

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
tese será disponibilizado
somente a partir de 16/01/2021.

Laís Salomão Arias

**Síntese e avaliação dos efeitos de um
nanocarreador de miconazol sobre
microrganismos orais**

ARAÇATUBA - SP

2020

Laís Salomão Arias

**Síntese e avaliação dos efeitos de um
nanocarreador de miconazol sobre
microrganismos orais**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciência Odontológica – Área Saúde Bucal da Criança.

Orientador: Prof. Dr. Douglas Roberto Monteiro

Coorientadores: Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Prof. Assoc. Juliano Pelim Pessan

ARAÇATUBA - SP

2020

Catálogo-na-Publicação

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Arias, Laís Salomão.

A696s Síntese e avaliação dos efeitos de um nanocarreador de miconazol sobre microrganismos orais / Laís Salomão Arias. - Araçatuba, 2020
154 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia, Araçatuba

Orientador: Prof. Douglas Roberto Monteiro

Coorientador: Prof. Juliano Pelim Pessan

Coorientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

1. Biofilmes 2. Candida 3. Miconazol 4. Nanopartículas
5. Óxido ferroso-férrico 6. Quitosana I. T.

Black D27

CDD 617.645

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dados Curriculares

LAÍS SALOMÃO ARIAS

Nascimento	07/06/1990 Campo Grande-MS
Filiação	Edison Rubens Arrabal Arias Sônia Maria Salomão Arias
2008/2011	Curso de graduação em Odontologia na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
2012/2014	Residência em Odontopediatria na Universidade Estadual de Londrina
2014/2016	Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica – área Saúde Bucal da Criança, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP
2016/2020	Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica – área Saúde Bucal da Criança, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP, com período sanduíche na University of Glasgow (2018/2019)
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica IADR - International Association for Dental Research

Dedicatória

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Edison e Sônia

Pelo apoio em todos os momentos difíceis, pelo exemplo de bondade e dedicação, pelos olhares atentos às minhas necessidades mais do que às minhas vontades. Por me ensinarem a ter firmeza de caráter e a levantar frente às dificuldades sempre com muita humildade. Finalmente, por me ensinarem o caminho para uma fé na qual a vida é plena. Não poderia ter tido melhor berço.

Amo e admiro muito vocês!

À minha irmã, Juliana

Por ser minha companheira. Por regozijar-se pelos mesmos gostos, argumentar desgostos, dividir madrugadas filosóficas de conversas e me assegurar de que não estou sozinha e de que a melhor escolha da minha vida foi ter pedido que viesse ao mundo para 'brincar' comigo. Eu tenho muito orgulho da sua dedicação em tudo e de como já caminha sozinha em sua jornada pela vida. E fico igualmente feliz quando posso te ajudar com conselhos ou quando os seus conselhos me confortam. Obrigada por, lá no céu, ter escolhido ser minha irmã. Amo você.

À minha avó Helena (in memoriam)

Por viver o amor. Ser exemplo. Ser fé. Ser vida. Ser bondade. Ser carinho. Ser sabedoria. Ser vó. Ser mãe. Ser todos os recursos que nunca me faltaram. Exemplo é isso: ser por alguém. Tudo isso me ensinou e marcou minha vida para sempre. Nada é mais forte, nem mais bonito do que este legado. Não importa quanto tempo passe, sempre me lembrarei de você com muito carinho e esperança. Minha meta é poder algum dia, servir de exemplo para alguém.

Vó Helena, mulher de fé. Tenho saudades e vou amá-la sempre.

Agradecimentos Especiais

Agradecimentos especiais

A Deus

Pela minha vida, família e saúde. Pela proteção recebida a todo momento, por guiar meus passos pelos melhores caminhos e por me conferir a centelha que vem de ti e que pulsa e gera todas as coisas. Agradeço pelo constante aprendizado que a vida me proporciona e que me faz repensar conceitos com a mesma frequência em que aumento meu conhecimento de ti e de mim mesma. Espero não falhar nos seus planos assim como nunca falhou nos meus. Obrigada por todas as pessoas maravilhosas que colocou no meu caminho e pelo amparo que recebi nas horas mais difíceis.

À minha família

Por me apoiarem, me amarem e por serem os maiores torcedores da minha vida. Por se tornarem meu motivo de querer ser cada dia mais e melhor. Por todas as orações, e por serem a minha estrutura e meu chão forte. Muito obrigada, amo muito vocês.

Ao meu coorientador , Prof. Juliano Pessan

Por ser mais que um simples co-orientador, não só para mim, mas para todos no nosso departamento. Agradeço por me ensinar tantas coisas além das disciplinas. Por dividir suas experiências e por tirar do seu tempo tão corrido para ouvir com sincera atenção as minhas dificuldades e tentar solucionar minhas barreiras. Sem O-Juliano não haveria Doutorado Sanduíche, não haveria defesa e também não haveria A-Laís. Serei sempre grata por toda a paciência e acolhimento, e pela amizade nos anos de Araçatuba. Admiro seu profissionalismo e a sua dedicação em tudo o que acredita. Você é um membro fundamental na equipe FOA-UNESP e um modelo para mim e para todos os alunos. Vou levar seu exemplo comigo aonde eu for. Muito obrigada!

Ao meu coorientador , Prof. Alberto Delbem

Gratidão por sempre ajudar à todos e querer ver prosperar cada membro do nosso departamento. Obrigada por nos mostrar este exemplo de profissional que une competência e trabalho em equipe com uma grande humildade. Isso faz todos nos admirarmos e nos espelharmos. Sei que é uma pessoa de poucas palavras. Mas há quem diga que "o silêncio é o grande elemento onde as grandes coisas se formam". Não há dúvidas de que por trás desse silêncio, há uma mente observadora e cientista peculiar, que nos ensina que a grandeza do homem está em seu propósito. Questionar, duvidar e confrontar é o que traz grandes mudanças na história. Obrigada por viver e nos ensinar diariamente esse exemplo de grandeza.

Ao meu orientador Douglas Roberto Monteiro

Há 5 anos sou grata por ter me acolhido com tamanha humildade e vontade de compartilhar seus conhecimentos. Agradeço por ter me ensinado desde o início, embora eu não tivesse experiência alguma com o laboratório ou com a pós-graduação. Agradeço pelo tempo e atenção sempre redobrada que dedica à minha orientação, e por toda a paciência que sempre teve comigo. Agradeço principalmente por sempre acreditar em mim, muitas vezes mais do que eu acredito em mim mesma. Isso pode parecer pouco, mas fez toda a diferença e me ajudou em cada passo até aqui. Não é à toa que com tom carinhoso, e um pouco de desespero e desabafo te chamamos de "mestre". É sempre a pessoa mais calma e confiável a quem recorremos para buscar de volta o nosso caminho. Agradeço a amizade, risadas, confiança, conselhos e ensinamentos em todos esses anos. Te admiro demais e espero algum dia ser metade do profissional e pessoa que você é. Levarei esse "mestre" no meu coração pra sempre. Meu muito obrigada!

Ao Prof. Robson

Agradeço por ser um exemplo de professor. Sua dedicação ao ensino, aos pacientes e aos alunos realmente nos inspiram para sermos profissionais cada vez melhores e para ajudarmos cada vez mais pessoas. Muito obrigada por mostrar que isso é possível, fundamental e transformador!

Aos demais professores da FOA-UNESP

Sou sempre grata por todos os ensinamentos. Foi uma honra aprender com todos que conheci e presenciar a enorme competência e capacidade de cada um. Essa equipe é gigante em conhecimento e em coração. Eu tenho orgulho de todos os anos que compartilhei com vocês. Muito obrigada!

Ao Francisco Nunes de Souza Neto¹ e Andressa Kubo (Universidade Federal de São Carlos - UFSCar)

Muito obrigada pela amizade, parceria e a incrível conexão do nosso grupo. Muita gratidão por dividirem seu conhecimento e nos auxiliarem na síntese e caracterização do nanosistema utilizado neste estudo.

Aos meus amigos de Araçatuba...

Ao Renan Aparecido Fernandes e Gabriela Fernandes

Quero agradecer essa dupla por caminhar comigo desde o mestrado e mostrar que a insegurança proporcionada por novas mudanças pode nos trazer as pessoas mais queridas, as risadas mais genuínas e as amizades mais preciosas. Deus foi muito bom por colocá-los em meu caminho. Muito obrigada por tudo!

À Luhana

Por ter sido companheira de apartamento, de conversas até mais tarde, de jantinhas aleatórias no meio da semana, de muitos bolos de banana deliciosos, tortas de legume e filminhos nas tardes de domingo. Por ter sido minha família por todo o tempo que passamos juntas. Saudades de você. Muito obrigada por tudo!

Ao Igor Zen

Por ter aceitado ser meu inesperado segundo companheiro de apartamento. Por ser sempre tão atencioso e querido. Por ter se dedicado nas limpezas semanais ao som de esquisitas músicas da rádio Disney, por ser meu parceiro de assistir Master Chef Brasil e por além de aturar, se esforçar em aprender as minhas frases de efeito em japonês. Agradeço tanto por ser essa pessoa sincera, espontânea e agradeço por todo o empenho em manter o contato ainda quando fui morar fora do país. Sem dúvidas, isso significou demais pra mim e me ajudou em momentos bem difíceis. Que nossa amizade seja para sempre. Muito obrigada!

À Ana Paula Vieira

Obrigada por ser minha amizade tranquila. Obrigada por nossa troca de xingamentos, sinceridades e verdades que no fim das contas é mais carinhosa do que as palavras corriqueiras de muitas pessoas. Obrigada por se preocupar genuinamente comigo. Obrigada por ter caminhado junto a mim em uma parte bem difícil da nossa pesquisa. O tempo nos traz entendimento. Entendo hoje que Deus me deu você para que eu chegasse sã até aqui. Muito obrigada por tudo, minha amiga!

À Mayra Frasson

Por sua forma de lidar com a vida e suas palavras que sempre trazem conforto. A forma como você cultivava suas amizades e encara os problemas é maravilhosa e sempre me ajudou muito. Quero agradecer em especial pela presença que você marcou no tempo que eu estive fora do país. Você e o Igor sempre lembraram de mim, queriam saber como eu estava e me fizeram muito mais feliz. A experiência de não estar na nossa terra pode às vezes causar bastante medo e solidão. Vocês foram uma luz cálida que espantou as indecisões e me ajudou a viver mais plenamente essa experiência. Da mesma forma, pode contar comigo sempre, muito obrigada!

À Amanda Andolfatto

Deus é tão bom que mesmo na reta final do doutorado me brindou com pessoas muito incríveis, do tipo que a sua alma reconhece a bondade e firmeza

de caráter. Você é uma delas e não importa termos passado pouco tempo juntas, parece que nos conhecemos há muito tempo e espero que a distância não seja obstáculo para nossa amizade. Você por perto é luz na minha vida, muito obrigada amiga!

À Nayara, Heitor, Tata, Priscila e Francienne

Fico muito feliz e agradecida por ter amigos maravilhosos, de bem com a vida e bom coração. Essa "turma do cortiço" é simplesmente fantástica. Por todas as jantinhas, saídas e trocas de risadas que vocês proporcionam à todos: muito obrigada sempre!

À Thayse, Caio, Karina e Leonardo

Obrigada pelos intervalos de café, pelo jeito espontâneo que vocês tem e que me faz dar muitas risadas e pelo exemplo de alunos dedicados e companheiros. Que bom passar o tempo com vocês. Nosso laboratório é ainda mais incrível quando estão lá. Muito obrigada!

Aos demais alunos do Departamento de Odontopediatria

Fico feliz por dizer que nosso departamento está em boas mãos e cheios de alunos dedicados e com muito potencial. Obrigada pela presença e auxílio de cada um que me ajudou a chegar até aqui. Todos foram fundamentais. Que orgulho dessa equipe! Muito obrigada.

Aos meus amigos de Glasgow...

À Jamilli Medeiros

Tenho tanto a te agradecer. Foi minha primeira amiga do "estrangeiro". Foi minha confidente, companheira de viagens e passeios e de tentativas de jantinhas brasileiras na Escócia. O nosso tempo juntas foi curto, mas intenso e me ajudou como ninguém a passar por essa incrível experiência. Novamente

*só tenho a agradecer à Deus por colocá-la em meu caminho. Obrigada demais
por sua amizade!*

À Aline Ribeiro

*Não tenho nem palavras para te agradecer amiga. Você é um exemplo enorme de profissional e eu tenho um orgulho enorme de você. Obrigada por todos os "perrengues" que passamos juntas, pelas coisas incríveis que vivenciamos e por cultivar nossa amizade que agora é pra vida inteira, afinal, virei sua "cumadre, uai". Ao refletir sobre o meu período de Doutorado e o último ano, vejo que só tenho o que agradecer pelo apoio de pessoas incríveis como você.
Muito obrigada por tudo!*

À Francesca Picarella e Laura Tramarin

A amizade de vocês só me trouxe risadas e muita alegria. Essa interação Brasil x Itália é poderosa e me enriqueceu com muita cultura, música, alegria e sonhos. Obrigada pelo Natal que passamos juntas e por todo o carinho com essa brasileira. Meu doutorado no exterior com vocês foi muito mais bonito.

À Khawlah Albashaireh

Khawlah, muito obrigada por ser mais que uma irmã para mim no tempo que passamos juntas. É incrível perceber que nem a barreira de línguas, religião ou cultura pode impedir uma amizade verdadeira. Sinto muito sua falta. Obrigada pelo apoio e por me fazer conhecer novas perspectivas. Nossa amizade só me trouxe crescimento e eu sou muito grata.

À Abeer, Om Alkihir, Sumaya e Inas

Agradeço demais pela amizade, pelos ensinamentos, pelas risadas, pelas comidas caseiras incríveis, pelo compartilhamento de cultura e por tamanho carinho e empatia por esta brasileira. Que bom olhar pra trás e lembrar que eu tinha vocês! Obrigada por tudo.

**À Sudhanvi, Rebecca, Zain, Vageesh , Merryn, Nishtha, Queenie, Weiyi
and Charlotte**

*Esse grupo foi fantástico e me recebeu tão bem. Obrigada pela amizade e por
dividirmos tanta cultura e experiências juntos!*

Ao Jason Brown e Ryan Kean

*Muito obrigada por me receberem tão bem, lidarem com a diferença de
sotaques e cultura e se empenharem com tanto zelo na tarefa de me ensinar e
guiar nos protocolos laboratoriais, apresentações, artigos e pesquisas do
Departamento de Ciências Orais da Universidade de Glasgow. Foi incrível e
enriquecedor aprender com vocês.*

Agradecimentos

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

*na pessoa de seu diretor **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara**, pela oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal e profissional.*

Ao atual coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra, pelo trabalho, competência e acessibilidade.

Ao Departamento de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

pela oportunidade da realização do meu doutorado e aos professores e funcionários pelo convívio tão agradável.

Às funcionárias da seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Valéria, Cristiane e Lilian, pela presteza, apoio e suporte durante todo esse tempo.

À todos os funcionárias da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

pela convivência, dedicação e trabalho duro para manter a nossa Instituição, muito obrigada!

Aos queridos Pós-graduandos do Departamento de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

pela amizade, convivência agradável e auxílio mútuo que proporcionaram um ambiente maravilhoso de intenso crescimento pessoal e profissional.

**Ao Professor Dr. Emerson Camargo e equipe da Universidade Federal de
São Carlos (UFSCar)**

pelo grande apoio e parceria no desenvolvimento e caracterização do nanosistema utilizado no presente estudo.

À empresa nChemi na pessoa de Bruno H. R. de Lima

pela parceria e fornecimento da magnetita utilizada no presente estudo.

Ao LabMicro - FCT / Unesp (Faculdade de Tecnologia e Ciências Aplicadas (FCT), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Presidente Prudente / São Paulo, Brasil) na pessoa de José

Diego Fernandes e o Prof. Carlos José Leopoldo Constantino

pela disponibilidade do equipamento e auxílio na obtenção das imagens de microscopia confocal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

pelo grande apoio financeiro na forma de Auxílio Regular à Pesquisa (Processo 2017/24416-2).

**Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
(CNPq)**

pelo apoio financeiro na forma de bolsa de pesquisa de doutorado (Processo nº.: 140543/2017-1) e de Auxílio à Pesquisa (Edital MCTI/CNPq 16/2016 – Universal – Faixa A, Processo nº.: 404721/2016-8).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

pelo apoio financeiro na forma de bolsa de pesquisa de doutorado sanduíche (PDSE – Edital nº 47/2017 – Seleção 2018, Processo nº.: 88881.188706/2018-01), código financeiro 001.

Ao meu orientador no exterior, Professor Gordon Ramage

por abrir a oportunidade para que eu pudesse desenvolver minha pesquisa na Universidade de Glasgow sob sua orientação durante 11 meses. Obrigada pelo patrocínio proporcionado no desenvolvimento de nossa pesquisa e por ser tão acessível e ter tido interesse genuíno na troca de experiências entre as instituições. Obrigada por ter me dado a oportunidade de aprender tantas metodologias no seu laboratório e por ser presente e dedicado na minha supervisão. Quero agradecer por tudo do fundo do meu coração e deixar registrado que foi uma honra aprender com esse grande nome da área de Microbiologia.

À Universidade de Glasgow e equipe de funcionários

pela recepção e incrível oportunidade dada aos pesquisadores estrangeiros. Obrigada por serem tão prestativos, acessíveis e amigáveis.

Aos alunos do departamento de Ciências Orais da Faculdade de Odontologia da Universidade de Glasgow (Dental School - University of Glasgow)

pela recepção, convivência amigável, auxílio e ensinamentos durante meus 11 meses em Glasgow, muito obrigada!

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho

Meu muito obrigada!

*“A educação é para a alma humana, o que a escultura é para um
bloco de mármore”*

Joseph Addison

Resumo Geral

ARIAS, L.S. **Síntese e avaliação dos efeitos de um nanocarreador de miconazol sobre microrganismos orais.** 2020 149f. Tese (Doutorado em Ciência Odontológica, área de Saúde Bucal da Criança) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2020.

RESUMO GERAL

A presente tese teve como objetivo geral preparar, caracterizar e avaliar os efeitos antimicrobianos de um nanocarreador de miconazol (MCZ) à base de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPsMOF) funcionalizadas com quitosana (QS). Assim, dois subprojetos (SP1 e SP2) foram desenvolvidos e apresentaram os seguintes objetivos específicos: SP1) Preparar, caracterizar e avaliar os efeitos do nanocarreador NPsMOF-QS-MCZ sobre células planctônicas e biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Candida glabrata*; SP2) Avaliar o efeito do nanocarreador na composição de três diferentes modelos de biofilmes polimicrobianos patogênicos orais (gingivite, prótese total e cárie dentária). A primeira etapa do SP1 consistiu em revestir as NPsMOF com QS e carregar este *core-shell* com MCZ, a fim de caracterizar este nanocarreador por métodos físico-químicos. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) do nanocarreador foram determinadas pelo método da microdiluição em caldo, usando o índice da concentração inibitória fracionária a fim de avaliar se houve interação sinérgica entre os compostos. Ainda, biofilmes simples e mistos de *Candida* foram formados no fundo de placas de 24 ou 96 poços por 48 h e, em seguida, tratados por 24 h com NPsMOF-QS-MCZ carreando MCZ a 31,2 e 78 µg/ml, na presença e ausência de um campo magnético externo. Os biofilmes foram avaliados quantitativamente por biomassa total, atividade metabólica, contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) e composição da matriz extracelular. Os dados foram analisados por ANOVA a dois fatores, seguida pelo teste de Holm-Sidak ($p < 0,05$). Ainda, a estrutura dos biofilmes foi avaliada qualitativamente por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal. Os resultados do SP1 mostraram que o nanocarreador apresentou diâmetro menor que 50 nm e valores de CIM menores do que aqueles encontrados para MCZ sozinho, com efeito sinérgico sobre *C. albicans*. NPsMOF-QS-MCZ a 78 µg/ml foi mais eficaz que MCZ sozinho na redução de UFCs e atividade metabólica de biofilmes misto e simples de *C. albicans*. A biomassa total dos biofilmes e a matriz extracelular não foram afetadas pelo nanocarreador, e a aplicação de um campo magnético externo não melhorou seu efeito antibiofilme. As imagens de

microscopia confirmam que tratamentos com o nanocarreador, principalmente na maior concentração, apresentaram maior atividade antibiofilme. Com relação ao SP2, as CIMs de NPsMOF-QS-MCZ foram determinadas para diferentes espécies microbianas, e todos os biofilmes polimicrobianos foram desenvolvidos por 5 dias e tratados por 24 h com NPsMOF-QS-MCZ a 64 µg/ml. Após o tratamento, os biofilmes foram avaliados quanto à biomassa total, atividade metabólica, contagem de UFCs e análise composicional por PCR quantitativo. Microscopia eletrônica de varredura foi usada para analisar a estrutura do biofilme. As diferenças entre os grupos foram determinadas por teste t não pareado ($p < 0,05$). Os resultados do SP2 mostraram que NPsMOF-QS-MCZ foi mais eficaz que MCZ sozinho contra a maioria das células fúngicas e bacterianas testadas. Ainda, este nanocarreador foi capaz de reduzir a atividade metabólica, biomassa total e UFCs ($p < 0,05$) dos biofilmes, além de alterar a sua ultraestrutura. Por fim, NPsMOF-QS-MCZ afetou a composição dos três biofilmes polimicrobianos avaliados, reduzindo principalmente os números de *Streptococcus* spp. e alterando a prevalência das espécies nos biofilmes. Em suma, os resultados dos SP1 e SP2 permitiram concluir que o nanocarreador melhorou o efeito antimicrobiano do MCZ, dependendo da espécie e parâmetro de biofilme avaliados. O nanocarreador também mostrou potencial para interferir nas interações sinérgicas entre células fúngicas e bacterianas dentro de biofilmes polimicrobianos.

Palavras-chaves: Biofilmes; *Candida*; Miconazol; Nanopartículas; Óxido ferroso-férrico; Quitosana.

General Abstract

ARIAS, L.S. **Synthesis and evaluation of the effects of a miconazole nanocarrier on oral microorganisms.** 2020 149f. Tese (Doutorado em Ciência Odontológica, área de Saúde Bucal da Criança) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2020.

GENERAL ABSTRACT

The present thesis aimed to prepare, characterize and evaluate the antimicrobial effects of a miconazole (MCZ) nanocarrier based on iron oxide magnetic nanoparticles (IONPs) functionalized with chitosan (CS). Thus, two subprojects (SP1 and SP2) were developed and had the following specific objectives: SP1) To prepare, characterize and evaluate the effects of the IONPs-CS-MCZ nanocarrier on planktonic cells and single- and dual-species biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*; SP2) To evaluate the effect of IONPs-CS-MCZ on the composition of three different models of oral pathogenic biofilms (gingivitis, denture and dental caries). The first step of SP1 was to coat IONPs with CS and to load this *core-shell* association with MCZ, in order to characterize this nanocarrier by physicochemical methods. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the nanocarrier were determined by the microdilution method, using the fractional inhibitory concentration index in order to assess whether there was synergistic interaction between the compounds.. In addition, single- and dual-species biofilms of *Candida* species were formed at the bottom of 24- or 96-well plates for 48 h and, in sequence, treated for 24 h with IONPs-CS-MCZ carrying MCZ at 31.2 and 78 µg/ml, in both the presence and absence of an external magnetic field. Biofilms were quantitatively evaluated by total biomass, metabolic activity, counting of colony forming units (CFUs) and extracellular matrix components. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by Holm-Sidak test ($p < 0.05$). In addition, the structure of biofilms was qualitatively evaluated by scanning electron microscopy and confocal microscopy. The results from SP1 showed that IONPs-CS-MCZ presented diameter smaller than 50 nm, and MIC values lower than those found for MCZ alone, with synergistic effect on *C. albicans*. Moreover, 78 µg/ml IONPs-CS-MCZ was more effective than MCZ alone in reducing CFUs and metabolic activity of single biofilms of *C. albicans* and dual-species biofilms. Total biofilm biomass and extracellular matrix were not affected by the nanocarrier, and the application of an external magnetic field did not improve the nanocarrier effects. Microscopy images confirm that treatments with the nanocarrier, mainly in the highest concentration, exhibited greater antibiofilm activity. Regarding SP2, the MICs of IONPs-CS-MCZ were determined for different

microbial species, and all polymicrobial biofilms were developed for 5 days and treated for 24 h with IONPs-CS-MCZ at 64 µg/ml. After treatment, the biofilms were evaluated for total biomass, metabolic activity, counting of CFUs and quantitative PCR analysis. Scanning electron microscopy was used to analyze the biofilm ultrastructure. Differences between groups were determined by unpaired t-test ($p < 0.05$). Results from SP2 showed that IONPs-CS-MCZ was more effective than MCZ alone against most fungal and bacterial cells tested. Moreover, this nanocarrier was able to reduce the metabolic activity, total biomass and CFUs ($P < 0.05$) of the biofilms, besides altering their ultrastructure. Finally, IONPs-CS-MCZ affected the composition of the three evaluated biofilms, mainly reducing the numbers of *Streptococcus* spp. and changing the prevalence of species in the biofilms. From the results obtained by SP1 and SP2, it was possible to conclude that the nanocarrier improved the antimicrobial effect of MCZ, depending on the species and biofilm parameter evaluated. Nanocarrier also showed potential to interfere in the synergistic interactions among fungal and bacterial cells within polymicrobial biofilms.

Keywords: Biofilms, *Candida*; Miconazole; Nanoparticles; Ferrosiferic Oxide; Chitosan.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- FIGURE 1 -** Transmission electron microscopy image (a), size distribution histogram (b), Fourier-transform infrared spectrum (c) and thermogravimetric analysis (d) for the iron oxide magnetic nanoparticles-chitosan-miconazole nanocarrier. Enlarged image in (a) represents the core of a chitosan-coated nanoparticle, and miconazole particles bound to chitosan. The red circle in (c) shows the region of characteristic bands of the presence of miconazole..... **81**
- FIGURE 2-** Quantification of total biomass (mean absorbance values per cm^2) for single- (a and b) and dual-species (c) biofilms of *C. albicans* ATCC 10231 and *C. glabrata* ATCC 90030 treated with 110 $\mu\text{g/ml}$ iron oxide magnetic nanoparticles (IONPs), 110 $\mu\text{g/ml}$ chitosan (CS), 78 $\mu\text{g/ml}$ miconazole (MCZ) and MCZ-containing nanocarrier at 31.2 (IONPs-CS-MCZ31.2) and 78 $\mu\text{g/ml}$ (IONPs-CS-MCZ78), in the absence or presence of an external magnetic field. Negative control denotes non-treated biofilms (NC). Different uppercase and lowercase letters show significant differences among the treatments for biofilms treated in the absence and presence of an external magnetic field, respectively (2-way ANOVA and Holm-Sidak test, $p < 0.05$)..... **82**

-
- FIGURE 3 -** Quantification of metabolic activity (mean absorbance values per cm²) for single- (a and b) and dual-species (c) biofilms of *C. albicans* ATCC 10231 and *C. glabrata* ATCC 90030 treated with 110 µg/ml iron oxide magnetic nanoparticles (IONPs), 110 µg/ml chitosan (CS), 78 µg/ml miconazole (MCZ) and MCZ-containing nanocarrier at 31.2 (IONPs-CS-MCZ31.2) and 78 µg/ml (IONPs-CS-MCZ78), in the absence or presence of an external magnetic field. Negative control denotes non-treated biofilms (NC). Different uppercase and lowercase letters show significant differences among the treatments for biofilms treated in the absence and presence of an external magnetic field, respectively (2-way ANOVA and Holm-Sidak test, p < 0.05)..... **83**
- FIGURE 4 -** Quantification of cultivable cells (mean values of the logarithm of colony-forming units per cm²) for single- (a and b) and dual-species (c and d) biofilms of *C. albicans* ATCC 10231 and *C. glabrata* ATCC 90030 treated with 110 µg/ml iron oxide magnetic nanoparticles (IONPs), 110 µg/ml chitosan (CS), 78 µg/ml miconazole (MCZ) and MCZ-containing nanocarrier at 31.2 (IONPs-CS-MCZ31.2) and 78 µg/ml (IONPs-CS-MCZ78), in the absence or presence of an external magnetic field. Negative control denotes non-treated biofilms (NC). Different uppercase and lowercase letters show significant differences among the treatments for biofilms treated in the absence and presence of an external magnetic field, respectively (2-way ANOVA and Holm-Sidak test, p < 0.05). Within each treatment, asterisk (*) indicates significant difference between biofilms treated in the absence and presence of an external magnetic field..... **84**

-
- FIGURE 5 -** Scanning electron microscopy images of dual-species biofilms of *Candida albicans* ATCC 10231 and *C. glabrata* ATCC 90030 treated with 110 µg/ml iron oxide magnetic nanoparticles (b), 110 µg/ml chitosan (c), 78 µg/ml miconazole (d) and miconazole-containing nanocarrier at 31.2 (e) and 78 µg/ml (f). Negative control denotes non-treated biofilm (a). Magnification: 2500x. Bars: 10 µm. The red arrows in images (c), (e) and (f) indicate particle clusters..... **85**
- FIGURE 6 -** Confocal laser scanning microscopy images of dual-species biofilms of *Candida albicans* ATCC 10231 and *C. glabrata* ATCC 90030 treated with 110 µg/ml iron oxide magnetic nanoparticles (b), 110 µg/ml chitosan (c), 78 µg/ml miconazole (d) and miconazole-containing nanocarrier at 31.2 (e) and 78 µg/ml (f). Negative control denotes non-treated biofilm (a). Magnification: 20x. Bars: 100 µm..... **86**

Capítulo 2

- FIGURE 1 -** Results of XTT reduction assay (A), quantification of total biomass (B) and scanning electron microscopy (SEM) observation (C) for the gingivitis biofilm model non-treated (control) and treated with the nanocarrier containing miconazole at 64 mg/L (IONPs-CS-MCZ). Magnification of the SEM images: 1,000x and 3,500x; Bars: 10 and 5 µm. Significant differences between the groups were calculated by unpaired t-test (* p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001). White arrows represent adhesion of bacteria to yeasts/hyphae. Yellow arrow represents loss of cellular membrane integrity..... **118**

-
- FIGURE 2 -** Results of XTT reduction assay (A), quantification of total biomass (B) and scanning electron microscopy (SEM) observation (C) for the denture biofilm model non-treated (control) and treated with the nanocarrier containing miconazole at 64 mg/L (IONPs-CS-MCZ). Magnification of the SEM images: 1,000x and 3,500x; Bars: 10 and 5 μ m. Significant differences between the groups were calculated by unpaired t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). White arrows represent adhesion of bacteria to yeasts/hyphae. Yellow arrow represents loss of cellular membrane integrity..... **119**
- FIGURE 3 -** Results of XTT reduction assay (A), quantification of total biomass (B) and scanning electron microscopy (SEM) observation (C) for the caries biofilm model non-treated (control) and treated with the nanocarrier containing miconazole at 64 mg/L (IONPs-CS-MCZ). Magnification of the SEM images: 1,000x and 3,500x; Bars: 10 and 5 μ m. Significant differences between the groups were calculated by unpaired t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). White arrows represent adhesion of bacteria to yeasts/hyphae. Yellow arrow represents loss of cellular membrane integrity..... **120**
- FIGURE 4 -** Results of counting of colony forming units (A), colony forming equivalents of viable cells (B) and biofilm percentage composition (C) for gingivitis biofilm model non-treated (control group) and treated with nanocarrier containing 64 mg/L miconazole (IONPs-CS-MCZ). Significant differences between the groups were calculated by unpaired t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)..... **121**

- FIGURE 5 -** Results of counting of colony forming units (A), colony forming equivalents of viable cells (B) and biofilm percentage composition (C) for denture biofilm model non-treated (control group) and treated with nanocarrier containing 64 mg/L miconazole (IONPs-CS-MCZ). Significant differences between the groups were calculated by unpaired t-test (* p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001)..... **122**
- FIGURE 6 -** Results of counting of colony forming units (A), colony forming equivalents of viable cells (B) and biofilm percentage composition (C) for caries biofilm model non-treated (control group) and treated with nanocarrier containing 64 mg/L miconazole (IONPs-CS-MCZ). Significant differences between the groups were calculated by unpaired t-test (* p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001)..... **123**

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Table 1 -	Minimum inhibitory concentration (MIC) values of iron oxide magnetic nanoparticles (IONPs), chitosan (CS) and miconazole (MCZ), alone or in association, for the tested <i>Candida</i> strains.....	77
Table 2 -	Mean values (standard deviation) of the protein content obtained from the extracellular matrix of single- and dual-species <i>Candida</i> biofilms after treatment with different compounds.....	78
Table 3 -	Mean values (standard deviation) of the carbohydrate content obtained from the extracellular matrix of single- and dual-species <i>Candida</i> biofilms after treatment with different compounds.....	79
Table 4 -	Mean values (standard deviation) of the DNA content obtained from the extracellular matrix of single- and dual-species <i>Candida</i> biofilms after treatment with different compounds.....	80

Capítulo 2

Table 1 -	Values of minimum inhibitory concentration (MIC) of miconazole (MCZ) and MCZ nanocarrier (IONPs-CS-MCZ) for planktonic (pMIC) and sessile (sMIC ₅₀ e sMIC ₈₀) cells of different <i>Candida albicans</i> strains.....	114
Table 2 -	Values of minimum inhibitory concentration (MIC) of miconazole (MCZ) and MCZ nanocarrier (IONPs-CS-MCZ) for planktonic (pMIC) and sessile (sMIC ₅₀ e sMIC ₈₀) cells of the species included in the different studied biofilm models.....	115
Table 3 -	Bacterial and fungal primer sequences for real time PCR.....	116
Table 4 -	Mean % composition values for each microorganism from the three different biofilm models (Gingivitis, Denture and Dental caries).....	117

Sumário

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	38
-------------------------	-----------

CAPÍTULO 1- Novel nanocarrier of miconazole based on chitosan-coated iron oxide nanoparticles as a nanotherapy to fight *Candida* biofilms

TITLE PAGE	48
ACKNOWLEDGEMENTS	48
ABSTRACT	50
INTRODUCTION	52
MATERIALS AND METHODS	53
RESULTS	59
DISCUSSION	62
REFERENCES	66
TABLE AND FIGURE CAPTIONS	74

CAPÍTULO 2- Effect of a miconazole nanocarrier on the composition of three *in vitro* models of pathogenic oral biofilms

TITLE PAGE	88
ABSTRACT	89
INTRODUCTION	91
MATERIALS AND METHODS	93
RESULTS	99
DISCUSSION	102
ACKNOWLEDGEMENTS	106
REFERENCES	107
FIGURE CAPTIONS	112
ANEXOS	124

Introdução geral

Introdução geral

O ecossistema oral é um ambiente único que proporciona nichos favoráveis à colonização e proliferação de diferentes microrganismos, os quais se encontram, na maioria das vezes, em associações comunitárias complexas formando biofilmes¹. Os desequilíbrios causados pela falta de higiene oral, uso de certos medicamentos, próteses orais, alterações imunológicas e doenças sistêmicas como diabetes e síndrome da imunodeficiência adquirida geram alterações na composição do microbioma oral, levando ao desenvolvimento de doenças orais como gengivite, cárie dentária e candidíases²⁻⁵.

As leveduras do gênero *Candida* colonizam a cavidade oral de 25 a 75% dos indivíduos saudáveis⁶⁻⁸. No entanto, em estado de desequilíbrio, fungos oportunistas contribuem significativamente para o desenvolvimento de patologias orais⁷. Como um exemplo, *Candida albicans* seguido por *Candida glabrata* são os microrganismos mais frequentemente detectados em candidíases orais, como a estomatite protética relacionada à *Candida*^{9,10}. Ainda, *C. albicans* promove associações sinérgicas com outros microrganismos patogênicos, como *Streptococcus mutans*¹¹. Tal associação é mediada principalmente pela secreção de glicosiltransferases por *S. mutans*¹², já que estas exoenzimas produzem α -glucanos que aumentam a adesão de *S. mutans* à parede celular de *C. albicans*^{12,13}. Além disso, a associação destas espécies resulta na secreção de baixas concentrações (25-50 μ M) da molécula de *quorum sensing* farnesol por *C. albicans*, o que estimula a formação de biofilmes de *S. mutans*¹⁴.

Dentre os agentes antifúngicos empregados no tratamento das candidíases destaca-se o miconazol (MCZ), um fármaco de amplo espectro do grupo imidazol, capaz de combater fungos e algumas bactérias¹⁵. MCZ tem atividade superior à nistatina

no combate à candidíase oral¹⁶ e é superior em termos de eficácia em relação a outros azóis, uma vez que apresenta atividade fungicida e fungistática¹⁷. Entretanto, esta droga pode interagir com outros fármacos, reduzindo sua eficácia, bem como apresentar efeitos colaterais como irritação da mucosa, vômito, diarreia e dores de cabeça^{16,18}.

O conhecimento do microbioma oral como um conjunto heterogêneo de espécies que modulam umas às outras, o seu ambiente e também o hospedeiro, auxilia a compreender não apenas como ocorre a progressão das doenças, mas também como os microrganismos se adaptam às intempéries físicas e químicas¹⁹. A literatura tem relatado com maior frequência o desenvolvimento de resistência microbiana aos fármacos convencionais, como o MCZ, e os principais fatores envolvidos são a super-expressão de bombas de efluxo, alteração do alvo celular da droga e a formação de biofilmes²⁰⁻²³.

A fim de resolver esta problemática, os pesquisadores vêm estudando novas estratégias que possam contornar os mecanismos de resistência sem estimular o desenvolvimento de microrganismos ainda mais resistentes e de difícil erradicação. O uso de nanopartículas como sistemas controlados de entrega de drogas tem sido bastante investigado, já que os nanocarreadores têm potencial para contornar barreiras físicas e químicas, bem como entregar a droga na célula alvo, reduzindo o tempo de exposição e a quantidade de fármaco empregada. Como resultado, o uso de nanocarreadores pode diminuir os efeitos colaterais dos fármacos, bem como as chances de desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte dos microrganismos²⁴⁻²⁶.

Nessa perspectiva, as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPsMOF) permitem fácil manipulação com ajuda de um campo magnético externo e a entrega de drogas de modo ativo e passivo, além de apresentar alta receptividade pelo tecido ou

célula alvo²⁷. Ainda, a capacidade de funcionalização do núcleo ou '*core*' de óxido de ferro com compósitos ou '*shell*' de diversas naturezas (ex.: polímeros, surfactantes, ouro, silanos, entre outros)²⁸ permite reduzir a oxidação das nanopartículas e torná-las mais biocompatíveis, favorecendo sua aplicabilidade clínica²⁸. A quitosana (QS) é um polímero derivado da quitina (obtida da carapaça de crustáceos) que tem se mostrado como revestimento apropriado às NPsMOF, já que apresenta propriedades antimicrobianas e hemostáticas, além de ser biocompatível e biodegradável^{29,30}. Ainda, a QS permite a ligação química e o carreamento de diferentes drogas, diversificando o campo de atuação dos nanocarreadores³⁰⁻³².

Embora os nanocarreadores à base de NPsMOF tenham sido testados em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, revestidos ou não por QS, sua aplicabilidade tem sido quase inteiramente voltada para terapias de tratamento do câncer^{28,33,34}. Entretanto, estudos recentes têm investigado a ação antibiofilme de nanocarreadores de diferentes drogas convencionais baseados em NPsMOF, mostrando resultados favoráveis em comparação às drogas aplicadas sozinhas^{30,32,35}. Por fim, uma outra aplicação é a utilização de um campo magnético externo guiado a fim de mover as NPsMOF pelo biofilme e criar microcanais que facilitam a penetração de drogas nas camadas mais internas do biofilme, promovendo ação antimicrobiana sobre um número maior de células^{36,37}.

Diante de todo o contexto supracitado e tendo em vista que a eficácia antimicrobiana de um nanocarreador de MCZ com base em NPsMOF revestidas com QS permanece desconhecida, os objetivos do presente estudo foram: 1) preparar e caracterizar um novo nanocarreador de MCZ com base em NPsMOF revestidas com QS (NPsMOF-QS-MCZ), bem como avaliar seu efeito antimicrobiano sobre biofilmes

simples e mistos de *C. albicans* e *C. glabrata*, na presença e ausência de um campo magnético externo; 2) avaliar o efeito *in vitro* do nanocarreador NPsMOF-QS-MCZ na composição de modelos polimicrobianos de biofilmes orais patogênicos de gengivite, prótese total e cárie dentária.

Para alcançar os objetivos propostos, o presente estudo foi dividido em dois capítulos, como detalhado abaixo:

- Capítulo 1: “Novel miconazole nanocarrier based on chitosan-coated iron oxide nanoparticles as a nanotherapy to fight *Candida* biofilms” (artigo nas normas do periódico Colloids and Surfaces B: Biointerfaces).

- Capítulo 2: “Effect of a miconazole nanocarrier on the composition of three *in vitro* models of pathogenic oral biofilms” (artigo nas normas do periódico Journal of Oral Microbiology).

Referências

1. Seneviratne CJ, Zhang CF, Samaranayake LP. Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chin J Dent Res.* 2011;14(2):87-94.
2. Ferizi L, Dragidella F, Spahiu L, Begzati A, Kotori V. The Influence of Type 1 Diabetes Mellitus on Dental Caries and Salivary Composition. *Int J Dent.* 2018;2018:5780916.
3. Gaitan-Cepeda LA, Sanchez-Vargas O, Castillo N. Prevalence of oral candidiasis in HIV/AIDS children in highly active antiretroviral therapy era. A literature analysis. *Int J STD AIDS.* 2015;26(9):625-632.

4. Zomorodian K, Kavooosi F, Pishdad GR, et al. Prevalence of oral *Candida* colonization in patients with diabetes mellitus. *J Mycol Med.* 2016;26(2):103-110.
5. Kumar M, Mishra L, Mohanty R, Nayak R. "Diabetes and gum disease: the diabolic duo". *Diabetes Metab Syndr.* 2014;8(4):255-258.
6. Dar-Odeh NS, Shehabi AA. Oral candidosis in patients with removable dentures. *Mycoses.* 2003;46(5-6):187-191.
7. Quindos G, Gil-Alonso S, Marcos-Arias C, et al. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2019;24(2):e172-e180.
8. Zomorodian K, Haghghi NN, Rajaei N, et al. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol.* 2011;49(2):208-211.
9. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2011;20(4):251-260.
10. Mahdavi Omran S, Rezaei Dastjerdi M, Zuashkiani M, Moqarabzadeh V, Taghizadeh-Armaki M. *In Vitro* Antifungal Susceptibility of *Candida* Species Isolated from Iranian Patients with Denture Stomatitis. *Biomed Res Int.* 2018;2018:3086586.
11. Delaney C, Kean R, Short B, et al. Fungi at the Scene of the Crime: Innocent Bystanders or Accomplices in Oral Infections? *Current Clinical Microbiology Reports.* 2018;5(3):190-200.
12. Gregoire S, Xiao J, Silva BB, et al. Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental

- pellicle on hydroxyapatite surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(18):6357-6367.
13. Hwang G, Marsh G, Gao L, Waugh R, Koo H. Binding Force Dynamics of *Streptococcus mutans*-glucosyltransferase B to *Candida albicans*. *J Dent Res.* 2015;94(9):1310-1317.
 14. Ramage G, Saville SP, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(11):5459-5463.
 15. Nenoff P, Koch D, Kruger C, Drechsel C, Mayser P. New insights on the antibacterial efficacy of miconazole in vitro. *Mycoses.* 2017;60(8):552-557.
 16. Zhang LW, Fu JY, Hua H, Yan ZM. Efficacy and safety of miconazole for oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Oral Dis.* 2016;22(3):185-195.
 17. Delattin N, Cammue BP, Thevissen K. Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. *Future Med Chem.* 2014;6(1):77-90.
 18. Rodrigues LS, Motta FA, Picharski GL, Vasconcelos TM, Ricciari MC, Dalla-Costa LM. Invasive candidiasis: Risk factor for mortality in a pediatric tertiary care hospital in south of Brazil. *Medicine (Baltimore).* 2019;98(23):e15933.
 19. Brown JL, Johnston W, Delaney C, et al. Polymicrobial oral biofilm models: simplifying the complex. *J Med Microbiol.* 2019.
 20. Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol.* 2012;2012:528521.

21. Hans S, Fatima Z, Hameed S. Retrograde signaling disruption influences ABC superfamily transporter, ergosterol and chitin levels along with biofilm formation in *Candida albicans*. *J Mycol Med*. 2019;29(3):210-218.
22. Ishchuk OP, Ahmad KM, Koruza K, et al. RNAi as a Tool to Study Virulence in the Pathogenic Yeast *Candida glabrata*. *Front Microbiol*. 2019;10:1679.
23. Kean R, Rajendran R, Haggarty J, et al. *Candida albicans* Mycofilms Support *Staphylococcus aureus* Colonization and Enhances Miconazole Resistance in Dual-Species Interactions. *Front Microbiol*. 2017;8:258.
24. Patra JK, Das G, Fraceto LF, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnology*. 2018;16(1):71.
25. H RR, Dhamecha D, Jagwani S, et al. Local drug delivery systems in the management of periodontitis: A scientific review. *J Control Release*. 2019;307:393-409.
26. Liu YL, Chen D, Shang P, Yin DC. A review of magnet systems for targeted drug delivery. *J Control Release*. 2019;302:90-104.
27. Arruebo M, Fernández-Pacheco R, Ibarra MR, Santamaría J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*. 2007;2(3):22-32.
28. Arias LS, Pessan JP, Vieira APM, Lima TMT, Delbem ACB, Monteiro DR. Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: A Perspective on Synthesis, Drugs, Antimicrobial Activity, and Toxicity. *Antibiotics (Basel)*. 2018;7(2).
29. Kas HS. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *J Microencapsul*. 1997;14(6):689-711.

30. Hussein-Al-Ali SH, El Zowalaty ME, Kura AU, et al. Antimicrobial and controlled release studies of a novel nystatin conjugated iron oxide nanocomposite. *Biomed Res Int.* 2014;2014:651831.
31. Liakos I, Grumezescu AM, Holban AM. Magnetite nanostructures as novel strategies for anti-infectious therapy. *Molecules.* 2014;19(8):12710-12726.
32. Chifiriuc CM, Grumezescu AM, Saviuc C, Croitoru C, Mihaiescu DE, Lazar V. Improved antibacterial activity of cephalosporins loaded in magnetic chitosan microspheres. *Int J Pharm.* 2012;436(1-2):201-205.
33. Chertok B, Moffat BA, David AE, et al. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials.* 2008;29(4):487-496.
34. Weinstein JS, Varallyay CG, Dosa E, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: diagnostic magnetic resonance imaging and potential therapeutic applications in neurooncology and central nervous system inflammatory pathologies, a review. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30(1):15-35.
35. Vieira APM, Arias LS, de Souza Neto FN, et al. Antibiofilm effect of chlorhexidine-carrier nanosystem based on iron oxide magnetic nanoparticles and chitosan. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019;174:224-231.
36. Li J, Nickel R, Wu J, Lin F, van Lierop J, Liu S. A new tool to attack biofilms: driving magnetic iron-oxide nanoparticles to disrupt the matrix. *Nanoscale.* 2019;11(14):6905-6915.
37. Quan K, Zhang Z, Chen H, et al. Artificial Channels in an Infectious Biofilm Created by Magnetic Nanoparticles Enhanced Bacterial Killing by Antibiotics. *Small.* 2019;15(39):e1902313.

References

1. Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Lavery D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. *J Clin Periodontol*. 2017;44 Suppl 18:S94-S105.
2. Lourenco AG, Ribeiro A, Nakao C, Motta ACF, Antonio LGL, Machado AA, et al. Oral *Candida* spp carriage and periodontal diseases in HIV-infected patients in Ribeirao Preto, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2017;59:e29.
3. Nakajima M, Umezaki Y, Takeda S, Yamaguchi M, Suzuki N, Yoneda M, et al. Association between oral candidiasis and bacterial pneumonia: a retrospective study. *Oral Dis*. 2019.
4. Ramage G, O'Donnell L, Sherry L, Culshaw S, Bagg J, Czesnikiewicz-Guzik M, et al. Impact of frequency of denture cleaning on microbial and clinical parameters - a bench to chairside approach. *J Oral Microbiol*. 2019;11:1538437.
5. Brown JL, Johnston W, Delaney C, Short B, Butcher MC, Young T, et al. Polymicrobial oral biofilm models: simplifying the complex. *J Med Microbiol*. 2019.
6. Koo H, Andes DR, Krysan DJ. *Candida*-streptococcal interactions in biofilm-associated oral diseases. *PLoS Pathog*. 2018;14:e1007342.
7. Nobbs AH, Jenkinson HF. Interkingdom networking within the oral microbiome. *Microbes Infect*. 2015;17:484-92.
8. Xu H, Jenkinson HF, Dongari-Bagtzoglou A. Innocent until proven guilty: mechanisms and roles of *Streptococcus-Candida* interactions in oral health and disease. *Mol Oral Microbiol*. 2014;29:99-116.

9. Delaney C, Kean R, Short B, Tumelty M, McLean W, Nile CJ, et al. Fungi at the Scene of the Crime: Innocent Bystanders or Accomplices in Oral Infections? *Current Clinical Microbiology Reports*. 2018;5:190-200.
10. World Health Organization. Antimicrobial resistance : global report on surveillance. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2014.
11. Wistrand-Yuen E, Knopp M, Hjort K, Koskiniemi S, Berg OG, Andersson DI. Evolution of high-level resistance during low-level antibiotic exposure. *Nat Commun*. 2018;9:1599.
12. Aslani N, Abastabar M, Hedayati MT, Shokohi T, Aghili SR, Diba K, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* species isolated from dental plaques. *J Mycol Med*. 2018;28:433-36.
13. Nenoff P, Koch D, Kruger C, Drechsel C, Mayser P. New insights on the antibacterial efficacy of miconazole in vitro. *Mycoses*. 2017;60:552-57.
14. Miranda-Cadena K, Marcos-Arias C, Mateo E, Aguirre JM, Quindos G, Eraso E. Prevalence and antifungal susceptibility profiles of *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and their close-related species in oral candidiasis. *Arch Oral Biol*. 2018;95:100-07.
15. Kean R, Rajendran R, Haggarty J, Townsend EM, Short B, Burgess KE, et al. *Candida albicans* Mycofilms Support *Staphylococcus aureus* Colonization and Enhances Miconazole Resistance in Dual-Species Interactions. *Front Microbiol*. 2017;8:258.
16. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MDP, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnology*. 2018;16:71.

17. Arias LS, Pessan JP, Vieira APM, Lima TMT, Delbem ACB, Monteiro DR. Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: A Perspective on Synthesis, Drugs, Antimicrobial Activity, and Toxicity. *Antibiotics (Basel)*. 2018;7.
18. Vieira APM, Arias LS, de Souza Neto FN, Kubo AM, Lima BHR, de Camargo ER, et al. Antibiofilm effect of chlorhexidine-carrier nanosystem based on iron oxide magnetic nanoparticles and chitosan. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019;174:224-31.
19. Nehra P, Chauhan RP, Garg N, Verma K. Antibacterial and antifungal activity of chitosan coated iron oxide nanoparticles. *Br J Biomed Sci*. 2018;75:13-18.
20. Sherry L, Lappin G, O'Donnell LE, Millhouse E, Millington OR, Bradshaw DJ, et al. Viable Compositional Analysis of an Eleven Species Oral Polymicrobial Biofilm. *Front Microbiol*. 2016;7:912.
21. Brown JL, Johnston W, Delaney C, Rajendran R, Butcher J, Khan S, et al. Biofilm-stimulated epithelium modulates the inflammatory responses in co-cultured immune cells. *Sci Rep*. 2019;9:15779.
22. Zhou Y, Millhouse E, Shaw T, Lappin DF, Rajendran R, Bagg J, et al. Evaluating *Streptococcus mutans* Strain Dependent Characteristics in a Polymicrobial Biofilm Community. *Front Microbiol*. 2018;9:1498.
23. Sen N, Sermet IB, Gurler N. Sealing capability and marginal fit of titanium versus zirconia abutments with different connection designs. *J Adv Prosthodont*. 2019;11:105-11.
24. Kean R, McKloud E, Townsend EM, Sherry L, Delaney C, Jones BL, et al. The comparative efficacy of antiseptics against *Candida auris* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;52:673-77.

25. Allison DL, Willems HME, Jayatilake J, Bruno VM, Peters BM, Shirtliff ME. *Candida*-Bacteria Interactions: Their Impact on Human Disease. *Microbiol Spectr*. 2016;4.
26. Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol*. 2012;2012:528521.
27. Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig*. 2003;7:181-8.
28. Garcia-Cuesta C, Sarrion-Perez MG, Bagan JV. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. *J Clin Exp Dent*. 2014;6:e576-82.
29. Brincker H. Prophylactic treatment with miconazole in patients highly predisposed to fungal infection. A placebo-controlled double-blind study. *Acta Med Scand*. 1978;204:123-8.
30. Delattin N, Cammue BP, Thevissen K. Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. *Future Med Chem*. 2014;6:77-90.
31. Lou MM, Zhu B, Muhammad I, Li B, Xie GL, Wang YL, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of chitosan solutions against apricot fruit rot pathogen *Burkholderia seminalis*. *Carbohydr Res*. 2011;346:1294-301.
32. Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 2003;4:1457-65.
33. Rajkumar S, Prabakaran M. Multi-functional nanocarriers based on iron oxide nanoparticles conjugated with doxorubicin, poly(ethylene glycol) and folic acid as theranostics for cancer therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018;170:529-37.

34. Mukaremera L, Lee KK, Mora-Montes HM, Gow NAR. *Candida albicans* Yeast, Pseudohyphal, and Hyphal Morphogenesis Differentially Affects Immune Recognition. *Front Immunol.* 2017;8:629.
35. Kim D, Liu Y, Benhamou RI, Sanchez H, Simon-Soro A, Li Y, et al. Bacterial-derived exopolysaccharides enhance antifungal drug tolerance in a cross-kingdom oral biofilm. *ISME J.* 2018;12:1427-42.
36. Wen ZT, Yates D, Ahn SJ, Burne RA. Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. *BMC Microbiol.* 2010;10:111.
37. Periasamy S, Chalmers NI, Du-Thumm L, Kolenbrander PE. *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 requires *Actinomyces naeslundii* ATCC 43146 for growth on saliva in a three-species community that includes *Streptococcus oralis* 34. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:3250-7.