

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE SAIS IMIDAZÓLICOS FRENTE À *CANDIDA ALBICANS*

In vitro evaluation of antifungal potential of imidazolium salts against *Candida albicans*

 Thomas Fernando Mallmann^a,  Guilherme Stein Porto Alegre^a,  Vinícius Demétrio da Silva^b,  Henri Stephan Schrekker^b,  Lina Naomi Hashizume^a

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antifúngico de um conjunto de sais imidazólicos (SI) frente a *Candida albicans*. **Materiais e métodos:** A avaliação antifúngica dos SI foi realizada por meio do teste de difusão em ágar, utilizando uma cepa de *Candida albicans* (ATCC 90028). Cinco diferentes SI foram sintetizados e testados no presente estudo: brometo de 1,8-bis(metilimidazólio-1-il) octano (MImC8MImBr₂), metanossulfonato de 1,12-bis(metilimidazólio-1-il) dodecano (MImC12MIm(MeS)₂), cloreto de 1-n-hexadecil-2,3-dimetilimidazólio (C16DMImCl), metanossulfonato de 1,10-bis(metilimidazólio-1-il) decano (MImC10MIm(MeS)₂) e brometo de 1,10-bis(metilimidazólio-1-il) decano (MImC10MImBr₂). O cloreto de cetilpiridíneo (C16PyrCl) foi utilizado como composto de referência e as soluções de digluconato de clorexidina (C34H54Cl₂N10O14) e salina (NaCl 0,9%) foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente. **Resultados:** Dentre os SI testados, MImC12MIm(MeS)₂, MImC10MIm(MeS)₂ e MImC10MImBr₂ apresentaram os seguintes valores para os halos de inibição formados: 28,00 mm, 20,50 mm e 18,75 mm, respectivamente. Esses valores foram similares ou superiores inclusive aos encontrados para o controle positivo (14,87 mm) e o composto de referência (0 mm). **Discussão:** Os SI podem apresentar uma alternativa promissora às terapias com antifúngicos convencionais, concordando com estudos prévios. Entretanto, mais estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para avaliar o potencial antifúngico destes compostos frente a biofilmes multiespécies de *C. albicans*. **Conclusão:** Baseado nestes resultados, três dos SI testados apresentam atividade antifúngica *in vitro* promissora frente à *Candida albicans*.

Palavras-Chave: *Candida albicans*. Antifúngicos. Líquidos iônicos.

ABSTRACT

Aim: This study aims to evaluate the antifungal potential of imidazolium salts (IS) against *Candida albicans*. **Material and methods:** Antifungal evaluation of the IS was performed using the disk diffusion test, using a strain of *Candida albicans* (ATCC 90028). Five different IS were synthesized and tested in the present study: 1,8-bis(methylimidazolium-1-yl) octane bromide (MImC8MImBr₂), 1,12-bis(methylimidazolium-1-yl) dodecane methanesulfonate (MImC12MIm(-MeS)₂), 1-n-hexadecyl-2,3-dimethylimidazolium chloride (C16DMImCl), 1,10-bis(methylimidazolium-1-yl) decane methanesulfonate (MImC10MIm(MeS)₂) e 1,10-bis(methylimidazolium-1-yl) decane bromide (MImC10MImBr₂). Cetylpyridinium chloride (C16PyrCl) was used as a reference substance. Chlorhexidine (C34H54Cl₂N10O14) and saline (NaCl 0,9%) solutions were positive and negative controls, respectively. **Results:** Among the tested IS, MImC12MIm(-MeS)₂, MImC10MIm(MeS)₂ and MImC10MImBr₂ showed the following values for inhibition halos: 28,00 mm, 20,50 mm and 18,75 mm, respectively. These values were similar or superior than those found for the positive control (14.87 mm) and reference (0 mm) substances. **Discussion:** IS can be a promising alternative to antifungal conventional therapies, as exemplified in previous studies. However, further *in vitro* and *in vivo* studies are needed to assess the antifungal potential of these compounds against *Candida*-mixed biofilms. **Conclusion:** Based on these results, three IS, tested in this study, have *in vitro* promising antifungal potential against *Candida albicans*.

Keywords: *Candida albicans*. Antifungal agents. Ionic liquids.

^a Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Autora de correspondência: Lina Naomi Hashizume - E-mail: lhashizume@yahoo.com

Data de envio: 29/04/2021 **Data de aceite:** 20/07/2021



INTRODUÇÃO

A candidíase oral consiste em uma infecção local e oportunista relacionada ao aumento no crescimento de *Candida spp*¹. Essa patologia tem como fatores predisponentes o uso de aparelhos protéticos e ortodônticos, higiene bucal deficiente, hábitos como o tabagismo, xerostomia, diabetes e quadros de imunossupressão². A *Candida albicans* (*C. albicans*) é o primeiro e mais frequente agente etiológico relacionado à candidíase oral, sendo a levedura mais bem sucedida no processo de colonização oral devido a diferentes fatores de virulência como formação de hifas, plasticidade fenotípica, secreção de enzimas como proteases e fosfolipases, além da presença de uma grande diversidade de adesinas que possibilitam adesão a diferentes receptores presentes em células do epitélio bucal, polímeros inertes em próteses e outros micro-organismos, características que garantem vantagens de crescimento sobre outros micro-organismos na cavidade bucal, tanto em superfícies bióticas como abióticas^{3,4,5}.

Medicamentos antifúngicos tópicos, antifúngicos sistêmicos, assim como substâncias desinfetantes são utilizados como formas de tratamento para candidíase oral/estomatite protética de origem fúngica, sendo a nistatina, miconazol, fluconazol, anfotericina B e a clorexidina os antimicrobianos mais comumente usados⁶.

A nistatina tem sido a primeira opção medicamentosa tópica no tratamento da candidíase oral devido ao seu baixo custo e presença rara de fungos resistentes. Entretanto existe pouca receptividade por parte dos pacientes devido ao seu gosto desagradável. Casos mais graves onde são associados à imunossupressão e internações em UTI, a administração de fármacos como anfotericina B e fluconazol podem ser empregados de maneira sistêmica. Outra opção é a utilização de enxaguatórios bucais à base de clorexidina, tidos como antissépticos padrão-ouro, os quais possuem efeito fungicida quando em contato com a *C. albicans*, devido uma série de alterações celulares que promovem a lise da parede celular e degradação do citoplasma deste fungo^{5,6,7}.

O número limitado de antifúngicos disponíveis no mercado e o uso indiscriminado dos fármacos em ambiente hospitalar podem levar ao aumento da resistência por parte destes micro-organismos, assim, mostra-se necessária a busca por terapias alternativas às convencionais^{8,9}.

Os sais imidazólicos (SI) tem se mostrado como uma alternativa promissora, pois apresentam interações com sistemas biológicos em geral, incluindo interações droga-hospedeiro e droga-levedura¹⁰, apresentando assim um potencial de inibição diante diferentes cepas e espécies de *Candida*^{11,12}. A observação microscópica revelou que as células fúngicas de *Candida albicans* expostas por algumas horas ao sal de imidazólio cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólio (C16MImCl) eram menores do que as células de controle não tratadas¹³. De acordo com Lee et al.¹⁴, o encolhimento celular foi associado à permeabilização da membrana celular e vazamento de conteúdo intracelular após a exposição a agentes antifúngicos como a apigenina. Além disso, estudos conduzidos por Schrekker et al.¹² evidenciaram a ausência de características citotóxicas por parte dos SI frente a células leucocitárias humanas, onde os mesmos não provocaram danos à membrana celular nem alterações estruturais do DNA. *Candida albicans* é a espécie mais associada com a candidíase oral e estudos sobre a atividade antifúngica de SI frente *C. albicans* são limitados³. SI dicatiônicos com espaçadores alquílicos, em alguns casos contendo éteres pequenos (MImC4MImI2 e MImC8MImI2 na Figura 1) mostraram atividades ainda pouco significativas¹⁵.

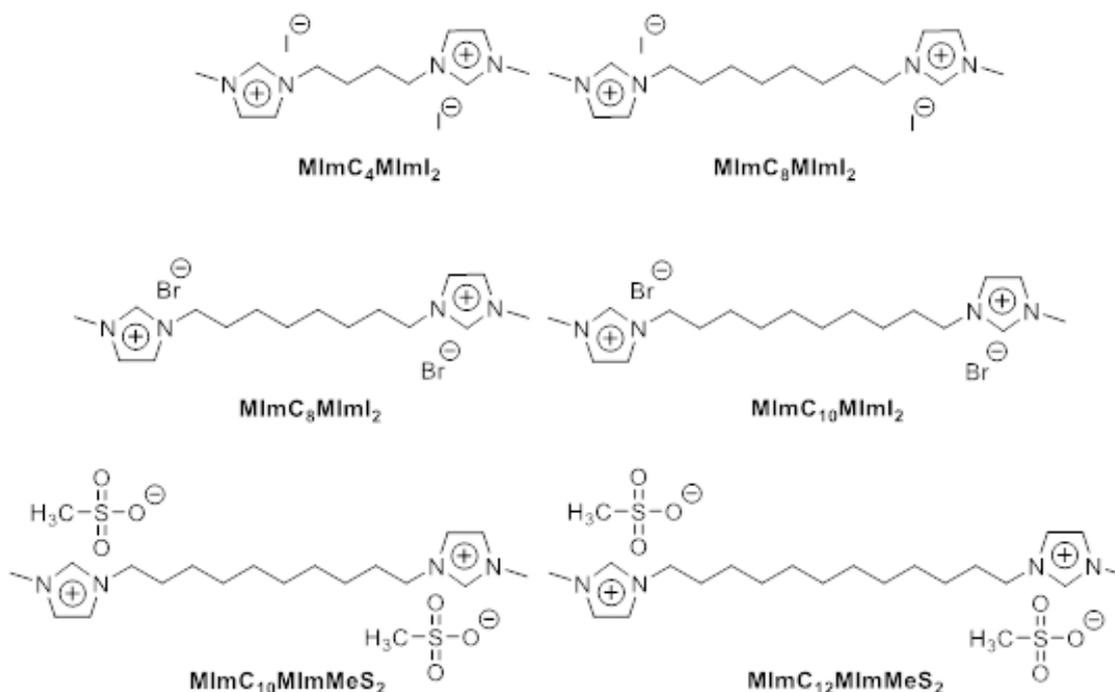


Figura 1: Estruturas químicas dos SI dicatiónicos com espaçadores alquílicos já testados (MImC₄MImI₂ e MImC₈MImI₂) frente *C. albicans* e os derivados utilizados no presente estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sais Imidazólicos

Os SI brometo de 1,8-bis (metilimidazólio-1-il) octano (MImC₈MImBr₂) e brometo de 1,10-bis (metilimidazólio-1-il) decano (MImC₁₀MImBr₂) foram sintetizados de acordo com a literatura¹⁶. Metanossulfonato de 1,12-bis (metilimidazólio-1-il) dodecano (MImC₁₂MIm(MeS)₂) e metanossulfonato de 1,10-bis (metilimidazólio-1-il) decano (MImC₁₀MIm(MeS)₂) foram preparados em duas etapas, primeiro foram sintetizados os alquilantes como segue: uma solução de 1,8-octanodiol (27,3 mmol) e trietilamina (58,6 mmol) em diclorometano (100 mL) foi resfriada a 0 °C, então foi adicionado cloreto de metanossulfonila (54,7 mmol) lentamente, gota a gota. A reação foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e agitada durante 2 h. A fase orgânica foi lavada duas vezes com água e bicarbonato de sódio aquoso a 10%, seca com Na₂SO₄ e filtrada. O solvente presente no material foi removido em pressão reduzida. O mesmo método foi utilizado para a síntese do alquilante a partir do 1,10-decanodiol. O SI cloreto de 1-*n*-hexadecil-2,3-dimetilimidazólio (C₁₆DMImCl) também foi preparado de acordo com literatura¹⁶. Os pesos molares (g/mol) de MImC₈MImBr₂, MImC₁₂MIm(MeS)₂, C₁₆DMImCl, MImC₁₀MIm(MeS)₂ e MImC₁₀MImBr₂ são respectivamente: 436,23, 522,72, 357,02, 494,67 e 464,28 (Figura 2).

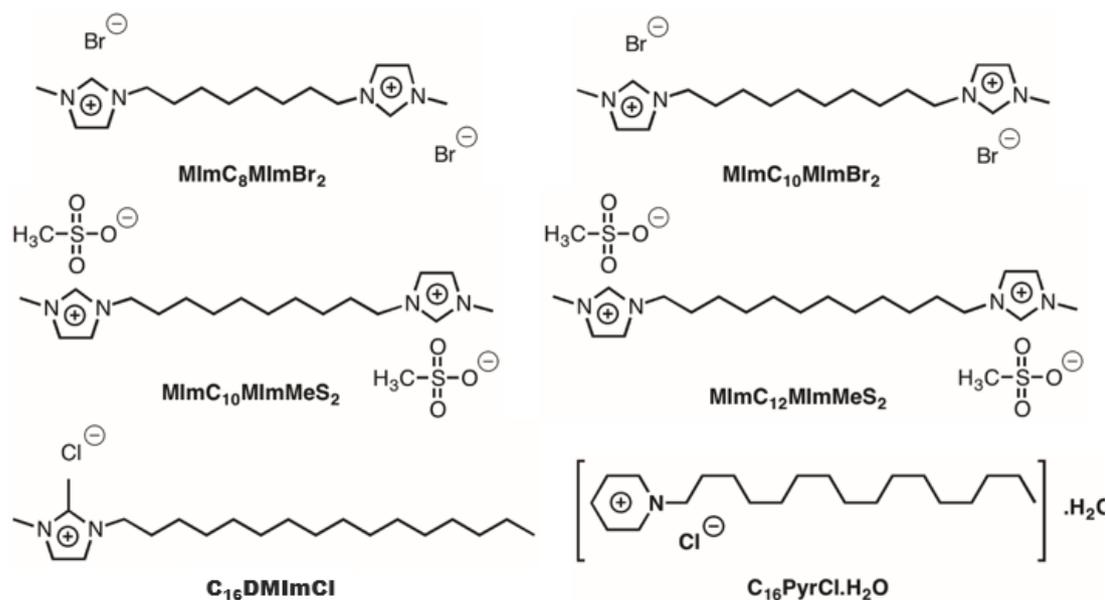


Figura 2: Estruturas químicas dos compostos utilizados no presente estudo.

Baseado no documento M27-A3 publicado em 2008 pelo Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), uma série de microdiluições foi realizada previamente ao experimento, onde a solução tampão fosfato foi utilizada como diluente na fase de microdiluições. O cloreto de cetilpiridíneo (C16PyrCl, Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA) foi incluído no estudo como um composto de referência por ser largamente utilizado como antimicrobiano em enxaguatórios bucais comerciais. A concentração final para todos os compostos testados foi de 100 µg/mL que foi padronizada através do número de diluições realizadas. Cada solução foi esterilizada através de filtração através de uma unidade filtrante (0,22 µm, Millipore, Merck, Alemanha) acoplada a uma seringa estéril. Como grupos controle foram definidos a solução de digluconato de clorexidina (C₃₄H₅₄Cl₂N₁₀O₁₄) a 0,12% (Periogard®. Colgate-Palmolive, São Paulo, Brasil) como controle positivo e uma solução salina (NaCl 0,9%) como controle negativo.

Cepa microbiana utilizada

Foi utilizada a cepa de *C. albicans* ATCC 90028 no presente estudo. Ela foi reativada, a partir de um estoque congelado, em placas contendo meio ágar Saboraud dextrose (Himedia, Mumbai, Índia) e incubada por 24 horas a 37 °C. Após o crescimento, as colônias formadas foram coletadas e inoculadas em tubos contendo meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após esse período, realizou-se o ajuste da densidade óptica da suspensão fúngica para 0,5 da escala de McFarland equivalente a 1,5 x 10⁶ UFC/mL.

Teste disco-difusão em ágar

Foram inoculados 200 µL da suspensão fúngica em 10 (dez) placas de Petri, previamente demarcadas em quatro quadrantes, contendo meio BHI ágar e espalhada na superfície por meio de pérolas de vidro estéreis. Discos de papel filtro estéreis foram imersos durante 5 segundos em microtubos contendo uma das soluções de SI, de referência ou os controles, e posteriormente posicionados de maneira equidistante em seus respectivos quadrantes nas

placas. As placas foram incubadas a 37°C e os halos de inibição foram medidos após 24 horas de incubação. Por meio de uma régua os halos formados foram mensurados em milímetros e registrados. O experimento foi realizado em triplicata em diferentes momentos.

Análise estatística

Os resultados dos valores dos halos de inibição formados foram calculados e expressos em média e desvio padrão para comparação entre os grupos e com os grupos controle positivo e negativo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey. O valor de significância foi 0,05.

RESULTADOS

A Figura 3 mostra os halos de inibição formados a partir dos SI, solução referência e controles utilizados no presente estudo frente à cepa de *C. albicans*. A Tabela 1 apresenta os valores de média e desvio padrão para os halos de inibição formados em cada grupo. O SI MImC12MIm(MeS)₂ apresentou o maior valor (28,00 mm) comparado a todos os demais compostos, com resultado superior inclusive ao do controle positivo ($p < 0,05$). MImC10MIm(MeS)₂ e MImC10MImBr₂ apresentaram resultados similares entre si com os valores médios de 20,50 mm e 18,75 mm, respectivamente. Comparados ao controle positivo, MImC10MIm(MeS)₂ apresentou um valor superior e MImC10MImBr₂ apresentou um resultado similar. Quanto aos valores encontrados para os compostos MImC8MImBr₂, C16PyrCl e C16DMImCl, eles foram similares entre si e ao controle negativo ($p > 0,05$), não apresentando efeito antifúngico frente a cepa de *C. albicans* testada.

Tabela 1: Valores dos halos de inibição formados frente a *C. albicans* (ATCC 90028) por cada um dos sais imidazólicos, solução de referência e controles testados no estudo ($n = 8$)

Composto testado	Média \pm desvio padrão
MImC8MImBr ₂	3,37 \pm 5,98 ^a
MImC12MIm(MeS) ₂	28,00 \pm 3,38 ^b
C16DMImCl	0 \pm 0 ^a
MImC10MIm(MeS) ₂	20,50 \pm 3,46 ^c
MImC10MImBr ₂	18,75 \pm 5,36 ^{cd}
C16PyrCl	0 \pm 0 ^a
Controle positivo	14,87 \pm 0,83 ^d
Controle negativo	0 \pm 0 ^a

Anova seguido pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os compostos testados. (Fonte: elaboração dos autores)

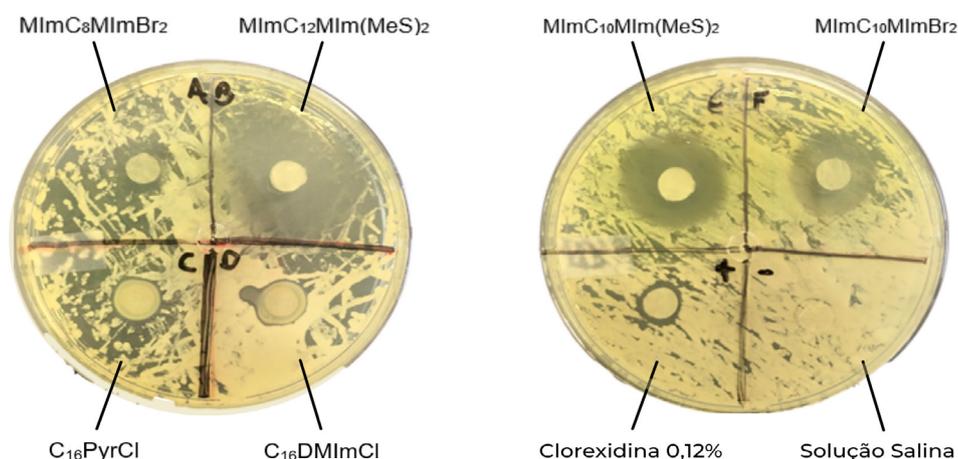


Figura 3: Fotografias das placas mostrando os halos de inibição formados pelos cinco SI testados em concentração de 100 µg/mL frente à cepa *C. albicans* ATCC 90028. (Fonte: elaboração dos autores)

DISCUSSÃO

O presente estudo sintetizou e testou o potencial antifúngico de cinco SI frente a uma cepa de *C. albicans* e verificou que três deles, MImC12MIm(MeS)₂, MImC10MIm(MeS)₂ e MImC10MImBr₂ apresentaram este potencial. Os SI testados são compostos iônicos contendo uma ou duas unidades imidazólicas (catiônica). O heterocíclico imidazol, a versão neutra (sem carga) desta unidade, é encontrada em agentes antifúngicos conhecidos, como o cetoconazol e o miconazol, sendo o principal responsável pelas atividades biológicas apresentadas por estas drogas¹². Em comparação, os SI exibem várias propriedades importantes como maior hidrossolubilidade e alta estabilidade térmica e química¹⁷. Além disso, vários SI apresentam atividade antifúngica frente a diversas espécies de *Candida* em concentrações extremamente baixas, sem mostrar toxicidade em leucócitos humanos¹². Um estudo prévio¹² relatou o potencial antifúngico promissor de múltiplos SI frente a *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Sendo que *C. glabrata* é a segunda espécie do gênero *Candida* mais comumente encontrada na cavidade bucal, e é isolada frequentemente de pacientes que usam próteses dentárias¹⁸.

No presente estudo três dos cinco SI sintetizados e testados apresentaram potencial antifúngico contra a cepa utilizada de *C. albicans* (ATCC90028), com resultados similares [MImC10MImBr₂] ou superiores [MImC12MIm(MeS)₂ e MImC10MIm(MeS)₂] ao controle positivo. Um estudo prévio, que buscou avaliar o potencial antifúngico de SI com uma unidade imidazólica frente a diferentes cepas de dermatófitos, verificou um padrão relacionado às cadeias e ao potencial inibitório dos SI, tendo como tamanho “ideal” cadeias *N*-alquílicas com 10 a 16 carbonos¹¹. Os resultados do presente estudo também mostram uma relação entre o tamanho do espaçador nos SI dicatiônicos e a atividade antifúngica [MImC12MIm(MeS)₂ > MImC10MIm(MeS)₂ ~ MImC10MImBr₂ >>> MImC8MImBr₂], em concordância com este estudo prévio. De acordo com Ocakoglu et al.¹⁵ foi observada atividade antifúngica em *C. albicans*, entretanto os resultados são limitados. No estudo são apresentados SI com espaçadores alquílicos de quatro ou oito carbonos, em alguns casos contendo éteres, com atividades ainda pouco significativas, não estando nos mesmos níveis de efetividade dos sais com cadeias alquílicas mais longas apresentados neste estudo.

Outro estudo que também avaliou diferentes SI e sua ação inibitória frente a diversas cepas de micro-organismos, dentre elas, diferentes gêneros de *Candida*, reportou que os compostos que apresentaram maiores efeitos inibitórios foram aqueles com 16 carbonos em sua estrutura¹², discordando dos resultados do presente estudo que não verificou inibição no SI moncatiônico C16DMImCl que possui 16 carbonos em sua estrutura. No entanto, nenhum dos estudos citados anteriormente^{11,12}, avaliou os efeitos antifúngicos dos compostos imidazólicos frente a *C. albicans*, podendo explicar a diferença dos resultados encontrados no presente estudo e nos estudos prévios.

No presente estudo não foi observado formação de halo de inibição frente à cepa fúngica testada, pelo composto C16PyrCl, que é o cloreto de cetilpiridínio muito utilizado em enxagatatórios bucais comerciais. Embora estudos relatem um efeito antimicrobiano deste composto^{19,20} ele não apresentou efeito antifúngico frente à cepa de *C. albicans* (ATCC90028) testada no estudo. Tanto para o SI C16DMImCl quanto para o sal piridínio C16PyrCl não há presença do hidrogênio com maior acidez na posição C2. No caso do C16DMImCl esse hidrogênio está substituído por um grupo metil e no caso do sal C16PyrCl em sua estrutura não existe o anel imidazólio resultando na ausência deste mesmo hidrogênio ácido. Esse é um diferencial significativo em relação aos demais sais que apresentaram atividade mais significativa e possuem esse hidrogênio ácido na posição C2 (Figura 4).

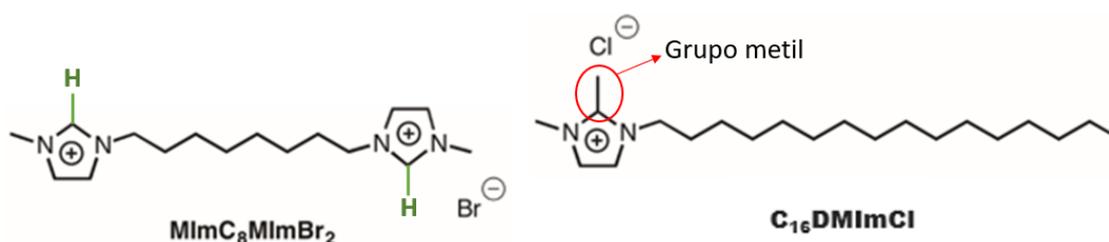


Figura 4: Presença do hidrogênio ácido na posição C2 no MImC8MImBr₂ e o grupo metil na posição C2 no C₁₆DMImCl.

Apesar da literatura relatar a ausência de efeito citotóxico dos SI¹², para uma avaliação ideal seria relevante serem realizados testes de biocompatibilidade com células do tecido gengival.

O crescente aumento na resistência de fungos e leveduras aos antibióticos convencionais tem sido uma preocupação e tem impulsionado a busca por outros compostos alternativos para reduzir esta tolerância microbiana. De acordo com os resultados do presente estudo, pode-se sugerir que os SI podem apresentar uma alternativa promissora às terapias com antifúngicos convencionais, concordando com estudos prévios²¹. Entretanto, estudos tem reportado que a *C. albicans* apresenta interação com bactérias, aumentando a patogenicidade do biofilme e reduzindo sua susceptibilidade aos agentes antimicrobianos^{22,23}. Portanto é necessário também avaliar o efeito antifúngico dos SI em biofilmes multiespécies de *C. albicans* através de estudos *in vitro*, utilizando modelos animais e *in vivo*.

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados do presente estudo, conclui-se que os sais imidazólicos MIm-C12MIm(MeS)₂, MImC10MIm(MeS)₂ e MImC10MImBr₂ apresentam atividade antifúngica

inibindo o crescimento de uma cepa de *Candida albicans*, podendo ser considerados compostos promissores para serem testados em biofilmes multiespécies deste fungo.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Epstein JB. Antifungal therapy in oropharyngeal mycotic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1990 Jan;69(1):32-41.
2. Stramandinoli RT, Souza PHC, Westphalen FH, Bisinelli JC, Ignácio SA, Yurgel LS. Prevalência de candidose bucal em pacientes hospitalizados e avaliação dos fatores de risco. *RSBO (Online)*. 2010 Mar 1;7(1):66-72.
3. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1999 Jun;10(3):359-83.
4. Akpan A. Oral candidiasis. *Postgraduate Medical Journal [Internet]*. 2002 Aug;78(922):455-9.
5. Simões RJ, Fonseca P, Figueiral MH. Infecções por *Candida* spp na cavidade oral. *Odontologia Clínico-Científica*. 2013 Mar;12(1):19-22.
6. Pereira JM, Paiva JA. Tratamento da candidíase invasiva no doente crítico. *Revista Portuguesa de Medicina Intensiva*. 2010;17(1):23-30.
7. Neto MM, Danesi CC, Unfer DT. Candidíase Bucal. *Saúde*. 2005;31(1-2):16-26.
8. Canuto MM, Rodero FG. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *The Lancet Infectious Diseases*. 2002 Sept; 2(9):550-63.
9. Mukherjee P, Sheehan D, Puzniak L, Schlamm H, Ghannoum M. Echinocandins: are they all the same? *Journal of Chemotherapy*. 2011 Dec;23(6):319-25.
10. Anderson EB, Long TE. Imidazole- and imidazolium-containing polymers for biology and material science applications. *Polymer*. 2010 May;51(12):2447-54.
11. Dalla Lana DF, Donato RK, Bündchen C, Guez CM, Bergamo VZ, de Oliveira LFS, et al. Imidazolium salts with antifungal potential against multidrug-resistant dermatophytes. *Journal of Applied Microbiology*. 2015 Jun;119(2):377-88.
12. Schrekker HS, Donato RK, Fuentefria AM, Bergamo V, Oliveira LF, Machado MM. Imidazolium salts as antifungal agents: activity against emerging yeast pathogens, without human leukocyte toxicity. *MedChemComm*. 2013 Oct;4(11):1457-60.
13. Reddy GKK, Nancharaiyah YV. Alkylimidazolium ionic liquids as antifungal alternatives: antibiofilm activity against *Candida albicans* and underlying mechanism of action. *Frontiers in Microbiology*. 2020 Apr;11:730.
14. Lee H, Woo ER, Lee DG. Apigenin induces cell shrinkage in *Candida albicans* by membrane perturbation. *FEMS Yeast Research*. 2018 Feb;18(1). doi: 10.1093/femsyr/foy003.
15. Ocakoglu K, Tasli H, Limoncu MH, Lambrecht FY. Synthesis and antimicrobial activity of imidazolium salts. *Trends in Cancer Research and Chemotherapy*. 2018 1: doi: 10.15761/TCRC.1000103.
16. Fonseca E, Demétrio da Silva V, Klitzke JS, Schrekker HS, Amico SC. Imidazolium ionic liquids as fracture toughening agents in DGEBA-TETA epoxy resin. *Polymer Testing*. 2020 87:106556.
17. Cornellias A, Perez L, Comelles F, Ribosa I, Manresa A, Garcia MT. Self-aggregation and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium based ionic liquids in aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2011 Mar;355(1):164-71.
18. Costa ACBP, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AOC. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed *in vitro*. *Mycoses*. 2013 May;56(6):614-22.
19. Fu J, Wei P, Zhao C, He C, Yan Z, Hua H. *In vitro* antifungal effect and inhibitory activity on biofilm formation of seven commercial mouthwashes. *Oral Diseases*. 2014 Nov;20(8):815-20.
20. Ardizzoni A, Pericolini E, Paulone S, Orsi CF, Castagnoli A, Oliva I, et al. *In vitro* effects of commercial mouth washes on several virulence traits of *Candida albicans*, viridans streptococci and *Enterococcus faecalis* colonizing the oral cavity. Sturtevant J, editor. *PLOS ONE*. 2018 Nov 15;13(11):e0207262.

21. Barbour M, Maddocks S, Wood N, Collins A. Synthesis, characterization, and efficacy of antimicrobial chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles for applications in biomedical materials and consumer products. *International Journal of Nanomedicine* ;8:3507-19.
22. Lobo CIV, Rinaldi TB, Christiano CMS, De Sales Leite L, Barbugli PA, Klein MI. Dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* exhibit more biomass and are mutually beneficial compared with single-species biofilms. *Journal of Oral Microbiology*. 2019 Mar;11(1):1581520.
23. Souza JGS, Bertolini M, Thompson A, Mansfield JM, Grassmann AA, Maas K, et al. Role of glucosyltransferase R in biofilm interactions between *Streptococcus oralis* and *Candida w*. *The ISME Journal*. 2020 May;14(5):1207-1222.