (D) biofilmes tratados com NPs a 54 µg/mL. Magnificação: x 1000