



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Vanessa Coronato Nogueira Constantino

Caracterização de exopolissacarídeos solúveis e insolúveis de biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* via análises espectroscópicas

Araraquara

2022



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Vanessa Coronato Nogueira Constantino

Caracterização de exopolissacarídeos solúveis e insolúveis de biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* via análises espectroscópicas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do grau de Cirurgião-dentista.

Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

Araraquara

2022

C758c Constantino, Vanessa Coronato Nogueira
Caracterização de exopolissacarídeos solúveis e insolúveis de biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* via análises espectroscópicas / Vanessa Coronato Nogueira Constantino. -- Araraquara, 2022
42 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Odontologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima
Coorientadora: Profa. Dra. Marlise Inéz Klein

1. Biofilmes. 2. Polissacarídeos. 3. Matriz extracelular. 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.

**UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara**

Vanessa Coronato Nogueira Constantino

**Caracterização de exopolissacarídeos solúveis e insolúveis de biofilmes
mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* via análises
espectroscópicas**

Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

Assinatura Orientador (a):



Assinatura Aluno (a): *Vanessa C. N. Constantino*

Araraquara, 28 de março de 2022.

Dedico este trabalho a minha família, sobretudo meus pais, que foram meus maiores incentivadores e que sempre deram total apoio em todos os momentos dessa minha jornada. Sem vocês nada disso seria possível. Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Valéria e Edmar, os meus maiores companheiros, que sempre estiveram ao meu lado, e fizeram o maior esforço para garantir a minha educação;

Ao meu tio Vanderlei, que é um segundo pai para mim, e que também sempre apoiou e ajudou na minha trajetória;

Ao meu irmão Eduardo por todo o suporte e carinho;

À Marlise Inêz Klein, minha orientadora da pesquisa, pela oportunidade concebida, pela dedicação, competência e pela disponibilidade sempre que precisei;

Ao meu orientador deste trabalho de conclusão de curso, Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima, pelo apoio na elaboração deste trabalho.

Ao Guilherme Rocha, pelo treinamento nos experimentos, pela paciência em explicar e tirar todas as dúvidas;

Aos amigos que conheci durante o curso, pela companhia e suporte em qualquer momento. A presença de vocês tornou a minha trajetória bem mais fácil.

Ao Laboratório de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Odontologia de Araraquara pelo uso do espaço e equipamentos presentes, e também a todos os funcionários pela colaboração.

Ao PIBIC pela concessão de bolsa de iniciação científica (Processo nº148475/2018-3).

Constantino VCN. Caracterização de exopolissacarídeos solúveis e insolúveis de biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* via análises espectroscópicas [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

A cárie dentária é um problema de saúde pública mundial gerada por um biofilme oral patogênico resultante de uma dieta rica em açúcares. A construção desse biofilme patogênico depende da formação da matriz extracelular (MEC). A partir da adesão e co-agregação de microrganismos na película salivar, os mesmos usam a sacarose da dieta para produção de ácidos e de diversos polímeros de carboidratos denominados exopolissacarídeos (EPS), que são os principais componentes da matriz extracelular. Os principais exopolissacarídeos são glucanos. Com o passar do tempo, os microrganismos presentes no biofilme produzem ácidos que levam à desmineralização da superfície dentária, ou seja, causam as lesões de cárie. *Candida albicans* tem sido encontrada em associação com *S. mutans* em biofilmes de lesões de cárie de rápida progressão. Um modelo in vitro demonstrou que a formação do biofilme com a associação destes microrganismos possui uma maior quantidade de MEC, principalmente os exopolissacarídeos insolúveis, quando comparados com um biofilme simples. *Streptococcus mutans* produz predominantemente glucanos com ligações glicosídicas do tipo α -glucanos, enquanto *Candida albicans*, β -glucanos. Dependendo do carbono utilizado para a ligação destes glucanos para formação dos exopolissacarídeos, observa-se características solúveis, com ligações α ou β do tipo 1,6-glucano, e insolúveis, com ligações α ou β do tipo 1,3-glucano principalmente. Porém, ainda são desconhecidas quais as características de exopolissacarídeos (proporção e tipos de ligações glicosídicas) na MEC de biofilme misto de *S. mutans* e *C. albicans*. Então, o objetivo desse trabalho foi caracterizar os exopolissacarídeos solúveis e insolúveis de biofilmes mistos de *S. mutans* e *C. albicans* via análises espectroscópicas. Foi realizada a formação dos biofilmes in vitro de *S. mutans* UA159 e *C. albicans* SC5314 sobre 24 discos de hidroxiapatita contendo película salivar (CEP: 31725114.8.0000.5416). O meio de cultura utilizado durante a formação do biofilme foi o triptona com extrato de levedura suplementado com 1% de sacarose, sobre discos em posição vertical em placas de 24 poços. O inóculo do biofilme foi semeado em ágar sangue como forma de controle. Foram realizadas trocas de meio de cultura nos tempos de 19 e 27 horas. Ao completar 43 horas de desenvolvimento, os biofilmes foram removidos e uma porção foi semeada em ágar sangue. Os biofilmes foram processados para extração dos exopolissacarídeos solúveis e insolúveis em água. O método colorimétrico usado para a quantificação desses polímeros da matriz foi o fenol-ácido sulfúrico. A produção de exopolissacarídeos insolúveis superou significativamente a dos solúveis. Foram realizados 4 testes, sendo encontrado uma média de 3,95 mg de exopolissacarídeos solúveis e 9,44 mg de exopolissacarídeos insolúveis. A proteção dos microrganismos embebidos na matriz favorece a maturação do biofilme, tornando-o um potencial foco de desmineralização dental. Reduzir de alguma forma a organização deste tipo de biofilme depende em ter ciência desta alta produção de matriz e sua característica insolúvel. Este conhecimento pode ser usado para focar em princípios ativos que diminuam ou dificultem a produção desse tipo de matriz. Uma etapa a ser realizada

ainda é a identificação dos tipos de ligações glicosídicas predominantes nos exopolissacarídeos isolados da matriz dos biofilmes.

Palavras – chave: Biofilmes. Polissacarídeos. Matriz extracelular.

Constantino VCN. Characterization of soluble and insoluble exopolysaccharides from mixed biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* via spectroscopic analysis [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Dental caries is a worldwide public health problem generated by a pathogenic oral biofilm resulting from a diet rich in sugars. The construction of this pathogenic biofilm depends on the formation of the extracellular matrix (ECM). From the adhesion and co-aggregation of microorganisms in the salivary film, they use the sucrose in the diet to produce acids and various carbohydrate polymers called exopolysaccharides (EPS), which are the main components of the extracellular matrix. The main exopolysaccharides are glucans. Over time, the microorganisms present in the biofilm produce acids that lead to demineralization of the tooth surface, i.e. cause caries lesions. *Candida albicans* has been found in association with *S. mutans* in biofilms of rapidly progressing caries lesions. An in vitro model showed that biofilm formation with the association of these microorganisms has a higher amount of ECM, especially insoluble exopolysaccharides, when compared to a simple biofilm. *Streptococcus mutans* produces predominantly glucans with glycosidic linkages of the α -glucan type, while *Candida albicans*, β -glucans. Depending on the carbon used for binding these glucans to form exopolysaccharides, soluble features are observed, with α - or β -bonds of the 1,6-glucan type, and insoluble ones, with α - or β -bonds of the 1,3-glucan type mainly. However, the characteristics of exopolysaccharides (proportion and types of glycosidic bonds) in the MEC of mixed biofilm of *S. mutans* and *C. albicans* are still unknown. Therefore, the aim of this work was to characterize soluble and insoluble exopolysaccharides of mixed biofilms of *S. mutans* and *C. albicans* via spectroscopic analysis. The in vitro biofilm formation of *S. mutans* UA159 and *C. albicans* SC5314 was performed on 24 hydroxyapatite disks containing salivary film (ZIP code: 31725114.8.0000.5416). The culture medium used during biofilm formation was tryptone with yeast extract supplemented with 1% sucrose, on discs in vertical position in 24-well plates. The biofilm inoculum was seeded on blood agar as a control. The culture medium was changed at 19 and 27 hours. At 43 hours of development, the biofilms were removed and a portion was seeded on blood agar. The biofilms were processed for extraction of water soluble and insoluble exopolysaccharides. The colorimetric method used for the quantification of these polymers in the matrix was phenol-sulfuric acid. The production of insoluble exopolysaccharides significantly exceeded that of soluble exopolysaccharides. Four tests were performed, and an average of 3.95 mg of soluble exopolysaccharides and 9.44 mg of insoluble exopolysaccharides were found. The protection of microorganisms embedded in the matrix favors the maturation of the biofilm, making it a potential focus of tooth demineralization. To somehow reduce the organization of this type of biofilm depends on being aware of this high matrix production and its insoluble characteristic. This knowledge can be used to focus on active ingredients that decrease or hinder the production of this type of matrix. A further step to be taken is the identification of the types of glycosidic bonds predominant in exopolysaccharides isolated from the biofilm matrix.

Keywords: Biofilms. Polysaccharides. Extracellular Matrix.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	11
3 REVISÃO DA LITERATURA	12
3.1 Cárie dentária	12
3.2 <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Candida albicans</i> e sua interação na construção do biofilme cariogênico.....	14
4 MATERIAL E MÉTODO.....	19
4.1 Formação de biofilme patogênico in vitro	19
4.2 Formação da película adquirida.....	19
4.3 Preparo dos biofilmes para espectroscopia.....	20
4.4 Processamento dos biofilmes para extrair os WSP e ASP.....	22
4.5 Processamento de WSP (sobrenadante) e ASP (pellet).....	23
5 RESULTADOS.....	26
6 DISCUSSÃO	30
7 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33
ANEXO A – COMPROVANTE DO COMITÊ DE ÉTICA.....	38
ANEXO B – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO RELATÓRIO FINAL.....	42

1 INTRODUÇÃO

As doenças que ocorrem na cavidade oral são provocadas por biofilmes disbióticos, assim como várias outras doenças infecciosas que acometem os seres humanos. Entre as que acometem a boca estão a cárie dental, a candidíase oral e as doenças periodontais¹. A cárie é a condição de saúde mais prevalente no mundo, e é um dos principais motivos de visitas a centros de emergência, sendo o tratamento dessa doença oneroso². Ainda, esta doença pode afetar as atividades e desempenho escolar de crianças³, é responsável por ausência ao trabalho, além de causar uma redução da qualidade de vida devido à dor e sofrimento causado⁴.

A formação de um biofilme patogênico (i.e., cariogênico) é um processo dinâmico que depende do desenvolvimento de uma matriz extracelular (MEC) rica em exopolissacarídeos (EPS) de origem microbiana^{5,6}. Na comunidade microbiana oral, apesar de *Streptococcus mutans* não ser a espécie predominante⁷, este tem a capacidade de produzir ácidos e ser tolerante aos mesmos, e coordena a construção de biofilme quando sacarose e amido da dieta estão disponíveis. As suas exoenzimas glicosiltransferases (Gtfs) estão presentes na película salivar (i.e., película adquirida) e nas superfícies microbianas e são responsáveis pela produção dos EPS in situ⁵.

Os EPS in situ permitem a aderência e agregação dos microrganismos na superfície dos dentes, e com o decorrer do tempo esses polissacarídeos auxiliam na edificação de uma matriz tridimensional que abrange e protege as células, gerando um ambiente com alta coesão e difusão limitada. A GtfB e GtfC produzem glucanos do tipo α -1,3-glucanos, os quais são EPS insolúveis em água e dão uma característica densa e impermeável à MEC, dificultando o tamponamento promovido pela saliva e a ação de antimicrobianos de ação tópica. No entanto, a GtfC e a GtfD são responsáveis pela produção de glucanos que possuem ligações glicosídicas do tipo α -1,6^{5,6} e são EPS solúveis em água também com a função de proteção e coesão do biofilme, e servem como reserva de energia extracelular. *Streptococcus mutans* também produz frutanos via enzima frutossiltransferase (Ftf), mas em menor quantidade.

Além de *S. mutans*, o fungo *Candida albicans* é constantemente identificado em grande quantidade em biofilmes, principalmente em lesões de cárie na

infância^{8,10,11}. Esta espécie de fungo também produz ácidos e sobrevive neste ambiente, contribuindo para a cariogenicidade do biofilme. *C. albicans* estimula a produção de Gtfs sintetizadas por *S. mutans* e dá suporte para a adesão em sua parede celular, principalmente na forma de pseudo-hifas ou hifas¹². Assim, a associação entre *S. mutans* e *C. albicans* mimetiza a construção de um biofilme misto patogênico associado ao desenvolvimento de lesões cariosas severas¹³ e também a biofilmes encontrados em próteses acrílicas^{14,15}.

C. albicans é responsável pela produção de β -glucanos via várias glucosiltransferas e esses polissacarídeos estão presentes na parede celular do fungo e também é um EPS na matriz extracelular^{16,17}. Os β -glucanos podem se ligar a fluconazol e anfotericina B, prevenindo a penetração desses fármacos antifúngicos para dentro de biofilmes^{18,19,17,20}. Na parede do fungo também são encontradas mananas, componente da parede celular sendo o terceiro mais encontrado nas análises de composição de matriz formada por *C. albicans*, responsável pela proteção e resistência do microrganismo frente a agentes externos^{16,20}. A quantidade de EPS solúveis e insolúveis na MEC de biofilmes mistos é maior do que nos biofilmes simples das duas espécies²¹.

Porém, ainda é desconhecido quais as características dos EPS (proporção e tipos de ligação) da matriz formada por este biofilme misto. O conhecimento sobre essas informações ajudaria na formulação de maneiras de evitar a formação descontrolada dessa matriz, através de terapias que prejudiquem a construção do biofilme.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi caracterizar os exopolissacarídeos solúveis e insolúveis de biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* via análises espectroscópicas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

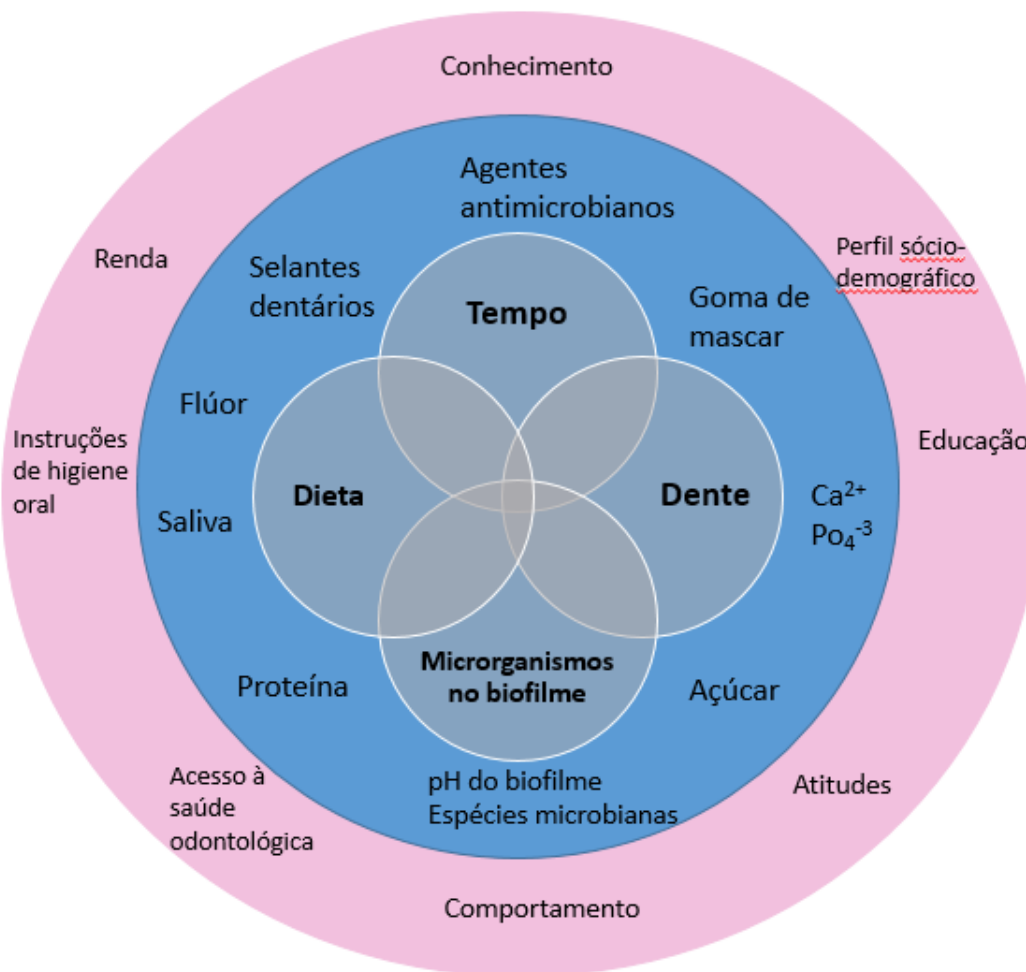
Esta seção é destinada a uma breve revisão da literatura sobre os principais tópicos abordados neste trabalho.

3.1 Cárie dentária

A cárie dental é caracterizada como a desmineralização dos tecidos duros dentais pelos ácidos produzidos a partir da fermentação de carboidratos provenientes da dieta por microrganismos que colonizam a superfície do dente²². Esta desmineralização é resultante de um desequilíbrio no equilíbrio fisiológico entre a estrutura do esmalte do dente e o biofilme²³.

A cárie é uma doença multifatorial (Figura 1) causada pela interação complexa entre os microrganismos presentes no biofilme, a dieta (quantidade, composição e frequência), a superfície dentária e o tempo, em que estes fatores estão interagindo. O risco de cárie pode variar de um indivíduo para outro, já que existem fatores que aumentam a probabilidade de ocorrência da doença, e esses fatores podem ser modificados. Os fatores de risco podem ser do tipo pessoal, como por exemplo o conhecimento, renda, educação e o comportamento relacionado a higiene oral e o costume de “beliscar” alimentos durante o dia; e também pode ser um fator de risco relacionado ao ambiente oral, como fluxo e composição da saliva, exposição ao flúor, a espécie microbiana presente e a existência de selantes dentais²⁴.

Figura 1 - Fatores envolvidos no desenvolvimento da cárie



Resumo dos fatores que interagem entre si para o desenvolvimento da cárie dentária. Em rosa estão os fatores pessoais, em azul os fatores ambientais da cavidade oral e em cinza os fatores que contribuem diretamente para o desenvolvimento da cárie.

Fonte: Adaptado de Selwitz et al.²⁴, p.54.

De acordo com o Global Burden of Disease, a cárie não tratada em dentes permanentes é a condição mais predominante, afetando 2,5 bilhões de pessoas no mundo, enquanto que a cárie não tratada em dentes decíduos afligiu 573 milhões de crianças¹. A saúde bucal não apresentou melhoras nos últimos 25 anos (1990-2015), e o número dessas doenças que acometem a cavidade oral tendem a aumentar, devido ao crescimento e envelhecimento da população¹.

O custo direto com tratamentos de doenças dentárias no mundo foi de US\$ 297,67 bilhões, sendo que a maior parte dessas despesas ocorreram em países de alta renda, e o custo indireto decorrente da perda de produtividade foi de US\$ 144,25 bilhões, de acordo com um estudo realizado em 2010²⁵.

3.2 *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* e sua interação na construção do biofilme cariogênico

Existem diversos microrganismos que residem na cavidade oral, e entre estes estão mais de 700 espécies de bactérias e 101 espécies de fungos, que influenciam extremamente na condição de saúde ou doenças orais^{26,27}.

O biofilme é definido como um conjunto de microrganismos que se organizam em comunidades complexas, altamente dinâmicas e estruturadas, tanto nas superfícies duras como nos tecidos moles da mucosa oral, sendo esses microrganismos amparados por uma matriz extracelular com estrutura tridimensional (3D)²⁸.

O substrato primário para o crescimento dos microrganismos na cavidade bucal não é derivado da alimentação humana, uma vez que estes detritos de alimentos são removidos rapidamente pelo fluxo salivar e pela deglutição. Na verdade, são derivados da saliva e do fluído cervical da gengiva na forma de glicoproteínas²⁹. Essas glicoproteínas se depositam sobre a estrutura do dente gerando a película salivar, sobre a qual vão se ligar os colonizadores primários. Sob circunstâncias propícias, os colonizadores primários se multiplicam dando origem a microcolônias que secretam EPS no qual ficam envolvidos, enriquecendo assim a matriz extracelular. Conforme as condições mudam durante o desenvolvimento do biofilme, os colonizadores secundários se aderem aos primários, formando uma comunidade multiespécie de estruturação tridimensional³⁰.

A estrutura e constituição da matriz do biofilme podem ser tão alterados quanto os seus constituintes microbianos, são influenciados pelas situações ambientais locais e podem se modificar com o passar do tempo³¹. Os carboidratos mais consumidos na sociedade atual são a sacarose e o amido, e a sua ingestão ao mesmo tempo pode elevar a indução de formação de cárie³². Alguns microrganismos usam esses nutrientes para a produção de substâncias poliméricas que são detectadas na matriz de biofilmes bacterianos como exopolissacarídeos, proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, ácidos lipoteicóicos, lipopolissacarídeos e eDNA. Os exopolissacarídeos e glucanos são produzidos pelas enzimas glicosiltransferases (Gtfs) enquanto os frutanos são produzidos pelas fructosiltransferases (Ftfs)^{5,6,31,33,34}. Ainda, constatou-se recentemente que eDNA e ALT agem com exopolissacarídeos na construção de biofilmes, podendo influenciar na virulência de *S. mutans*³⁵.

A MEC exerce um papel crucial na virulência de biofilmes, interferindo nas suas propriedades físicas e bioquímicas. A matriz também envolve os microrganismos e permite a criação de nichos acídicos devido à metabolização dos carboidratos fermentáveis provenientes da dieta, e esses ácidos produzidos fazem com que o pH local caia abaixo de valores críticos, causando a desmineralização da superfície dental. A lesão de cárie pode progredir, parar ou reverter dependendo do equilíbrio entre o processo de remineralização e desmineralização, ou seja, quando saliva deixa de reduzir a ação nociva dos ácidos e proteger a estrutura dentária, a recuperação dos minerais é afetada, ocorrendo um descontrole no processo de remineralização e causando uma cavitação na estrutura do dente. Os exopolissacarídeos podem intervir no processo de difusão, seja durante o tamponamento da saliva (neutralização dos ácidos no biofilme), ou diminuindo a difusão de agentes antimicrobianos de ação tópica para dentro do biofilme, os quais são usados para o combater microrganismos. A formação desse ambiente altamente coesivo e com difusão limitada aumenta a capacidade de geração de biofilmes cariogênicos^{5,24,28}.

Streptococcus mutans é uma bactéria Gram-positiva e está presente em alto número em crianças com cárie da infância^{37,38}. Apesar de não ser a espécie predominante dentro do biofilme, é tido como o principal microrganismo associado a lesões de cárie^{40,41}, devido a sua produção elevada de exopolissacarídeos na matriz extracelular, especialmente o do tipo insolúvel⁵. *S. mutans* também possui fatores de virulência como a aciduricidade (consegue sobreviver em ambiente de baixo pH), a acidogenicidade (produz ácidos como o lático e o acético) e a capacidade de superar diversas situações de estresse³⁹.

S. mutans consegue aderir-se a superfície do dente tanto na presença quanto na ausência de sacarose. O seu principal método de aderência ocorre na presença de sacarose e é liderado pelas exoenzimas Gtfs, que sintetizam EPS. Já o seu mecanismo de aderência independente da sacarose dá-se por meio de via adesinas^{5,41,42}. Ainda, a alta geração de Gtfs repercute no aumento da síntese de glucanos EPS, ofertando sítios de ligação para organismos adicionais e assim alterando bastante a complexidade da microbiota do biofilme.

S. mutans produz três enzimas Gtfs distintas: GtfB, GtfC e GtfD. A GtfB e GtfC sintetizam glucanos insolúveis em água (do inglês *alkali soluble polysaccharides* - ASP) ricos em ligações α -1,3, enquanto GtfC e GtfD sintetizam

glucanos solúveis em água (do inglês *water soluble polysaccharides* - WSP) principalmente com ligações glicosídicas do tipo α -1,6. As enzimas Gtfs também conseguem se ligar a outras bactérias orais, convertendo as que não são capazes de sintetizar Gtfs em produtoras de glucanos de fato^{5,31,36,43}.

Embora diversos fungos possam colonizar a cavidade oral, *Candida albicans* é o mais encontrado normalmente, sendo um membro importante da microbiota oral²⁷. Quando ocorrem alterações no ambiente do hospedeiro, este fungo passa de uma fase comensal para uma de patógeno oportunista, podendo formar biofilmes junto com estreptococos orais em superfícies mucosas e dentais^{13,44}. Estes biofilmes são responsáveis por doenças como a cárie dental e candidíases (cutâneas, mucosas e sistêmicas). Além disto, o fungo *C. albicans* é o encontrado com mais regularidade em candidíase no mundo, chegando a 63,8%^{44,45}, e também é constatado em lesões de cárie de rápida evolução quando em relação simbiótica com *S. mutans*^{8,46}.

Candida albicans pode ter forma de levedura, pseudo-hifa ou de hifa⁴⁶. A relação entre *S. mutans* e *C. albicans* é favorecida pela forma de hifa, que aumenta a superfície de contato para a adesão de *S. mutans* e conseqüentemente ajuda no desenvolvimento de um biofilme cariogênico (Figura 2)^{13,47}. Este biofilme também é cariogênico devido a características da *C. albicans*, como ser acidogênica e acidúrica, além de secretar aspartil proteases, enzimas que degradam o colágeno dentinário em ambiente ácido cariogênico⁴⁸.

Figura 2 - Arquitetura tridimensional de biofilme misto de *S. mutans* e *C. albicans*

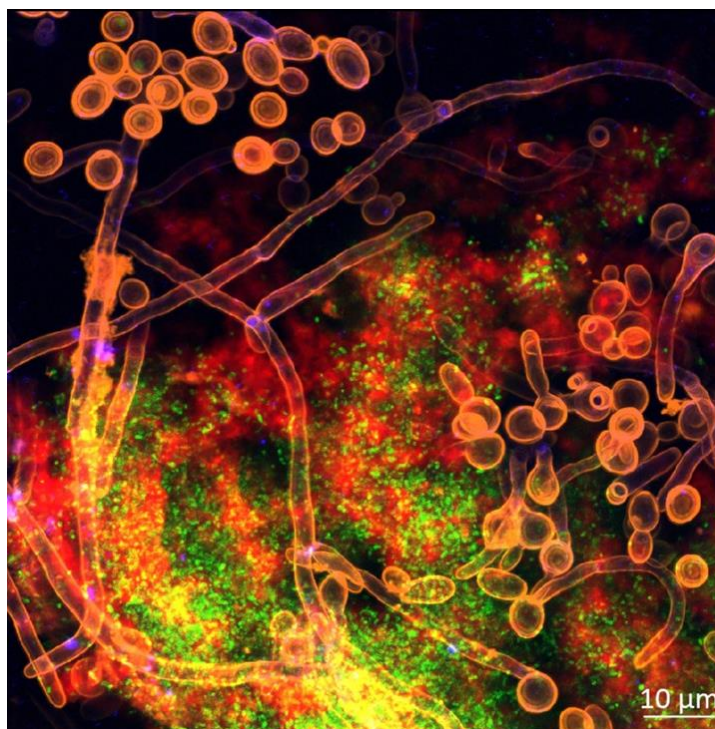


Imagem de microscopia confocal onde se constata a complexidade da arquitetura do biofilme. Em vermelho estão os α -glucanos, em verde as bactérias, em azul os β -glucanos e em laranja os fungos.

Fonte: Arquivo pessoal de Guilherme Roncari Rocha.

Candida albicans tem pouca ou nenhuma adesão com *S. mutans* na ausência de sacarose, mas na sua presença a adesão entre estes microrganismos é potencializada. Esta interação é intermediada pelas enzimas Gtfs, principalmente pela GtfB, que se liga à superfície do fungo produzindo altas quantidades de glucanos que fornecem sítios de ação para *S. mutans* e também aumentam a adesão de *C. albicans* à superfície dentária, ampliando a formação da MEC, principalmente a produção de exopolissacarídeos insolúveis pela bactéria^{12,13,36,43,49}. Em modelo animal, quando a superfície dentária foi infectada tanto por *S. mutans* quanto por *Candida albicans* junto a uma dieta rica em sacarose, nota-se uma ampliação no desenvolvimento de lesões cariosas severas¹³.

Ainda, *C. albicans* produz materiais de matriz (β -glucanos) via várias glucosiltransferases e esses polissacarídeos estão presentes na parede celular do fungo e também é um EPS na matriz, principalmente com ligações β -1,3 e β -1,6¹⁷. Os β -glucanos conferem proteção contra agentes antifúngicos, ligando-se a

fluconazol e anfotericina B, prevenindo a penetração desses fármacos para dentro de biofilmes^{19,20}.

4 MATERIAL E MÉTODO

Nesta seção foi descrito o passo a passo dos procedimentos realizados, desde a formação do biofilme nos discos de hidroxiapatita até o seu processamento para a quantificação de WSP e ASP.

4.1 Formação de biofilme patogênico in vitro

Os biofilmes foram formados em discos de hidroxiapatita pré-fabricada (HA) com área de superfície de $2,7 \pm 0,2 \text{ cm}^2$ (Clarkson Chromatography Products, Inc., South Williamsport, PA). Sobre eles foi criada uma película salivar, pois as glicoproteínas da película facilitam a adesão dos microrganismos sobre o substrato.

Foram usadas as cepas *S. mutans* UA159 e *C. albicans* SC5314. As cepas se encontravam congeladas em freezer -80°C , e a sua reativação foi realizada pela técnica de esgotamento em placa de ágar sangue, as quais foram incubadas em estufa ($37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$) durante 48 horas.

De 5 a 10 colônias das placas de cada cepa foram utilizadas para pré-inóculos em 10 mL de meio de cultura líquido (triptona e extrato de levedura – TYE, pH 7,0, 1% de glicose). Esses pré-inóculos foram incubados na mesma estufa. Após 16 a 18 horas, foram formados os inóculos com a diluição de 1:20 dos pré-inóculos no mesmo meio de cultura fresco e conferida a densidade óptica (DO) até o valor desejado de microrganismos (*S. mutans*: $0,728 \pm 0,247$ e *C. albicans*: $0,966 \pm 0,033$, com o espectrofotômetro calibrado em 600nm para ambos) para a formação do biofilme.

4.2 Formação da película adquirida

A saliva foi estimulada pela mastigação de um pedaço de parafilme por voluntários (de acordo com o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Instituição Sede – CAAE: 31725114.8.0000.5416, Anexo A). Quanto mais doadores utilizados na pesquisa, melhor para obter um produto mais heterogêneo. Os doadores selecionados precisavam passar pelos pré-requisitos: o candidato deve ser saudável, 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), não ter ingerido antibióticos nos últimos 3 meses e não pode ocorrer sangramento durante a coleta.

Após o término da coleta, misturou-se a saliva humana com tampão de adsorção – saliva artificial – (Tampão AB – 0,05M KCl; 0,02M KPO₄; 0,02M CaCl₂; 0,02M 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 concentração final). Em seguida, o conteúdo foi centrifugado por 20 minutos a 4000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi recolhido (saliva totalmente clarificada) e 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 da placa de 24 poços. Após, cada aparato (Figura 3) com os discos (pré-hidratados em água MilliQ esterilizada) foram transferidos para a placa com auxílio de uma pinça. A placa com os discos e saliva foi incubada à 37 °C, sob agitação de 75 rpm, durante 1 hora para formação da película (sHA).

Figura 3 - Aparato metálico que mantém os discos na posição vertical



Discos pré-fabricados de hidroxiapatita agarrados pelo aparato confeccionado de fio ortodôntico para mantê-los na posição vertical (a fim de evitar efeito de depósitos microbianos devido à gravidade) dentro da placa de 24 poços utilizada para realizar os experimentos.

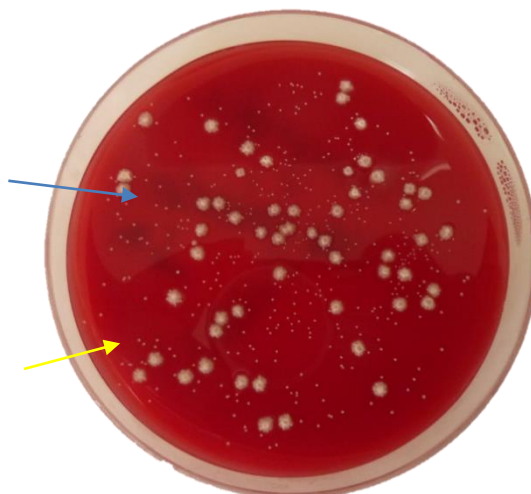
Fonte: Rocha⁵⁰, p.17.

4.3 Preparo dos biofilmes para espectroscopia

O modelo de biofilme misto de *S. mutans* UA159 (10⁶ UFC/mL) e *C. albicans* SC5314 (10⁴ UFC/mL) mimetiza o biofilme cariogênico. Após o período de formação da película salivar e concomitantemente os microrganismos chegarem na densidade óptica desejada, foram pipetados 43,8 µL de *S. mutans* e 30,61 µL de *C. albicans* para um volume final de 60 mL de meio de triptona e extrato de levedura + 1%

sacarose. Uma alíquota de 100 μ L do mesmo foi coletado para plaqueamento em ágar sangue, para controlar, padronizar e quantificar as unidades formadoras de colônia (UFC) inseridas no início do experimento (Figura 4 ilustra a diferença entre os microrganismos e como é a placa de ágar sangue no momento da contagem). O meio de cultura com os microrganismos foi distribuído em placa de 24 poços, sendo 2,8 mL em cada poço, para na sequência fazer a imersão dos discos com a película salivar no meio e seguir com incubação a 37 °C e 5% CO₂.

Figura 4 - Placa de ágar sangue com os microrganismos estudados

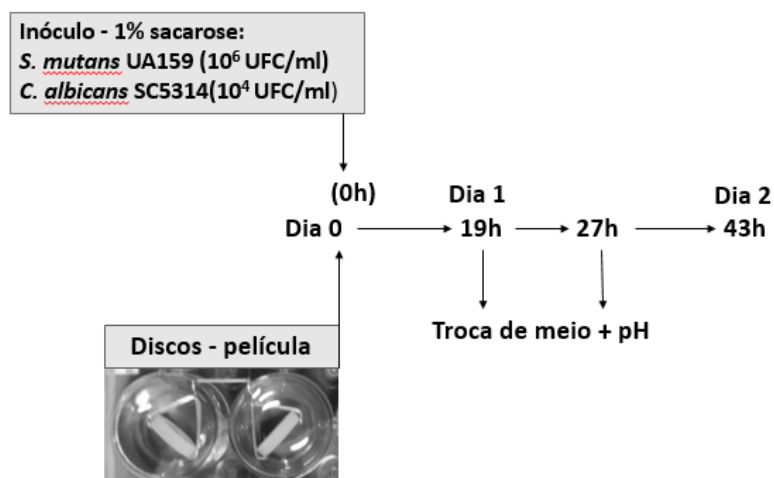


Placa utilizada para contagem das duas espécies que foram distinguidas visualmente. As colônias brancas e grandes são de *C. albicans* (seta azul) e as colônias pequenas e amareladas são de *S. mutans* (seta amarela).

Fonte: Rocha^{50, p.25}.

Foram realizadas trocas do meio de cultura às 19 e 27 horas, sendo medidos os pHs (pHmetro de mesa) dos poços das placas já utilizadas. Os biofilmes cresceram por 43 horas seguindo o desenho experimental, para depois fazer o seu processamento (Figura 5).

Figura 5 - Desenho experimental do preparo das amostras para análises por espectroscopia



Trocas de meio de cultura (setas pretas). A ilustração são discos de hidróxiapatita imersos em saliva para a formação da película salivar. Em 43 horas os discos passam por processamento para extração de ASP e WSP.

Fonte: Adaptado de Rocha⁵⁰, p.27.

4.4 Processamento dos biofilmes para extrair os WSP e ASP

Os exopolissacarídeos foram extraídos da matriz tridimensional formada durante o desenvolvimento dos biofilmes usando metodologia descrita anteriormente. Baseado em pesquisas anteriores, foram necessários 3 mg de EPSs solúveis e insolúveis, o que demandou a confecção de múltiplos biofilmes. Para obtenção de quantidade suficiente para análise, foram necessários pelo menos 10 biofilmes (que correspondem a 20 discos).

Esses biofilmes foram processados para a obtenção de suspensão de biofilmes homogeneizadas por sonicação, e alíquotas para determinar a população foram removidas. A suspensão restante foi centrifugada (4000 rpm/15 min/ 4 °C – centrífuga 5810 R, Eppendorf), e o sobrenadante foi armazenado para análise de WSP e o pellet para análise de ASP.

Assim, especificamente, quando os biofilmes estavam formados após 43 horas, estes foram processados. Adicionou-se NaCl a 0,89%, estéril, em novos poços em placas de 24 poços para enxague dos discos (3 vezes). Em seguida, os discos foram retirados do aparato de metal com auxílio de uma pinça e transferidos isoladamente para tubos de ensaio numerados e foi inserido 2 mL de NaCl 0,89%

estéril. Posteriormente, levados para banho ultrassônico com água MiliQ em temperatura ambiente por 10 minutos, para remoção dos biofilmes dos discos. A seguir, com auxílio de uma espátula nº 24 esterilizada, os discos foram raspados para remover o biofilme residual e o volume transferido para um tubo Falcon de 50 mL (como havia 20 discos, transferir o conteúdo de 4 discos para 1 tubo Falcon de 50 mL – assim, houve 5 tubos. Esses tubos precisam ser pré-pesados, e o peso de cada um anotado, pois foi importante para o processamento do pellet para ASP). Em seguida, um novo volume de 3 mL de NaCl foi inserido no tubo de vidro para lavagem das paredes do tubo, do disco em si e da espátula, para adquirir todo o biofilme formado no disco. Esse líquido foi adicionado aos tubos Falcon (cada tubo ficou com 20 mL). O volume passou por sonda com potência de 7 Watts por 30 segundos (Sonicador modelo Q125, QSonica) para homogeneizar a amostra e remover uma alíquota de 100 µL da mesma, e transferir para um tubo contendo 900 µL de NaCl a 0,89% para realizar diluição seriada e semeadura em placa de ágar sangue, seguida de incubação por 48 horas à 37 °C e 5% de CO₂. Após esse período, foram contadas as colônias e calculado UFC por biofilme.

Os tubos contendo os 19,9 mL restantes de suspensão de biofilme foram para a centrifuga a 4000 rpm, por 15 minutos a 4°C (centrifuga 5810R, Eppendorff) e iniciou a coleta/separação do sobrenadante e precipitado da amostra. O sobrenadante foi armazenado em novo tubo e o precipitado celular com os componentes insolúveis da matriz extracelular foram lavados com 10 mL de água milliQ esterilizada por mais duas vezes seguidas de centrifugação. Depois das centrifugações, o sobrenadante (contendo WSP) totalizava 39,9 mL e o tubo com o precipitado foi para pesagem. A diferença no peso pré (limpo) e pós processamento (microrganismos + ASP) correspondeu ao peso molhado do biofilme, sendo: 80% do peso em água e 20% correspondendo ao peso seco.

4.5 Processamento de WSP (sobrenadante) e ASP (pellet)

Para determinar o WSP, retirou-se uma alíquota de 700 µL do sobrenadante coletado para realização do teste colorimétrico, o qual tem como base a reação fenol-sulfúrico para a distinção de intensidade de cor: quanto maior a densidade óptica encontrada na amostra, maior o número de polissacarídeos⁵¹.

O restante (39,2 mL) foi dividido em novos tubos Falcon de 50 mL, sendo 9,8 mL de amostra para 29,4 mL de álcool 99% (proporção 1:3 em volume) e essa mistura foi armazenada em freezer -80°C durante 18 horas para precipitação do WSP. Após as 18 horas, os tubos foram centrifugados a 9500 rpm durante 20 minutos a 4 °C (Centrífuga Eppendorf 5810 R, Hamburgo, Alemanha), e o sobrenadante foi descartado. Foi inserido novos 10 mL de álcool 75% no tubo e com ajuda de uma alça de inoculação esterilizada, a parede do tubo era raspada para 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 as lavagens, o precipitado final foi colhido dos tubos Falcon e unidos, finalizando em apenas um tubo eppendorf com auxílio de acetona. A acetona neste processo é utilizada por ser extremamente volátil e ao terminar de unir todos os tubos e coletar todos os precipitados, o excesso de acetona foi removido e os tubos permaneceram abertos e protegidos de poeira na intenção de secar. O processo de secagem levou por volta de 45 minutos a 60 minutos. Após este período, os tubos estavam prontos para serem selados e enviados.

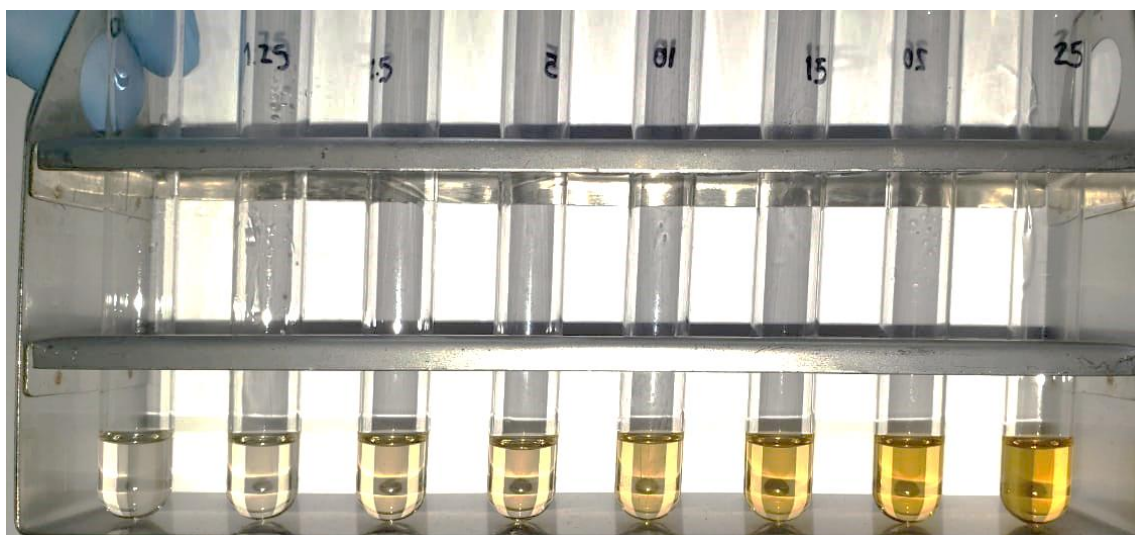
Para determinar o ASP, após a pesagem do peso molhado das amostras e calculado o peso seco (20% do peso molhado), foi adicionado a cada amostra 300 µL de NaOH (0,5M) para cada 1 mg de peso seco de material. Foi utilizado o vórtex para homogeneização e incubado em estufa orbital a 37 °C durante 2 horas, sendo que após os primeiros 10 minutos e aos 30 minutos os tubos passavam novamente pelo vórtex afim de lavar e dissolver todas as partículas do precipitado. Após as 2 horas de incubação, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi armazenado em um tubo Falcon de 50 mL. O sobrenadante contém a amostra de ASP que queremos analisar.

Novamente o volume de NaOH foi inserido no precipitado e incubado por 2 horas seguindo os mesmos passos. Foi centrifugado, o sobrenadante armazenado no mesmo tubo Falcon 50 mL para cada dupla de amostra e o precipitado novamente suspenso com NaOH, mas nesta 3ª suspensão em NaOH apenas passou pelo vórtex até que visualmente todo precipitado estivesse lavado pela solução (não foi incubado por mais 2 horas, passou direto para o passo da centrifuga). Após a última centrifugação, o sobrenadante foi coletado e armazenado

e o tubo eppendorf com o material precipitado foi descartado. Neste momento, com os 3 sobrenadantes coletados temos o volume final da amostra de ASP. Foi colhido 200 μ L de cada um dos tubos Falcon para quantificação do ASP pelo mesmo processo colorimétrico de WPS (Figura 6).

A partir deste momento, os tubos Falcon estavam prontos para serem lavados da mesma forma como foi descrito na lavagem do WSP, passou pelo mesmo processo até o concentrado final, resultando em um tubo eppendorf. Prontos ambos os tubos e nomeados de maneira correta, estes estão quase prontos para o envio das amostras para o professor Dr. Bruce R. Hamaker, aos cuidados de Anton Terekhov, o responsável pela parte experimental (*Roy L. Whistler Chair Professor, Director, Whistler Center for Carbohydrate Research Purdue University*). O processo final antes do envio é a quantificação das amostras coletadas (700 μ L de WSP e 200 μ L de ASP) para informá-lo da quantidade estimada de miligramas das amostras para realização das análises de espectroscopia.

Figura 6 - Curva de realização do teste colorimétrico para detecção e quantificação de carboidratos



A curva é ideal para obtermos uma equação da reta a qual as amostras devem estar localizadas entre os valores máximo e mínimo da curva. A curva é feita em duplicata e as amostras são lidas em triplicata. Quanto mais amarelo, maior a concentração de carboidrato dentro da solução – Reação fenol-ácido sulfúrico descrita por Dubois⁵¹ em 1956.

Fonte: Arquivo pessoal de Guilherme Roncari Rocha.

5 RESULTADOS

Este processo foi realizado quatro vezes. Na primeira ocasião, foram utilizados 20 discos de HA e um dos tubos de WSP estourou durante o processo de centrifugação após 18 horas contendo álcool 99%, perdendo assim parte da amostra. O experimento seguiu com a quantificação e envio das amostras, mas a quantidade de açúcar estava no limite mínimo, sendo insuficiente para continuidade dos testes. A quantidade de ASP e WSP mínimos era de 3 mg, e como na primeira tentativa o valor estava muito próximo do peso necessário para as análises, as amostras foram enviadas. Na segunda ocasião, aumentamos para 24 discos e não houve perda da amostra, pois foram divididos em mais tubos para evitar trincas durante a centrifugação, e conseqüentemente perda da amostra.

Os resultados dos dois experimentos estão apresentados na tabela 1. Ao chegar para as análises na *Purdue University*, o Anton não conseguiu dissolver as amostras em DMSO (Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo).

Tabela 1 - Resultados dos testes colorimétricos

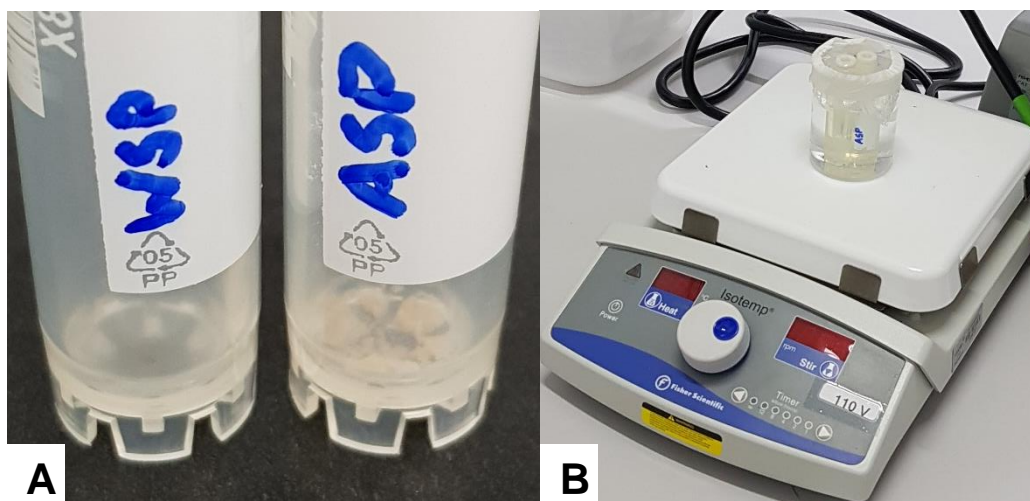
Experimento 1				Experimento 2			
Amostras		total µg	total mg	Amostras		total µg	total mg
WSP	1	893,7	0,89	WSP	1	721,8	0,72
	2	828,1	0,83		2	819,7	0,82
	3	783,0	0,78		3	754,0	0,75
	4	755,7	0,76		4	658,8	0,66
	5	703,8	0,70		5	733,9	0,73
					6	754,0	0,75
TOTAL			3,96	TOTAL			4,44
ASP	1	2034,0	2,03	ASP	1	1444,0	1,44
	2	1735,7	1,74		2	1201,7	1,20
	3	1940,6	1,94		3	1226,6	1,23
	4	1641,3	1,64		4	1119,1	1,12
	5	1485,0	1,49		5	1450,8	1,45
TOTAL			8,8367		6	1250,9	1,25
Estimado			7,0694	TOTAL			7,69

A tabela mostra os valores de ASP e WSP enviados nos dois experimentos. O valor estimado foi calculado devido as trincas e perda de parte das amostras no primeiro experimento como descrito no texto. O valor de 3,96 mg de WSP foi insuficiente para a análise das amostras.

Fonte: Elaboração própria.

O terceiro teste foi preparado para envio e a solução enviada por ele no dia 19 de março de 2019 às 16:59 horas (por email) foi de enviar as novas amostras já dissolvidas em 0,5 ml DMSO para cada 2 mg de amostra. O experimento 3 não teve sucesso na solubilização das amostras. Foi realizado banho seco a 35 °C por 4 horas seguidos de vórtex para tentar solubilizar, e as amostras foram armazenadas em incubadora orbital a 37 °C e 90 rpm até o dia seguinte para tentar novamente o banho seco, mas agora com 60 °C por 4 horas passando pelo vórtex de hora em hora. As amostras voltaram para a incubadora orbital com a mesma definição. Tentou-se trocar de frasco para podermos inserir um imã e foi deixado em agitador magnético por 2 dias a 1200 rpm em temperatura ambiente. Após esta tentativa, aumentou-se a temperatura do agitador magnético para 60 °C por 1 dia, após 90 °C e por fim 100 °C por um período de 1 dia cada uma das temperaturas. Todas as tentativas não tiveram sucesso na solubilização dos exopolissacarídeos solúveis e insolúveis (Figura 7).

Figura 7 - Imagem da terceira tentativa em solubilização dos açúcares



A: o precipitado após centrifugação no fundo do tubo e após os conteúdos serem coletados para a análise da quantidade solubilizada. B: Tubos em agitador magnético.

Fonte: Arquivo pessoal de Guilherme Roncari Rocha.

Após várias tentativas com falha, o líquido contendo cristais e sem uma solubilização total, passou por centrifugação de 30 segundos a 6000 rpm para precipitação dos cristais não solúveis, e cuidadosamente o líquido foi coletado para teste bioquímico colorimétrico tentando avaliar a quantidade de açúcar dissolvido

após as tentativas citadas acima. Foi encontrado um total de 3,037 mg de ASP e 1,361 mg de WSP. Sendo suficiente a quantidade do conteúdo insolúvel; porém, o líquido mostrava uma característica amarelada. Este produto poderia ter sido alterado pelas variações de temperatura, os açúcares podem ter perdido suas características e foi decidido realizar um quarto experimento para uma nova tentativa.

Para a quarta tentativa, decidiu-se não alterar a temperatura no momento de tentativas de solubilização e foi retirado do processo a utilização da acetona no final do preparo das amostras e secagem como o descrito anteriormente. A ideia era não deixar o açúcar se aglomerar e coaptar. A união dos últimos tubos foi realizada por álcool 75% igual nas lavagens, foi retirado o excesso do álcool substituindo a acetona neste processo e não deixou as amostras secarem. Logo após retirar o máximo possível de álcool, foi inserido o DMSO 99% para a concentração final de 2 mg de amostra para 500 µL de DMSO como anteriormente citado.

Tabela 2 - Resultados dos testes colorimétricos

Experimento 3				Experimento 4			
Amostras		total µg	total mg	Amostras		total µg	total mg
WSP	1	980,87	0,98	WSP	1	477,93	0,48
	2	698,96	0,70		2	516,93	0,52
	3	805,17	0,81		3	541,14	0,54
	4	617,66	0,62		4	377,07	0,38
	5	603,24	0,60		5	564,00	0,56
	6	689,78	0,69		6	500,79	0,50
TOTAL			4,40	TOTAL			2,98
ASP	1	1842,98	1,84	ASP	1	829,68	0,83
	2	1974,70	1,97		2	5168,99	5,17
	3	1759,11	1,76		3	1170,75	1,17
	4	2155,51	2,16		4	648,87	0,65
	5	1793,30	1,79		5	913,47	0,91
	6	1831,17	1,83		6	1143,31	1,14
TOTAL			11,36	TOTAL			9,88

A tabela mostrando os valores de ASP e WSP enviados em dois experimentos (3º e 4º).

Fonte: Elaboração própria.

As amostras seguiram para incubadora orbital a 37 °C e 90 rpm por 1 dia, seguido de 6 horas em vórtex na velocidade máxima do aparelho e foi inserido o imã

para agitador magnético. O conteúdo apresenta os mesmos cristais, mas agora mais dispersos (em menor tamanho). Foi realizado teste bioquímico semelhante ao terceiro experimento para determinar a quantidade de ASP e o resultado foi de 2,89 mg de amostra dissolvida. A quantidade mínima de amostra seriam 3 mg. O conteúdo com menos de 3 mg não pode ser enviado para análise. Anton foi contatado novamente para nos ajudar a solucionar este problema de solubilização. A ideia enviada via email foi de utilizar mais DMSO, sendo uma concentração de 1 mg de amostra por mL de DMSO.

Portanto, uma vez resolvido o problema de solubilização das amostras de WSP e ASP, estas serão submetidas às análises espectroscópicas. Essas análises serão empregadas para avaliar o perfil das ligações glicosídicas e o grau de ramificação dos exopolissacarídeos na matriz. As amostras serão analisadas usando protocolos estabelecidos para: (i) Cromatografia gasosa (GC-MS; Agilent Tech.) para análise da composição de carboidratos, estereoquímica dos resíduos de açúcar e os tipos de ligações polissacarídicas; (ii) Cromatografia líquida de alta eficiência (GC/HPLC; HP) para separação do peso molecular, da distribuição de comprimentos de cadeia e distribuição de oligossacarídeos; e (iii) Espectroscopia de ressonância magnética (NMR; Varian Inc.) para análise da configuração anomérica e sequência de resíduos glicosídicos.

6 DISCUSSÃO

De acordo com os dados obtidos, a produção de exopolissacarídeos insolúveis superou consideravelmente a produção dos solúveis, e esta característica condiz com o perfil de um biofilme virulento, como é o caso de um biofilme misto de *S. mutans* e *C. albicans*. Estes microrganismos desenvolvem uma relação simbiótica na presença de uma dieta rica em sacarose, que é mediada por Gfts derivados de *S. mutans*, os quais se ligam a *C. albicans* e produzem grandes quantidades de glucanos na sua superfície, intensificando a produção de EPS na matriz, e conseqüentemente, aumentando a capacidade destes microrganismos de formar biofilme juntos⁴³. Além do mais, a presença de *C. albicans* em biofilmes de espécies mistas induz a expressão de Gfts de *S. mutans*, aumentando a virulência do biofilme e ocasionando lesões de cárie agressivas (como é o caso da cárie da infância)³⁶.

A produção de uma maior quantidade de matriz “impermeável” também dificulta a penetração e ação de antimicrobianos de ação tópica e da saliva, deixando o biofilme mais viscoelástico, e conseqüentemente a sua remoção mecânica fica mais difícil^{5,24}.

A principal causa da cárie dentária ainda é a negligência na higiene bucal, e hábitos como o de escovar os dentes e passar fio dental frequentemente ajuda a remover microrganismos e substâncias fermentáveis da superfície do dente⁵². Alguns agentes antimicrobianos são utilizados para tentar prevenir a ocorrência de cárie, como o flúor e a clorexidina, mas estes agentes possuem limitações. No caso do flúor, que é considerado o padrão para prevenção de cárie, oferece uma defesa incompleta contra a cárie e atua incorretamente sobre o aspecto microbiológico desta⁵³, pois seu principal mecanismo de ação é a promoção de remineralização da estrutura dentária. Já a clorexidina é um potente agente microbicida de amplo espectro, mas não é compatível com o flúor, apresenta efeitos colaterais adversos (manchamento da estrutura dentária, próteses e restaurações, alterações no paladar, queimaduras no tecido mole e formação de cálculos) e, portanto, não é adequado para uso diário⁴⁴.

Por isso, a intenção das análises espectroscópicas, as quais ainda não foi possível realizar por não compreender o que está atrapalhando a solubilização da amostra, é responder alguns questionamentos, como por exemplo: “qual o principal

conteúdo nesta matriz?”, se ele é produzido pela bactéria (α -glucano) ou pelo fungo (β -glucano); qual a principal característica dessa cadeia, sendo ela insolúvel pelo que observamos nas tabelas pela quantidade de material, mas produzida no início da formação do biofilme ou no final da sua maturação. Todos estes questionamentos nos levam a tentar compreender como os microrganismos respondem ao viver em uma comunidade que tem uma dieta rica em açúcar, e formular maneiras de evitar a formação descontrolada dessa matriz, focando em princípios ativos que diminuam ou dificultem a produção desse tipo de matriz.

7 CONCLUSÃO

A alta produção de ASP mostra o potencial patogênico de biofilme misto de *S. mutans* e *C. albicans* em presença de sacarose.

REFERÊNCIAS*

1. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T et al. GBD 2015 oral health collaborators: global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990-2015: a systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. *J Dent Res*. 2017; 96(4): 380-7.
2. 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.
3. Jackson SL, Vann WF, Kotch JB, Pahel BT, Lee JY. Impact of poor oral health on children's school attendance and performance. *Am J Public Health*. 2011; 101(10): 1900-6.
4. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ*. 2005; 83(9): 661-9.
5. 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.
6. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res*. 2013; 92(12): 1065-73.
7. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011; 90(3): 294-303.
8. 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.
9. Raja M, Hannan A, Ali K. Association of oral candida carriage with dental caries in children. *Caries Res*. 2010; 44 (3): 272-6.
10. 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.
11. Xiao J, Moon Y, Li L, Rustchenko E, Wakabayashi H, Zhao X et al. *Candida albicans* carriage in children with severe childhood caries (S-ECC) and maternal relatedness. *PLoS One*. 2016; 11(10): 1-16.

* 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>

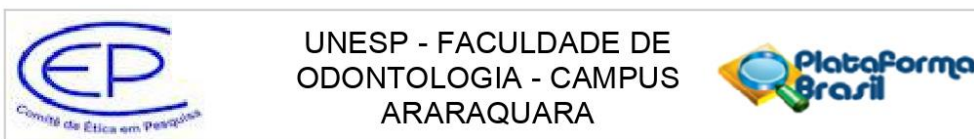
12. Gregoire S, Xiao J, Silva BB, Gonzalez I, Agidi PS, Klein MI et al. Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(18): 6357-67.
13. Falsetta ML, Klein 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.
14. 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.
15. Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EMM, Del Bel Cury AA, ten Cate JM et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *C. albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol.* 2008; 53(8): 755-64.
16. Lal P, Sharma D, Pruthi P, Pruthi V. Exopolysaccharide analysis of biofilm-forming *Candida albicans*. *J Appl Microbiol.* 2010; 109(1): 128-36.
17. Taff, HT, Nett JE, Zarnowski R, Ross KM., Sanchez H, Cain MT et al. A *Candida* biofilm induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. *PLoS Pathog.* 2012; 8(8): e1002848.
18. Nett JE, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyada K, Hoff B et al. Putative role of -1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(2): 510-20.
19. 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.
20. Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt J et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio.* 2014; 5(4): e01333-14.
21. Lobo CIV. Interação de *Streptococcus mutans* e de *Candida albicans* em biofilme in vitro [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.
22. Marsh, PD, Lewis, MA, Williams, D., & Martin, MV (2009). Livro eletrônico sobre microbiologia oral. Ciências da saúde da Elsevier.
23. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res* 2004; 38(3): 182-91.
24. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. 2007; 369(9555): 51-9.

25. Listl, S, Galloway, J, Mossey, PA, Marcenes, W. Global economic impact of dental diseases. *J Dent Res.* 2015; 94(10): 1355-61.
26. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* 2000. 2006; 42: 80-7.
27. 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(1): e1000713.
28. Fleming CH, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(9): 623-33.
29. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013; 69(1): 137-43.
30. 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.
31. Xiao J, Klein MI, Delahunty CM, Yates III JR, Lu B, Heydorn A, Falsetta ML 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.
32. 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.
33. 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.
34. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res.* 2009; 88(11): 982-90
35. Castillo Pedraza MC, Novais TF, Faustoferri RC, Quivey RG Jr, Terekhov A, Hamaker BR et al. Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of *Streptococcus mutans* biofilms. *Biofouling.* 2017; 33(9): 722-40.
36. 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.
37. Hughes CV, Dahlan M, Papadopolou 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.

38. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986; 50(4): 353-80.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends Microbiol.* 2018; 26(3): 229-42.
44. 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.
45. Harriott MM, Noverr MC. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol.* 2011; 19(11): 557-63.
46. 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.
47. 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.
48. Klink 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.
49. 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.

50. Rocha GR. Avaliação da eficácia de agente antimicrobiano liberado por novo sistema de liberação de fármacos contra biofilmes orais patogênicos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.
51. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*. 1951; 168(4265): 167.
52. Islam B, Khan SN, Khan AU. Dental caries: from infection to prevention. *Med Sci Monit*. 2007; 13(11): 196-203.
53. ten Cate JM. Novel anticaries and remineralizing agents: prospects for the future. *J Dent Res*. 2012; 91(9): 813-5.

ANEXO A – COMPROVANTE DO COMITÊ DE ÉTICA



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 INEZ KLEIN

Área Temática:

Versão: 7

CAAE: 31725114.8.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final

Detalhe:

Justificativa: Prezado(a)s

Data do Envio: 07/10/2021

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.100.298

Apresentação da Notificação:

Trata-se da apresentação do relatório final da pesquisa cujo resumo constava: "A cárie dentária e as doenças periodontais são doenças infecciosas causadas por biofilmes virulentos e os agentes de utilização tópica que previnem ou tratam essas doenças geralmente não tem uma retenção adequada para que os mesmos exerçam por completo seu potencial terapêutico. Portanto, novas estratégias para o controle de biofilmes deveriam focar na retenção e liberação controlada de agentes no sítio onde o biofilme se desenvolve, sendo assim, o objetivo deste estudo será avaliar o efeito de nanopartículas carreadoras (NPC) ativadas por pH na localização e liberação contínua de diferentes agentes anti-biofilmes em biofilmes. Será usado um modelo de biofilme cariogênico in vitro sobre superfícies de hidroxiapatita e de materiais odontológicos (cerâmicas e resinas), comparando-se o uso de agentes livres (farnesol e apigenina) ou não ligados às NPC (NPC-farnesol, NPC-apigenina e NPC-apigenina+farnesol). Saliva fornecida por voluntários formarão,

Endereço: HUMAITA 1680, SALA 512

Bairro: CENTRO

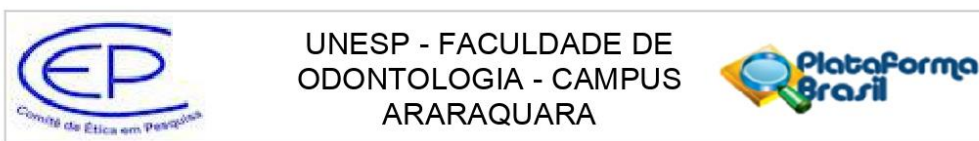
UF: SP

Telefone: (16)3301-6459

CEP: 14.801-903

Município: ARARAQUARA

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.100.298

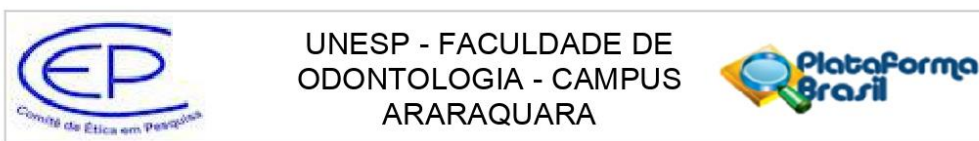
sobre discos de hidroxiapatita ou de materiais odontológicos, a película salivar para formar biofilmes mistos compostos de *Streptococcus mutans* UA159, *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 e *Streptococcus oralis* ATCC 35037 ou compostos por *S. mutans* e *Candida albicans*. Esses biofilmes serão tratados com agentes ligados ao NPC e sem NPC (agentes livres). 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 (agente livre), 6) farnesol (agente livre), 7) apigenina+farnesol (agentes livres), e 8) veículo controle (tampão 1X PBS, pH 7,0, que é o diluente de todos os agentes e NPC).

Esses tratamentos serão aplicados topicamente nos discos de hidroxiapatita com a película salivar e biofilmes duas vezes por dia durante 1 minuto (ou mais 5 minutos), por um período de 3 dias. Serão usados os métodos padrão de análises bioquímicas (colorimétricas) e métodos de cultivo bacteriano para determinar o peso seco do biofilme (biomassa), o total de proteínas, o conteúdo de exopolissacarídeos (solúveis e insolúveis em água) e número de células viáveis (unidades formadoras de colônia). Ainda, será avaliada a estrutura desses biofilmes via microscopia confocal e a expressão de genes de virulência dos microrganismos. Os dados obtidos nos experimentos *in vitro* serão analisados para determinar a influência do sistema de liberação dos agentes composto pelas nanopartículas carreadoras (NPC) no efeito anti-biofilme dos agentes ligados às NPC comparados aos agentes livres (não ligados à NPC). Os dados obtidos serão analisados usando o software Prism 6 (GraphPad Software, Inc., 2014) comparando-se os tratamentos via modelos de regressão para obtenção de testes de igualdade e comparações pareadas. O nível de significância será 0,05. Essa análise determinará a efetividade de das nanopartículas carreadoras para melhora do efeito de agentes anti-biofilme.

Objetivo da Notificação:

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de nanopartículas carreadoras (NPC) ativadas por pH na localização e liberação contínua de diferentes agentes anti-biofilmes em biofilmes. Foi usado um modelo de biofilme cariogênico *in vitro* sobre superfícies de hidroxiapatita e de materiais odontológicos (cerâmicas e resinas), comparando-se o uso de agentes livres (farnesol e apigenina) ou não ligados às NPC (NPCfarnesol, NPC-apigenina e NPC-apigenina+farnesol). Saliva fornecida por voluntários formaram, sobre discos de hidroxiapatita ou de materiais odontológicos, a película salivar para formar biofilmes mistos compostos de *Streptococcus mutans* UA159, *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 e *Streptococcus oralis* ATCC 35037 ou compostos por *S. mutans* e *Candida albicans*. Esses biofilmes foram tratados com agentes ligados ao NPC e sem NPC (agentes livres). Os grupos experimentais correspondentes a cada tratamento foram: 1) NPC-apigenina, 2) NPC-

Endereço: HUMAITA 1680, SALA 512	CEP: 14.801-903
Bairro: CENTRO	
UF: SP	Município: ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-6459	E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.100.298

farnesol, 3) NPC-apigenina+farnesol, 4) NPC apenas (NPCcontrole), 5) apigenina (agente livre), 6) farnesol (agente livre), 7) apigenina+farnesol (agentes livres), e 8) veículo controle (tampão 1X PBS, pH 7.0, que é o diluente de todos os agentes e NPC). Esses tratamentos foram aplicados topicamente nos discos de hidroxiapatita com a película salivar e biofilmes duas vezes por dia durante 1 minuto (ou mais 5 minutos), por um período de 3 dias. Serão usados os métodos padrão de análises bioquímicas (colorimétricas) e métodos de cultivo bacteriano para determinar o peso seco do biofilme (biomassa), o total de proteínas, o conteúdo de exopolissacarídeos (solúveis e insolúveis em água) e número de células viáveis (unidades formadoras de colônia). Ainda, foi avaliada a estrutura desses biofilmes via microscopia confocal e a expressão de genes de virulência dos microrganismos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

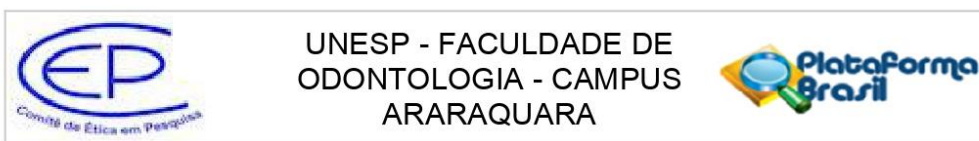
Riscos: Não existem riscos sociais ou físicos significantes para a doação de saliva. Não existem riscos conhecidos associados à doação de saliva total. Os voluntários serão convidados a expectorar (cuspir) saliva total estimulada dentro de um contêiner plástico estéril. Não existe risco conhecido para a coleta de saliva, outro que o risco do voluntário 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. Um outro risco possível pode ser estresse. Entretanto, a participação na pesquisa é estritamente voluntária; o voluntário pode finalizar sua participação na pesquisa a qualquer momento.

Benefícios: Não existem benefícios diretos aos voluntários. Entretanto, esta pesquisa poderá aumentar os conhecimentos sobre possíveis novos alvos para terapia antimicrobiana/anti-biofilme direcionada contra biofilmes orais virulentos e promover melhoras a saúde bucal.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Foi apresentado relatório Final da Pesquisa, dentro do prazo solicitado na emenda do relatório parcial aprovado em agosto de 2020, cumprindo o número de participantes solicitado para finalização deste (n=16). A pesquisadora apresentou resumo do relatório parcial apresentado em agosto de 2020 e a complementação deste período final, de setembro de 2020 a setembro de 2021. Os dados foram utilizados para apresentação em congresso científico (38ª Reunião da SBPqO,

Endereço: HUMAITA 1680, SALA 512	CEP: 14.801-903
Bairro: CENTRO	
UF: SP	Município: ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-6459	E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.100.298

2021), confecção de um manuscrito (em revisão pelo periódico Journal of Oral Microbiology) e uma tese de doutorado, com defesa marcada para 08/11/2021.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado o relatório final.

Recomendações:

Vide campo conclusões ou pendências e lista de inadequações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugere-se a aprovação do relatório final.

Considerações Finais a critério do CEP:

Relatório Final APROVADO em reunião de 11 de novembro de 2021.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Final	formulario_para_relatorio_final_Nanoparticulas_pH_dependentes_2021.pdf	07/10/2021 14:27:26	MARLISE INEZ KLEIN	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 11 de Novembro de 2021

Assinado por:
Andréa Gonçalves
(Coordenador(a))

Endereço: HUMAITA 1680, SALA 512
Bairro: CENTRO **CEP:** 14.801-903
UF: SP **Município:** ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-6459 **E-mail:** cep@foar.unesp.br

ANEXO B – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO RELATÓRIO FINAL

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Sistema PIBIC

Início | Acesso Restrito

Iniciação Científica

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

Orientador Envio do relatório final dos projetos

 Orientador
MARLISE INÊZ KLEIN
FURLAN

Lista de pedidos

Início

Trocar Senha

Editar dados

Meus Pedidos

Criar Pedido

Envio do relatório final

Formulário de Avaliação do Relatório Parcial

Substituições

Cancelamentos

Sair

Não existe pedidos para entrega do Relatório.

Status dos Pedidos após envio do Relatório Final

52325 - Formulação com frações de planta para controle de biofilme cariogênico (ÉRICK DANTE DE OLIVEIRA FRATUCELLI) (03/05/2019 - Nova)

Status: **Aguarde Avaliação**

52127 - Influência de formulação com composto 1771 na microbiota de biofilmes microcosmos (RICARDO AUGUSTO VICENTE) (01/05/2019 - Nova)

Status: **Aguarde Avaliação**

52125 - Caracterização da matriz extracelular de biofilmes microcosmos (MATHEUS MIELI CANONICI) (01/05/2019 - Nova)

Status: **Aguarde Avaliação**

52121 - Influência da matriz extracelular na geração de células persistentes de Streptococcus mutans em biofilmes e caracterização da matriz derivada das células persistentes (VANESSA CORONATO NOGUEIRA CONSTANTINO) (01/05/2019 - Nova)

Status: **Aguarde Avaliação**

47175 - Caracterização de exopolissacarídeos solúveis e insolúveis de biofilmes mistos de Streptococcus mutans e Candida albicans via análises espectroscópicas (VANESSA CORONATO NOGUEIRA CONSTANTINO) (22/05/2018 - Nova)

Status: **Aguarde Avaliação**

47109 - Avaliação da eficácia de fármacos liberados por novo sistema de liberação de fármacos contra biofilmes mistos de Streptococcus mutans e Candida albicans (RICARDO AUGUSTO VICENTE) (22/05/2018 - Nova)

Status: **Aguarde Avaliação**

47053 - Dinâmica populacional durante o desenvolvimento de biofilmes microcosmos expostos a desafio nutricional (RAYSSA MARIANA DANTAS) (21/05/2018 - Nova)

Status: **Aguarde Avaliação**

46194 - Avaliação de atividades de extratos e frações de Casearia sylvestris sobre as etapas iniciais da formação de biofilmes cariogênicos (PRISCILA KELLEN PEREIRA) (27/04/2018 - Nova)

Status: **Aguarde Avaliação**

52325 - Formulação com frações de planta para controle de biofilme cariogênico (ÉRICK DANTE DE OLIVEIRA FRATUCELLI) (03/05/2019 - Nova)

Status: **Aprovado**

52127 - Influência de formulação com composto 1771 na microbiota de biofilmes microcosmos (RICARDO AUGUSTO VICENTE) (01/05/2019 - Nova)

Status: **Aprovado**

52125 - Caracterização da matriz extracelular de biofilmes microcosmos (MATHEUS MIELI CANONICI) (01/05/2019 - Nova)

Status: **Aprovado**

52121 - Influência da matriz extracelular na geração de células persistentes de Streptococcus mutans em biofilmes e caracterização da matriz derivada das células persistentes (VANESSA CORONATO NOGUEIRA CONSTANTINO) (01/05/2019 - Nova)

Status: **Aprovado**

47175 - Caracterização de exopolissacarídeos solúveis e insolúveis de biofilmes mistos de Streptococcus mutans e Candida albicans via análises espectroscópicas (VANESSA CORONATO NOGUEIRA CONSTANTINO) (22/05/2018 - Nova)

Status: **Aprovado**

- Análise: Relatório muito bem elaborado e discutido com relevância os achados experimentais. O que permitiu a aluno de iniciação científica elaborar e discutir os experimentos , portanto cumprindo adequadamente os requisitos da iniciação. Os resultados serão utilizados na continuação da pesquisa. Verificação: Foram devidamente realizadas.

47109 - Avaliação da eficácia de fármacos liberados por novo sistema de liberação de fármacos contra biofilmes mistos de Streptococcus mutans e Candida albicans (RICARDO AUGUSTO VICENTE) (22/05/2018 - Nova)