

UNIVERSIDADE DE UBERABA

GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**LAURA LETÍCIA SANTOS SOUZA
LETÍCIA MEDEIROS ARANTES**

**EFEITO DA LACTOFERRINA NA FORMAÇÃO E
DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME DE *Candida albicans*
*in vitro.***

UBERABA – MG

2018

**UNIVERSIDADE DE UBERABA
LAURA LETÍCIA SANTOS SOUZA
LETÍCIA MEDEIROS ARANTES**

**EFEITO DA LACTOFERRINA NA FORMAÇÃO E
DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME DE *Candida albicans in vitro*.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Odontologia da Universidade de
Uberaba.

Orientadora: Prof. Dra. Ruchele Dias
Nogueira Geraldo Martins

UBERABA – MG

2018

S89e Souza, Laura Leticia Santos.
Efeito da lactoferrina na formação e desenvolvimento do biofilme de *candida albicans* in vitro / Laura Leticia Santos Souza, Leticia Medeiros Arantes. – Uberaba, 2018.
28 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso -- Universidade de Uberaba. Curso de Odontologia, 2018.

Orientadora: Profa. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins.

1. Boca – Doenças. 2. Candida albicans. 3. Biofilme. 4. Odontologia. I. Arantes, Leticia Medeiros. II. Martins, Ruchele Dias Nogueira Geraldo. III. Universidade de Uberaba. Curso de Odontologia. IV. Título.

CDD 616.3107

Ficha elaborada pela bibliotecária Tatiane da Silva Viana CRB6-3171

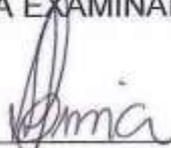
UNIVERSIDADE DE UBERABA
LAURA LETÍCIA SANTOS SOUZA
LETÍCIA MEDEIROS ARANTES

**EFEITO DA LACTOFERRINA NA FORMAÇÃO E
DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME DE *Candida albicans in vitro*.**

Trabalho apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de
Cirurgião-Dentista do Curso de Graduação em Odontologia da Universidade de
Uberaba.

Aprovada em: 08/12/2018

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dra. Sanívia Aparecida de Lima Pereira
Universidade de Uberaba



Prof. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo-Martins
Universidade de Uberaba

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus por ter me abençoado e ter me dado a oportunidade de trilhar esta jornada. Ao meus pais, Valdison Moreira de Souza e Joana Dárck Santos Souza, à minha irmã, Maria Bruna Souza que sempre me apoiaram, me dedicaram tempo e atenção, me passaram a confiança para seguir em frente nos estudos, especialmente nos momentos mais difíceis. E ao meu namorado e a todos da família que me deram força.

Atenciosamente, Laura Letícia Santos Souza.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por me conceder a sabedoria, paciência e os dons necessários para concluir esta etapa em minha vida. À minha família, aos meus pais, Roneido Arantes de Souza e Kátia Gomes Medeiros por todo o empenho, apoio e por todos os sacrifícios que fizeram para que este meu sonho se realizasse. À minha irmã Marianna Medeiros Arantes que sempre acreditou em mim e esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins da graduação. Ao meu amado, Venâncio Batista Ferreira, por ser meu grande companheiro, pela amizade, pelos conselhos, por toda a ajuda que me proporcionou nestes anos, obrigada por estar sempre ao meu lado, por acreditar em mim e por sempre me incentivar a ser o melhor. Amo vocês!

Atenciosamente, Letícia Medeiros Arantes.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter nos dado força para nos dedicarmos a este curso e por nunca nos desamparar.

Aos nossos familiares por terem lutado e nos apoiado, ajudando-nos a realizar este sonho.

À Universidade de Uberaba, por nos proporcionar os meios necessários para que pudéssemos concluir este nosso sonho e pelo ensino de excelência.

A todos os professores que passaram por nós nestes anos de graduação, por nos apresentarem a Odontologia de forma competente e apaixonante, por nos motivarem a ser melhores a cada momento e superar nossas limitações.

Aos funcionários da instituição que sempre estiveram à disposição, para que nada nos faltasse.

A Prof.^a Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins, nossa orientadora e amiga, por toda a atenção, apoio, confiança e dedicação que teve conosco e com este trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a nossa formação, o nosso muito obrigada.

RESUMO

A entrada de micro-organismos pela cavidade bucal pode ocasionar o surgimento de vários tipos de infecção. Dentre as doenças orais, a candidose é uma doença oportunista em que *Candida albicans* se prolifera formando biofilmes, que inclui a adesão inicial e a acumulação em superfícies. Durante os primeiros meses de vida, a candidose é uma manifestação que pode acontecer em crianças frequentemente. O aleitamento materno é uma prática comum nos primeiros 6 meses de vida, devido as suas excelentes fontes nutricionais e imunológica para o neonato. O colostro possui diversos componentes de defesa, dentre estes, a lactoferrina que possui boas propriedades contra variados micro-organismos, no entanto, pouco se sabe sobre sua ação sobre a formação do biofilme de *Candida albicans* (CA). O objetivo desse estudo foi o de avaliar *in vitro* a adesão inicial e acúmulo de CA em presença de lactoferrina. Para isso, foram realizados biofilmes de CA em placas de 24 poços de poliestireno que receberão lactoferrina em dois momentos distintos: antes da inserção microbiana e após a CA ser aplicada. Após 24 horas de incubação a 37 °C em aerobiose, os biofilmes foram fixados em formaldeído e corados posteriormente com cristal violeta. A densidade óptica (DO) foi analisada em espectrofotômetro digital a 460 nm. Os resultados mostraram que a DO no grupo de controle positivo de $1,80 \pm 0,278$ muito superior ao controle negativo que foi de $0,231 \pm 0,121$ ($p < 0,05$). Houve diferença estatisticamente significante na DO média da biomassa do biofilme formado no grupo que recebeu a LA antes (média $0,715 \pm 0,260$) quando comparado a DO do controle positivo ($p < 0,05$). Por outro lado, a incubação conjunta da LA com o inóculo fúngico aumentou significamente o desenvolvimento e acúmulo do biofilme após 24 horas quando comparada com o grupo de aplicação prévia da LA, isto por que a DO média foi de $1,933 \pm 0,17$, estatisticamente maior ($p < 0,05$) mas não diferente da DO do controle positivo ($p > 0,05$). Os resultados permitiram concluir que a lactoferrina pode interferir na adesão inicial de CA, impossibilitando que ocorra o acúmulo microbiano.

Palavras-Chaves: *Candida albicans*, Lactoferrina, Candidose oral, Biofilme

ABSTRACT

The entry of microorganisms into the oral cavity may lead to several types of infection. Among oral diseases, candidiasis is an opportunistic disease in which *Candida albicans* proliferates forming biofilms, which includes initial adhesion and accumulation on surfaces. During the first months of life, often, candidosis is a manifestation that can happen in children. Breastfeeding is a common practice in the first 6 months of life because of its excellent nutritional and immunological sources for the newborn. Colostrum has several defense components, among them lactoferrin that has good properties against various microorganisms, but little is known about its action on the formation of *Candida albicans* (CA) biofilm. The objective of this study was to evaluate *in vitro* the initial adhesion and accumulation of CA in the presence of lactoferrin. For this, CA biofilms were made in 24-well polystyrene plates that will receive lactoferrin at two different times: before microbial insertion and after CA is applied. After 24 hours of incubation at 37°C in aerobiosis, the biofilms were fixed in formaldehyde and stained with violet crystal. The optical density (OD) was analyzed in a digital spectrophotometer at 460 nm. The results showed that OD in the positive control group was 1.80 ± 0.278 much higher than the negative control that was 0.231 ± 0.121 ($p < 0.05$). There was a statistically significant difference in the mean OD of the biofilm biomass formed in the group that received the LA before (mean 0.715 ± 0.260) when compared to the OD of the positive control ($p < 0.05$). On the other hand, the LA incubation with the fungal inoculum significantly increased the development and accumulation of the biofilm after 24 hours when compared to the previous LA application group, because the mean OD was 1.933 ± 0.17 , statistically higher ($p < 0.05$) but not different from the DO of the positive control ($p > 0.05$). The results allowed concluding that lactoferrin may interfere with the initial adhesion of CA, making it impossible for microbial accumulation to occur.

Key words: *Candida albicans*, Lactoferrin, Oral candidosis, Biofilm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| FIGURA 1- Representação esquemática dos procedimentos e grupos experimentais | 17 |
| FIGURA 2- Placas de Microtitulação com os biofilmes diluídos em Cristal violeta para mensuração da DO | 18 |
| GRÁFICO 1- Valor médio de DO (600 nm) dos biofilmes formados de <i>Candida albicans</i> nos grupos de aplicação de LA (Lactoferrina) antes e depois do inóculo fúngico, e dos grupos controle positivo e negativo | 20 |
| GRÁFICO 2- Porcentagem de redução do biofilme de <i>Candida albicans</i> nas repetições dos grupos de aplicação de LA (Lactoferrina) antes e depois do inóculo fúngico | 21 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1- Seleção da Cepas Microbianas e Meios de Cultura | 16 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

ATCC – American Type Culture Collection

LA – Lactoferrina

CA – *Candida albicans*

BHI – Brian Heart Infusion

mL – Mililitro

°C – Grau Celsius

DO – Densidade Óptica

Nm – Nanômetros

μL – Microlitro

H – Horas

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO e JUSTIFICATIVA | 11 |
| 2 HIPÓTESE | 14 |
| 3 OBJETIVOS | 15 |
| 3.1 Gerais | 15 |
| 3.2 Específicos | 15 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 16 |
| 4.1 Seleção da Cepa Microbiana e Meios de Cultura | 16 |
| 4.2 Ensaio de Formação de Biofilme in vitro | 16 |
| 4.2.2 Preparação do meio de cultura e Cultivo Microbiano | 16 |
| 4.2.3 Formação do Biofilme | 16 |
| 4.2.4. Grupos Experimentais e Controles | 17 |
| 4.2.5 Fixação e coloração do Biofilme | 18 |
| 4.2.6 Análises Estatísticas | 19 |
| 5 RESULTADOS | 20 |
| 6 DISCUSSÃO | 9 |
| 7 CONCLUSÕES | 11 |
| REFERÊNCIAS | 12 |

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A colonização oral do recém-nascido inicia-se a partir do nascimento, quando a criança recebe micro-organismos provenientes do canal do parto ou pelo contato com as pessoas e o ambiente (BRANDTZAEG, 2003). A cavidade oral é a via primária de entrada de vários micro-organismos (BERKOWITZ et al., 1980). Alguns destes, embora passem pelas mucosas, não são capazes de colonizá-las (SMITH & TAUBMAN, 1992). No entanto, outros se tornam residentes das superfícies mucosas, modificando-a e permitindo o estabelecimento de novos micro-organismos, formando comunidades microbianas complexas denominadas de biofilmes (MARCOTTE & LAVOIE, 1998).

Biofilmes são derivados microbiológicos de comunidades sésseis caracterizados por células que estão irreversivelmente ligadas a um substrato ou uma interface ou uma à outra (ZIJNGE et al., 2010) contendo uma ampla variedade de espécies que interagem entre si (SHIRTLIFF et al., 2009; THEIN et al., 2009) e são incorporados numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (DONLAN & COSTERTON, 2002). A cavidade bucal é colonizada por diferentes espécies microbianas que se encontram organizadas em biofilmes (JAROSZ et al., 2009).

Alguns biofilmes microbianos contribuem para a causa de doenças humanas (FALSETTA et al., 2014), como, por exemplo, a candidose que é uma doença comum na infância e que têm como agente etiológico *Candida albicans* (CA) (LOHSE, et al., 2017), a espécie fúngica mais comum, considerada comensal na cavidade oral de seres humanos (KIANIPOUR, et al., 2018) e oportunista pois pode ocasionar lesões orais quando a imunidade, higiene, entre outros fatores do hospedeiro é prejudicada (SAMARANAYAKE et al., 2009; VAN DE VEERDONK et al., 2010). A candidose se manifesta quando fatores predisponentes, fisiológicos, patológicos e mecânicos, modificam o relacionamento que ocorre entre o hospedeiro e a microbiota residente (ALMEIDA, et al., 2018), ou seja, a relação de comensal depende da integridade do tecido, da microbiota e do sistema imune do hospedeiro. Neste caso, a candidose pode ser localizada, determinando sintomatologia restrita a essa área ou pode ser sistêmica (JOUAULT et al., 2009; DE ROSSI, 2011). As infecções disseminadas podem ser letais com alta taxa de morbidade e mortalidade (40 a 60%), sendo que a candidose está em quarto lugar entre os principais tipos de infecções nosocomiais (WENZEL & GENNINGS, 2005).

A candidose oral consiste em uma manifestação local que pode acometer cerca de 10 a 15% da população de crianças nos primeiros meses de vida (STECKSÉN-BLICKS et al., 2015). Cerca de 5,7% dos recém-nascidos possuem *Candida* spp na cavidade oral (RUSSELL & LAY, 1973), sendo que entre 0,5 a 1,5 anos, há um aumento de 44% de crianças portadoras do fungo (KLEINEGGER et al., 1996). Este micro-organismo se acumula, principalmente, na língua; mas, pode transitar na mucosa e saliva e se organizar em biofilmes (LIM et al., 2012) possibilitando sua melhor sobrevivência (WILLIAMS & LEWIS, 2011; WILLIAMS et al., 2011) e aumento da expressão de fatores de virulência (RAJENDRAN et al., 2010; LIM et al., 2012). Possui vários fatores de virulência, incluindo a capacidade de se aderir às superfícies pelo crescimento filamentosos e produzir enzimas hidrolíticas capazes de causar danos às células (WILLIAMS & LEWIS, 2011; WILLIAMS et al., 2011).

Uma prática muito comum e preconizada pelo Ministério da Saúde é o aleitamento materno exclusivo até no mínimo os 6 primeiros meses de vida. É indiscutível a importância deste leite para o desenvolvimento do neonato pois é caracterizado por um complexo nutricional e de sistema de defesa (FUSTINONI, et al., 2018.), que inclui imunoglobulinas, lactoferrina, caseínas, lactoperoxidase, lisozima, leucócitos, oligossacarídeos antiaderentes, lipídios antivirais e agentes anti-inflamatórios (HANSON & KOROTKOVA, 2002). O leite materno pode ajudar no combate de algumas infecções, proporcionando o revestimento das superfícies mucosas, impedindo assim a adesão de micro-organismos nos tecidos (DIAS, et al., 2017). No entanto, mesmo com essa proteção, alguns micro-organismos ainda conseguem se unir às mucosas, formando o biofilme (COSTA, et al., 2014). Além disto, há uma grande discussão a respeito do aleitamento prolongado e a ausência de higiene oral após as mamadas, o que vem contribuindo para o aumento de lesões orais como a cárie (VICTORA et al., 2016).

Um estudo recente, mostrou que o leite materno, mais especificamente, o colostro, que é o leite mais rico em componentes imunológicos e secretados nos primeiros dias após o parto, não favorece a adesão do biofilme de *CA in vitro*, e ainda impossibilita o seu desenvolvimento (FARIA, 2017). As razões para isto, certamente estão associadas aos vários componentes que o leite materno possui. Dentre estes componentes a lactoferrina, que é uma glicoproteína do leite materno com efeitos antimicrobianos e anti-inflamatórios (LÖNNERDAL, 2013). A proteção

contra diarreia e infecções neonatais são as atividades relevantes mais prováveis da lactoferrina em crianças (TURIN et al., 2014).

Muito se discute sobre a concentração no leite materno e a possibilidade de introdução da lactoferrina em crianças não aleitadas no peito (LÖNNERDAL, 2013). Há evidências de que a lactoferrina possa interferir na proliferação da *Candida* (SOUKKA et al., 1992) e que o leite humano desnatado e diluído em meio de cultura teve efeitos fungistáticos sobre *C. albicans* que foram revertidos pela adição de ferro (ANDERSSON et al., 2000). Diante do exposto, há necessidade de se investigar as propriedades do leite materno, em especial, da lactoferrina, na adesão e formação da *C. albicans* na conformação de biofilme que representa um consórcio de difícil acesso para os componentes imunológicos e antimicrobianos.

2 HIPÓTESE

A lactoferrina diminui a formação do biofilme de *C. albicans in vitro* por impossibilitar a adesão inicial desta levedura.

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

O objetivo desse estudo foi o de avaliar *in vitro* a formação e desenvolvimento do biofilme *Candida albicans* em presença de lactoferrina.

3.2 Específicos

Os objetivos específicos incluíram:

- Avaliar a aderência microbiana após a aplicação de lactoferrina;
- Avaliar a biomassa do biofilme formado após 24 horas em contato com a lactoferrina;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção da Cepa Microbiana e Meios de Cultura

O quadro a seguir indica a cepa, seu registro de ATCC, e os meios de cultura utilizado para obtenção do inóculo para os testes realizados:

| Micro-organismo | ATCC number | Meio de cultura |
|-------------------------|-------------|----------------------------|
| <i>Candida albicans</i> | 10231 | BHI (Brian Heart Infusion) |

4.2 Ensaios de Formação de Biofilme in vitro

4.2.2 Preparação do meio de cultura e Cultivo Microbiano

Foi utilizado o meio de cultura Brian Heart Infusion (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI) diluído em água deionizada e posteriormente autoclavado em tubos de 25 mL. A cepa de CA foi crescida em BHI durante 24 h em aerobiose a 37° C. Após atingir uma absorbância de 1 após a mensuração a 600 nm em Espectrofotômetro (Thermo Plate TP-Reader), a cultura microbiana foi utilizada para a formação de biofilme.

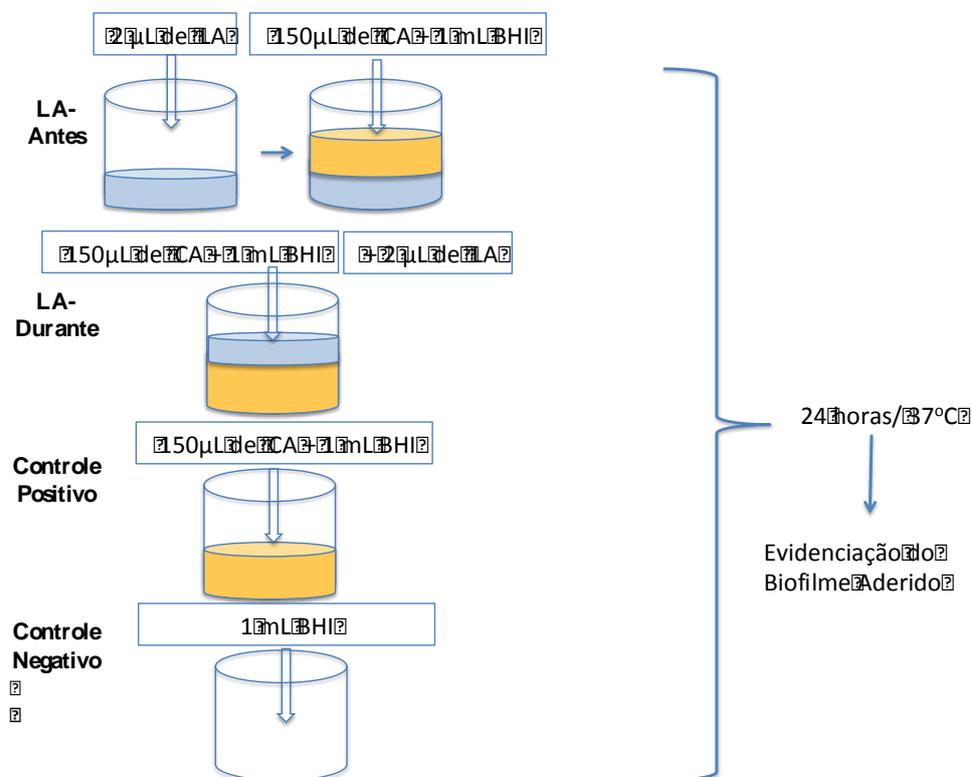
4.2.3 Formação do Biofilme

Foram utilizadas seis repetições em placas estéreis de 24 poços de microtitulação com fundo plano de poliestireno (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Os poços receberam as amostras de LA (nos grupos experimentais) e 150µL da cultura de CA e 1 mL do meio BHI. Após 24 horas de incubação a 37° C em aerobiose, os biofilmes foram avaliados e corados.

4.2.4. Grupos Experimentais e Controles

Os experimentos foram divididos em 2 grupos experimentais (com 6 repetições de cada) de aplicação da Lactoferrina (LA): ANTES e DURANTE a aplicação da cultura de *Candida albicans* ($DO^{600nm} = 1$) como esquematizado na Figura 1 e descritos abaixo.

Figura 1. Representação esquemática dos procedimentos e grupos experimentais



- **Grupo LA antes:** Aplicação da LA antes do biofilme: Foram aplicados 2µL de LA nos poços das placas de poliestireno que foi mantido a temperatura ambiente, sob agitação por 3 horas. Em seguida foi acrescentado os materiais para a formação do biofilme como descrito no item 4.2.3.
- **Grupo LA durante:** Aplicação da LA em conjunto com CA. Foram aplicados 2µL de amostras de LA nos poços das placas de poliestireno em conjunto com os materiais para a formação do biofilme como descrito no item 4.2.3

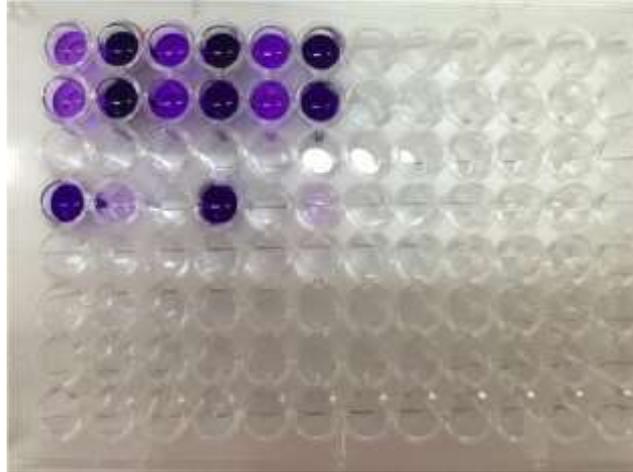
- **Grupo Controle Positivo (Con positivo)** - 24 horas: Foram aplicados nos poços o biofilme como descrito no item 4.2.3 sem a presença da LA e deixados incubados por 24 horas.
- **Grupo Controle Negativo (Con negativo)**: Foram aplicados nos poços o meio BHI e incubados a e após 24 horas de incubação a 37°C em aerobiose.

4.2.5 Fixação e coloração do Biofilme

Após remoção das células planctônicas o biofilme formado nos poços das placas de microtitulação foram fixados com 1 mL de solução de formaldeído a 10% e deixados durante a noite à temperatura ambiente. O formaldeído foi removido e 1 mL de solução de 0,1% de violeta de cristal foi adicionado, e a placas foram mantidas à temperatura ambiente durante 1 h. A solução de violeta cristal não aderidas ao biofilme foram lavadas por 2 vezes com água destilada. Após lavagem e remoção da água, os poços receberam 1 mL de álcool absoluto solubilizando o cristal aderido.

A determinação do crescimento bacteriano e a formação de biofilme foram avaliadas através da leitura das absorbâncias de cada poço (Figura 2) das placas de microtitulação de 96 poços a 490 nm num Leitor de Elisa (Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA).

Figura 2. Placas de Microtitulação com os biofilmes diluídos em Cristal violeta para mensuração da DO (Arquivo Pessoal)



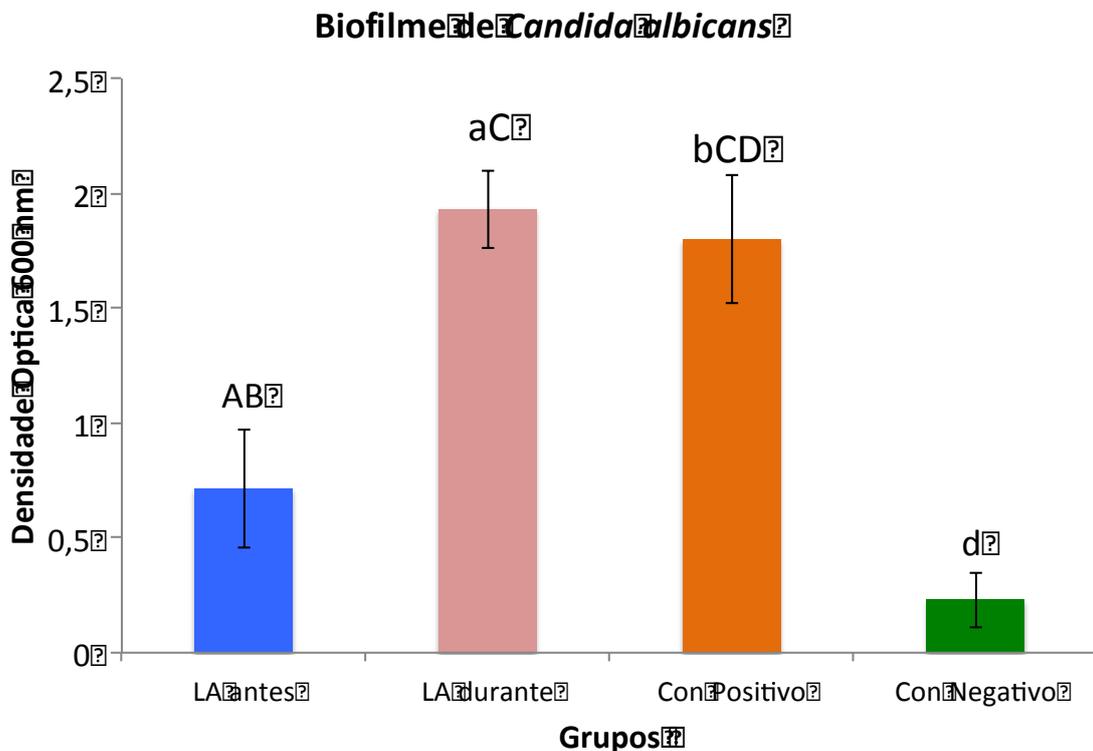
4.2.6 Análises Estatísticas

Foram avaliados os valores de DO obtidos nos poços após a fixação e coloração dos biofilmes. Os grupos experimentais foram comparados entre si bem como com os grupos controle. Os resultados foram analisados estatisticamente pela Análise de variância, com pós teste de Bonferroni. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

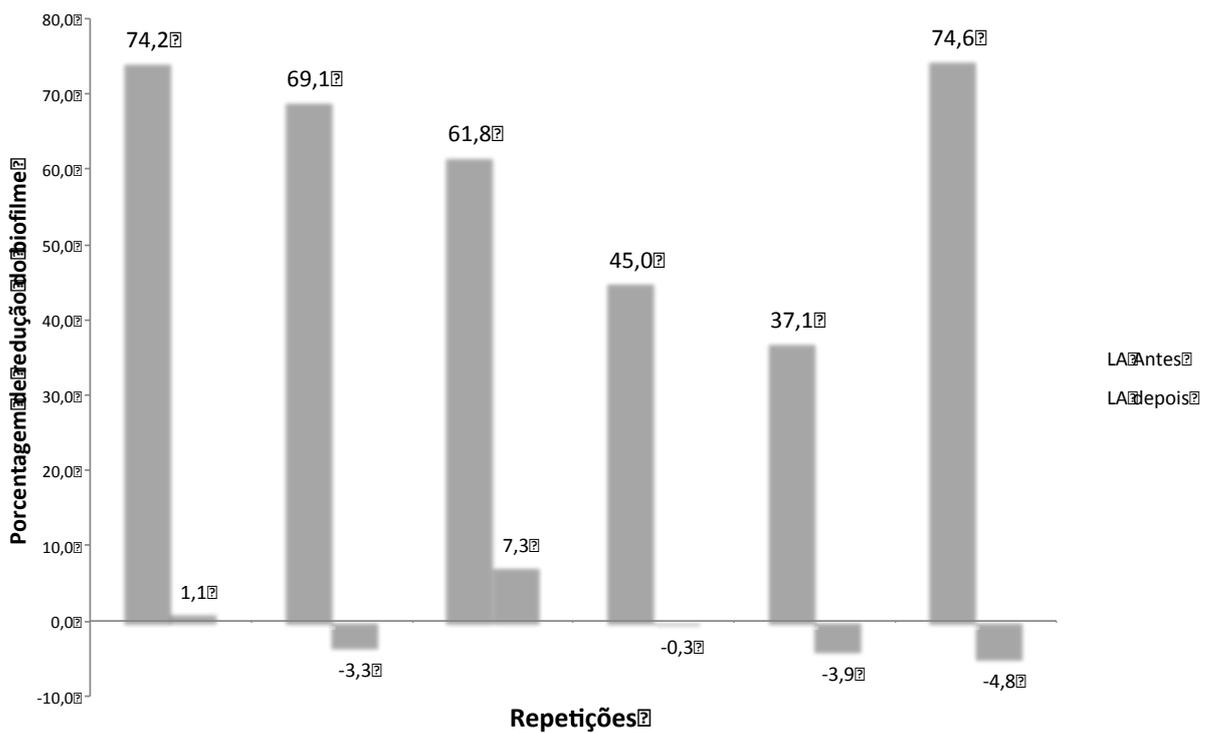
O Biofilme do grupo controle positivo formado em 24 horas teve uma DO média de $1,80 \pm 0,278$ muito superior ao controle negativo que foi de $0,231 \pm 0,121$ (Gráfico 1, $p < 0,05^{Dd}$). Houve diferença estatisticamente significativa na DO média da biomassa do biofilme formado no grupo que recebeu a LA antes (média $0,715 \pm 0,260$) quando comparado a DO do controle positivo (Gráfico 1, $p < 0,05^{Bb}$). Por outro lado, a incubação conjunta da LA com o inóculo fúngico aumentou significativamente o desenvolvimento e acúmulo do biofilme após 24 horas quando comparada com o grupo de aplicação prévia da LA, isto por que a DO média foi de $1,933 \pm 0,17$, estatisticamente maior (Gráfico 1, Anova, $p < 0,05^{Aa}$) mas não diferente da DO do controle positivo (Gráfico 1, Anova, $p > 0,05^{Cc}$).

Gráfico 1. Valor médio de DO (600 nm) dos biofilmes formados de *Candida albicans* nos grupos de aplicação de LA (Lactoferrina) antes e depois do inóculo fúngico, e dos grupos controle positivo e negativo.



As repetições que apresentaram aumento ou diminuição da porcentagem de biomassa de biofilme de CA quando comparadas com o controle positivo estão esquematizadas no Gráfico 2. Todas as repetições dos grupos que tiveram a LA aplicadas antes da formação do biofilme reduziram em média de 60,3% a formação do biofilme (Gráfico 2), o que foi estatisticamente diferente do grupo de aplicação posterior ($p < 0.05$). Por outro lado, a aplicação conjunta de LA durante a inoculação microbiana fez com que a maioria dos biofilmes fossem ligeiramente aumentados, ou seja, 83% dos ensaios tiveram uma DO maior do que o controle positivo.

Gráfico 2. Porcentagem de redução do biofilme de *Candida albicans* nas repetições dos grupos de aplicação de LA (Lactoferrina) antes e depois do inóculo fúngico.



6 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou o desenvolvimento do biofilme CA em placas de poliestireno em presença de LA em momentos distintos: antes da inoculação microbiana e aplicação concomitante da cultura. A hipótese alternativa do presente estudo nos mostra que a presença de lactoferrina reduz a adesão inicial de biofilme de CA, mas não interfere no acúmulo dos micro-organismos ao poliestireno, visto que a aplicação da lactoferrina depois, aumentou a biomassa microbiana, tal como na sua ausência.

A formação de aglomerados de *Candida albicans* em biofilmes representa um dos principais mecanismos de virulência desta levedura por torná-los menos susceptíveis à ação antimicrobiana (SZIEGOLEIT *et al.*, 1999). A adesão do fungo às células do hospedeiro é mediada pelas adesinas e a expressão destas moléculas sofre influência de fatores ligados tanto ao ambiente, quanto ao hospedeiro. A ação das adesinas é essencial para que o fungo sobreviva superficialmente aderido às células epiteliais ou internalizado por elas (PEREIRA, 2009; DE ROSSI, 2011). Os resultados obtidos permitem sugerir a lactoferrina pode interferir na ação destas adesinas fúngicas, visto pela diminuição do desenvolvimento do biofilme no grupo de aplicação prévia.

Os resultados do presente estudo mostraram que a presença de lactoferrina aplicado antes alterou o biofilme diferentemente dos resultados do estudo prévio que testou amostras de colostro pois não alteram a média de DO quando comparado aos controles de crescimento (FARIA, 2017). Embora, neste estudo prévio as análises de frequência de amostras de colostro analisadas mostraram que mais de 63% diminuiram o biofilme. Há evidências de que a lactoferrina interfere na proliferação de CA em modelos animais (VELUSAMY *et al.*, 2014) e os nossos resultados permitiram observar que esta propriedade está relacionada a adesão inicial de CA e não ao seu acúmulo *in vitro*.

A possibilidade de introdução da lactoferrina em crianças não aleitadas no peito (LÖNNERDAL, 2013) pode ser uma boa medida de controle do crescimento de CA, desde que a higiene oral seja realizada periodicamente para remoção dos biofilmes já formados de CA. As evidências de que a lactoferrina possa interferir na

proliferação da *Candida* (SOUKKA et al., 1992) é correta pois impede a adesão inicial do fungo em superfícies o que impossibilita a organização dos biofilmes.

Diante do exposto, a presente investigação das propriedades anti biofilme de CA da lactoferrina, colabora com as boas e inúmeras propriedades antimicrobianas do leite materno, e fortalece a hipótese de que a higiene oral de crianças deve ser um hábito e realizado frequentemente.

7 CONCLUSÕES

Os resultados dos ensaios de CA permitiram concluir que:

- A aplicação de lactoferrina, antes no inóculo alterou a adesão de CA e o biofilme se formou em menor concentração que no controle;
- A lactoferrina aplicada em conjunto com o fungo não interferiu no crescimento de CA; pois, o biofilme, não se altera em biomassa após 24 horas;
- Os efeitos da lactoferrina são efetivos antes do início da formação do biofilme, principalmente por interferir no primeiro evento da formação do biofilme que é a adesão inicial a superfície.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Caroline Medeiros De. *et al.* Atividade antifúngica, antibiofilme e antiproliferativa de *Guapira Graciliflora* Mart. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 32, May 2018.

Andersson, Y., S. Lindquist, C. Lagerqvist, and O. Hernell. 2000. Lactoferrin is responsible for the fungistatic effect of human milk. *Early Hum. Sci* **Direct** [S.I.], v. 59, n. 2, p. 95-105, Aug 2000.

BERKOWITZ, R. J. *et al.* Primary oral infection of infants with *Streptococcus mutans*. **Archives of oral biology** [S.I.], v. 25, n. 4, p. 221-4, 1980.

BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. **Vaccine** [S.I.], v. 21, p. 3383-8, Jul 28 2003.

COSTA, João Carlos Miguel. Increase in biofilm formation by *Escherichia coli* under conditions that mimic the mastitic mammary gland. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 4, Apr 2014.

DIAS. Elizabeth Moreira. Analysis of colostrum IgA against bacteria involved in neonatal infections. **Einstein**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 256–261, Jul-Sep 2017.

DE ROSSI, T. L., MAB; DA SILVA, RV; FERNANDES, EV; GERALDINO, TH; COSTA, IC. ET AL. Interactions Between *Candida albicans* and Host. **Seminário: Ciências Biológicas e da Saúde** [S.I.], v. 32, N. 1, p. 15-28, 2011.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews** [S.I.], v. 15, n. 2, p. 167-93, Apr 2002.

FALSETTA, M. L. *et al.* Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. **Infection and immunity** [S.I.], v. 82, n. 5, p. 1968-81, May 2014.

FARIA, J.B. Avaliação da formação de biofilme de *Candida Albicans* e *Streptococcus Mutans* na presença de colostro humano: influência da 3' sialolactose na biomassa microbiana. 2016. (Mestrado). **Department of Pediatrics, Medical School of Ribeirao Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil & Uberaba University, Universidade de Uberaba, Uberaba.**

FUSTINONI, Adriana Medeiros. *Streptococcus mutans* Competence-Stimulating Peptide Inhibits *Candida albicans* Hypha Formation. **Eukaryot Cell** [S.I.], v. 8, n. 11, p. 1658–1664, Nov 2009.

HANSON, L. A. Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology** [S.I.], v. 81, n. 6, p. 523-33; quiz 533-4, 537, Dec 1998.

JAROSZ, L. M. *et al.* *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. **Eukaryotic Cell** [S.I.], v. 8, n. 11, p. 1658-64, Nov 2009.

JOUAULT, T. *et al.* Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*. **Cellular Microbiology** [S.I.], v. 11, n. 7, p. 1007-15, Jul 2009.

KIANIPOUR, Sahar. Identification of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* Species Isolated from Bronchoalveolar Lavage Samples Using Genotypic and Phenotypic Methods. **Adv Biomed Res.** [S.I.], v. 7, n. 66, Apr 2018.

KLEINEGGER, C. L. *et al.* Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. **Journal of Clinical Microbiology** [S.I.], v. 34, n. 9, p. 2246-54, Sep 1996.

LIM, C. S. *et al.* *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology** [S.I.], v. 31, n. 1, p. 21-31, Jan 2012.

LOHSE, Matthew B. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nat Rev Microbiol** [S.I.], v. 16, n. 1, p. 19-31, Jan 2018.

LÖNNERDAL, Bo. Bioactive proteins in breast milk. **Journal of Paediatrics and Child Health**[S.I.], v. 49, p. 1-7, 2013.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR** [S.I.], v. 62, n. 1, p. 71-109, Mar 1998.

PEREIRA, C. A. Efeitos da Terapia Fotodinâmica *in vitro* em Biofilmes formados por *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. **Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos** [S.I.], 2009.

RAJENDRAN, R. *et al.* Hydrolytic enzyme production is associated with *Candida albicans* biofilm formation from patients with type 1 diabetes. **Mycopathologia** [S.I.], v. 170, n. 4, p. 229-35, Oct 2010.

RUSSELL, C.; LAY, K. M. Natural history of *Candida* species and yeasts in the oral cavities of infants. **Archives of Oral Biology** [S.I.], v. 18, n. 8, p. 957-62, Aug 1973.

SAMARANAYAKE, L. P. *et al.* Oral mucosal fungal infections. **Periodontology 2000** [S.I.], v. 49, p. 39-59, Feb 2009.

SHIRTLIFF, M. E. *et al.* Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. **FEMS Microbiology Letters** [S.I.], v. 299, n. 1, p. 1-8, Oct 2009.

SMITH, D. J.; TAUBMAN, M. A. Ontogeny of immunity to oral microbiota in humans. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : an Official Publication of the American Association of Oral Biologists** [S.I.], v. 3, n. 1-2, p. 109-33, 1992.

SOUKKA. T. Fungicidal effect of human lactoferrin against *Candida albicans* [S.I.], v. 69, n. 3, p. 223-8, Jan 1992.

STECKSEN-BLICKS, C. *et al.* Prevalence of oral *Candida* in the first year of life. **Mycoses** [S.I.], v. 58, n. 9, p. 550-6, Sep 2015.

SZIEGOLEIT, F. *et al.* Effect of dental treatment and/or local application of amphotericin B to carious teeth on oral colonization by *Candida*. **Medical Mycology** [S.I.], v. 37, n. 5, p. 345-50, Oct 1999.

THEIN, Z. M. *et al.* Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. **Mycoses** [S.I.], v. 52, n. 6, p. 467-75, Nov 2009.

TURIN, CG. Lactoferrin for prevention of neonatal sepsis. **Biometals** [S.I.], v. 27, n.5, p. 1007-16, Oct 2014.

VAN DE VEERDONK, F. L. *et al.* Pathogenesis of invasive candidiasis. **Current Opinion in Critical Care** [S.I.], v. 16, n. 5, p. 453-9, Oct 2010.

VELUSAMY, S. K. *et al.* Protective effects of human lactoferrin during *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced bacteremia in lactoferrin-deficient mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** [S.I.], v. 58, n. 1, p. 397-404, 2014.

VICTORA, C. G. *et al.* Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. **Lancet** [S.I.], v. 387, n. 10017, p. 475-90, Jan 30 2016.

WENZEL, R. P.; GENNINGS, C. Bloodstream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. **Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America** [S.I.], v. 41 Suppl 6, p. S389-93, Sep 15 2005.

WILLIAMS, D. W. *et al.* *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. **Periodontology 2000** [S.I.], v. 55, n. 1, p. 250-65, Feb 2011.

WILLIAMS, D.; LEWIS, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. **Journal of Oral Microbiology** [S.I.], v. 3, 2011.

ZIJNGE, V. *et al.* Oral biofilm architecture on natural teeth. **PLoS One** [S.I.], v. 5, n. 2, p. e9321, 2010.