

RESSALVA

Atendendo solicitação do
(a) autor(a), o texto
completo desta tese será
disponibilizado somente a
partir de 26/10/2020.

Thayse Yumi Hosida

**Efeito do hexametáfosfato de sódio,
associado ou não ao fluoreto, no biofilme
misto contendo *Streptococcus mutans* e
*Candida albicans***

**ARAÇATUBA - SP
2018**

Thayse Yumi Hosida

**Efeito do hexametáfosfato de sódio, associado
ou não ao fluoreto, no biofilme misto contendo
Streptococcus mutans e *Candida albicans***

*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 Doutor em Ciência
Odontológica – Área Saúde Bucal da
Criança.*

Orientador: Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Coorientador: Prof. Ass. Juliano Pelim Pessan.

Coorientador: Prof. Dr. Douglas Roberto Monteiro

ARAÇATUBA - SP

2018

Catálogo-na-Publicação

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Hosida Thayse Yumi.

H825e Efeito do hexametáfosfato de sódio, associado ou não ao fluoreto, no biofilme misto contendo *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* / Thayse Yumi Hosida. - Araçatuba, 2018
111 f. : il. ; tab.

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

Orientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Coorientador: Prof. Juliano Pelim Pessan

Coorientador: Prof. Douglas Roberto Monteiro

1. Biofilmes 2. Fosfatos 3. Flúor I. T.

Black D27

CDD 617.645

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dados Curriculares

THAYSE YUMI HOSIDA

Nascimento	16/11/1990 – Maringá/PR
Filiação	Veronica Yutiko Sakai Hosida Luiz Mitsuyochi Hosida
2008/2012	Curso de Graduação em Odontologia na Universidade Estadual de Maringá
2013/2015	Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica, área de concentração Saúde Bucal da Criança, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
2015/2016	Especialização em Odontopediatria na Faculdade de Odontologia de Araçatuba
2015/Atual	Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica, área de concentração Saúde Bucal da Criança, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo. SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica.

Dedicatória

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Luiz e Verônica,

Por me ensinarem a importância da honestidade e humildade. Agradeço o amor, paciência, compreensão e sabedoria em todos os momentos. Vocês são os principais responsáveis para realização de todos os meus sonhos. Agradeço o incentivo e a preocupação com meu bem estar. Meus sinceros agradecimentos, por tudo que são e representam na minha vida.

Ao meu irmão, Vítor,

Agradeço a cumplicidade, o companheirismo, amizade, paciência e o apoio em todos os momentos. Você sempre caminhou ao meu lado e nunca mediu esforços para me ajudar. Obrigada por me confortar sempre que necessário, ajudar a enfrentar meus medos e compartilhar meus sonhos.

Ao avô Massuo,

Pelo amor, carinho, apoio e incentivo durante toda minha caminhada. Você sempre esteve presente nos momentos mais importantes e bonitos da minha vida. Amo muito você!

Saibam que o maior estímulo na minha vida é saber que alguém confia e espera de mim grandes coisas, sonham, trabalham, torcem e comemoram comigo.

Deixo registrado aqui o meu muito obrigada!

Agradecimentos Especiais

A Deus

Por caminhar comigo em todos os momentos, mesmo naqueles em que acreditei estar sozinha. Agradeço pela minha vida, saúde, pela minha família, pelas pessoas maravilhosas que colocou no meu caminho e por me iluminar em cada decisão.

A minha família

Por ser a minha motivação de felicidade pessoal e profissional, por estarem ao meu lado e por me fazerem sentir amada. Em especial agradeço à minha cunhada *Mariela Meira Caunetto* e aos meus primos *Marlon Osida* e *Renato Osida*, mais que primos, meus “irmãos de sangue”, que estão sempre presente na vida. Agradeço a minha prima-sobrinha *Rafaela Osida* por ser nossa alegria diária, por ter trazido tanta felicidade e união à nossa família, além de nos permitir sentir um amor tão sincero. Agradeço também aos meus tios, em especial meus padrinhos Tio *Valdemar Osida* e Tia *Catarina Osida*, por sempre torcerem pelo meu sucesso e felicidade.

Ao meu orientador Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Pelo tempo dedicado, pela paciência na orientação e pela persistência em ensinar inúmeras vezes quando tive dificuldades. Obrigada por ser este orientador sempre acessível e estar sempre à disposição para resolver qualquer problema. Agradeço pela confiança depositada, pela liberdade com a qual sempre me permitiu trabalhar, errar e aprender com meus erros... Agradeço os esforços para me ajudar quando fosse preciso, por sempre ouvir e aceitar minha opinião e decisões mesmo quando não concordava com elas. Isto sem dúvidas me proporcionou um crescimento muito grande. Aprendi muito com seu discernimento e equilíbrio emocional diante das adversidades do dia a dia, além do respeito e consideração que o mesmo tem pelo próximo, respeitando o tempo e as limitações de cada um. Seus ensinamentos e orientação foram fundamentais para meu desenvolvimento profissional e pessoal. Muito obrigada!

Ao meu coorientador Prof. Juliano Pelim Pessan

Pela generosidade em dividir seu conhecimento, pela compreensão e acolhida nos momentos que precisei. Agradeço por não medir esforços para me ajudar quando fosse preciso, pela confiança e amizade durante esses anos em Araçatuba. Admiro sua dedicação e profissionalismo na carreira acadêmica, além do cuidado e ajuda com o próximo. Serei eternamente grata pela paciência, persistência, orientação e pelo apoio nas dificuldades diárias. Ter a oportunidade de conhecer, uma pessoa dedicada, amigo e de bom coração foi um privilégio!

Ao meu coorientador Prof. Douglas Roberto Monteiro

Pela gentileza em ensinar de forma exemplar e respeitosa, por nunca se negar a ajudar e repetir quantas vezes fosse necessário. Admiro sua dedicação, paciência e educação em todos os momentos. O desenvolvimento deste projeto foi possível graças ao seu empenho e ajuda na execução. Muito obrigada pelo companheirismo!

A minha amiga Thamires Priscila Cavazana

Nossa amizade começou de forma natural! Foi construída em momentos exaustivos e difíceis durante o desenvolvimento dos experimentos. A ajuda e o companheirismo foram muito além dos dias no laboratório e os desafios vividos diariamente. Agradeço por dividir comigo o peso dos momentos difíceis, pelo estímulo constante e, sobretudo, pelo silêncio quando necessário. O trabalho foi árduo, mas espero que você leve os bons momentos vividos. Agradeço por tudo o que fez por mim e por fazer da nossa amizade maior que as nossas diferenças. A realização deste trabalho não seria possível sem a sua ajuda. Estarei sempre torcendo pelo seu sucesso e pela sua felicidade.

Aos meus amigos Caio Sampaio e Leonardo Antônio de Moraes

Agradeço imensamente o companheirismo, paciência e amizade. Vocês sempre estenderam a mão quando precisei. A amizade e a generosidade de vocês tornaram meus

dias em Araçatuba mais felizes e leves. A ajuda de vocês foi essencial para a conclusão desse projeto.

*As minhas amigas de infância Luciana Iwamoto e Beatriz
Castanheira e Camila Dartibale*

É tão bom saber que tenho vocês na minha vida, uma amizade sincera, sem interesse, sem preconceito e que permanece firme depois de tantos anos. Obrigada pela preocupação comigo, por compreenderem minha ausência, por não desistirem de me encontrar, sei que não é fácil entender meus problemas diários, mas saibam que reconheço o quanto vocês se esforçam pela nossa amizade.

A minha amigas de graduação Andrielli Borri Costa

Por continuar sendo essa pessoa maravilhosa e grande amiga que conheci na graduação! O tempo passa, mas a nossa amizade não enfraquece, se fortalece pois temos sentimentos que nos unem, o carinho e a admiração! Você me apoia e torce sinceramente por mim, sem julgamento, apenas por querer minha felicidade. Sinto muito a sua falta!

Aos meus amigos que fiz em Araçatuba

Agradeço a todos os amigos que passaram pela minha vida, colaborando para meu crescimento, amadurecimento e aprendizado, fazendo meus dias leves, felizes, harmoniosos e gostosos.

A minha amiga Mariana Nagata,

Posso dizer que em você tenho uma amizade verdadeira e sincera. Durante esses anos você foi uma amiga ímpar na minha vida, esteve ao meu lado sempre que precisei, nunca mediu esforços para me ajudar, uma companheira para todas as horas. Você é um exemplo de humildade, bondade e de uma generosidade gigantesca que ilumina a vida das pessoas que te cercam. Agradeço a Deus por tê-la colocado em meu caminho. Conte sempre comigo. Hoje seguimos caminhos diferentes, mas tenho certeza que a amizade e o companheirismo continuam. Fica aqui registrada minha eterna gratidão!

A minha amiga Liliانا Carolina Báez-Quinteiro,

Foi enriquecedor conhecer você! Atravessou vários quilômetros para realizar seu sonho e acabou me presenteando com sua amizade e companheirismo. Aprendi com você que podemos criar laços fortes e esses permanecerem mesmo a distância! Agradeço pelo cuidado, paciência e compreensão durante todos esses anos. Você com certeza é uma pessoa que iluminou meus dias! Muito obrigada!

A minha amiga Christine Men Martins

A nossa amizade foi além das pesquisas da minha iniciação científica. Agradeço por todo apoio, respeito, carinho, cuidado, compreensão e dedicação. Você me acolheu me fez sentir que estava em família e conseguiu fazer dos meus dias em Araçatuba mais alegres. Durante toda minha vida acadêmica foi a minha orientadora e por mais que o tempo passe você continua fazendo parte dela. Muito obrigada!

A minha amiga Marjully Rodrigues da Silva

Gratidão por todos os momentos e os cuidados compartilhados. Somos tão diferentes, mas conseguimos criar um sentimento tão bonito... a amizade. Agradeço imensamente sua hospitalidade e seus cuidados nesses últimos anos, fez com que me sentisse parte da

sua família! Com certeza você participou dos momentos mais alegres da minha vida e me fez enxergar a vida de uma maneira diferente! Estendo meus agradecimentos a Tia Marlene que sempre me acolheu e cuidou tão bem de mim!

A minha amiga Carla Favretto

Amiga única! Agradeço por ter cruzado meu caminho e ter me presenteado com sua amizade! Ser humano iluminado que valoriza a amizade e as pessoas que estão ao seu redor! Admiro seu lado humano, o seu zelo com o próximo e o cuidado que tem com seus amigos. Você me fez entender que é necessário valorizar os laços de amizade e expressar melhor os sentimentos! Agradeço por sempre se fazer presente na minha vida, mesmo com vários quilômetros de distância.

Aos meus amigos Kevin Bruce Hall e Jaqueline Canova

Pela amizade, companheirismo e aprendizado que tivemos no mestrado e que perdura até hoje. Com vocês dividi minhas preocupações e dificuldades. Agradeço a generosidade e a paciência durante esses anos. Vocês fazem muita falta! Sei que posso sempre contar com vocês!

A Karina Caiassa

Obrigada por trazer leveza e diversão à minha vida. Agradeço o companheirismo, apoio, acolhimento, amizade e paciência principalmente nesses últimos meses. Ter você ao meu lado foi muito importante para o meu crescimento. Obrigada por me dar força e fazer dos meus dias tensos mais leves e alegres.

Agradecimientos

“*Não conheço missão maior e mais nobre que a de dirigir as inteligências jovens e preparar os homens para o futuro*” (Pedro II do Brasil). Cada mestre que passou pela minha vida, deixou um pedaço dentro de mim, que a cada dia me muda e me transforma! Quiçá um dia eu possa unir tudo de bom que cada mestre me mostrou para me tornar um pouquinho do que eles são! Muito obrigada a todos esses mestres! Em especial, a professora *Denise Pedrini*, minha orientadora de mestrado e pessoa pela qual me espelho pela sua elegância, generosidade e respeito a todos. Poder sentir e manter uma relação de amizade, respeito e confiança com a senhora me deu a oportunidade de conhecer a grandiosa pessoa que és. Muito obrigada por todo apoio e ensino durante esses anos. A professora *Cristiane Duque*, agradeço imensamente pelo carinho e amizade. Com o tempo, tive a chance de conhecer a professora maravilhosa e admirável que és! Obrigada pelas oportunidades, pelos conselhos, considerações, confiança e principalmente pelas palavras acolhedoras que muitas vezes vieram em horas que mais precisei. Obrigada por todos os bons exemplos e ensinamentos durante todos esses anos. Ao professor *Robson Frederico Cunha*, obrigada pelas oportunidades, por estimular e ajudar sempre. Muito que aprendi durante a pós-graduação devo a sua paciência e adoração em ensinar. O senhor é uma pessoa admirável, com um coração enorme que está sempre disposto a dividir seu conhecimento e proporcionar crescimento profissional e pessoal a todos que estão ao seu redor. Feliz daquele que tem a oportunidade de aprender com o senhor. Obrigada por tudo e por todas as oportunidades dadas a mim. Agradeço aos demais professores da disciplina *Célio Percinotto, Marcelle Danelon, Rosângela Nery, Sandra Aguiar* pelo conhecimento transmitido, pelas orientações constantes e pela convivência diária durante o Doutorado, “Bebê Clínica” e Clínicas de graduação. À minha orientadora da graduação *Mirian Marubayashi Hidalgo*, obrigada por me ensinar que professores incríveis podem formar não só bacharéis, mas também pessoas humanas, justas e principalmente amigos. Agradeço também à toda equipe de Odontologia da UEM, que me formaram Cirurgiã-Dentista e pelos quais tenho muito orgulho em dizer que sou egressa dessa instituição!

Aos amigos da pós-graduação, *Bruna Mantovan, Carla Mendes, José Antônio Santos Souza, Lenara Chaves, Giovana Coelete, Francisco Nunes, Vanessa Rodrigues*, penso em vocês e só

me lembro de momentos em que me estenderam a mão, pararam o que estavam fazendo para me ajudar e me disseram palavras carinhosas e divertidas. O coração de vocês é grandioso e nobre!

Aos demais colegas do laboratório de Odontopediatria, *Ana Paula Miranda, Bruno Cunha, Cecília Sousa, Daniela Alvin, Emanuella Prado, Francienne Castro, Gabriela Fernandes, Héitor Ceclin, Isabela Catazone, Igor Zen, Isabel Salama, Jackeline Amaral, João Rafael Amadeu, Jorge Orlando, Jesse Augusto, Kelly Aida, Laís Arias, Luhana Garcia, Mayra Frassin, Martin Adriaola, Nayara Gonçalves, Priscila Toninato, Renan Fernandes, Silvio César, Sara Akabane, Suelten Priscila, Rodrigo Sakuma*, obrigada pelo convívio agradável no dia-a-dia! Aos alunos de iniciação científica *Viviane Zequine* e *Emanuel Silva* pela ajuda nas etapas laboratoriais deste trabalho.

Aos funcionários do departamento de Odontopediatria, *Luiz, Mário e Ricardo*, pela ajuda e atenção. Às funcionárias da seção de pós-graduação *Valéria, Cristiane e Lítian*, pelo profissionalismo, nos orientando nos momentos de dúvida.

A *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* pelo apoio financeiro nesses dois anos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho,

Minha gratidão!

Epígrafe

“Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém; é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser autossuficiente. Ninguém se faz sozinho: sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor.”

Selma Carvalho Perdigão

Resumo Geral

Hosida, TY. **Efeito do hexametáfosfato de sódio, associado ou não ao fluoreto, no biofilme misto contendo *Streptococcus mutans* e *Candida albicans***. 2018. 111 f. Tese (Doutorado em Ciência Odontológica, área de Saúde Bucal da Criança) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2018.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo verificar o efeito do hexametáfosfato de sódio (HMP), associado ou não ao fluoreto (F), sobre a composição orgânica, inorgânica e no pH do biofilme mistos de *S. mutans* e *C. albicans* formados *in vitro*. Para todos os estudos, os biofilmes foram formados em poços de placas de microtitulação, colocando uma suspensão (1×10^7 células/mL *C. albicans* + 1×10^8 células/mL *S. mutans*) em saliva artificial suplementada com sacarose (0,4%), a qual tinha metade de seu conteúdo renovada a cada 24 horas. Os biofilmes foram tratados três vezes (72, 78 e 96 horas de formação), por um minuto, com soluções contendo HMP (0.25, 0.5 ou 1%) com ou sem 500 ppm F, além de soluções contendo 500 e 1100 ppm F. A saliva artificial foi utilizada como controle negativo. Para o estudo microbiológico, após o terceiro tratamento foram realizados os testes de quantificação de células cultiváveis (CFU), biomassa total (teste colorimétrico de cristal violeta – CV), atividade metabólica (redução de XTT) e quantificação dos componentes da matriz extracelular (proteína, carboidrato e ácidos nucleicos). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em três ocasiões diferentes. Os resultados foram submetidos à análise de variância a um critério, seguida pelo teste Fisher LSD ($p < 0.05$). O HMP apresentou efeito redutor principalmente na biomassa, metabolismo e nos componentes da matriz extracelular do biofilme. Biofilmes formados por 96 h foram expostos a três diferentes concentrações de sacarose (10, 20 ou 30%) durante 1, 3 ou 5 min. O pH foi medido antes da exposição à sacarose, imediatamente após sua remoção e após 1, 3, 5 e 10 min após a retirada da sacarose. Os resultados foram submetidos à análise de variância a três critérios, seguida pelo teste Fisher LSD ($p < 0.05$). O biofilme exposto a solução de sacarose a 20% por 3 min exibiu padrão de alteração de pH semelhante ao observado *in vivo*. Para o estudo da concentração de F, Ca, e Pi, após o período de tratamento, estes foram analisados no biofilme total e no fluido do biofilme após a mensuração do pH do biofilme. Em outro conjunto de experimentos, após o terceiro tratamento (96 h de formação de biofilme) o biofilme foi exposto, por 3 minutos, à solução de sacarose a 20%. Esta foi removida e,

após 1 minuto, analisou-se o pH do meio e as concentrações de F, Ca, e Pi tanto na biomassa como no fluido do biofilme. Os dados foram submetidos à análise de variância a dois critérios, seguida pelo teste de Fisher LSD ($p < 0.05$). O tratamento com HMP aumentou a concentração de F e Pi no fluido do biofilme antes da exposição à sacarose, além de manter o pH do meio mais próximo do neutro, mesmo após a exposição do biofilme à sacarose. Assim, é possível concluir que o HMP interfere na biomassa, metabolismo, composição orgânica e inorgânica, bem como no pH do biofilme testado.

Palavras-chaves: Fosfatos, Flúor, Biofilmes, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*

Abstract

Hosida, TY. **Effect of sodium hexametaphosphate, associated or not with fluoride, on mixed biofilm containing *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*.** 2018.111 f. Tese (Doutorado em Ciência Odontológica, área de Saúde Bucal da Criança) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2018.

ABSTRACT

The aim of the present study was to verify the effect of sodium hexametaphosphate (HMP), associated or not to fluoride (F), on the inorganic, organic composition and pH of the mixed biofilm of *S. mutans* and *C. albicans*, formed *in vitro*. For all studies, the biofilms were formed in wells of microtiter plates by placing a suspension (1×10^7 cells/mL *C. albicans* + 1×10^8 cells/mL *S. mutans*) in artificial saliva supplemented with sucrose (0,4%), which had half of its content renewed every 24 hours. Biofilms were treated three times (72, 78 and 96 hours of formation), for one minute, with solutions containing HMP (0.25, 0.5 or 1%) with or without 500 ppm F, as well as solutions containing 500 and 1100 ppm F. Artificial saliva was used as a negative control. For the microbiological study, the following tests were performed: quantification of cultivable cells (UFC), total biomass (colorimetric crystal violet test - CV), metabolic activity (XTT reduction) and quantification of matrix components (protein, carbohydrate and nucleic acid). All assays were performed in triplicate on three different occasions. The results were submitted to one-way analysis of variance, followed by the Fisher LSD's test ($p < 0.05$). HMP showed a reducing effect mainly on the biomass, metabolism and components of the extracellular matrix of the biofilm. Biofilms formed for 96 h were exposed to three different concentrations of sucrose (10, 20 or 30%) for 1, 3 or 5 min. The pH was measured before exposure to sucrose, immediately after its removal and after 1, 3, 5 and 10 min after removal of the sucrose. The results were submitted to 3-way analysis of variance, followed by the Fisher LSD test ($p < 0.05$). The biofilm exposed to 20% sucrose solution for 3 min exhibited a pattern of pH change similar to that observed *in vivo*. For the study of the concentrations of F, Ca, and Pi, these ions were analyzed in the total biofilm and in the biofilm fluid after treatment with the test solutions and after the pH measurement of the biofilm. In another set of experiments, after the third treatment (96 h of biofilm formation), the biofilms were exposed for 3 minutes to a 20% sucrose solution. This was removed and after 1 minute the biofilms

were collected, and the pH of the medium and F, Ca, and Pi concentrations were determined both in the biomass and in the biofilm fluid. The data were submitted to two-way analysis of variance, followed by Fisher LSD's test ($p < 0.05$). Treatment with HMP increased F and Pi concentration of the biofilm fluid prior sucrose exposition, and maintained the pH of the medium close to neutral values even after exposure of the biofilm to sucrose. Thus, it is possible to conclude that HMP interferes in the biomass, metabolism, organic and inorganic composition and the pH of the biofilm tested.

Keywords: Phosphates, Fluoride, Biofilms, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*.

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figure 1** Logarithm of colony-forming units per cm² for *S. mutans* (a) and *C. albicans* (b) biofilms, and absorbance values per cm² obtained for the total biomass (c) and metabolic activity (d) quantification assays. NC: negative control (untreated biofilms). Error bars denote the standard deviations of the means. Different upper-case letters symbolize statistical differences among the groups ($p < 0.05$). 54

Capítulo 2

- Figure 1** Mean pH values determined after exposure of the mixed biofilm of *Candida albicans* ATCC 10231 and *Streptococcus mutans* ATCC 25175 to 10% sucrose (A), 20% sucrose (B) and 30% sucrose (C), as a function of the exposure time to sucrose and time of pH determination. Baseline: pH values determined before biofilm exposure to sucrose; t0: pH determined immediately after sucrose removal; t1, t3, t5 and t10: pH determined at 1, 3, 5 and 10 minutes after sucrose removal, respectively. Different capital letters between parentheses denote significant differences among exposure times to sucrose within the same sucrose concentration (Stand time). Different lowercase letters represent significant differences among pH values at each individual graph, as well as among sucrose concentrations. Vertical bars represent the standard deviation of the means (Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$, $n = 3$). 67

Capítulo 3

- Figure 1** Mean values of F (A), Ca (B), P (C) and HMP (D) in $\mu\text{g} / \text{mL}$ of biofilm fluid, before and after contact with sucrose. Lower case letters present statistical difference between groups ($p < 0.05$). 89

- Figure 2** Mean values of F (A), Ca (B), P (C) and HMP (D) in $\mu\text{g} / \text{mL}$ of 90
biofilm biomass, before and after contact with sucrose. Lower
case letters present statistical difference between groups (p
 <0.05).
- Figure 3** Mean values of Ca (A), HMP (B), in $\mu\text{g} / \text{mL}$ after cell lysis, 91
before and after contact with sucrose. Lower case letters present
statistical difference between groups ($p <0.05$). Capital letters
present statistical difference between groups prior and after
sucrose exposition.
- Figure 4** Possible formations of CaHPO_4^0 (A), HPO_4^{-2} (B), CaF^+ (C), HF^0 92
(D) in the biofilm fluid before and after contact with the sucrose.
Lower case letters present statistical difference between groups
($p <0.05$).

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- Table 1.** Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum fungicidal concentration (CFM) and minimum bactericidal concentration (MBC) concentrations of HMP against the strains tested (n=3). 52
- Table 2.** Mean values (SD) of each matrix component of dual-species biofilms obtained after treatment with different concentrations of HMP, associated or not to F. 53

Capítulo 3

- Table 1.** Mean values (standard deviation) of pH of the biofilm after contact with sucrose. Different upper letters symbolize a statistical difference between groups ($p < 0.05$). 87
- Table 2** Degree of saturation values (SD) in relation to hydroxyapatite (HA) and calcium fluoride (CaF_2) from biofilm fluid, before (no sucrose) and after (sucrose) contact with sucrose according to the groups. 88

Sumário

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	31
------------------	----

Capítulo 1 – Effect of sodium hexametaphosphate, associated or not to fluoride, on mixed biofilms

ABSTRACT	37
INTRODUCTION	38
MATERIALS AND METHODS	39
RESULTS	42
DISCUSSION	43
REFERENCES	48

Capítulo 2 – pH changes of mixed biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* after exposure to sucrose solutions *in vitro*

ABSTRACT	57
INTRODUCTION	58
MATERIALS AND METHODS	59
RESULTS	60
DISCUSSION	61
REFERENCES	64

Capítulo 3 – Sodium hexametaphosphate and fluoride affect F, Ca, Pi and pH of dual-species biofilms after sucrose exposure

ABSTRACT	70
INTRODUCTION	71
MATERIALS AND METHODS	72
RESULTS	75
DISCUSSION	77
REFERENCES	82
ANEXOS	95

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

A cavidade bucal é composta por tecidos duros e moles, os quais propiciam um ambiente favorável para a formação de biofilmes polimicrobianos (Jakubovics & Kolenbrander, 2010). A relação entre diferentes microrganismos do biofilme pode aumentar a sua resistência (Jakubovics & Kolenbrander, 2010) e o desequilíbrio dessas comunidades pode exacerbar a patogenicidade das espécies e contribuir para o surgimento de doenças orais relacionadas ao biofilme, como a cárie dentária. A cárie é uma doença biofilme-açúcar dependente (Sheiham & James, 2015), ocasionada pela ação de ácidos produzidos por bactérias a partir da fermentação de carboidratos da dieta, os quais progressivamente levam a perda de minerais do dente, decorrente da constante queda de pH (Cummins & Bowen, 2006).

Um dos principais agentes etiológicos dessa doença é a bactéria Gram-positiva *Streptococcus mutans*, devido à sua capacidade de colonizar a superfície dentária, metabolizar carboidratos, produzir matriz extracelular e ácido láctico, além de ter a capacidade de crescer e se multiplicar em ambiente ácido (Marsh & Martin, 2009; Lamont *et al.*, 2006), características que conferem alto grau de virulência (Loesche, 1986; Krzysciak *et al.*, 2014). Além de bactérias, o biofilme dental é composto por outros microrganismos, dentre os quais se destacam *Candida albicans*, que é o fungo mais comumente encontrado na cavidade oral (Nikawa *et al.*, 2003). A presença de *C. albicans* é um importante fator na progressão da cárie dentária, uma vez que contribui em sua patogênese em crianças cárie-ativas (de Carvalho *et al.*, 2006, Klinker *et al.*, 2009), pois possui enzimas proteolíticas que realizam a degradação do colágeno (Pereira *et al.*, 2018). Além disso, tem sido relatado que *C. albicans* interage com *S. mutans*, acentuando as características de virulência dos microrganismos cariogênicos (Raja *et al.*, 2010; Metwalli *et al.*, 2013).

Quando organizados na forma de biofilmes, os microrganismos se apresentam embebidos em uma matriz extracelular composta por glicoproteínas e polissacarídeos (ten Cate *et al.*, 2009). Inicialmente, várias adesinas de bactérias interagem com as glicoproteínas salivares da película adquirida na superfície dos dentes, por meio de ligação a cátions bivalentes. Na presença de sacarose, as bactérias aderem-se firmemente à superfície dentária, como resultado da produção de exopolissacarídeos (glucanos), por meio da atividade das enzimas glicosiltransferases (GTFs). Assim, o amadurecimento do biofilme promove um metabolismo mais eficiente da sacarose pelo

o *S. mutans*, levando à produção de ácido láctico (Marsh & Martin, 2009; Lamont *et al.*, 2006). Este, por sua vez, causa quedas de pH, o que acarreta um desequilíbrio no estado de saturação dos minerais do fluido do biofilme em relação à estrutura dentária.

O biofilme dental tem a capacidade de reter íons Ca^{2+} e F^- na forma de depósitos minerais (Kaufman & Kleinberg, 1976), ligados a grupamentos aniônicos das paredes das bactérias (Rose *et al.* 1993; 1996) e ligados nas proteínas da matriz do biofilme (Gao *et al.*, 2001). Assim, o biofilme dental atua como um reservatório de íons que podem ser liberados para o fluido do biofilme durante quedas de pH, portanto interferindo em seu grau de saturação, reduzindo a perda mineral do dente. Neste sentido, há evidência de que ocorre um aumento significativo na concentração de Ca^{2+} no fluido do biofilme após um desafio cariogênico (Margolis & Moreno, 1992; Rankine *et al.* 1996; Tanaka & Margolis, 1999), o qual resulta da liberação a partir destes reservatórios.

Além do F e Ca^{2+} , as concentrações de fosforo (Pi) no biofilme dental (biomassa e fase fluida) exercem papel fundamental nos processos de desmineralização e remineralização da estrutura dentária, visto que a concentração destes íons no biofilme dental apresenta uma relação inversa com a incidência de cárie (Shaw *et al.*, 1983), possivelmente devido à liberação destes íons para o fluido do biofilme (Buzalaf *et al.*, 2011). Quanto ao processo de remineralização, este pode ocorrer através da precipitação de fosfatos de cálcio ou pelo crescimento dos cristais de esmalte remanescentes através do Ca e P presentes na saliva (Buzalaf *et al.*, 2011).

Os dentifrícios fluoretados têm contribuído substancialmente para redução na prevalência da cárie dentária (Pessan *et al.*, 2011), visto que sua utilização associa a remoção ou desorganização periódica do biofilme dental com as propriedades cariostáticas do fluoreto (F) (Pessan *et al.*, 2006; Tenuta *et al.*, 2009). Sendo assim, o uso frequente dos dentifrícios promove a manutenção de concentrações elevadas de F na saliva durante o dia, o que é responsável por seu efeito preventivo e terapêutico. Em acréscimo, a formação de produtos da reação esmalte dentina com F, formando o mineral fluoreto de cálcio (CaF_2), também é responsável pelos efeitos supracitados, uma vez que o depósito destes reservatórios no biofilme dental e em lesões de cárie iniciais é capaz de interferir na progressão das mesmas (Buzalaf *et al.*, 2011).

Apesar do declínio na incidência e prevalência da cárie dentária observado em vários países, tem havido uma preocupação crescente em potencializar o efeito do F como estratégia para indivíduos severamente acometidos pela doença (Vogel *et al.*,

2008). Neste sentido, medidas que visem a aumentar os reservatórios iônicos intrabuciais devem estar fundamentadas em estudos que avaliam a capacidade destes íons em permanecer por um longo período de tempo no biofilme dental. Dentre as estratégias disponíveis, a suplementação de veículos fluoretados com sais de fosfato tem sido uma possibilidade para se aumentar a efetividade do F, uma vez que estes parecem agir como uma barreira parcial aos ácidos bacterianos devido a sua afinidade com a superfície do esmalte (da Camara *et al.*, 2014).

Estudos *in vitro* demonstraram que dentifrícios com concentração reduzida de F suplementados com hexametáfosfato de sódio (HMP) apresentam efeito semelhante ao de um dentifrício convencional (1100 ppm F) sobre a desmineralização do esmalte (da Camara *et al.*, 2014). Os efeitos da associação do HMP e F dependem da proporção molar entre estes compostos (da Camara *et al.*, 2015, da Camara *et al.*, 2016), de forma que a concentração ideal de HMP a ser utilizada é de 1% em formulações de dentifrício contendo 1100 ppm F (da Camara *et al.*, 2015, da Camara *et al.*, 2016). Quanto aos efeitos sobre o biofilme dental, demonstrou-se que a associação de 1% de HMP a 1100 ppm de F promoveu a menor retenção de Ca e maior retenção de F quando comparado ao grupo controle (1100 ppm F), enquanto os valores para P foram semelhantes entre os tratamentos. Em acréscimo, esta associação promoveu uma redução significativa na concentração de polissacarídeos extracelulares comparado ao controle negativo (placebo), porém não diferenciou estatisticamente do grupo tratado com 1100 ppm F (da Camara *et al.*, 2015).

Com base no exposto, a associação entre HMP e F apresenta efeito anticárie sobre a desmineralização do esmalte, porém o efeito desta associação no biofilme dental ainda é escasso e contraditório, visto que não foi avaliado o fluido do biofilme e quando analisado o biofilme ocorreu um aumento de F e diminuição da concentração de Ca após desafio cariogênico (da Camara *et al.*, 2015). Devido à capacidade quelante do HMP, ligações com íons presentes no biofilme e na parede dos microrganismos poderiam interferir na disponibilidade de íons como o Ca^{2+} , pois estes estariam ligados ao HMP. Este aspecto reforça a necessidade de estudos adicionais avaliando os efeitos do F, Ca e do HMP sobre o biofilme, especialmente envolvendo métodos analíticos complementares aos utilizados nos estudos supracitados, para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação destes íons sobre a dinâmica da cárie dentária.

Portanto, seria interessante conduzir um estudo *in vitro* avaliando os efeitos da associação entre F e HMP sobre a composição e metabolismo de um biofilme misto de *S. mutans* e *C. albicans*, sobre a retenção de F, P e Ca não somente no biofilme total, mas também no fluido do biofilme antes e após a exposição à sacarose e sobre o pH deste biofilme.

Para abordar o tema proposto, o estudo será apresentado em três capítulos distintos, conforme descrito abaixo:

- Capítulo 1: **“Effect of sodium hexametaphosphate, associated or not to fluoride, on mixed biofilms”**

(artigo submetido ao periódico Future Microbiology);

http://www.futuremedicine.com/userimages/ContentEditor/1340638225103/fm_author_guidelines.pdf

- Capítulo 2: **“pH changes of mixed biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* after exposure to sucrose solutions *in vitro*”**

(artigo aceito no periódico Archives of Oral Biology);

- Capítulo 3: **“Sodium hexametaphosphate and fluoride affect F, Ca, Pi and pH of dual-species biofilms after sucrose exposure”**

(artigo formatado de acordo com as normas do periódico Journal of Dentistry).

<https://www.elsevier.com/journals/journal-of-dentistry/0300-5712?generatepdf=true>

ANEXO A

REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL

1. Buzalaf MAR, Pessan JP, Honório HM, ten Cate JM. Mechanisms of Action of Fluoride for Caries Control. *Monogr Oral Sci* 2011; 22:97-114.
2. Cummins D & Bowen WH. Biotechnology in oral care. *Cosmetic Science and technology series. Biotech in Personal Care* 2006; 29(13):23-52.
3. da Camara DM, Miyasaki ML, Danelon M, Sasaki KT, Delbem AC. Effect of low-fluoride toothpastes combined with hexametaphosphate on *in vitro* enamel demineralization. *J Dent* 2014; 42(3):256-62.
4. da Camara DM, Pessan JP, Francati TM, Santos Souza JA, Danelo M, Delbem AC. Synergistic effect of fluoride and sodium hexametaphosphate in toothpaste on enamel demineralization *in situ*. *J Dent* 2015; 43(10):1249-54.
5. da Camara DM, Pessan JP, Francati TM, Souza JA, Danelon M, Delbem AC. Fluoride toothpaste supplemented with sodium hexametaphosphate reduces enamel demineralization *in vitro*. *Clin Oral Investig* 2016; 20(8):1981-85.
6. de Carvalho FG, Silva I, Hebling DS, Spolidorio J, Spolidorio LC, Palomari DM. Presence of mutans streptococci and *candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol* 2006; 51(11):1024-28.
7. Gao XJ, Fan Y, Kent RL Jr, Van Houte J, Margolis HC. Association of caries activity with the composition of dental plaque fluid. *J Dent Res* 2001; 80(9):1834-39.
8. Jakubovics NS, Kolenbrander PE. The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. *Dis Oral* 2010; 16(8):729-39.
9. Kaufman HW, Kleinberg I. X-ray diffraction examination of calcium phosphate in dental plaque. *Calcif Tissue Res* 1973; 11(2):97-104.
10. Klink T, Kneist S, De Soet JJ, Kuhlisch E, Mauersberger S, Förster A, Klimm W. Acid Production by Oral Strains of *Candida albicans* and *Lactobacilli*. *Caries Res* 2009; 43(2):83-91.
11. Krzysciak W, Jurczak A, Koscielniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33(4):499-515.
12. Lamont RJ, Burne RA, Lantz MS, Leblanc DJ. Oral Microbiology and

- Immunology. USA: American Society for Microbiology Press; 2006.
13. Margolis HC, Moreno EC. Composition of pooled plaque fluid from caries-free and cariespositive individuals following sucrose exposure. *J Dent Res* 1992; 71(11):1776-84.
 14. Marsh PD, Martin MV. *Oral Microbiology*. 5th edition. United Kingdom: Churchill Livingstone; 2009.
 15. Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS Pathog* 2013; 9(10)e1003616.
 16. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986; 50:353-80.
 17. Nikawa H, Yamashiro H, Makihira S, Nishimura M., Egusa H, Furukawa M, Setijanto D, Hamada T. *In vitro* Cariogenic Potential of *Candida albicans*. *Mycoses* 2003; 46(11–12): 471-78.
 18. Pereira DFA, Seneviratne CJ, Koga-Ito CY, Samaranayake LP. Is the Oral Fungal Pathogen *Candida albicans* a Cariogen? *Oral Dis* 2018; 24(4):5218-26.
 19. Pessan JP, Sicca CM, de Souza TS, da Silva SM, Whitford GM, Buzalaf MA. Fluoride concentrations in dental plaque and saliva after the use of a fluoride dentifrice preceded by a calcium lactate rinse. *Eur J Oral Sci* 2006; 114(6):489-93.
 20. Pessan JP, Toumba KJ, Buzalaf MAR. Topical fluorides for caries control. *Monogr Oral Sci* 2011; 22:115-32.
 21. Raja M, Hannan A, Ali K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. *Caries Res* 2010; 44(3):272-276.
 22. Rankine CA, Smith SL, Schneider PE, Gardiner DM. Biochemical comparison of plaque fluid on tooth and acrylic surfaces during a sucrose challenge. *Arch Oral Biol* 1996; 41(7):695-698.
 23. Rose RK, Dibdin GH, Shellis RP. A quantitative study of calcium binding and aggregation in selected oral bacteria. *J Dent Res* 1993; 72(1):78-84.
 24. Rose RK, Shellis RP, Lee AR. The role of cation bridging in microbial fluoride binding. *Caries Res* 1996; 30(6):458-64.
 25. Shaw L, Murray JJ, Burchell CK, Best, JS. Calcium and phosphorus content of plaque and saliva in relation to dental caries. *Caries Res* 1983; 17:543-48.
 26. Sheiham A, James WP. *Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars*

- Reemphasized. *J Dent Res* 2015; 94(10):1341-47.
27. Tanaka M, Margolis HC. Release of mineral ions in dental plaque following acid production. *Arch Oral Biol* 1999; 44(3):253-58.
 28. ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, Groot PW. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J Dent Res* 2009; 88(2):105-15.
 29. Tenuta LM, Zamataro CB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP, Cury JA. Mechanism of fluoride dentifrice effect on enamel demineralization. *Caries Res* 2009; 43(4):278-85.
 30. Vogel GL, Schumacher GE, Chow LC, Takagi S, Carey CM. Ca pre-rinse greatly increases plaque and plaque fluid F. *J Dent Res* 2008; 87(5):466-69.