



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Guilherme Roncari Rocha

Avaliação da eficácia de *tt*-farnesol liberado por novo sistema de liberação controlada de fármacos contra biofilmes orais patogênicos

Araraquara

2017



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Guilherme Roncari Rocha

Avaliação da eficácia de *tt*-farnesol liberado por novo sistema de liberação controlada de fármacos contra biofilmes orais patogênicos

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral Área de Materiais Odontológicos e Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientador: Dra. Marlise Inêz Klein Furlan

Araraquara

2017

R672a

Rocha, Guilherme Roncari

Avaliação da eficácia de tt-farnesol liberado por novo sistema de liberação controlada de fármacos contra biofilmes orais patogênicos / Guilherme Roncari Rocha. -- Araraquara, 2017

53 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Marlise Inêz Klein Furlan

1. Biofilmes. 2. Streptococcus mutans. 3. Candida albicans. I.

Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Guilherme Roncari Rocha

Avaliação da eficácia de tt-farnesol liberado por novo sistema de liberação controlada de fármacos contra biofilmes orais patogênicos

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Reabilitação Oral

Presidente e orientador Profa.Dra. Marlise Inêz Klein Furlan

2º Examinador Profa.Dra. Carla Raquel Fontana Mendonça

3º Examinador Profa.Dra Fernanda Lourenção Briguenti

Araraquara, 07 de Julho de 2017

DADOS CURRICULARES

Guilherme Roncari Rocha

NASCIMENTO: 22/09/1991 – Franca – São Paulo.

FILIAÇÃO: Luis Carlos Ferreira Rocha e Zuleika Roncari Rocha.

2010 – Ingresso no curso de graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP.

2014 – Conclusão do curso de Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP.

2017 - Mestrado em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter dado a oportunidade de estudar, graduar e seguir a carreira acadêmica com a finalidade de ajudar ao próximo dentro do âmbito da odontologia. Agradeço o apoio dos meus familiares (Luis Carlos Ferreira da Rocha; Zuleika Roncari Rocha; Danilo Roncari Rocha; Ana Paula Roncari Rocha; Sabrina Dalpino Iezzi Roncari; e Amélia Aimola Roncari) nessa jornada árdua e difícil que é ficar distante de um neto/filho/irmão. O carinho e apoio dos amigos (Leonardo D. Cifali; Victor Gonçalves; Valter Nailton Silva; Filipe Melo Franco de Mendonça; Rodolfo Xavier; Elkin Florez Salamanca; entre outros) que acompanharam a minha rotina de trabalho e transmitiram força nos momentos mais difíceis. A orientação atenciosa e próxima da qualificada professora doutora Marlise Inêz Klein Furlan e aos amigos de trabalho/laboratório.

À

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2015/03424-1) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Rocha GR. Avaliação da eficácia de *tt*-farnesol liberado por novo sistema de liberação controlada de fármacos contra biofilmes orais patogênicos [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

RESUMO

O desenvolvimento de terapias eficazes para o controle de biofilme oral é um desafio. Agentes tópicos usados para tratar ou prevenir doenças orais causadas por biofilme, geralmente, não são mantidos na boca por um período suficiente para exercer o seu potencial terapêutico. Portanto, estratégias que objetivem na retenção e liberação controlada de agentes ativos no local onde o biofilme virulento se desenvolve são necessárias. Assim, nanopartículas carreadoras (NPC) de fármaco que se aderem à hidroxiapatita, à película salivar e aos exopolissacarídeos da matriz extracelular de biofilme foram desenvolvidas. As NPC possuem elementos responsivos à mudanças de pH para a liberação controlada de agentes terapêuticos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de tratamento tópico utilizando sistema de liberação de fármacos carregado com *tt*-farnesol sobre película salivar e biofilme misto de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* em diferentes superfícies encontradas na cavidade bucal. Para tanto, foram formados biofilmes mistos sobre a superfície de zircônia (LAVA Frame, 3M), de resina acrílica (Lucitone 550, Dentsply) e de hidroxiapatita (controle). Foram aplicados 6 tratamentos tópicos com tempo de exposição de 5 minutos: PBS (tampão fosfato diluente de NPC); NPC-Livre; NPC + *tt*-farnesol; Veículo (PBS com 15% álcool etílico diluente de *tt*-farnesol isolado); e *tt*-farnesol. As análises realizadas foram: biomassa, exopolissacarídeos solúveis e insolúveis em água, pH do meio de cultura, população microbiana e análise da morfologia 3D via microscopia confocal. Os tratamentos com nanopartículas carregada associada ao farnesol mostraram redução na população de *S. mutans* e de exopolissacarídeos solúveis em água (os quais geram proteção para este biofilme), independente do substrato. Porém, esse tratamento não alterou a população do fungo e aumentou a quantidade de exopolissacarídeos insolúveis em água. Assim, a redução da população da bactéria e a menor proteção da mesma por exopolissacarídeos solúveis torna eficiente o tratamento associado à tecnologia de nanopartículas. Porém, é necessário adequar a estratégia para reduzir a população do fungo e de exopolissacarídeos insolúveis em água.

Palavras-chave: Biofilmes. *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*.

Rocha GR. Evaluation of *tt*-farnesol efficacy released by a novel controlled drug delivery system against pathogenic oral biofilms [dissertação de mestrado].

Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

ABSTRACT

The development of efficacious therapies to control oral biofilms is challenging. Topical agents used to treat or prevent oral diseases are generally not retained in the mouth for sufficient duration to exert their full therapeutic potential. Thus, novel strategies for biofilm control focused on retention and sustained delivery of active agents at the site where virulent biofilm develops are warranted. Therefore, nanoparticle-carriers (NPC) that bind avidly to hydroxyapatite, to tooth-pellicle and exopolysaccharides were developed. NPC contains pH-responsive elements that facilitate controlled-release of therapeutic agents. Therefore, the aim of this study was to evaluate the efficacy of topical treatment using farnesol loaded delivery system against pathogenic mixed-species biofilm of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* on different surfaces found in oral cavity. Therefore, mixed-species biofilms were formed on different surfaces: zirconia (LAVA Frame, 3M), acrylic resin (Lucitone 550, Dentsply) and hydroxyapatite (control). Six topical treatments were applied on different surfaces for 5 minutes: PBS (phosphate buffer used to prepare NPC); NPC-free; NPC + *tt*-farnesol; Vehicle (phosphate buffer with 15% ethanol used to prepare *tt*-farnesol); and *tt*-farnesol. The assays performed were: biomass, water-soluble and -insoluble exopolysaccharides, pH of spent media, microbial population, and 3D architecture of biofilms by confocal microscopy. Nanoparticulate treatments associated with *tt*-farnesol showed a reduction in the amount of *S. mutans* population and amounts of water-soluble exopolysaccharides (which provides protection for biofilm), independent of the substrate. In addition, this treatment had no effect on *C. albicans* population and on amounts of water-insoluble exopolysaccharides. Therefore, the reduction of bacterial population and of protection of the microbial population by water-soluble exopolysaccharides demonstrated that the treatment associated with nanoparticle technology is efficient. However, it is necessary to improve the strategy to reduce also the fungal population and the water-insoluble exopolysaccharides.

Keywords: Biofilms. *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 PROPOSIÇÃO.....	15
3 MATERIAL E MÉTODO	16
3.1 Preparo dos Tratamentos	17
3.2 Corpos de Prova	19
3.3 Comportamento do Crescimento das Espécies	21
3.4 Formação da Película Salivar	22
3.5 Crescimento, Adesão e Tratamento dos Biofilmes Sobre as Diferentes Superfícies Propostas	23
3.6 Remoção e Processamento de Biofilmes	26
3.7 Microscopia Confocal	29
3.8 Análise Estatística	30
4 RESULTADOS.....	31
4.1 pH do Meio de Cultura Coletados no Decorrer dos Experimentos	31
4.2 Biomassa dos Biofilmes após os Tratamentos Tópicos	33
4.3 População Microbiana nos Biofilmes após os Tratamentos Tópicos	34
4.4 Composição da Matriz Extracelular após os Tratamentos Tópicos	36
4.5 Análise da Morfologia 3D	38
5 DISCUSSÃO.....	41
6 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
ANEXO	52

1 INTRODUÇÃO

A boca tem uma grande diversidade de micro-organismos, os quais vivem e se organizam em comunidades complexas e dinâmicas. Estas células microbianas estão protegidas por uma matrix extracelular (MEC) com estrutura tridimensional (3D), todo este complexo é chamado biofilme (Fleming, Wingender²⁰, 2010). Para a formação do mesmo as glicoproteínas da saliva se depositam sobre o dente formando uma película salivar. Sobre esta película se aderem os micro-organismos colonizadores iniciais. Após a adesão, os mesmos podem se multiplicar formando uma estrutura 3D chamada de microcolônia e produzir substâncias poliméricas extracelulares que enriqueçam a MEC (Rickard et al.⁵⁷, 2003). Posteriormente vão se coagregar outros micro-organismos (colonizadores secundários) que participam na construção de microcolônias e dão uma organização 3D à MEC.

Muitas doenças infecciosas em humanos são causadas por biofilmes virulentos, incluindo aquelas que ocorrem na boca, por exemplo: a cárie, as doenças periodontais e a candidíase oral (Dye et al.¹⁵, 2007; Marcenes et al.⁴⁶, 2013). A cárie é o produto de uma complexa interação entre os micro-organismos produtores de ácido e os carboidratos fermentáveis (provenientes da dieta) que se dá ao longo do tempo (Selwitz et al.⁵⁸, 2007). Esta doença é uma das causas frequentes de consulta a centros de emergência e gera grandes gastos, convertendo-se em um problema de saúde pública mundial (Marcenes et al.⁴⁶, 2013).

O amido e a sacarose são os carboidratos mais ingeridos na sociedade atual, seu consumo concomitante eleva a cariogenicidade (Firestone¹⁹, 1982), alguns micro-organismos utilizam estes e outros nutrientes e substratos para a elaboração de substâncias poliméricas como proteínas, lipídeos, ácidos lipoteicóicos e exopolissacarídeos (EPS), os quais são os principais constituintes da MEC. Os EPS, glucanos e frutanos são produzidos pelas enzimas glicosiltransferases (Gtfs) e fructosiltransferases (Ftfs), respectivamente (Hamada et al.²⁴, 1977; Loesche⁴⁵, 1986; Paes-Leme et al.⁵¹, 2006; Bowen, Koo.¹⁰, 2011; Koo et al.⁴⁴, 2013, Hojo et al.²⁷, 2009).

A MEC envolve os micro-organismos e possibilita a formação de nichos ácidos devido à fermentação dos açúcares presentes na dieta gerando a

desmineralização da superfície dental. A partir do momento em que o equilíbrio na troca entre íons de cálcio e fosfato vindos da saliva e a superfície do esmalte dental é alterado, ocorre um descontrole no processo de remineralização, gerando uma erosão local (Abou Nell et al.¹, 2016). Os EPS interferem na difusão da saliva (a qual tem uma função de tamponamento dos derivados ácidos) e também reduz a difusão de agentes externos como antimicrobianos (utilizados para o combate e destruição de bactérias e fungos) para dentro do biofilme. Esta difusão limitada aumenta o potencial de formação de biofilmes cariogênicos (Bowen et al.¹⁰, 2011; Fleming, Wingender.²⁰, 2010).

Streptococcus mutans é considerado o micro-organismo mais relacionado com lesões cáries (Hajishengallis et al.²³, 2017; Mattos-Graner et al.⁴⁷, 2014), pois é o produtor mais importante de EPS na MEC (Bowen et al.¹⁰, 2011). *S. mutans* possui ainda outras características de virulência como acidogenicidade (potencial de gerar produtos ácidos como ácidos láctico e acético), aciduricidade (capacidade de se manter em ambiente de baixo pH) (Kidd, Fejerskov.³⁴, 2004) e mecanismos de resistência à outros estresses ambientais, devido à propriedades da sua membrana celular (Ajdic et al.², 2002). Crianças com cárie precoce da infância apresentam colonização por número elevado de *S. mutans*, chegando a 40% da microbiota cultivável (Berkowitz et al.^{7,8}, 1984; 2009; Hughes et al.³⁰, 2012; Kanasi et al.³³, 2010; Milnes, Bowden.⁴⁸, 1985).

S. mutans é uma bactéria Gram positiva, que tem a capacidade de aderir-se às proteínas da película salivar (via adesinas SpaP, Wap, Agl/II em um processo independente de sacarose), coagregar-se com outras bactérias e fungos (que estão presentes) e aderir-se à própria MEC. Seu maior mecanismo de aderência é dependente de sacarose, e é guiado pelas exoenzimas Gtfs, que sintetizam EPS (Loesche.⁴⁵, 1986; Yamashita et al.⁶³, 1993; Bowen et al.¹⁰, 2011). Ainda, a sua elevada produção de Gtfs se reflete no aumento na síntese de EPS e consequentemente numa estruturação 3D mais complexa. *S. mutans* possui três enzimas Gtfs: GtfB sintetiza glucanos insolúveis em água (também chamados solúveis em álcali ou ASP do inglês *alkali soluble polysaccharides*), GtfD sintetiza glucanos solúveis em água (WSP do inglês *water soluble polysaccharides*) e GtfC que sintetiza tanto ASP quanto WSP (Bowen et al.¹⁰, 2011).

Candida albicans é um componente fundamental da microbiota oral humana em condições de saúde, sendo um organismo comensal (Ghannoum et al.²¹, 2010; Dupuy et al.¹⁴, 2014). Porém, sob condições permissivas do hospedeiro, esse micro-organismo pode formar biofilmes com estreptococos orais nas superfícies dos dentes e nas mucosas, e esses biofilmes estão associados com doenças orais como cárie e candidíase orofaríngea, estomatite protética e candidíase cutânea (Papon et al.⁵³, 2013; Thompson et al.⁵⁹, 2011; Harriott, Noverr.²⁵, 2011; Xu et al.⁶², 2014; Falsetta et al.¹⁷, 2014). Esse fungo pode ser encontrado na forma de levedura, na forma de pseudo-hifa ou hifa (Thompson et al.⁵⁷, 2011; Falsetta et al.¹⁶, 2012).

Destaca-se que *C. albicans* é o fungo com maior frequência encontrado em candidíase no mundo, em torno de 63,8% (Papon et al.⁵³, 2013), sendo o principal patógeno em candidíases (Harriott Noverr.²⁵, 2011), mas também é observado em lesões cariosas de rápida evolução associada a *S. mutans* (de Carvalho et al.¹², 2006; Raja et al.⁵⁶, 2010; Yang et al.⁶⁴, 2012, Falsetta et al.¹⁶, 2012). Esse fungo é acidogênico e acidúrico, e também secreta aspartil proteases, enzimas que degradam o colágeno dentinário em ambiente ácido, tornando o biofilme mais cariogênico (Klinke et al.^{38,39}, 2007, 2009).

A relação simbiótica entre *S. mutans* e *C. albicans* é favorecida pela estrutura de hifa do fungo que pode aumentar a superfície de contato para adesão de *S. mutans* e formação de um biofilme hiper-cariogênico (Falsetta et al.¹⁷, 2014; Barbosa et al.⁴, 2016) (Figura 1). Ressalta-se que *C. albicans* é um dos micro-organismos ao qual as Gtfs se aderem, formando quantidades elevadas de EPS em sua superfície (Gregoire et al.²², 2011). Essa relação estimula a formação da MEC, principalmente a produção de EPS (ASP) (Falsetta et al.¹⁷, 2014; Kim et al.³⁵, 2017). Em modelo animal observou-se um aumentando da virulência do biofilme e consequente aumento no estabelecimento e severidade de lesões cariosas do biofilme culminando em maior número de lesões cariosas quando os animais foram infectados conjuntamente com *S. mutans* e *C. albicans*, e estando em presença de uma dieta rica em sacarose (Falsetta et al.¹⁷, 2014).

Figura 1 - Arquitetura 3D de biofilme misto de *S. mutans* e *C. albicans*

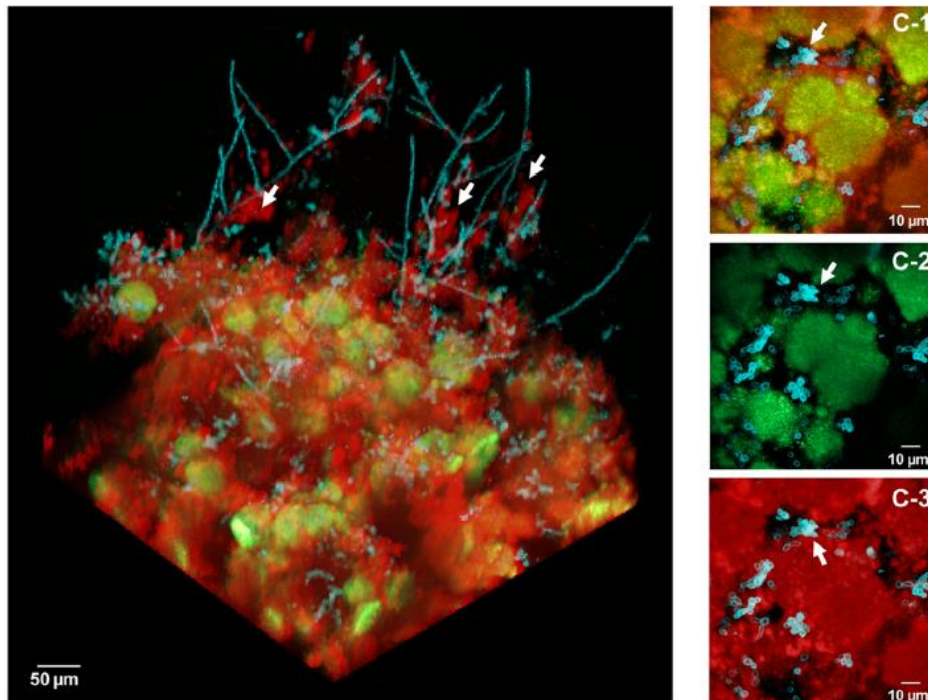


Imagem de microscopia confocal onde se observa a complexidade da arquitetura do biofilme. Estão representados em vermelho os glucanos, em verde as bactérias e em azul os fungos.

Fonte: Falsetta et al.¹⁷, 2014

C. albicans secreta uma molécula de comunicação inter-celular (*quorum sensing*) chamada farnesol. Esta, em baixas concentrações, controla a mudança da morfologia do fungo favorecendo a forma de leveduras, conseqüentemente, podendo reduzir a quantidade de micro-organismos coagregados e também diminuindo a virulência do biofilme (Hornby et al.²⁹, 2001; Wongsuk et al.⁶⁰, 2016). Esta molécula, em maiores concentrações, causa uma redução na resistência a ambientes ácidos na membrana de *S. mutans* (Koo et al.⁴² 2005), podendo assim ser um tipo de tratamento alternativo para este tipo de biofilme. O farnesol é encontrado e isolado da própolis e apresenta características antimicrobianas, anti-inflamatórias importantes para o controle de biofilmes (Burdock¹¹, 1998; Koo et al.^{40,41,42,43} 2002; 2002; 2005; 2010; Jeon et al.^{31, 32}, 2009; 2011; Fernandes et al.¹⁸ 2016). Isso faz com que *tt*-farnesol seja um forte candidato a aparecer em formulações de tratamentos tópicos baseados em produtos naturais.

O desenvolvimento de novas terapias contra doenças causadas por biofilmes na boca é difícil, porque (1) há falta de retenção de agentes exógenos introduzidos via regimes de tratamento padrão (exemplo: aplicação tópica com exposições breves), (2) eliminação rápida pela ação de lavagem da saliva, contato com alimentos, ação de atrito dos tecidos orais e alimentos e (3) a complexidade da estrutura do biofilme. Agentes tópicos precisam ser retidos ou ter efeito prolongado sem exibir atividade biocida de amplo espectro que podem comprometer a complexa microbiota oral comensal. Concomitantemente, os agentes não podem formar complexos com as proteínas salivares, que é um processo que facilita a eliminação rápida desses agentes da cavidade oral.

Nanopartículas carreadoras de fármacos formadas por polímeros têm um enorme potencial para enfrentar tais desafios na cavidade oral sem causarem efeitos tóxicos e colaterais como demonstrado em estudos clínicos de terapia contra câncer (Bourzac⁹, 2012). Nanopolímeros são solúveis em soluções aquosas e permitem o ajuste preciso de sua química, tamanho, carga superficial e outras propriedades como reter e liberar fármacos no local desejado e quando necessário (Benoit et al.^{5,6}, 2006; 2010). O conhecimento sobre a formação do biofilme, bem como as mudanças que ocorrem dentro do mesmo (exemplo: criação de nichos ácidos) oferece a oportunidade para utilizar uma intervenção terapêutica baseada em nanomedicina. Essa tecnologia tem potencial para aumentar a eficácia dos fármacos através da retenção e liberação destes quando necessário. Se bem-sucedida, pode ser empregada para a liberação localizada de qualquer medicamento de interesse com foco no local alvo, evitando assim, o consumo de elevadas concentrações de princípios ativos, ação secundária destes medicamentos e biodisponibilidade em locais do corpo onde não são necessários.

Assim, um trabalho inicial investigou uma abordagem inovadora para liberação de agentes anti-biofilme in situ via nanopartículas carreadoras (NPC) ativadas pelo fator ambiental: pH (Horev et al.²⁸, 2015). As NPC aderem-se avidamente à película e à matriz exopolissacarídica e são desenhadas para liberação de fármacos no local em que o pH se torna ácido (Horev et al.²⁸, 2015). Essa abordagem terapêutica com NPC carregadas com *tt*-farnesol diminuiu a biomassa de biofilme de *S. mutans* formado in vitro, e reduziu significativamente o número e a severidade de lesões de cárie em um modelo animal após a aplicação

tópica de NPC-*tt*-farnesol (Horev et al.²⁸, 2015). Em trabalho posterior, essas NPC foram otimizadas para aumentar o encapsulamento de *tt*-farnesol e melhorar outras características (Zhou et al.⁶⁵, 2016). Porém, é desconhecido se as NPC (livres e contendo *tt*-farnesol) possuem adesão à materiais odontológicos (com película salivar), bem como a capacidade de liberar e atuar no controle de biofilme formado sobre esses materiais. Sobretudo, é desconhecida a resposta de biofilmes in vitro mistos de *S. mutans* e *C. albicans* frente à essa estratégia terapêutica. Assim, a presente pesquisa investigou a eficácia de tratamento tópico com sistema de liberação de fármacos carregado com *tt*-farnesol (NPC-far) sobre biofilme misto patogênico de *S. mutans* e *C. albicans* formados em diferentes superfícies encontradas na cavidade bucal (hidroxiapatita e materiais odontológicos – resina acrílica e zircônia).

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do estudo in vitro foi avaliar eficácia de tratamento tópico utilizando sistema de liberação de fármacos carregado com *tt*-farnesol (NPC-far) sobre biofilme misto patogênico de *S. mutans* e *C. albicans* em diferentes superfícies encontradas na cavidade bucal (hidroxiapatita e materiais odontológicos – resina acrílica e zircônia).

3 MATERIAL E MÉTODO

Para testar o efeito de tratamento tópico com NPC-*tt*-farnesol em biofilmes mistos de *S. mutans* e *C. albicans*, foram incluídos os seguintes tratamentos: NPC-Livre (NP24-3; nanopartícula sem o princípio ativo); NPC + *tt*-farnesol (NP24-3 Far; nanopartícula associada ao princípio ativo *tt*-farnesol); *tt*-farnesol sem nanopartícula. Os controles foram PBS (*Phosphate-Buffered Saline* ou tampão fosfato) para os tratamentos com nanopartículas e V (veículo) sendo 15% de álcool etílico como veículo de *tt*-farnesol livre.

Biofilmes foram formados em três superfícies distintas: hidroxiapatita (para mimetizar o esmalte dentário) e os materiais odontológicos resina acrílica (com grande uso em próteses parciais removíveis e próteses totais) e zircônia utilizada em próteses fixas monolíticas (com um a três elementos).

No desenho original do estudo, tinham-se contemplado 5 tipos de tratamento (PBS, NP24-3, NP24-3 Far, V e Far), para serem realizados em duplicata (dois discos por tratamento, Figura 2), tendo um tempo de exposição de 5 minutos para cada dupla de discos, calculando-se um tempo aproximado de 30 minutos para a realização de cada sequência de tratamentos. Uma observação a ser citada é que as aplicações anteriores foram de 10 minutos, reduzindo pela metade o tempo de exposição neste trabalho (Horev et al.²⁸, 2015). Devido à grande quantidade de duplas, decidiu-se adotar como estratégia a realização de experimentos divididos por substrato (um total de 4 ocasiões para cada material) e análise dos dados separadamente (comparações dentro do mesmo grupo) e não entre grupos de diferentes substratos. O tempo fora da estufa (37°C/5%CO₂) seria alto, a ponto de arriscar variações entre os experimentos.

Figura 2 - Discos de hidroxiapatita suspensos verticalmente.



Disco de hidroxiapatita posicionados no aparato confeccionado com fio ortodôntico pronto para o uso nos testes.

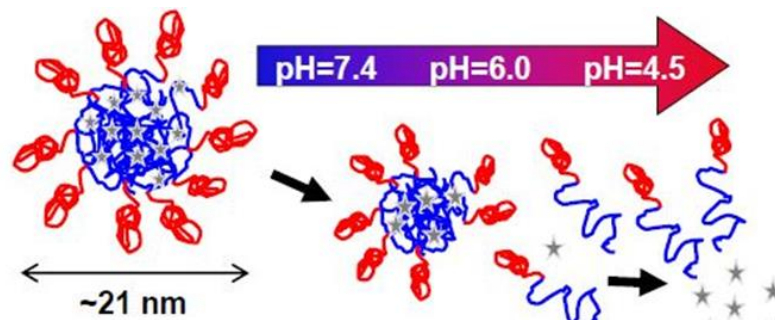
Fonte: Elaboração própria.

Foram realizadas quatro etapas para o desenvolvimento da presente pesquisa: 1) Preparo dos tratamentos; 2) Confeção dos corpos de prova; 3) O comportamento do crescimento das espécies (curvas de crescimento planctônico); 4) O crescimento e tratamento dos biofilmes sobre as diferentes superfícies propostas para análises dos biofilmes.

3.1 Preparo dos Tratamentos

Dentro dos biofilmes são criados nichos ácidos, os quais podem se encontrar também na interface biofilme/superfície (ou substrato). A nanopartícula utilizada nos tratamentos da pesquisa foi desenhada para ter uma resposta à mudança de pH, assim a queda do pH desfaz a estrutura coesa da nanopartículas liberando o fármaco encapsulado, no local e momento necessários para sua ação²⁵ (Figura 3).

Figura 3 - Nanopartícula carreadora



Porção em vermelho sendo a superfície com cargas positivas (corona) e porção em azul (core) sendo pH sensível e carregando o fármaco (representado pelas estrelas em cinza). A seta demonstra a variação do pH gerando a mudança de conformação da nanopartícula.

Fonte: Adaptado de Horev et al.²⁸, 2015.

As nanopartículas foram confeccionadas pelo grupo de pesquisa da Dra. Danielle S. W. Benoit (*University of Rochester*) seguindo a metodologia descrita por Horev et al.²⁸,2015; com algumas modificações que melhorassem as suas propriedades. O controle de qualidade e reprodutibilidade foi realizado pelo referido grupo de pesquisa antes do envio para a confecção dos tratamentos. Foram enviados 4 lotes de nanopartículas para serem testados no Brasil, eles foram nomeados como: NP24-1, NP24-2, NP24-3 e NP26-3 com valores de CCR (*core-corona ratio*) e de potencial zeta especificados na Tabela 1. Os valores de CCR são observados após a síntese das nanopartículas e servem para nos informar o

tamanho da cadeia formada de *poly (dimethylaminoethylmethacrylate)-b-poly (dimethylaminoethylmethacrylate-co-propylacrylic acid-co-butyl methacrylate)* (pDMAEMA-b-p(DMAEMA-co-PAA-co-BMA)).

Tabela 1 – Características das nanopartículas carreadoras

Lote	CCR	Diâmetro	Potencial zeta
NPC 24-1	3,42	13,11 nm	14 mV
NPC 24-2	4,23	13,28 nm	14 mV
NPC 24-3	2,7	11,3 nm	19,6 mV
NPC 26-3	4,1	15,1 nm	20,4mV

Fonte: Elaboração própria.

As nanopartículas dos lotes 24-1 e 24-2 foram enviadas prontas para a sua utilização. Os lotes 24-3 e 26-3 vieram em forma de pó, para serem resuspensas antes do uso. A ressuspensão foi feita com solução PBS (*Phosphate-buffered saline*, pH 7,0), como publicado anteriormente Horev et al.²⁸ (2015). Para cada 1,9 mg de NPC foi adicionado 1 mL de PBS, após incubação por 24 horas para hidratar as nanopartículas utilizou-se sonda sonicadora com potência de 7 W por 30 segundos (Sonicador modelo Q125, QSonica, Newtown, Estados Unidos da América), afim de alterar a conformação da nanopartículas, abrindo suas cadeias. Logo foram adicionados 0,5 mg de *tt*-farnesol ($\geq 95\%$ de pureza, 46193, Sigma-Aldrich) para cada 1 mL da solução com as NPC e novamente o volume passou pelo processo de sonicação por sonda. Por este motivo o grupo controle utilizado para estes tratamentos com NPC foi o PBS. Esta concentração foi definida pelo máximo de incorporação pela nanopartícula sendo sempre superior a 90% de incorporação. O tratamento pronto foi armazenado à 4°C, e antes de cada aplicação era sonicado em cuba ultrassônica afim de garantir que a nanopartícula estava na conformação correta e com o fármaco aprisionado dentro da mesma. O recurso utilizado para tal análise foi visual, pois quando o *tt*-farnesol está livre no meio aquoso, a suspensão tem tons azulados e se caracteriza pela sua turbidez, conseqüentemente quando a nanopartícula aprisiona o fármaco observamos um líquido límpido.

Como o *tt*-farnesol é um óleo, tem características hidrófobas, sendo insolúvel em água, portanto foi necessário o uso de álcool etílico. A concentração de álcool etílico utilizada foi de 15% para que se torne uma solução homogênea na concentração de 4 mM de *tt*-farnesol, sendo o limite de solubilização deste tratamento. Os veículos dos tratamentos são diferentes, para o tratamento sem a nanopartícula, foi utilizado PBS com álcool 15%. Assim, os gráficos com dados mostrarão ambos os veículos e os tratamentos com e sem nanopartícula.

Realizou-se teste piloto, usando duplicata em duas ocasiões para tratar biofilmes mistos e biofilmes contendo apenas a bactéria. No piloto se testaram os lotes NP24-1 e NP24-2 (tratamentos que vieram prontos para utilização), utilizando um tempo de tratamento para os discos de 1,5 minutos. Os tratamentos foram: 1) Nanopartícula livre (NPC-Livre) 2) Nanopartículas carregadas com *tt*-arnesol preparadas nos Estados Unidos (NPC+Far USA) 3) Nanopartícula carregadas com *tt*-farnesol preparadas no Brasil para ambos os biofilmes (NPC+Far BR) sobre a superfície de hidroxiapatita. Baseados nos resultados decidiu-se trabalhar com o lote NP24-2, porque o mesmo apresentou melhor eficiência em reduzir população e biomassa. Ainda, complementaram-se os dados obtidos para NP24-2 realizando mais uma ocasião com o tempo 1,5 minutos. Posteriormente, testou-se a NP24-2 em duplicata em três ocasiões, alterando o tempo de exposição para 5 minutos, com a finalidade de observar se o tempo influenciava nos resultados, lembrando que na literatura os tratamentos são aplicados pelo dobro do tempo (10 min; Horev et al.²⁸, 2015).

O controle na formação de biofilmes pelo uso de nanopartículas mostrou resultados favoráveis com relação a quantidade de biomassa no lote NP24-2, mas o resultado foi sutil. Pelo anteriormente exposto solicitou-se alteração das nanopartículas para obtenção resultados mais evidentes, que afetassem a virulência do biofilme (redução de EPS e diminuição do número de células bacterianas e fúngicas viáveis). Após testes dos novos lotes de NP24-3 e NP26-3, decidiu-se utilizar a NP24-3 nos testes deste trabalho, pois obtivemos valores numéricos melhores da população de *C. albicans*.

3.2 Corpos de Prova

Discos de hidroxiapatita (HA) com área de superfície de $2,7 \pm 0,2 \text{ cm}^2$ (Clarkson Chromatography Products, Inc., South Williamsport, PA). Os discos de

cada material foram fabricados nas mesmas medidas para que a área de superfície para formação do biofilme fosse a mesma. Assim, os grupos experimentais correspondentes a cada material foram: 1) Hidroxiapatita, 2) Resina Acrílica (Ra, Lucitone 550), 3) Zircônia Lava Frame (Frame, 3M).

Discos de Zircônia Lava Frame foram fabricados com o sistema CAD/CAM e preservou-se a superfície criada pela ponta cortante do sistema. Foi utilizado um forno Sirona inFire HTC speed (Sirona Dental Systems GmbH, Bensheim, Alemanha) para sinterização seguindo as recomendações do fabricante. Após sinterização, foram polidos com ponta de borracha somente na superfície lateral.

Discos de resina acrílica foram confeccionado manipulando resina Lucitone 550 na proporção de 21 g de pó para 10 mL de líquido (recomendações do fabricante). Adequou-se a mufla, prepararam-se duas bases, a primeira com gesso pedra e sobre ele uma base de vidro liso. Sobre o vidro adaptou-se uma matriz metálica com 10 orifícios de tamanho e formato padronizado. Inseriu a resina acrílica nos espaços da matriz e sobre o conjunto se colocou uma lâmina de plástico, para criar um espaço de escape para o excesso de material. Fechou-se a mufla e foi prensada a 0,5Kg/f durante 30 minutos. Após este período a estrutura foi aberta, para recortar e limpar os excessos de material. Retornou à prensagem, mas agora durante 2 horas com 1,5 Kg/f.

Finalizado o tempo de prensagem, a mufla foi colocada em uma prensa de aço inoxidável e levada à termopolimerizadora digital para a polimerização da resina durante 60 minutos em água a 73°C. Decorrido este tempo, a temperatura foi elevada para 100°C, na qual a mufla permaneceu por mais 30 minutos. Após o termino do processo o resfriamento foi feito de forma lenta, deixando o conjunto em temperatura ambiente. Após o resfriamento os discos foram retirados da matriz e com auxílio de uma ponta *minicut*. Os excessos foram removidos com cuidado e posteriormente, os discos foram polidos, medidos e os que continham tamanho adequado foram armazenados em água destilada até o dia dos experimentos (Panariello et al.⁵², 2006).

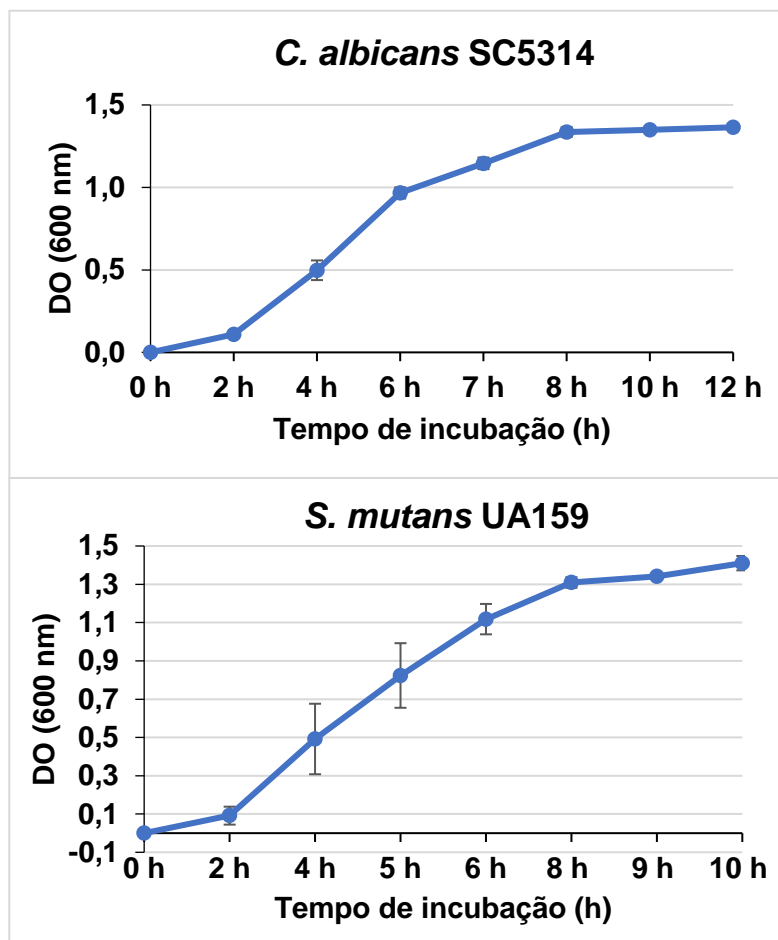
Todos os discos, exceto os de resina acrílica, foram esterilizados em autoclave (120°C durante 20 minutos) já posicionados nos aparatos metálicos (os mesmos utilizados em todos os experimentos) e armazenados em local seco. Os discos de resina acrílica foram esterilizados por micro-ondas por 6 minutos de

exposição com potência de 650 W (Neppelembroek et al.⁴⁹, 2003). Com auxílio de luvas cirúrgicas esterilizadas os discos foram adaptados nos aparatos metálicos esterilizados para a imediata formação da película salivar sobre os mesmos.

3.3 Comportamento do Crescimento das Espécies

Para realização do estudo, primeiramente padronizou-se o crescimento dos micro-organismos a serem estudados realizando as curvas de crescimento (densidade óptica – DO) e contagem de colônias (unidades formadoras de colônia - UFC) (Figura 4). As cepas *S. mutans* UA159 e *C. albicans* SC5314 são mantidas congeladas em freezer -80°C, foram reativadas em placas de ágar sangue e incubadas à 37°C e 5% CO₂, por 48 horas. Cinco colônias de cada cepa foram transferidas separadamente para meio de cultura líquido (triptona e extrato de levedura, TYE, Difco) suplementado com 1% glicose (37°C/5%CO₂). Após incubação por 16-18 horas, essas culturas foram diluídas 1:20 em meio TYE + 1% glicose, e incubadas (37°C/5%CO₂). Foram conferidos os valores de DO longitudinalmente, em horários pré-definidos para formação de uma curva de crescimento até a fase estacionária de crescimento de cada micro-organismo. Em alguns horários selecionados foram feitas diluições seriadas do inóculo para serem semeadas e placas de ágar sangue (cálculo de número de unidades formadoras de colônia - UFC). O objetivo foi observar na curva o meio da fase de crescimento exponencial e utilizar os valores de DO para determinar a quantidade de UFC para formação dos futuros biofilmes.

Figura 4 - Curvas de crescimento de *S. mutans* UA159 e de *C. albicans* SC5314



Curvas de crescimento geradas com o acompanhamento do crescimento dos microorganismos no decorrer do tempo de mensuração. No eixo Y apresentasse a DO e no eixo X a idade em horas. Com os dados definiu-se a DO em do meio da fase de crescimento exponencial de *S. mutans* em $0,73 \pm 0,25$ (que é alcançada em torno de 5 horas a partir da inoculação), e de $0,97 \pm 0,03$ para *C. albicans* (que é alcançada em torno de 6 horas a partir da inoculação). A partir destes valores calculou-se o volume necessário para a formação de um inóculo de 10^8 para *S. mutans* e 10^6 para *C. albicans*, sendo 3,65 mL e 2,55 mL em 38,8 mL de meio de cultura TYE + 1% sacarose completando 45 mL de inóculo para biofilme.

Fonte: Elaboração própria.

3.4 Formação da Película Salivar

Voluntários estimularam a produção de saliva a partir da mastigação de um pedaço de parafilme doando sem quantidade mínima (ANEXO: Comitê de Ética em Seres Humanos da Instituição Sede - CAAE: 31725114.8.0000.5416). Quanto mais doadores utilizados na pesquisa, melhor para obter um produto mais heterogêneo, desta maneira, foram utilizados 4 homens e 8 mulheres como voluntários. Os doadores foram selecionados e pré-requisitos analisados, estes eram: o candidato

deve ser saudável, deve fazer uso de dentifrícios que tenham como princípio ativo apenas o flúor na noite anterior e na manhã da coleta, não poderiam ter ingerido alimentos no dia da doação (jejum) e não podem ter ingerido antibióticos nos últimos 3 meses, não pode ocorrer sangramento durante a coleta.

Coletado o volume, misturou-se a saliva com tampão de adsorção (Tampão AB – 0,05 M KCl; 0,02 M KPO₄; 0,02 M CaCl₂; 0,02 M MgCl₂) em uma proporção de 1:1 (v/v) e adicionou-se 0,1 M PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*, Sigma) à uma relação de 1:1000 (0,1 mM PMSF para a concentração final). Em seguida, o conteúdo foi centrifugado por 10 minutos a 5500 xg, 4°C. O sobrenadante (saliva totalmente clarificada) foi filtrado usando filtro PES de poros de 0,22 µm. A saliva foi guardada no gelo até a sua utilização. Um volume de 2,8 ml de saliva esterilizada foi transferido para cada poço de uma placa de 24 poços. Os discos eram imersos na saliva e a placa foi incubada à 37°C, sob agitação (75 rpm) durante 1 hora (h) para formação da película.

3.5 Crescimento, Adesão e Tratamento dos Biofilmes Sobre as Diferentes Superfícies Propostas

Para a formação dos biofilmes, as cepas preparadas da mesma maneira que descritas no item **3.3. Comportamento do Crescimento das Espécies**, chegando na fase exponencial do micro-organismo o biofilme era formado afim de conter 10⁸ UFC/ml de *S. mutans* e 10⁶ UFC/ml de *C. albicans*. Destaque para a altíssima quantidade de micro-organismos no inóculo levando a uma maior possibilidade de adesão e formação de biofilme a partir de um riquíssimo inóculo. O modelo misto nestas concentrações destes micro-organismos é exacerbado para um biofilme cariogênico relacionado ao desenvolvimento de lesões cariosas severas (exemplo: cárie precoce da infância; Falsetta et al.¹⁷, 2014) e também é superior a biofilmes encontrados em próteses acrílicas (Pereira-Cenci et al.^{54,55}, 2008, 2010) afim de criar um desafio aos tratamentos propostos. Os experimentos foram feitos em 4 ocasiões e em duplicata para cada substrato.

Discos esterilizados de HA estava foram hidratados mediante a imersão por 30 minutos em água milliQ esterilizada, após este período, foram imersos em saliva para formação de película adquirida descrito no item **4.4 Formação da Película Salivar**. No momento que os dois micro-organismos chegarem na DO desejada

(metade da fase de crescimento exponencial), foram pipetados 3,28 mL de *S. mutans* e 2,3 mL de *C. albicans* em 39,42 mL de meio de cultura triptona e extrato de levedura contendo 1% de sacarose, totalizando 45 mL de meio inoculado com os dois micro-organismos. Uma alíquota 100 uL do mesmo foi coletado para semeadura em placas de ágar sangue, afim de controlar, padronizar e quantificar a quantidade de UFC inseridas para início de cada experimento (Figura 5) e 2,8 ml do inóculo para formação dos biofilmes foram transferidos para poços de placas de 24 poços.

Figura 5 - Placa de ágar sangue com os micro-organismos estudados



Placa utilizada para contagem das duas espécies que foram distinguidas visualmente. As colônias brancas e grandes são de *C. albicans* (seta azul) e as colônias pequenas e amareladas são de *S. mutans* (seta amarela).

Fonte: Elaboração própria.

Os aparatos contendo discos com película foram então enxaguados em tampão AB previamente e posteriormente aos tratamentos e inseridos no meio de cultura contendo os micro-organismos propostos. Os cinco tratamentos propostos foram: NPC-Livre (NP24-3; nanopartícula sem o princípio ativo); NPC + *tt*-farnesol (NP24-3 Far; nanopartícula associada ao *tt*-farnesol); *tt*-farnesol sem nanopartícula.

Estes eram aplicados em forma de gotas sobre a superfície, afim de molhar e cobrir com líquido todo o disco sem causar agressão mecânica e sem deixá-los ressecar durante o período de 5 minutos de tratamento (Figura 6). Após o tempo de tratamento, os discos foram enxaguados em tampão AB (Observação: após os demais tratamentos foi utilizado o NaCl 0,89% como solução para enxague) afim de retirar o excesso de fármaco e posteriormente imersos no inóculo. As placas armazenadas em estufa (37°C/5%CO₂).

Figura 6 - Técnica de tratamento por gotejamento.

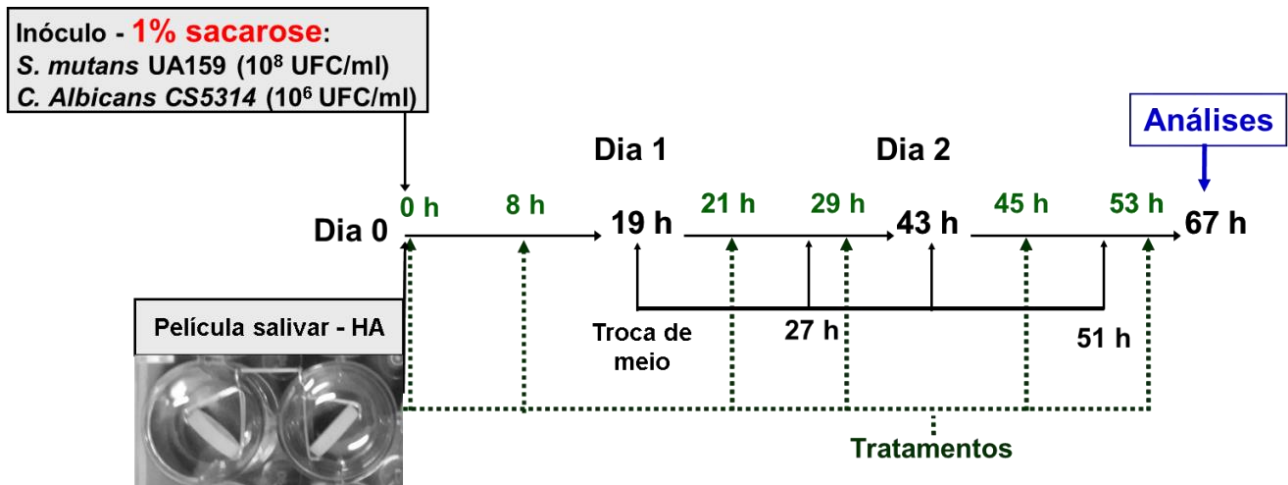


Conjuntos de discos foram submetido a tratamento tópico por gotejamento. Em cada superfície se aplicavam entono de 160-200 µL e o tratamento se mantinha nas superfícies entono de 5 minutos.

Fonte: Elaboração própria.

Foram aplicados seis tratamentos e quarto trocas de meio de cultura durante as 67 horas de experimento. Os tratamentos foram aplicados nos tempos: 0, 8, 21, 29, 45 e 53 horas a partir do tempo 0 horas (momento prévio à inoculação, para ser tratada a película salivar). O meio de cultura foi trocado as 19, 27, 43 e 51 horas, e em cada troca o pH do meio de cultura a ser descartado foi verificado. O desenho experimental foi baseado em estudos anteriores (Falsetta et al.^{16,17}, 2012; 2014; Horev et al.²⁸, 2015; Figura 7).

Figura 7 - Desenho experimental e regime de tratamentos.



Desenho experimental: regimes de tratamento (verde) e horário das trocas de meio de cultura (preto). Cada sequência de 67 horas é chamada de ocasião. A ilustração são discos de hidroxiapatita imersos em saliva para a formação da película salivar.

Fonte: Modificado de Horev et al.²⁸, 2015

3.6 Remoção e Processamento de Biofilmes

Ao atingir 67 horas de formação, o biofilme foi cuidadosamente processado para a análise de suas características: Biomassa, pH do meio de cultura, UFC/biofilme de *S. mutans* e de *C. albicans*, quantificação de WSP e ASP, e visualização de biofilmes através de microscopia confocal.

Os discos foram retirados do aparato de metal e transferidos isoladamente para tubos de ensaio de vidro numerados (16x10mm). A estes tubos foram adicionados 2 mL de NaCl 0,89% (esterilizado) e os tubos levados para banho ultrassônico por 480 segundos em temperatura ambiente com os tubos tampados e protegidos do meio externo mantendo a esterilização das amostras. A seguir, com auxílio de uma espátula nº24 esterilizada, os discos foram raspados e o volume transferido para um tubo falcon 15 mL. Agora, um novo volume de 3 mL de NaCl foi inserido em cada tubo de vidro para lavagem das paredes do tubo, do disco em si e da espátula, afim de adquirir todo o biofilme formado no disco. O volume de 5 ml de biofilme final coletado passou por um sonicador com potência de 7W por 30 segundos (Modelo Q125, QSonica, Newtown, Estados Unidos da América). De cada volume de 5 mL de cada suspensão de biofilme, 0,1 mL foram separados para diluição seriada e semeadura em placa de ágar sangue. As placas foram incubadas

por 48 horas à 37°C e 5% de CO₂, para contagem de colônias, e determinação da população microbiana em UFC/biofilme.

O restante do volume (4,9 mL) foi centrifugado a 4000 rpm, por 20 minutos a 4°C (Centrífuga Eppendorf 5810 R, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi armazenado em novo tubo (tubo falcon de 15 ml – nomeado como sobrenadante) e o *pellet* (precipitado celular com os componentes insolúveis da MEC) foi lavado com 2,6 mL de água Milli-Q esterilizada (4000rpm/ 20min/ 4°C). Depois da centrifugação, o sobrenadante foi misturado no mesmo tubo falcon de 15 mL com o primeiro sobrenadante. A lavagem foi repetida com mais 2,6 mL de água e o mesmo foi novamente armazenado (portanto, o sobrenadante total foi de 10 mL utilizados para WSP), O *pellet* foi ressuspensão em 2,6 mL de água, dos quais 0,5 mL foram utilizados para cálculo do peso seco insolúvel, e 1 mL para a determinação de polissacarídeos insolúveis em água (solúveis em álcali - ASP).

Para o peso seco insolúvel, o volume coletado foi inserido em suportes de papel alumínio previamente pesados em balança de precisão, foram deixados em estufa de secagem por 24 horas. Os suportes eram novamente pesados e a diferença dos valores anotados, sendo considerado o peso seco insolúvel.

Para determinar o WSP, retirou-se uma alíquota de 3 mL do sobrenadante coletado, à qual foram misturados 7 mL de álcool 99%. Essa mistura foi armazenada em freezer -80°C durante 18 horas para precipitação do WSP. Os tubos foram centrifugados a 9500g durante 20 minutos a 4°C (Centrífuga eppendorf 5430 R, Hamburgo, Alemanha), o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 7 mL de álcool 75% em cada tubo e com ajuda de uma alça de inoculação esterilizada, a parede do tubo era raspada afim de desprender o material que ficou grudado. O volume passou pelo vórtex para homogeneização até que visualmente não encontrássemos nenhum precipitado. Esta lavagem com álcool 75% foi realizada da mesma maneira por 3 vezes. Após a última lavagem, o material foi ressuspensão em 1mL de água e passou pelo vórtex com a mesma finalidade. Os tubos, após as lavagens e a ressuspensão em água, estão prontos para o teste colorimétrico, o qual tem como base a reação fenol- ácido sulfúrico para a distinção de intensidade de cor, quanto maior a densidade ótica encontrada na amostra, maior a quantidade de polissacarídeos como descrito por Dubois et al.¹³ (1956).

Para determinar o ASP, a amostra coletada foi centrifugada com 14.000 rpm por 10 minutos afim de criar um precipitado dentro do microtubo com o volume de 1 mL da amostra. O sobrenadante foi descartado e o precipitado passou por um processo de secagem com ajuda de um concentrador de amostras (modelo RVC 2-18C D, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH), no qual os microtubos com as amostras permaneceram por no mínimo 3 horas para a total secagem. Com o desprendimento passivo do precipitado do fundo do tubo e auxílio de novos microtubos pré-pesados, o precipitado foi transferido e pesado em balança de precisão. De acordo com o peso do material foi adicionado 300 μ L de NaOH (1M) para cada 1 mg de peso seco de material. Passou pelo vórtex e foi incubado em estufa orbital durante 2 horas, sendo que após os primeiros 10 minutos e após completar 30 minutos de incubação os tubos passavam novamente pelo vórtex para dissolver todas as partículas do precipitado. Após as 2 horas de incubação, os microtubos foram centrifugados com 14.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi armazenado em um tubo falcon de 15 mL. O sobrenadante contém a amostra a ser analisada: ASP. Novamente o volume de NaOH foi inserido no precipitado e incubado por mais 2 horas seguindo os mesmos passos. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi armazenado no mesmo tubo falcon 15 mL anterior e o precipitado novamente suspenso com NaOH, mas esta terceira suspensão em NaOH as amostras foram apenas homogeneizadas em vórtex até que visualmente todo precipitado estivesse lavado pela solução (não foi incubado por mais 2 horas, passou direto para o passo de centrifugação). Após a última centrifugação o terceiro sobrenadante foi coletado e armazenado e o microtubo com o material precipitado foi descartado. Neste momento, com os 3 sobrenadantes coletados tem-se o volume final da amostra de ASP para cada amostra de biofilme. A partir deste momento, as amostras ASP nos tubos falcon receberam 3 volumes de álcool etílico 75% para precipitação (-80°C / 18 horas). Essas amostras de ASP foram lavadas da mesma forma como foi descrito na lavagem de WSP, passaram pelo mesmo processo até o concentrado final, a diferença é que cada amostra foi ressuspensa no volume final de NaOH (3 vezes o volume adicionado para realizar cada extração, diferentemente do WSP que foi apenas ressuspensa em 1 mL de água). Essas amostras foram analisadas pelo teste colorimétrico fenol e ácido sulfúrico para determinação de carboidratos, como descrito por Dubois et al.¹³ (1956).

3.7 Microscopia Confocal

Para a análise da morfologia 3D, os biofilmes foram formados pelas mesmas 67 horas sobre hidroxiapatita e tratados conforme descrito anteriormente. Para marcação de EPS na matriz extracelular, foi usado um método baseado na incorporação de dextranos marcados com Alexa Fluor[®] 647 (fluorescentes; 10 kDa - absorvância / fluorescência máximos de emissão de 647/668 nm; *Molecular Probes, Invitrogen Corp.*, Carlsbad, CA) pelas enzimas Gtfs durante a formação de exopolissacarídeos (glucanos) (Klein et al.^{36,37}, 2009, 2011). Assim, para a visualização da matriz adicionou-se 13,4 µL desse dextrano fluorescente (1µM) em 2,8 mL de meio de cultura a partir do início (0 h) e durante o desenvolvimento dos biofilmes. Completado as 67 h, SYTO[®] 9 foi utilizado para marcar os micro-organismos nos biofilmes. Para tanto, os discos foram tirados da placa com meio de cultura e enxaguados com NaCl 0,89%, e transferidos para poços contendo 1,5 µL de SYTO[®] 9 (485/498 nm; Molecular Probes) e 2,8 mL de NaCl 0,89%. Os biofilmes foram incubados a temperatura ambiente durante 30 minutos, enxaguados três vezes utilizando NaCl 0,89%, e deixados nesta mesma solução a temperatura de 4°C até a realização de análises microscópicas. Todos os procedimentos foram realizados protegendo os biofilmes e os fluoróforos da luz para evitar fotodegradação.

As imagens foram adquiridas utilizando microscopia confocal de varredura à laser (microscópio Zeiss LSM 780, Zeiss, Alemanha). Esse microscópio estava equipado com uma lente objetiva de 20X. Cada biofilme foi examinado em 3 a 4 posições selecionadas aleatoriamente. Uma série de imagens no eixo Z foram geradas por corte óptico em cada uma destas posições (cortes a cada 1,5 µm). Essas imagens foram analisadas usando software AMIRA 6.0.1 (Mercury Computer Systems Inc., Chelmsford, MS) para criar representações tridimensionais de cada componente estrutural (EPS e micro-organismos) dos biofilmes para a visualização da morfologia e arquitetura 3D conforme descrito por Klein et al.^{36,37} (2009, 2011).

3.8 Análise Estatística

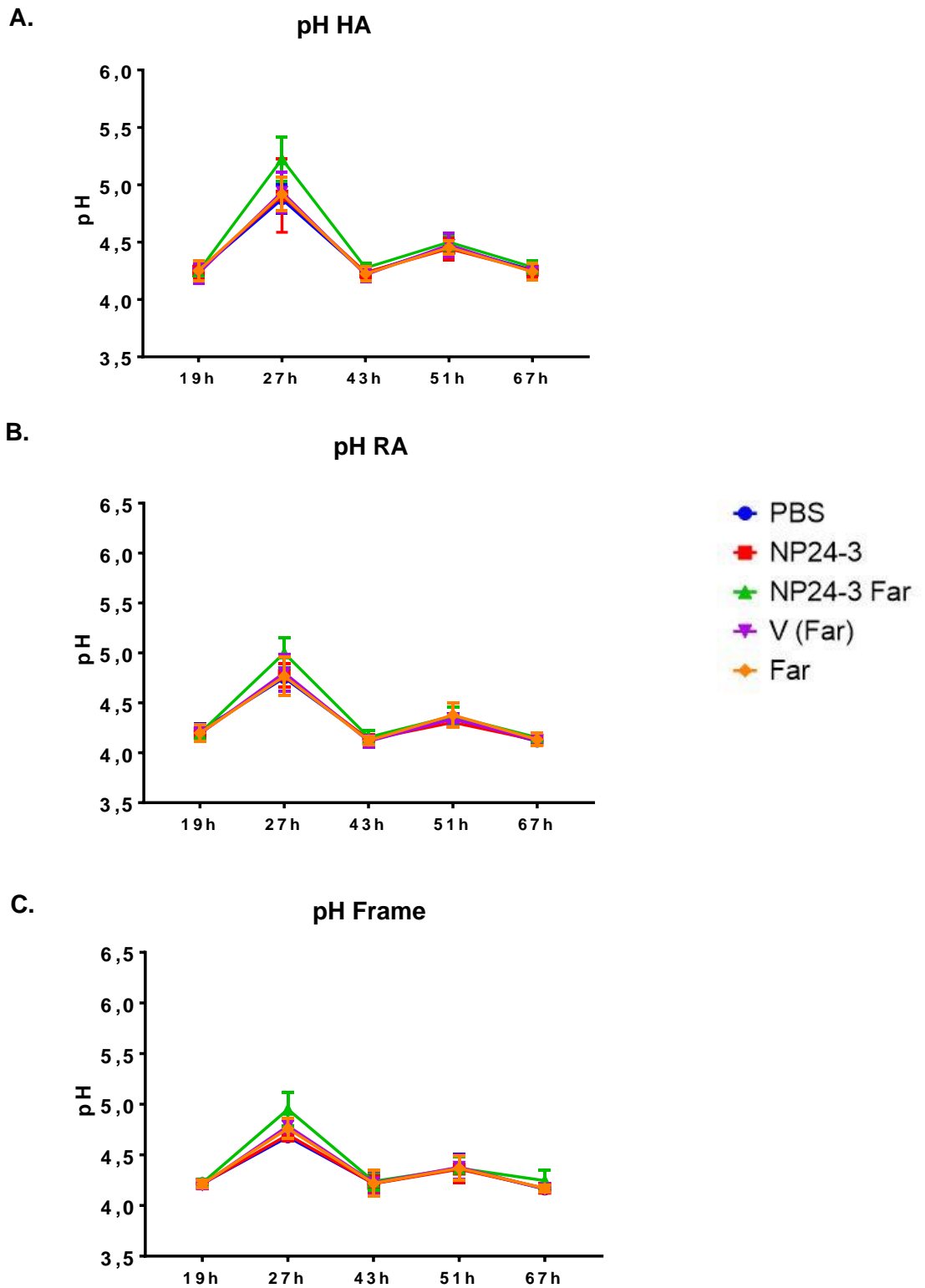
Os dados obtidos nos experimentos foram organizados em banco de dados e analisados com o auxílio de tratamentos estatísticos adequados de acordo com a distribuição. Devido aos dois controles dos tratamentos (os veículos diferentes) a análise foi criteriosamente realizada para que fossem comparados com o mesmo veículo correspondente (PBS sendo o veículo dos tratamentos contendo nanopartículas e V – PBS com 15% álcool para o tratamento com *tt*-farnesol livre). O teste utilizado foi ANOVA *one-way* com pós teste de Tukey. Os resultados foram analisados após o auxílio de um software estatístico Prism 7 (GraphPad Software, Inc., 2016). O nível de significância foi $\alpha \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 pH do Meio de Cultura Coletados no Decorrer dos Experimentos

Os resultados de pH observados durante a formação dos biofilmes independente do substrato foram valores ácidos entre 4 e 4,5 devido ao metabolismo dos micro-organismos em todos os tratamentos. Houve uma menor queda no tempo de 27 horas observados em todos os experimentos, chegando a valores próximos a 5 para os substratos resina acrílica e zircônia utilizados e valores acima de 5 para o substrato de hidroxiapatita, lembrando que este meio de cultura teve contato com os discos durante 8 horas e a idade do biofilme é de 27 horas apenas. Os demais valores de pH durante o restante do experimento foram ácidos com valores próximos a 4,5 (Figura 8).

Figura 8 - pH do meio de cultura dos biofilmes tratados e formados sobre as diferentes superfícies



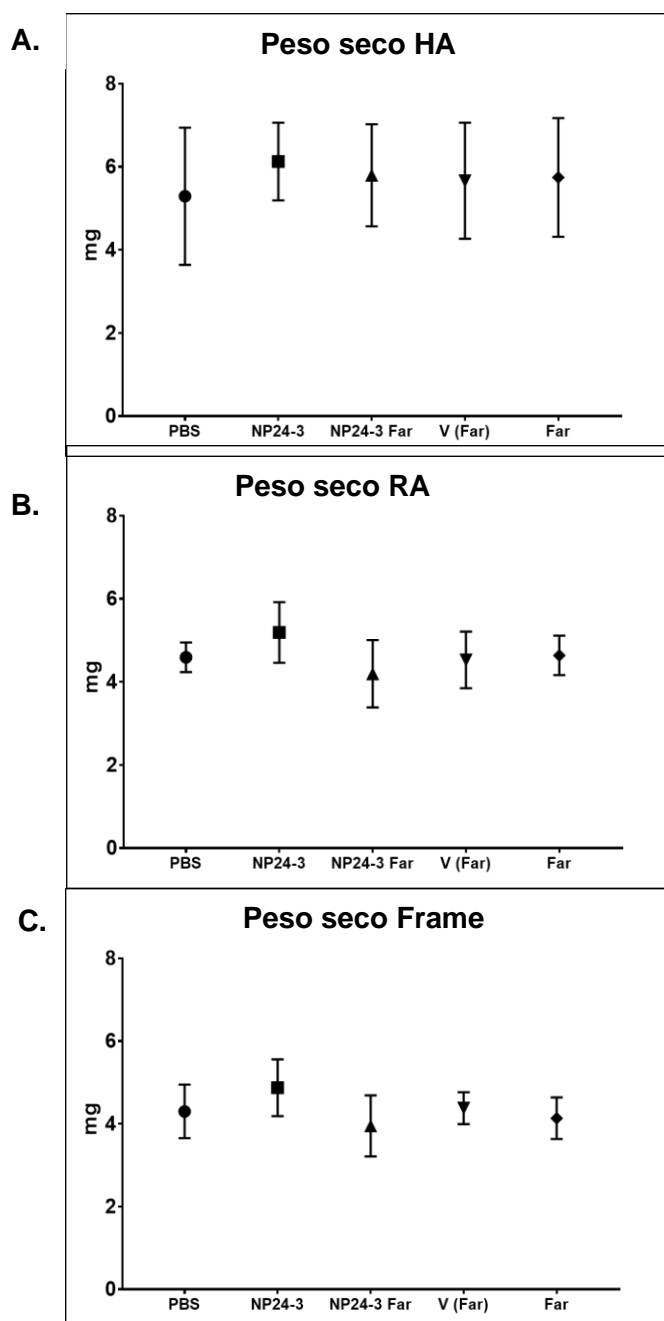
São os valores de pH coletados ao decorrer do tempo do experimento. Sendo A. Hidroxiapatita; B. Resina acrílica; e C. Zircônia LAVA Frame. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

4.2 Biomassa dos Biofilmes após os Tratamentos Tópicos

Os valores de peso seco não demonstraram diferença estatística em nenhum tratamento utilizado ou em nenhuma superfície de suporte (Figura 9).

Figura 9 - Biomassa dos biofilmes após os tratamentos tópicos



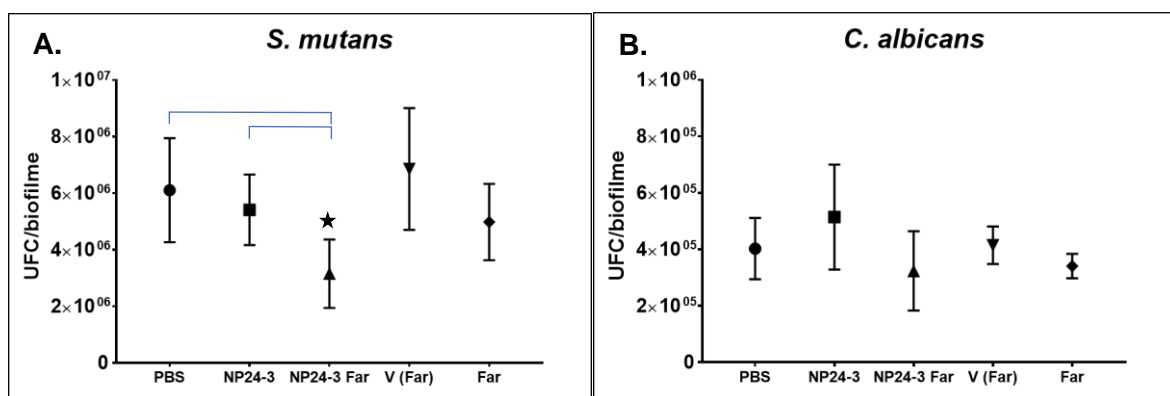
Os valores de peso seco não mostraram diferença estatística entre com nenhum tipo de substrato ou tratamento utilizado nos diferentes experimentos. Sendo A. Hidroxiapatita; B. Resina acrílica; e C. Zircônia LAVA Frame. O teste utilizado foi ANOVA *one-way* seguido de pós-teste de Tukey. PBS: veículo para os tratamentos com nanopartículas; NP24-3: NPC livre; NP24-3 Far: NPC associado ao *tt*-farnesol; V: veículo com 15% de álcool para o *tt*-farnesol isolado; Far: *tt*-farnesol. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

4.3 População Microbiana nos Biofilmes após os Tratamentos Tópicos

Os dados coletados de UFC (unidades formadoras de colônia) no substrato de HA mostraram uma redução estatisticamente significativa na população de *S. mutans* no tratamento com NPC + *tt*-farnesol (NP24-3 Far) com relação aos tratamentos controle PBS e NP24-3 (Figura 10). Já com relação à população de *C. albicans* não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Figura 10 - População microbiana nos biofilmes formados sobre hidroxiapatita após os tratamentos tópicos

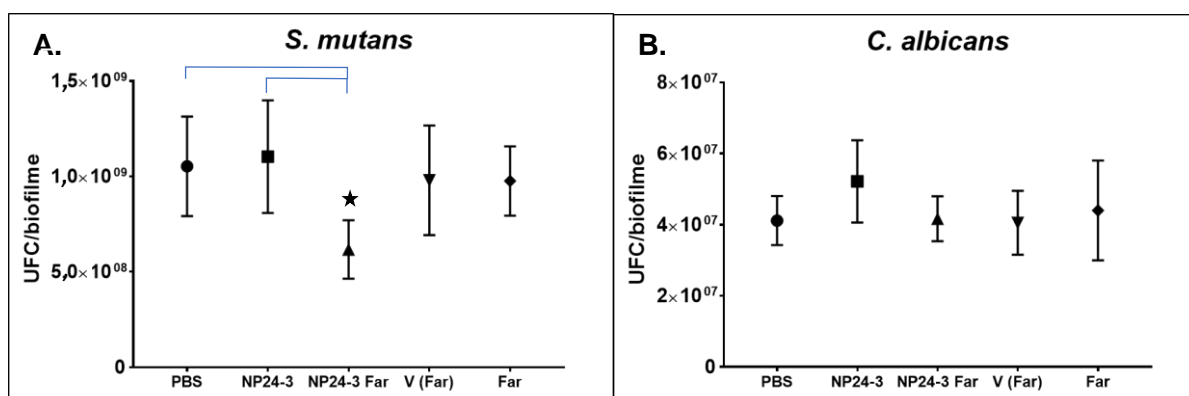


A) *S. mutans* (UFC/biofilme) e B) *C. albicans* (UFC/biofilme), o tratamento em destaque é NPC associada ao *tt*-farnesol, o qual ocasionou uma redução estatisticamente significativa com relação aos tratamentos PBS e NP24-3. O fungo não mostrou diferença estatística. O teste utilizado foi ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey. ★ Denota diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Sendo, PBS: veículo para os tratamentos com nanopartículas; NP24-3: NPC livre; NP24-3 Far: NPC associada ao *tt*-farnesol; V: veículo com 15% de álcool para o *tt*-farnesol isolado; Far: *tt*-farnesol. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

Os dados coletados de UFC no substrato de RA mostraram uma redução estatisticamente significativa na população de *S. mutans* no tratamento com NP24-3 Far com relação a todos os demais tratamentos propostos. Não houve diferença na população de *C. albicans* neste substrato (Figura 11).

Figura 11 - População microbiana nos biofilmes formados sobre resina acrílica Lucitone 550 após os tratamentos tópicos

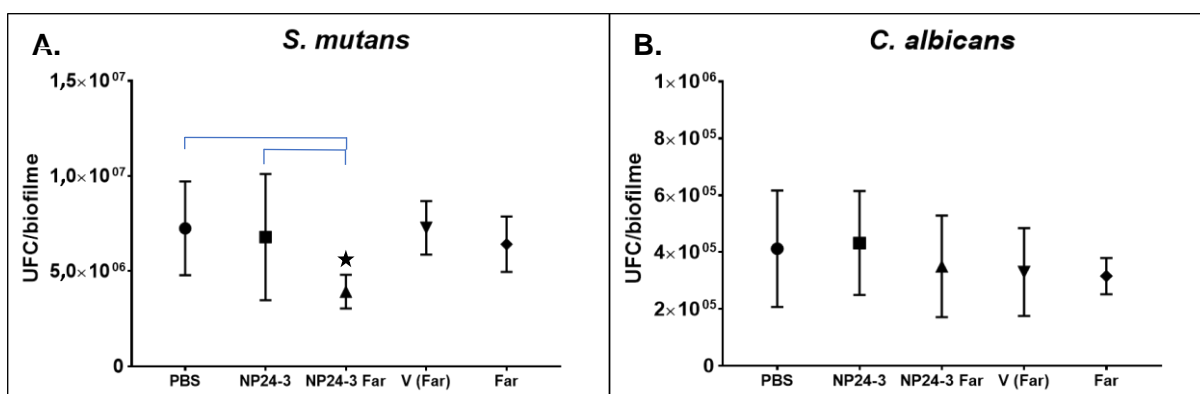


A) *S. mutans* (UFC/biofilme) e B) *C. albicans* (UFC/biofilme), o tratamento em destaque é NPC associada ao *tt*-farnesol, o qual houve uma redução estatisticamente significativa com relação aos demais tratamentos. A *C. albicans* não demonstrou diferença estatística em nenhum tratamento proposto. O teste utilizado foi ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey. ★ Denota diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Sendo, PBS: veículo para os tratamentos com nanopartículas; NP24-3: NPC livre; NP24-3 Far: NPC associado ao *tt*-farnesol; V: veículo com 15% de álcool para o *tt*-farnesol isolado; Far: *tt*-farnesol. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

Os dados coletados de UFC no substrato de frame mostraram uma redução estatisticamente significativa na população de *S. mutans* no tratamento com NP24-3 Far com relação ao veículo PBS o valor de $p = 0,0464$. Não houve diferença na população de *C. albicans* neste substrato (Figura 12).

Figura 12 - População microbiana nos biofilmes formados sobre zircônia LAVA frame após os tratamentos tópicos



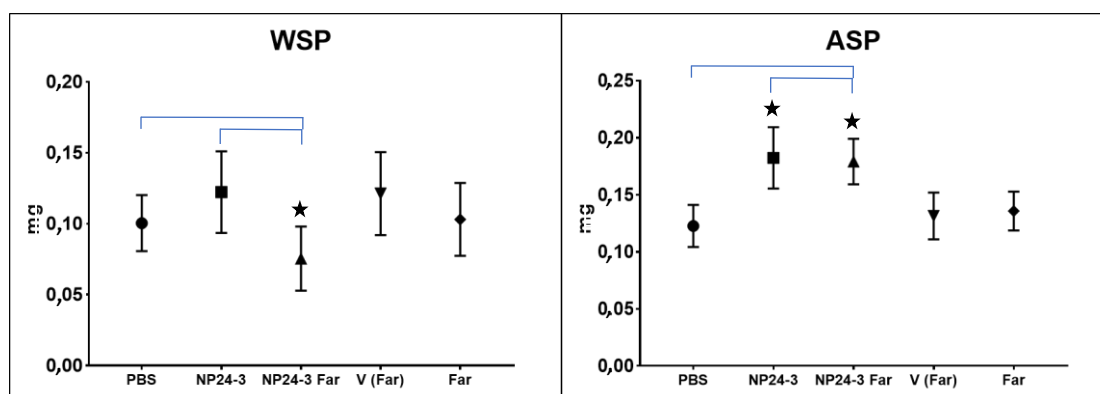
S. mutans (UFC/biofilme) e B) *C. albicans* (UFC/biofilme), o tratamento em destaque é NPC associada ao *tt*-farnesol, o qual houve uma redução estatisticamente significativa com relação ao veículo PBS. A *C. albicans* não demonstrou diferença estatística em nenhum tratamento proposto. O teste utilizado foi ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey.★ Denota diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Sendo, PBS: veículo para os tratamentos com nanopartículas; NP24-3: NPC livre; NP24-3 Far: NPC associada ao *tt*-farnesol; V: veículo com 15% de álcool para o *tt*-farnesol isolado; Far: *tt*-farnesol. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

4.4 Composição da Matriz Extracelular após os Tratamentos Tópicos

A composição da matriz extracelular é considerada um determinante de virulência e patogenicidade de biofilmes cariogênicos³⁷. Assim, a composição de polissacarídeos da matriz foi avaliada. As quantidades de exopolissacarídeos solúveis em água (WSP), em biofilmes formados sobre todos os substratos, tiveram uma redução significativa com o tratamento de NP24-3 Far frente ao tratamento NP24-3 (Figuras 13, 14 e 15). Mas diferente do que foi esperado, os exopolissacarídeos insolúveis em água (ASP) aumentaram nos tratamentos contendo a nanopartícula frente a todos os outros tratamentos propostos e em todos os substratos (Figuras 13, 14 e 15).

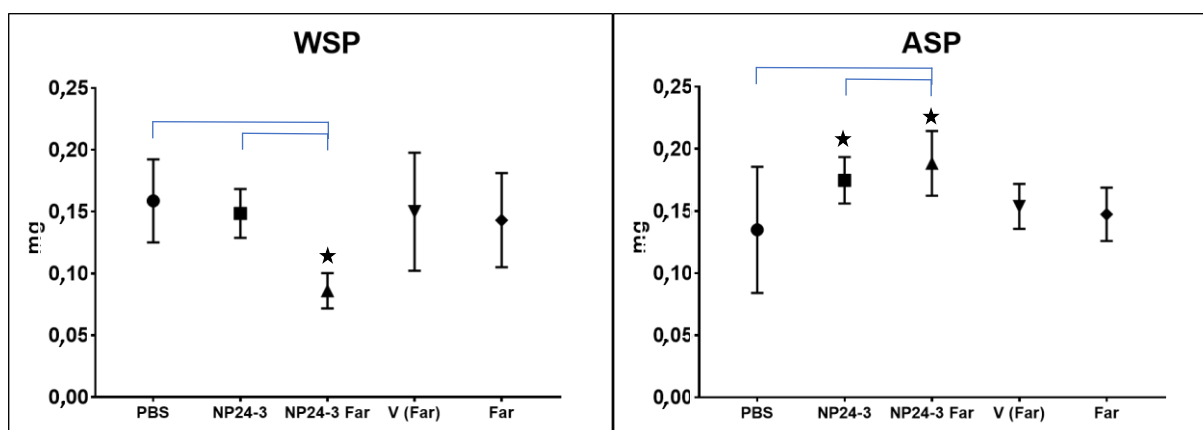
Figura 13 - Exopolissacarídeos solúveis (WSP) e insolúveis (ASP) na matriz extracelular de biofilmes tratados formados sobre HA



Quantidades de WSP destacando o tratamento com NPC24-3 Far, os demais tratamentos tiveram semelhança estatística (A) sendo $p = 0,0022$ comparado com NPC24-3. ASP mostrou um resultado diferente do esperado, tendo um aumento nos biofilmes que foram tratados com a nanopartícula (B). Teste utilizado foi ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey. ★ Denota diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Sendo, NP24-3: NPC livre; NP24-3 Far: NPC associado ao *tt*-farnesol; V: veículo com 15% de álcool para o *tt*-farnesol isolado; Far: *tt*-farnesol. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

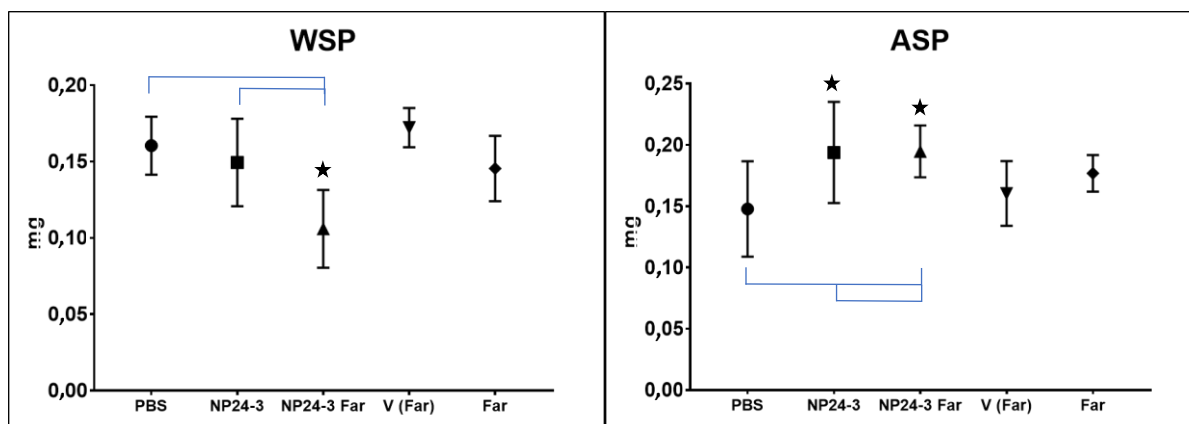
Figura 14 - Exopolissacarídeos solúveis (WSP) e insolúveis (ASP) na matriz extracelular de biofilmes tratados formados sobre RA



Quantidades de WSP destacando o tratamento com NPC24-3 Far, os demais tratamentos tiveram semelhança estatística (A) com $p = 0,0010$ comparado com PBS e $0,0078$ comparado com NPC24-3. ASP mostrou um resultado diferente do esperado, tendo um aumento nos biofilmes que foram tratados com a nanopartícula (B). Teste utilizado foi ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey. ★ Denota diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Sendo, NP24-3: NPC livre; NP24-3 Far: NPC associado ao *tt*-farnesol; V: veículo com 15% de álcool para o *tt*-farnesol isolado; Far: *tt*-farnesol. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 15 - Exopolissacarídeos solúveis (WSP) e insolúveis (ASP) na matriz extracelular de biofilmes tratados formados sobre frame



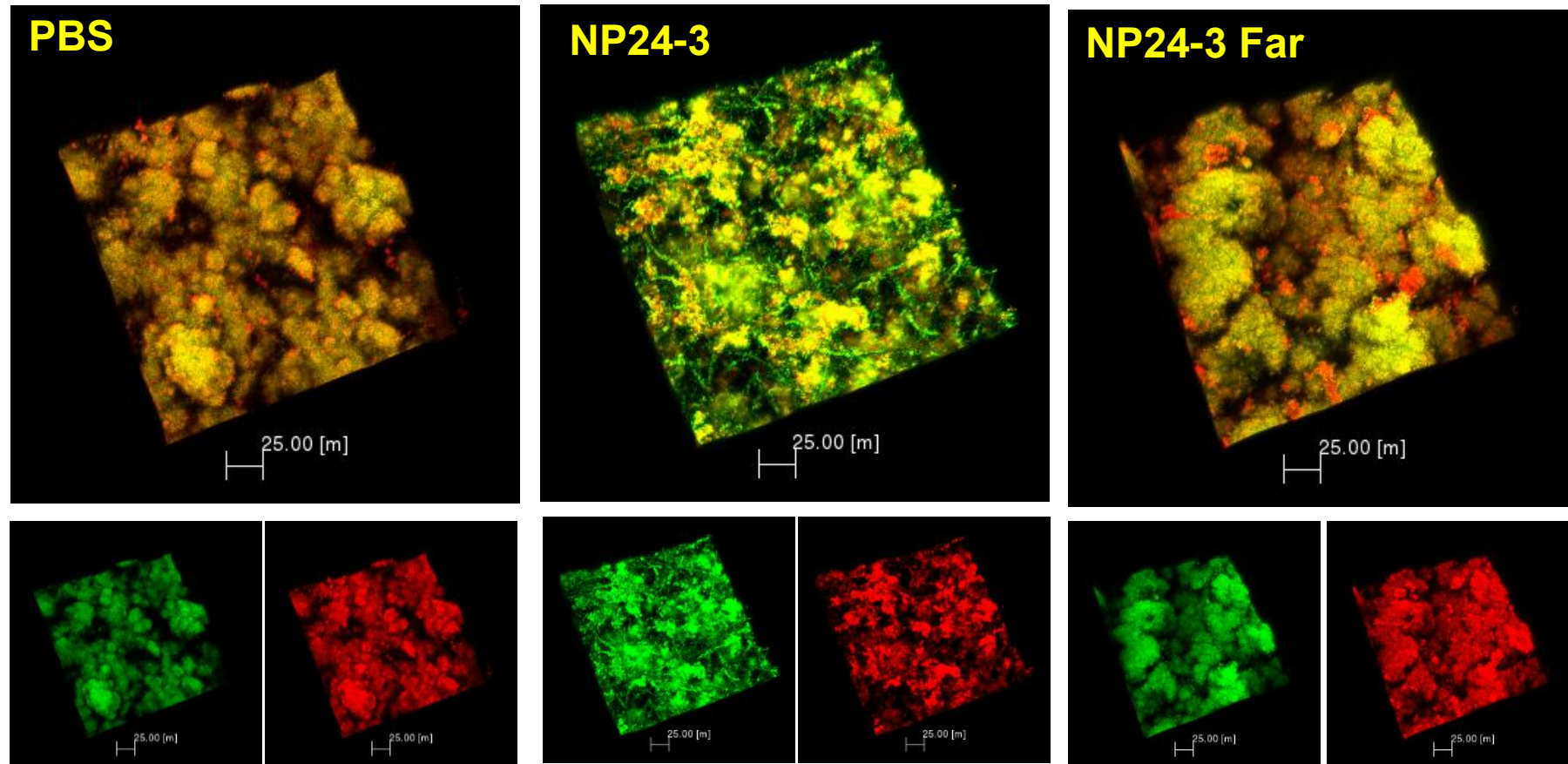
Quantidades de WSP destacando o tratamento com NPC24-3 Far, os demais tratamentos tiveram semelhança estatística (A) com valores de $p = 0,0003$ comparado com o PBS e $p = 0,005$ comparado com NPC24-3. ASP mostrou um resultado diferente do esperado, tendo um aumento nos biofilmes que foram tratados com a nanopartícula (B). Teste utilizado foi ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey. ★ Denota diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Sendo, NP24-3: NPC livre; NP24-3 Far: NPC associado ao *tt*-farnesol; V: veículo com 15% de álcool para o *tt*-farnesol isolado; Far: *tt*-farnesol. Imagens geradas pelo software Prism 7 GraphPad.

Fonte: Elaboração própria.

4.5 Análise da Morfologia 3D

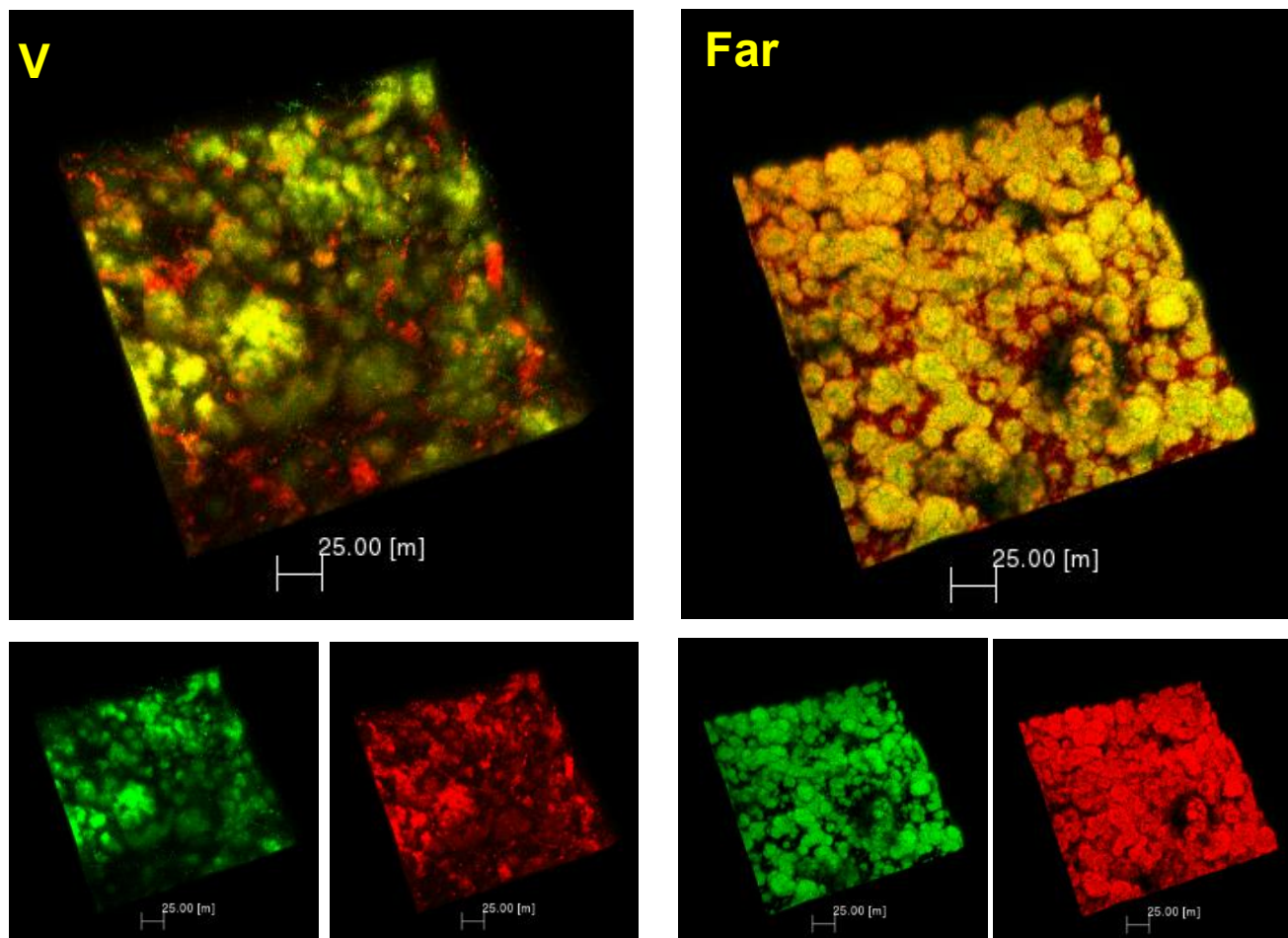
Em geral, a arquitetura 3D dos biofilmes após os cinco tratamentos foi distinta (Figura 16). No controle PBS, as microcolônias são definidas e de vários tamanhos. Para NP24-3 além de microcolônias grandes, estão evidentes as hifas de *C. albicans* (os prolongamentos verdes), o que não é observado para NP24-3 Far, pois *tt*-farnesol é uma molécula que inibe a formação de hifas em *C. albicans*. As hifas também estão presentes em V, mas estão recobertas com EPS, por isso os prolongamentos aparecem em vermelho. Para o tratamento Far, as microcolônias são bem menores que nos outros tratamentos, e não estão visíveis as hifas (como esperado pelo efeito de *tt*-farnesol em *C. albicans*).

Figura 16 - Arquitetura 3D de biofilmes formados sobre HA.



(Continua)

Figura 16 - Arquitetura 3D de biofilmes formados sobre HA.



Estas imagens são representativas de renderizações 3D dos biofilmes submetidos aos cinco tratamentos. As imagens foram obtidas por microscopia confocal pelo software AMIRA. A cor verde representa os micro-organismos em cada biofilme, enquanto que a cor vermelha representa ESP da matriz extracelular.

Fonte: Elaboração própria.

(Conclusão)

5 DISCUSSÃO

O uso de nanotecnologia deve ser mais explorado devido as vantagens de adesão e controle de liberação de fármacos em áreas específicas do corpo. Durante o ato do tratamento tópico aplicado as NPC se aderem na superfície do biofilme formado ligando-se aos micro-organismos ou a MEC (Horev et al.²⁸, 2015). Pensando que existem pacientes, os quais, tem dificuldades motoras ou áreas de difícil acesso para uma eficaz limpeza dental. A utilização de dentifrícios ou enxaguantes bucais que contenham essa tecnologia ajudaria no combate a formação de biofilmes virulentos combatendo os micro-organismos e a matriz que os protege reduzindo assim as chances de gerar doenças.

Os valores de pH do meio de cultura encontrados são ácidos e sem melhora durante o decorrer do tratamento. Estes valores foram influenciados pelo grampo de fio ortodôntico utilizado para segurar o disco na posição vertical, pois o biofilme sobre o mesmo não sofre a ação dos tratamentos. Este biofilme aderido no grampo também está gerando produtos ácidos em quantidades suficientes para influenciar o pH do meio de cultura. Assim, esse parâmetro não foi adequado para determinar a eficácia dos tratamentos realizados. Porém foi reportado no presente trabalho, pois aciduricidade é um fator de virulência associado ao desenvolvimento de lesões cariosas, principalmente nos valores encontrados (pH entre 4 e 4,5), conforme revisado por Bowen, Koo.¹⁰ (2011).

A biomassa ou peso seco são influenciados por todos os componentes do biofilme. Mesmo que tenha variações isoladas em uma das características do biofilme (exemplo: população microbiana) as outras características podem anular essa diferença na análise de peso seco. A incorporação das NPC ao biofilme pode também influenciar no dado de biomassa (Horev et al.²⁸, 2015). Então mesmo que os biofilmes criados sobre as superfícies mostrem resultados sem diferença estatística, deve-se analisar a fundo quais características do mesmo os tratamentos estariam atingindo.

A população microbiana mostrou uma redução no tratamento com o fármaco associado à nanopartícula (NP24-3 Far) evidenciando que independente do substrato, na presença de película adquirida, ocorre a formação de um biofilme maduro, mas este possui menor quantidade de *S. mutans* comparado com os outros tratamentos. Isso demonstra que essa estratégia é eficiente no controle deste micro-

organismo, conforme estabelecido anteriormente para biofilmes monoespécie de *S. mutans* e para biofilmes dentais de ratos inoculados com essa espécie e posteriormente tratados (Horev et al.²⁸, 2015). O uso da tecnologia de nanopartículas garantiu a permanência do fármaco evitando o uso de grandes concentrações do medicamento para o controle da população de *S. mutans*. E também, a liberação controlada garante que o medicamento só esteja biodisponível quando necessário (especificamente, quando ocorre queda de pH no biofilme). A não redução da população de *C. albicans* mostra que o fármaco pode não ser efetivo ou sua concentração insuficiente para o controle desse tipo de fungo, o qual é produtor de farnesol, mas em baixas concentrações como uma molécula de *quorum sensing* (Hornby et al.²⁹, 2001; Wongsuk et al.⁶⁰, 2016). Uma solução seria a associações de medicamentos para aumentar o controle deste tipo de biofilme, afim de encontrar melhores resultados.

Pode-se observar que em todos os biofilmes houve uma redução nos valores de WSP com o tratamento de nanopartícula associado ao *tt*-farnesol (NP24-3 Far). Com menos proteção e coesão por esses EPS a ação de agentes externos ou a própria maturação do biofilme seria dificultada. Sendo que o maior responsável pela produção de matriz é *S. mutans*, com a redução na sua população obteve-se o resultado de menor quantidade de WSP, porém com a presença do fungo, há um maior estímulo à produção de ASP mantendo os biofilmes inseridos dentro de uma matriz densa (Falsetta et al.¹⁷, 2014; Kim et al.³⁵, 2017). Mas para ser realmente eficaz temos que entender o porquê dos valores de ASP estarem aumentando nos tratamentos com a nanopartícula. Assim, em estudo posterior, devemos analisar como ela pode estar alterando e aumentando a produção de EPS.

O estresse gerado pelo contato dos tratamentos desde a inoculação pode ter gerado uma resistência ou uma maior resposta dos micro-organismos frente ao desafio gerado pelo contato com o tratamento, fazendo com que a resposta interna dos micro-organismos seja de proteger-se. O modo encontrado pode ser a maior produção de exopolissacarídeos insolúveis em água (ASP) devido à uma maior produção de Gtfs por *S. mutans* ou aumento da atividade dessas enzimas para produção de α -glucanos e adesão das mesmas sobre as superfícies dos fungos. Ou também, porque *C. albicans* também produz ASP, mas β -glucanos (Al-Fattani et al,³

2006; Net et al.⁵⁰, 2007). Portanto, estudo adicional é necessário para explicar o mecanismo envolvido no aumento da quantidade de ASP.

Afim de compreender melhor os achados dos resultados da matriz, foi realizada a análise da morfologia 3D do biofilme em HA (Figura 16). Devido ao volume do biofilme e à espessura, não foi possível fazer quantificações pela dificuldade de penetração do laser no biofilme com idade de 67 horas. Isso pode ser visualizado como “sombras” ou áreas escuras nas imagens 3D (Figura 16), e afetam a quantificação usando o programa COMSTAT2 (Heydorn et al.²⁶, 2000), pois onde não tem sinal (emissão de fluorescência) o programa interpreta como valor zero, assim, não obtendo valores reais e adequados para a real situação.

A influência da nanopartícula adequada é evidente, pois a população de um dos principais micro-organismos que compõe um biofilme virulento e a MEC foram reduzidos. Portanto, decaindo potencialmente as chances de gerar doença. O uso da NPC dá a vantagem de utilizar uma maior quantidade de *tt*-farnesol, mais disponível para o local de ação, nos tratamentos utilizados por há um limite de solubilização do produto em álcool (tratamento de *tt*-farnesol livre). Testes com associação de medicamentos e biofilmes contendo colonizadores iniciais devem ser realizados para observar se há uma redução na população do fungo e de outras espécies encontradas no meio bucal. E também, novos experimentos para entender melhor o porquê do aumento do ASP nos biofilmes que contêm a nanopartícula e como poderíamos reverter essa ação, reduzindo ainda mais a proteção dos micro-organismos pela MEC e, conseqüentemente, reduzir o potencial patogênico desses biofilmes.

6 CONCLUSÃO

O controle na formação de biofilmes pelo uso de *tt*-farnesol associado à nanopartículas mostrou resultados favoráveis e eficientes com relação a redução da população de *S. mutans* independente do substrato. Houve uma melhora evidente na quantidade de WSP produzido pelos micro-organismos, reduzindo esse fator de virulência.

REFERÊNCIAS*

1. Abou Neel EA, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young AM, et al. Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. *Int J Nanomedicine*. 2016; 11:4743-63.
2. Ajdić D, McShan WM, McLaughlin RE, Savić G, Chang J, Carson MB, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(22):14434-9.
3. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol*. 2006; 55(Pt 8):999–1008.
4. Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SF, de Alvarenga JA, Velloso Mdos S, Prata MC, et al. *Streptococcus mutans* can modulate biofilm formation and attenuate the virulence of *Candida albicans*. *PLoS One*. 2016; 11(3):e0150457
5. Benoit DS, Nuttelman CR, Collins SD, Anseth KS. Synthesis and characterization of a fluvastatin-releasing hydrogel delivery system to modulate hMSC differentiation and function for bone regeneration. *Biomaterials*. 2006; 27(36):6102-10.
6. Benoit DS, Henry SM, Shubin AD, Hoffman AS, Stayton PS. pH-responsive polymeric siRNA carriers sensitize multidrug resistant ovarian cancer cells to doxorubicin via knockdown of polo-like kinase 1. *Mol Pharm*. 2010; 7(2):442-55.
7. Berkowitz RJ, Turner J, Hughes C. Microbial characteristics of the human dental caries associated with prolonged bottle-feeding. *Arch Oral Biol*. 1984; 29(11):949-51.
8. Berkowitz RJ, Koo H, McDermott MP, Whelehan MT, Ragusa P, Kopycka-Kedzierawski DT, et al. Adjunctive chemotherapeutic suppression of mutans streptococci in the setting of severe early childhood caries: an exploratory study. *J Public Health Dent*. 2009; 69(3):163-7.
9. Bourzac K. Nanotechnology: carrying drugs. *Nature*. 2012; 491(7425):S58-60.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

10. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011; 45(1):69–86.
11. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol.* 1998; 36(4):347-63.
12. de Carvalho F, Silva D, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio 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):1024-8.
13. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 1956; 28(3): 350–6.
14. Dupuy AK, David MS, Li L, Heider TN, Peterson JD, Montano EA, et al. Redefining the human oral mycobiome with improved practices in amplicon-based taxonomy: discovery of *Malassezia* as a prominent commensal. *PLoS One.* 2014; 9(3):e90899.
15. Dye BA, Tan S, Smith V, Lewis BG, Barker LK, Thornton-Evans G, et al. Trends in oral health status: United States, 1988-1994 and 1999-2004. *Vital Health Stat.* 2007; (248):1-92.
16. Falsetta ML, Klein MI, Lemos JA, Silva BB, Agidi S, Scott-Anne KK, et al. Novel antibiofilm chemotherapy targets exopolysaccharide synthesis and stress tolerance in *Streptococcus mutans* to modulate virulence expression in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(12):6201-11.
17. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun.* 2014; 82(5):1968-81.
18. Fernandes RA, Monteiro DR, Arias LS, Fernandes GL, Delbem AC, Barbosa DB. Biofilm formation by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation. *Biofouling.* 2016; 32(3):329-38.
19. Firestone AR. Effect of increasing contact time of sucrose solution of powdered sucrose on plaque pH in vivo. *J Dent Res.* 1982; 61(11):1243-4.
20. Fleming CH, Wingender J. The biofilm matrix. *Rev Nature.* 2010; 8:623-33.

21. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog.* 2010; 6:e1000713.
22. Gregoire S, Xiao J, Silva BB, Gonzalez I, Agidi PS, Klein MI, et al. Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(18):6357-67.
23. Hajishengallis E, Parsaei Y, Klein MI, Koo H. Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. *Mol Oral Microbiol.* 2017; 32(1):24-34.
24. Hamada S, Gill K, Slade HD. Binding of lectins to *Streptococcus mutans* cells and type-specific polysaccharides, and effect on adherence. *Infect Immun.* 1977; 18(3):708–16.
25. Harriott MM, Noverr MC. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol.* 2011; 19(11):557-63.
26. Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, et al. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology.* 2000; 146 (Pt 10): 2395–407.
27. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res.* 2009; 88(11):982-90
28. Horev B, Klein MI, Hwang G, Li Y, Kim D, Koo H, et al. pH-activated nanoparticles for controlled topical delivery of farnesol to disrupt oral biofilm virulence. *ACS Nano.* 2015; 24;9(3):2390-404.
29. Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(7):2982-92.
30. Hughes CV, Dahlan M, Papadopoulou E, Loo CY, Pradhan NS, Lu SC, et al. Aciduric microbiota and *mutans streptococci* in severe and recurrent severe early childhood caries. *Pediatr Dent.* 2012; 34(2):e16-23.
31. Jeon JG, Klein MI, Xiao J, Gregoire S, Rosalen PL, Koo H. Influences of naturally occurring agents in combination with fluoride on gene expression and structural organization of *Streptococcus mutans* in biofilms. *BMC Microbiol.* 2009; 9:228.

32. Jeon JG, Pandit S, Xiao J, Gregoire S, Falsetta ML, Klein MI, et al. Influences of trans-trans farnesol, a membrane-targeting sesquiterpenoid, on *Streptococcus mutans* physiology and survival within mixed-species oral biofilms. *Int J Oral Sci.* 2011; 3(2):98-106.
33. Kanasi E, Dewhirst FE, Chalmers NI, Kent R, Jr, Moore A, Hughes CV, et al. Clonal analysis of the microbiota of severe early childhood caries. *Caries Res.* 2010; 44(5):485–97.
34. Kidd EA, Fejerskov O. What constitutes dental caries? histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res.* 2004; 83 (Spec No C):C35-8.
35. Kim D, Sengupta A, Niepa TH, Lee BH, Weljie A, Freitas-Blanco VS, et al. *Candida albicans* stimulates *Streptococcus mutans* microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites. *Sci Rep.* 2017; 7:41332.
36. Klein MI, Duarte S, Xiao J, Mitra S, Foster TH, Koo H. Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in *Streptococcus mutans* biofilm development. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75 (3): 837-41.
37. Klein MI, Xiao J, Heydorn A, Koo H. An analytical tool-box for comprehensive biochemical, structural and transcriptome evaluation of oral biofilms mediated by *mutans streptococci*. *J Vis Exp.* 2011; (47)pii: 2512.
38. Klinke HT, Pönisch R, Kriegel TM, Klimm HW. Immunohistochemical detection of the collagenolytic *Candida albicans* Sap2 proteinase in caries lesions. *Caries Res.* 2007; 41(4):287.
39. Klinke HT, Kneist S, de Soet JJ, Kuhlisch E, Mauersberger S, Forster A, et al. Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *Caries Res.* 2009; 43(2):83-91.
40. Koo H, Pearson SK, Scott-Anne K, Abranches J, Cury JA, Rosalen PL, et al. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol Immunol.* 2002; 17(6):337-43.
41. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(5):1302-9.

42. Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA, et al. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. *J Dent Res.* 2005; 84(11):1016-20.
43. Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol.* 2010; 192(12):3024-32.
44. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res.* 2013; 92(12):1065-73.
45. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986; 50(4):353–80.
46. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, et al. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res.* 2013; 92(7):592-7.
47. Mattos-Graner RO, Klein MI, Smith DJ. Lessons learned from clinical studies: roles of mutans streptococci in the pathogenesis of fental caries. *Curr Oral Health Rep.* 2014; 1(1): 70–8.
48. Milnes AR, Bowden GH. The microflora associated with developing lesions of nursing caries. *Caries Res.* 1985; 19(4):289–97.
49. Neppelembroek KH, Mima EGO, Spolidorio DMP, Giampaolo ET, Vergani CE, Pavarina AC. Effectiveness of microwave irradiation on disinfection of hard chairside relines resins and denture base resin. *Int J Prosthodont.* 2003; 35(4): 305-11.
50. Nett JE, Sanchez H, Cain MT, Andes DR. Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan. *J Infect Dis.* 2010; 202(1): 171–5.
51. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res.* 2006; 85(10):878-87.
52. Panariello BH, Izumida FE, Moffa EB, Pavarina AC, Jorge JH, Giampaolo ET. Effects of short-term immersion and brushing with different denture cleansers on the roughness, hardness, and color of two types of acrylic resin. *Am J Dent.* 2015; 28(3):150-6.

53. Papon N, Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ. Emerging and emerged pathogenic candida species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathog.* 2013; 9(9): e1003550.
54. Pereira-Cenci T, da Silva WJ, Cenci MS, Cury AA. Temporal changes of denture plaque microbiologic composition evaluated in situ. *Int J Prosthodont.* 2010; 23(3):239-42.
55. Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel, Cury AA, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol.* 2008; 53(8):755-64.
56. Raja M, Hannan A, Ali K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. *Caries Res.* 2010; 44(3):272-6.
57. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, PS Handley. Bacterial coaggregation: an integrated process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* 2003; 11(2): 94-100.
58. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet.* 2007; 369(9555):51-9.
59. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell.* 2011; 10(9):1173-82.
60. Wongsuk T, Pumeesat P, Luplertlop N. Fungal quorum sensing molecules: role in fungal morphogenesis and pathogenicity. *J Basic Microbiol.* 2016; 56(5):440-7.
61. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Delahunty CM, Yates III JR, Lu B, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog.* 2012; 8(4): e1002623.
62. Xu H, Sobue T, Thompson A, Xie Z, Poon K, Ricker A, et al. Streptococcal co-infection augments *Candida* pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. *Cell Microbiol.* 2014; 16(2):214-31.
63. Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, zitsu HK. Role of the *Streptococcus mutans* gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect Immun.* 1993; 61(9):3811-7.
64. Yang XQ, Zhang Q, Lu LY, Yang R, Liu Y, Zou J. Genotypic distribution of *Candida albicans* in dental biofilm of Chinese children associated with severe early childhood caries. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(8):1048-53.

65. Zhou J, Horev B, Hwang G, Klein MI, Koo H, Benoit DS. Characterization and optimization of pH-responsive polymer nanoparticles for drug delivery to oral biofilms. *J Mater Chem B Mater Biol Med*. 2016; 4(18):3075-85.

ANEXO

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Liberação controlada de agentes anti-biofilme in situ via nanopartículas carreadoras ativadas por pH.

Pesquisador: MARLISE INÊZ KLEIN

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 31725114.8.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 748.153

Data da Relatoria: 13/08/2014

Apresentação do Projeto:

Este projeto tem por objetivo analisar se agentes liberados pelo novo sistema de liberação de fármacos (NPC) podem (1) interromper a construção inicial do biofilme, (2) prevenir maior acumulação de biofilmes, e (3) promover a desmontagem (dispersão) ou impedir mais acúmulo de biofilme pré-formado na presença de saliva.

Objetivo da Pesquisa:

Serão utilizados agentes ligados ao NPC e sem NPC (agentes livres) para o tratamento de biofilmes. Os grupos experimentais correspondentes a cada tratamento serão: 1) NPC-apigenina, 2) NPC-farnesol, 3) NPC-apigenina+farnesol, 4) NPC apenas (NPC- controle), 5) apigenina, 6) farnesol, 7) apigenina+farnesol, e 8) veículo controle.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não existem riscos sociais ou físicos significantes para a doação de saliva. O único risco é que o participante poderá engolir o pedaço de filme de parafina. Se isso acontecer, o filme se dissolverá no estômago do mesmo modo como uma goma de mascar se dissolve, explicação fornecida no TCLE.

Endereço: HUMAITA 1680
Bairro: CENTRO **CEP:** 14.801-903
UF: SP **Município:** ARARAQUARA
Telefone: 1633-0164 **Fax:** 1633-0164 **E-mail:** cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 748.153

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de alto impacto na odontologia, pois busca uma maneira de impedir a formação de biofilme dentário, principal causador da cárie dentário e conseqüentemente perda de elementos dentários. O participante da pesquisa terá envolvimento com esta nos momentos em que for necessário a doação da saliva, podendo desistir a qualquer momento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios se encontram adequados e com as informações necessárias.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências para o projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Atendidas pendências de reunião de 26 de junho de 2014, considero APROVADO o protocolo.

ARARAQUARA, 12 de Agosto de 2014

Assinado por:
Maurício Meirelles Nagle
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680
Bairro: CENTRO CEP: 14.801-903
UF: SP Município: ARARAQUARA
Telefone: 1633-0164 Fax: 1633-0164 E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

Autorizo a reprodução deste trabalho

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 07 de Julho de 2017

Guilherme Roncari Rocha