



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



**Ricardo Augusto Vicente**

**Avaliação da eficácia de fármacos liberados por novo sistema de liberação de fármacos contra biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans***

**Araraquara**

**2022**



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



**Ricardo Augusto Vicente**

**Avaliação da eficácia de fármacos liberados por novo sistema de liberação de fármacos contra biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans***

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: Profa. Dra. Ana Claudia Pavarina**  
**Coorientadora: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein Furlan**

**Araraquara**

**2022**

V632a

Vicente, Ricardo Augusto

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. -- Araraquara, 2022

40 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Odontologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Ana Claudia Pavarina

Coorientadora: Marlise Inêz Klein Furlan

1. Cáries Dentárias. 2. Biofilmes. 3. *Streptococcus mutans*. 4. *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.



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



**Ricardo Augusto Vicente**

**Avaliação da eficácia de fármacos liberados por novo sistema de liberação de fármacos contra biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans***

**Orientador: Prof (a) Dr (a) Ana Claudia Pavarina**

**Assinatura Orientador (a):** *Ana Claudia Pavarina*

**Assinatura Aluno (a):** *Ricardo Augusto Vicente*

**Araraquara, 31 de março de 2022.**

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer aos meus pais pela oportunidade que me deram na vida de poder somente focar nos estudos, a Deus por ter me trazido até aqui com saúde, a todos os colegas do laboratório o qual participei das pesquisas, em especial para o pós-graduando Guilherme Roncari Rocha, por todos os ensinamentos e experimentos acompanhados e também a professora doutora Marlise Inêz Klein Furlan, por todo auxílio durante os processos e trabalhos e por todo conteúdo passado durante os anos de iniciação científica, agradecimentostambém a professora doutora Ana Claudia Pavarina pela orientação no trabalho de conclusão de curso.

À CNPq por todo apoio financeiro a pesquisa nas universidades de São Paulo, epelo apoio financeiro a essa pesquisa (Processo nº 47109).

Vicente RA. Avaliação da eficácia de fármacos liberados por novo sistema de liberação de fármacos contra biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* [Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

## **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 cavidade bucal por um período suficiente para que os mesmos possam exercer o seu potencial terapêutico máximo, devido à sua eliminação rápida pela saliva e ingestão de alimentos. Portanto, estratégias para o controle de biofilmes que objetivem retenção e liberação controlada de agentes ativos no local onde o biofilme virulento se desenvolve são necessárias. Assim, foram desenvolvidas nanopartículas carreadoras (NPC) de fármaco que se aderem à hidroxiapatita (componente mineral dos dentes), à película salivar e aos exopolissacarídeos (componentes principais da matriz extracelular de biofilmes). As NPC possuem elementos responsivos à mudanças de pH para a liberação de agentes terapêuticos em nichos ácidos, presentes em biofilmes orais patogênicos. Entretanto, faz-se necessária a otimização das NPC, assim os objetivos deste estudo são (i) avaliar a capacidade carreamento e de liberação de diferentes fármacos pelas NPCs e (ii) atividade anti-biofilme dos fármacos liberados por NPCs contra biofilmes formados por *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Os resultados das medições do pH dos meios de cultura, apontam para números melhores nos tratamentos realizados de forma livre (sem a NPC), contendo flúor na composição ou seja (Far+250, 1771+250, Far+1771+250 e 250). Os sistemas avaliados não influenciaram na biomassa e na contagem de unidades formadoras de colônia dos biofilmes avaliados.

**Palavras – chave:** Cáries dentárias. Biofilmes. *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*.

Vicente RA. Efficacy analyses a new drug delivery system which targets streptococcus mutans and candida albicans mixed biofilms [Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

## **ABSTRACT**

The development of effective therapies for the control of oral biofilm is a challenge. Surface agents used to treat or prevent oral diseases caused by biofilms are generally not kept in the oral cavity for enough time for them to exert their maximum therapeutic potential. Due to saliva and food intake the agents rapidly get eliminated from the mouth. Therefore, it is necessary to develop strategies aimed to control retention and release of active agents at the virulent biofilm site. Thus, drug carrier nanoparticles (NPC) were developed. These adhere to hydroxyapatite (a mineral component of the teeth), salivary pellicle and exopolysaccharides (the main components of the extracellular matrix of biofilms). NPCs have pH-responsive elements for the release of therapeutic agents in acidic niches, present in pathogenic oral biofilms. However, the optimization of NPCs is necessary, so the objectives of this study are (i) to evaluate the NPCs' carrying and release capacity of different drugs and (ii) anti-biofilm activity of drugs released by NPCs against biofilms formed by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. The pH measurements results point to expressive numbers in treatments carried out freely (without NPC), containing fluorine in the composition, which are (Far+250, 1771+250, Far+1771+250 and 250). The evaluated systems did not influence the biomass and colony forming units count of the analyzed biofilms.

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

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>08</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Película adquirida .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Biofilmes e cárie dentária.....</b>	<b>13</b>
<b>3.3 Nanopartículas.....</b>	<b>16</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 Teste de compatibilidade das nanopartículas com fármacos ...</b>	<b>18</b>
<b>4.2 Teste dos agentes em biofilme simples de <i>S. mutans</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>4.3 Desenho experimental.....</b>	<b>27</b>
<b>4.4 Análise dos dados.....</b>	<b>28</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>34</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>39</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Muitas patologias infecciosas em humanos tem como fator causal biofilmes virulentos, incluindo as doenças orais, por exemplo a cárie dentária<sup>1</sup>. A doença cárie dentária é um problema de saúde pública mundial<sup>1</sup>. Esta doença que afeta crianças e adultos ainda é uma das principais causas de visitas à centros de atendimento de urgência em odontologia bem como uma das maiores causas para ausência de trabalho e escola. O tratamento dessa doença é oneroso e vem crescendo anualmente.

O desenvolvimento de terapias eficazes contra doenças causadas por biofilmes orais é difícil porque, em primeiro lugar, existe baixa retenção das substâncias exógenas introduzidas via regimes de tratamento padrão (aplicação tópica com exposições breves), existe ainda uma eliminação rápida de medicamentos por ação da saliva, e não menos importante, a complexidade estrutural do biofilme. Substâncias em meio tópico precisam ser retidas ou ter efeito prolongado sem exibir atividade biocida de amplo espectro para prevenir a desorganização da microbiota oral complexa. Paralelamente a isso, as substâncias não devem formar complexos com as proteínas presentes na saliva que facilitem a eliminação rápida da substância da cavidade oral.

Nanopartículas carreadoras de fármacos formadas por polímeros tem um grande potencial para enfrentar tais obstáculos complexos na boca sem causar efeitos tóxicos e colaterais ao organismo ou microbiota, como demonstrado em estudos clínicos de terapia anticâncer<sup>2</sup>. Os nanopolímeros são solúveis em soluções aquosas e assim permitem o ajuste preciso de sua estrutura química, tamanho, carga superficial e entre outras propriedades, oferecendo dinâmica para realizar, reter e liberar fármacos no ambiente oral desejado<sup>3,4</sup>. O conhecimento sobre a sequência de construção e formação do biofilme e as mudanças que ocorrem dentro do biofilme (e.g., criação de nichos ácidos) oferecem oportunidades onde é possível utilizar intervenção terapêutica baseado em nanomedicina.

A construção de biofilme patogênico (e.g., cariogênico) é um processo dinâmico que depende do desenvolvimento de uma matriz extracelular rica

em exopolissacarídeos de origem bacteriana<sup>5,6</sup>. Na comunidade microbiana oral, *Streptococcus mutans* não é sempre a espécie predominante<sup>7,8</sup>. Porém, *S. mutans* coordena a construção de biofilme quando sacarose e amido da dieta estão disponíveis. As exoenzimas produzidas por *S. mutans* chamadas glicosiltransferases (Gtfs) estão presentes na película salivar (i.e., película adquirida) e nas superfícies microbianas e produzem os exopolissacarídeos in situ. Os exopolissacarídeos sintetizados in situ favorecem a adesão e acúmulo dos microrganismos nas superfícies. Com o passar do tempo, esses polissacarídeos ajudam a construir e fazem parte do constituinte da matriz tridimensional que envolve e protege as células, formando um ambiente altamente coesivo com baixa difusão.

Em paralelo, sacarose e outros açúcares da dieta são fermentados, como resultado microambientes (nichos) ácidos são criados dentro do biofilme e na interface entre biofilme e superfície<sup>9</sup>. Esses nichos com pH baixo facilitam a produção de exopolissacarídeos enquanto os microrganismos cariogênicos prosperam dentro do biofilme, assegurando o desenvolvimento do biofilme e a dissolução ácida localizada do esmalte dentário. Portanto, nanopartículas podem ser manipuladas para carrear agentes existentes e novos para o local onde ocorre a formação de biofilme.

As modalidades terapêuticas contemporâneas para o controle / modulação da formação do biofilme são limitadas. A clorexidina é um agente bactericida de amplo espectro que suprime os níveis de estreptococos do grupo mutans na saliva, mas não é muito efetivo contra biofilmes e não é adequado para uso preventivo e/ou terapêutico diário<sup>10</sup>. Exopolissacarídeos da matriz com carga negativa (possivelmente devido à presença de ácidos nucleicos — eDNA - e ácidos lipoteicóico - LTA) parecem afetar a penetração (e atividade antimicrobiana) de clorexidina que tem carga positiva em biofilmes<sup>11,9</sup>.

O uso de flúor é o padrão ouro para prevenção da cárie, oferece proteção incompleta contra cárie e não trata adequadamente o aspecto infeccioso dessa doença<sup>12</sup>. Pesquisas intensivas têm sido realizadas para encontrar novos agentes anti-biofilmes<sup>13-15</sup>.

Dentre os novos agentes, *tt*-farnesol e miricetina interrompem

efetivamente o desenvolvimento de biofilme cariogênico. A miricetina inibe a síntese de exopolissacarídeos *in situ* e o *tt*-farnesol é um agente que tem como alvo a membrana e desse modo consegue afetar a tolerância de *S. mutans* ao ácido (i.e., afeta a aciduricidade do patógeno), e ambos agentes não tem efeito biocida<sup>13,14</sup>. Entretanto, esses agentes possuem solubilidade em água pobre e não são otimamente retidos na boca para exercerem seu potencial terapêutico total *in vivo*<sup>13,14</sup>.

O composto 1771 é um composto pouco encontrado na literatura, mas apresentou ação sobre microrganismos Gram positivos e tem um possível efeito sobre *S. mutans*. Pesquisas anteriores revelam o composto 1771 como inibidor da produção de ácidos lipoteicóicos em *Staphylococcus aureus*<sup>16</sup> e *Enterococcus faecium*<sup>17</sup>. O alvo do composto 1771 é a proteína LtaS (do inglês lipoteichoic acid synthase) que é a enzima sintetase de ácido lipoteicóico em *S. aureus*<sup>18</sup>. Assim, como *S. mutans* as espécies *S. aureus* e *faecium* são Gram positivas e análise anterior com BLAST (do inglês Basic Local Alignment Search Tool) mostrou que o gene SMU.775 (uma proteína hipotética) de *S. mutans* é homólogo ao gene *ltaS* de *S. aureus*<sup>19</sup>.

Dados preliminares de projetos em progresso à época da execução da presente iniciação científica indicavam que o princípio ativo composto 1771 era promissor, conforme publicações posteriores<sup>20,21</sup>. Por exemplo, o composto 1771 e a miricetina isoladamente conseguiram inibir o crescimento da população viável de *S. mutans* e a biomassa total, além de que, quando associados com Flúor apresentou um maior valor de pH do meio de cultura, após os tratamentos, essa mesma associação de miricetina+1771+Flúor também se mostrou eficaz em reduzir o acúmulo de EPS insolúvel e EPS solúvel em água da matriz extracelular, e o composto 1771 também apresentou potencial em reduzir a quantidade de ácidos lipoteicóicos do mesmo ambiente<sup>21</sup>.

Ainda, em estudos posteriores ao presente projeto, foi evidenciado também que o *tt*-farnesol, apresenta atividade antimicrobiana e antibiofilme e demonstrou potencial de eliminação do crescimento bacteriano, além de apresentar efeito dose- dependente na inibição do crescimento fúngico viável (*Candida albicans*), o composto apresentou potencial de redução do

crescimento de biofilme de especie única de *C. albicans*, eliminando o fungo, a uma concentração de 31,25 µg/mL de *tt*- farnesol. A miricetina ainda apresentou efeito antibiofilme, contudo menor que *tt*- farnesol, o mesmo também está presente nas associações testadas que inibiram completamente o crescimento bacteriano no biofilme de dupla espécie, e na inibição total do crescimento fúngico no biofilme de dupla espécie, além de também fazer parte da associação de fármacos que reduziu pelo menos em 50% os valores de UFC/mL (vs. Veículo) de *S.mutans* ou *C. albicans*<sup>20</sup>.

## 2 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo são:

Avaliar a capacidade carreamento e de liberação de diferentes fármacos pelas NPCs;

Avaliar a atividade anti-biofilme dos fármacos liberados por NPCs contra biofilmes formados por *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*.

O projeto testou uma abordagem inovadora para liberação de substâncias in situ via nanopartículas carreadoras (NPC) ativadas por fator ambiental (i.e., pH)<sup>22</sup>, visando destacar o potencial de aumentar a eficácia dos fármacos através de mecanismos de retenção e liberação destes, diminuir quantidade de biomassa, UFC e controle do pH do microambiente do biofilme dental.

As NPC se aderem de forma notável à película e à matriz do biofilme, e são projetadas para liberação de fármacos no local em que o pH se torna ácido, no caso os biofilmes. Tal abordagem terapêutica mostrou efeito de diminuição da biomassa de um biofilme de *S. mutans* formado in vitro e diminuiu substancialmente o número e a severidade de lesões de cárie após aplicação tópica da NPC associada ao farnesol (NP-Far) em modelo animal<sup>22</sup>.

O *tt*-farnesol, miricetina, composto 1771 foram utilizados para tentar demonstrar a eficácia desse sistema de liberação de fármacos (comparado como os mesmos agentes livres — não ligados à NPC). Essa tecnologia tem potencial para aumentar a eficácia dos fármacos através da retenção e liberação dos agentes onde e quando eles são mais necessários. Se bem-sucedida, essa tecnologia poderá ser empregada para a liberação localizada de flúor/fluoretos (onde o processo de desmineralização está ocorrendo ativamente) e digluconato de clorexidina (evitando a exposição desnecessária da microbiota oral comensal ao fármaco).

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

A presente revisão de literatura foi realizada de forma a obedecer três subdivisões sequenciadas, sendo elas Película adquirida, Biofilmes e cárie dentária e Nanopartículas.

#### 3.1 Película adquirida

Com relação a formação de placa bacteriana, a evidencia mais antiga que temos é a construção de uma película na superfície do dente<sup>23</sup>. Os constituintes derivados da saliva são adsorvidos seletivamente à superfície do esmalte por exemplo, e se incluem, não sendo limitados a, proteínas ricas em prolina, amilase, lisozima, histatinas, peroxidase, estaterina e mucina<sup>23</sup>.

#### 3.2 Biofilmes e cárie dentária

Biofilmes são comunidades de microrganismos que estão aderidos a uma superfície e tem um papel significativo na prevalência de infecções bacterianas. As bactérias dentro de um biofilme são mais resistentes aos antibióticos, quando comparadas as bactérias planctônicas. Até agora, nenhuma droga está em uso clínico que visa especificamente os biofilmes bacterianos. Isso provavelmente ocorre porque até recentemente os detalhes moleculares da formação do biofilme eram pouco compreendidos. As bactérias integram informações do ambiente, como autoindutores e nutrientes de detecção de quórum e na expressão gênica apropriada relacionada ao biofilme<sup>24</sup>.

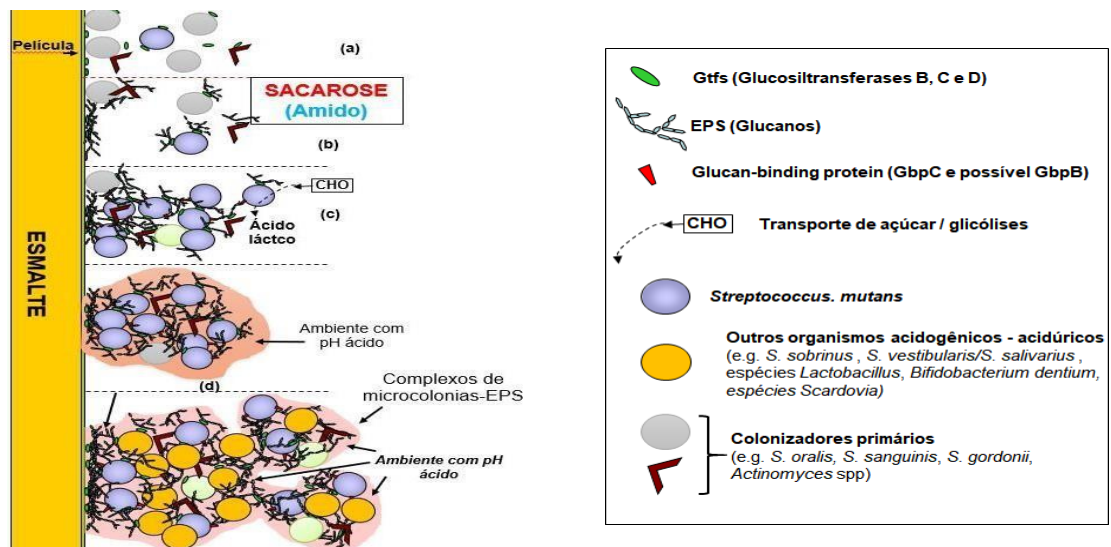
Biofilmes virulentos estão associados a muitas doenças e infecções humanas, incluindo as bucais e a placa dental em humanos é um dos sistemas mais complexos de organização de um biofilme<sup>25</sup>. A cárie é uma doença infecciosa da cavidade bucal que é dependente da formação de biofilme, assim, essa doença é resultado das interações que ocorrem nas superfícies dentárias, entre as bactérias da cavidade bucal, os produtos produzidos por esses microrganismo, a saliva e os carboidratos vindos da dieta. A partir disso, um biofilme cariogênico é formado na superfície dental e, eventualmente, pode levar a cavitações por meio da dissolução do esmalte<sup>5</sup>.

O *S. mutans* é reconhecido por muitos como o fator etiológico da cárie, sendo essa, uma espécie acidogênica e acidúrica ou seja, produz ácido

e sobrevive no mesmo meio, além disso, o *S. mutans* codifica enzimas que produzem os exopolissacarídeos (EPS) da matriz extracelular dos biofilmes por meio de enzimas que os sintetizam quando em presença de sacarose<sup>5</sup>.

Além disso, o *S. Mutans* pode coordenar o desenvolvimento dos biofilmes cariogênicos, por meio da produção das exoenzimas (Gtfs). Essas por sua vez, também são constituintes da película salivar e se ligam aos microrganismos, favorecendo a produção de glucanos *in situ* em presença de sacarose. Os EPS tem abundância em sítios de ligação primária, favorecendo assim união de mais microrganismos<sup>5</sup>, como mostra a figura 1) abaixo

**Figura 1 - Esquema de formação de um biofilme**



Legenda: Esquema ilustrativo do processo de formação de um biofilme virulento em superfície dentária, demonstrando a colonização primária do esmalte por meio da película adquirida, a produção das Gtfs e EPS e união de mais microrganismos acidogênicos e acidúricos e o estabelecimento da estrutura complexa de matriz extracelular.

Fonte: Koo et al.<sup>6</sup>.

A presença de quantidades de material celular bacteriano na película adquirida já foi relatada<sup>26</sup>, em estudos posteriores foram identificados frutossiltransferase, Gtf e ácido lipoteicoico em película adquirida formada *in vitro* e *in vivo*<sup>27,28</sup>. Os Gtfs presentes na película, favorecem a síntese de glucano *in situ*, em presença de sacarose<sup>29</sup>. Dessa forma, a presença de Gtfs ativos na película, facilita a formação de glucano *in situ*, o que favorece surgimento de locais de ligação diferentes para os microrganismos orais<sup>5</sup>.

A *C. albicans* é o microrganismo fúngico mais encontrado na superfície da mucosa humana, se co-aderindo a outras espécies, dessa forma auxiliando na formação do biofilme dental<sup>30</sup> quando há açúcar na dieta em quantidade adequada a essa condição. *C. albicans* apresenta grande capacidade de produção e de tolerância acida além da secreção das exoenzimas aspartil proteases, que degradam o colágeno da dentina em meio ácido, o que aumenta o potencial cariogênico dos biofilmes<sup>31, 32</sup>

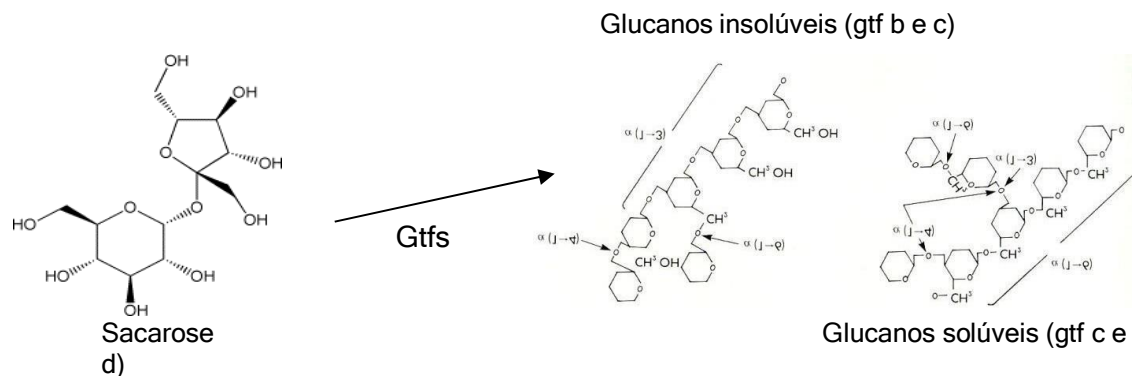
Similar ao descrito anteriormente *C.albicans*, também se adere as superfícies dentais, produz EPS e forma biofilmes, além de ser acidogênica e tolerante ao ambiente ácido. Também se associa a uma variedade de espécies bacterianas, patogênicas ou não, o que pode acarretar na construção de comunidades microbianas complexas<sup>33,34</sup>. Quando presente no biofilme misto, *C. albicans* modifica o microambiente físico, causa um aumento na produção de EPS induzindo a ativação de genes gtf's de *S. mutans*. Essa interação aumenta a capacidade de colonização das superfícies dentárias e aumenta a virulência do biofilme, o que torna esse biofilme multi-espécie complexo e de difícil controle<sup>35</sup>.

Paralelamente *S. mutans* é capaz de se manter e competir no microambiente dos biofilmes orais e contribui para a virulência dos mesmos. *S. mutans* utiliza sacarose para sintetizar EPS rapidamente por meio das exoenzimas e se adere fortemente às superfícies com glucanos, além de ser acidogênicos e acidúrico<sup>36</sup>.

O *S. mutans* tem pelo menos três Gtfs, B, C e D, essas utilizam sacarose para produzir glucanos solúveis, mais sintetizados pelas Gtfs D e C, e os glucanos insolúveis pelas Gtfs B e C, como exemplificado na figura 2) abaixo:



**Figura 2 - Esquema de formação dos glucanos**



Legenda: Figura demonstrativa da formação da estrutura química dos glucanos solúveis e não solúveis em água, via Glicosiltransferases, de forma que, a produção da matriz do biofilme com características mais insolúveis se deve as ligações  $\alpha$ -1,3- glucano, em paralelo, a produção de uma matriz com características mais solúveis se deve as ligações  $\alpha$ -1,6- glucano.  
 Fonte: Adaptado de van Hijum et al.<sup>37</sup>.

Todas as glicosiltransferases contribuem para a construção de um biofilme virulento pois além da produção dos glucanos, as Gtfs proporcionam a ligação dos microrganismos as superfícies. Além disso, as Gtfs adsorvem às células da *C. albicans*, transformando-a em produtor de glucanos<sup>5,38</sup>.

### 3.3 Nanopartículas

Sabe-se hoje que tratar biofilmes orais patogênicos é um grande desafio, pois drogas que são aplicadas de forma tópica, sofrem rápida depuração salivar, mal penetram na matriz extracelular composta por EPS dos biofilmes. Além disso, a falta de substantividade ou seja, a falta de retenção do fármaco nas superfícies dentárias também é um obstáculo. Dessa forma, é importante ressaltar que, a natureza onipresente e crônica dos biofilmes orais, faz com que qualquer terapêutica deva ser tolerada para uso contínuo e por um período maior, tendo baixa toxicidade e minimizando efeito de amplo espectro biocida<sup>39</sup>.

As nanopartículas são uma modalidade de tratamento altamente promissora para biofilmes. Muitas estratégias de nanopartículas têm como objetivo inibir biofilmes dentro da cavidade oral. Os biofilmes orais também servem como ótimos modelos para outros biofilmes associados à saúde, que

pode se beneficiar das abordagens de nanopartículas. As nanopartículas podem ser diretamente bactericidas ou projetadas para aumentar a solubilidade aquosa da droga e, por meio de ajustes precisos de composições químicas, tamanho, carga superficial e outras propriedades, podem fornecer flexibilidade incomparável para transportar, reter e liberar drogas exatamente quando e onde for mais necessário<sup>39</sup>.

Além disso os dados sugerem que as nanopartículas também podem diminuir o potencial de resistência bacteriana e proteger as drogas convencionais do pH e/ou degradação enzimática nos microambientes agressivos do biofilme<sup>40,41</sup>, dessa forma o design de nanopartículas pode ser ajustado para ser ativado em resposta a gatilhos microambientais patológicos exclusivos do biofilme, como pH ou hipóxia.

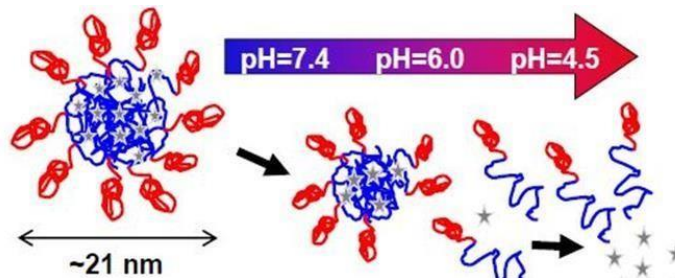
## 4 MATERIAL E MÉTODO

Os materiais e métodos do trabalho, obedeceram uma ordem sequenciada de escrita, partindo do teste de compatibilidade das nanopartículas, e terminando na realização dos tratamentos e análise dos dados obtidos

### 4.1 Teste de compatibilidade das nanopartículas com fármacos

As nanopartículas carreadoras de fármacos (NPC) foram confeccionadas pelo grupo de pesquisa da Dra. Danielle Benoit (*University of Rochester*) seguindo a metodologia já descrita por Horev et al. (2015), e seu potencial de carga foi alterado com intuito de melhorar a adesão em superfícies de *C. albicans*, pois os estudos anteriores utilizaram biofilmes apenas de *S. mutans*, como mostra a figura 3. abaixo.

**Figura 3** - Esquema de liberação programada de fármacos



Nanopartícula carreadora. Porção em vermelho sendo a superfície com cargas positivas e porção em azul sendo pH sensível e carregando o fármaco representado pelas estrelas em cinza.

Fonte: Adaptado de Horev et al.<sup>22</sup>.

Foi pesado um frasco de vidro limpo e esterilizado previamente a passagem da nanopartícula (NP) em forma de pó enviada pela Dra. Benoit. Manteve-se a proporção de 1,9 mg de NP em 1 mL de PBS como recomendado<sup>22</sup>. Após a adição de PBS o frasco foi vedado, protegido da luz e armazenado em 4°C por um dia para hidratação. Outro frasco foi preparado com NP livre e NP associado ao *tt*-farnesol (NP-Far, sendo 0,5 mg de *tt*-

farnesol em 1 mL; Sigma Aldrich- catálogo 277541).

Separadamente, Miricetina (Sigma Aldrich- catálogo M6760-25MG) foi preparada de duas maneiras: primeiro a sua utilização de forma direta (pó) adicionada sobre a NP e NP-Far; e utilizada solubilizada em 99% etanol sendo 0,0636g do composto para 4 mL de etanol molecular (50 mM), o composto 1771 foi solubilizado na concentração de 4,68 mM e ao final do preparo do tratamento apresentou a concentração de 10 µg / mL para serem aplicados sobre a superfície e de hidroxiapatita. e a quercetina para o teste de associação com NP-Far em forma de solução diluída de 10 µL de DMSO em 200 µL da quercetina e 25 µL de ETOH 99%. Todos estes compostos apresentavam potencial para fazer parte da solução final para tratamento, afinal, a associação dos princípios ativos associados à nanotecnologia é a principal ideia de dificultar a formação e desenvolvimento dos biofilmes multi-espécies.

A miricetina associada ao *tt*-farnesol e flúor já foi pesquisado e mostrou-se uma alternativa para serem os tratamentos tópicos escolhidos para o desenvolvimento do tratamento final com a nanopartícula<sup>42</sup>. A miricetina é um composto da classe dos flavonoides e responsável por reduzir a expressão dos genes *gtfBC*, principais genes na construção da matriz de exopolissacarídeos<sup>13,14</sup>. Sendo uma ferramenta importante na criação de uma terapia anti-biofilme.

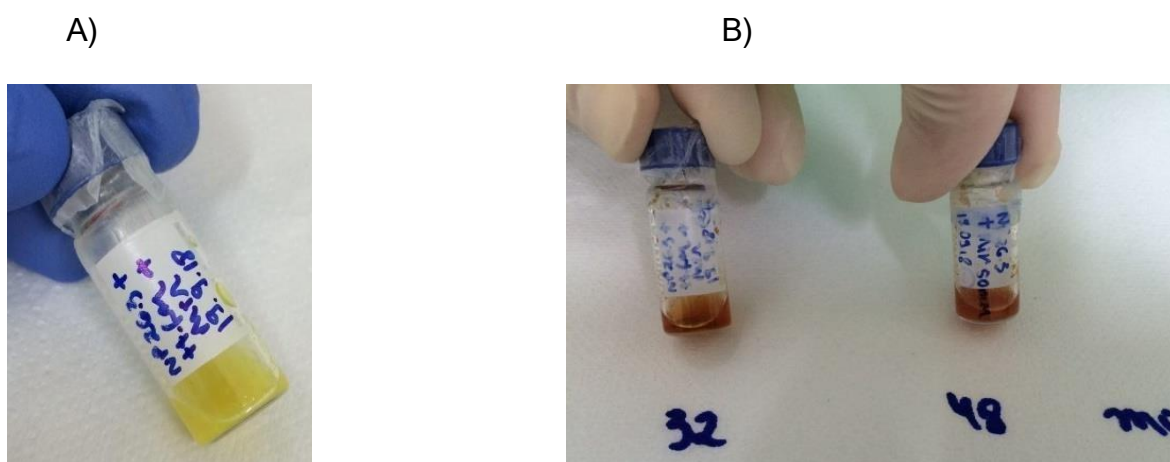
Outra substância testada foi a quercetina é um composto proveniente do extrato de própolis e de plantas. Essa substância isoladamente mostrou bons resultados como terapia contra *S. mutans*, mas quando aplicada com outros princípios ativos aumenta exponencialmente a ação de todos combatendo o crescimento do microrganismo, podendo afetar a expressão de genes importantes e até a parede celular do mesmo<sup>43</sup>.

O composto 1771 é um composto pouco encontrado na literatura, mas apresentou ação sobre microrganismos Gram positivos e tem um possível efeito sobre *S. mutans*. Pesquisas anteriores revelam o composto 1771 como inibidor da produção de ácidos lipoteicóicos em *Staphylococcus aureus*<sup>16</sup> e *Enterococcus faecium*<sup>17</sup>. O alvo do composto 1771 é a proteína LtaS (do

inglês *lipoteichoic acid synthase*), a enzima que sintetiza ácido lipoteicoico em *S. aureus*<sup>18</sup>. Assim, como *S. mutans*, as espécies *S. aureus* e *E. faecium* são Gram positivas e análise anterior com BLAST (do inglês Basic Local Alignment Search Tool) mostrou que o gene SMU.775 (uma proteína hipotética) de *S. mutans* é homólogo ao gene *ItaS* de *S. aureus*<sup>44</sup>.

A miricetina não mostrou ter uma boa diluição sendo inserida tanto na forma de pó dentro de uma solução de nanopartícula ou nanopartícula já associada ao farnesol. Foi observada a formação de um precipitado em ambos os testes. Foi inserido também a miricetina já dissolvida em 99% etanol como citado anteriormente (50 mM) não havendo precipitação do princípio ativo. Mas o ocorrido em ambos os testes foi a mudança de um tom amarelado (dado pela própria miricetina para tons roxos e marrons após alguns minutos em contato com a solução contendo NP ou NP-Far. Provavelmente uma reação de óxido-redução, podendo alterar atividade do fármaco e estrutura química havendo produtos indesejáveis dentro da solução (Figura 4).

**Figura 4** - Imagens testes de compatibilidade da miricetina



Legenda: Na figura A), o frasco contém a miricetina dissolvida em 99% etanol (50Mm) em associada a solução de NP-Far, a figura B) mostra 2 frascos, o primeiro, contendo a solução de miricetina em etanol + NP-Far, e o segundo a solução de miricetina + NP, ambos os frascos representam a reação ocorrida após alguns minutos de contato entre as soluções mencionadas.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Ao entrar em contato com a solução aumentou a opacidade da mesma. Após 32 minutos e 48 minutos foi observado pontos não dissolvidos da

miricetina no topo do frasco após banho ultrassônico e a formação de produtos da reação química tornando a solução roxo-amarronzada.

A quercetina passou pelos mesmos processos sendo inserida dentro da solução com NP isolada e NP associada ao farnesol em forma de pó e em forma de solução diluída em 10  $\mu\text{L}$  de DMSO em 200  $\mu\text{L}$  da quercetina e 25  $\mu\text{L}$  de ETOH 99%. A forma de pó apresentou um resultado amarelo leitoso e opaco com uma pequena parte precipitada, provavelmente sendo excesso de pó inserido para a reação e sem alteração de cor, diferente do que foi visto com a miricetina. Quando a quercetina já estava dissolvida a solução não ficou opaca e com o amarelo intenso, e houve uma pequena precipitação do sal (Figura 5)

**Figura 5** - Imagens testes de compatibilidade da quercetina

A)



B)



Legenda: A imagem A) representa a associação da quercetina em forma de pó a solução de NP-Far, a imagem B) representa a associação da quercetina já dissolvida em solução de DMSO e ETOH.

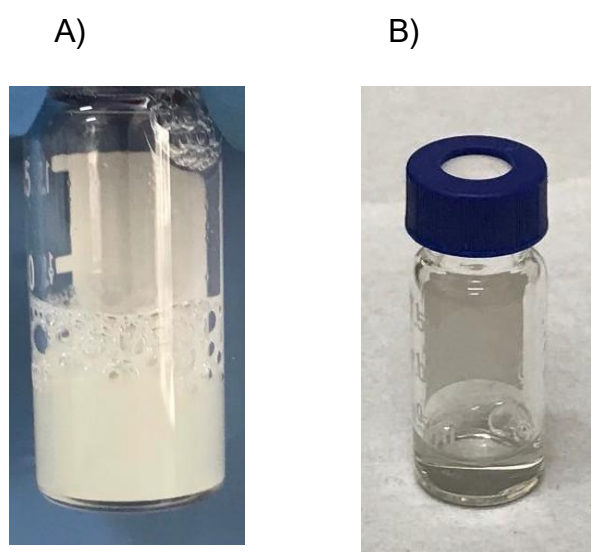
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

A quercetina ao entrar em contato com a solução aumentou a opacidade da mesma adicionada na forma de pó ou já dissolvida. Após 48 minutos foi observado em ambas um pequeno precipitado sendo a da esquerda extremamente opaca (teste com o pó inserido diretamente sobre

a solução contendo a NP-Far) e da direita translúcida com pequena coloração amarela dentro da mesma solução (similar a um precipitado). Nenhum dos testes realizados apresentou produtos de reação química que pudesse alterar a coloração da solução final. Não apresentando um bom resultado de compatibilidade.

O composto 1771 teve resultados extremamente semelhantes ao da quercetina quando sendo em pó, tornou a solução opaca e quando já dissolvido apresentou uma solução límpida e translúcida, mas agora sem nenhum precipitado aparente. Não houve mudança de cor a partir de produtos da reação. Até então a que apresentou o melhor resultado de compatibilidade com restante das substâncias químicas até o momento (Figura 6).

**Figura 6** - Imagens testes de compatibilidade do composto 1771



Legenda: O composto 1771 passou pelos mesmos testes anteriores, sendo a imagem A) o composto 1771 associado a solução NP-Far com esse aspecto opaco, da mesma forma que a quercetina reagiu, e na imagem B) o composto 1771 já dissolvido associado a mesma solução, apresentando um aspecto homogêneo e límpido.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Da mesma forma que a quercetina, ambos os testes do composto 1771, adicionado na forma de pó ou já dissolvido, aumentaram a opacidade da solução após o contato. Após 48 minutos não observou precipitado em ambos os testes sendo a da esquerda extremamente opaca (sendo o pó

inserido direto sobre a solução contendo a nanopartícula associada ao farnesol) e da direita translúcida. Ambas não apresentaram produtos da reação química que alterassem a cor do material.

Primeiramente buscamos entender os produtos formados da reação e para isso contamos com o auxílio de um especialista em química orgânica. A seguir, foram realizados testes de compatibilidade para termos certeza que esta alteração de cor ou os produtos formados não seriam agressivos ao hospedeiro e com ação apenas nos microrganismos. Ao final foi decidido que necessitávamos de uma nova formulação das nanopartículas com o objetivo de encapsular todos os fármacos de uma só vez para evitar reações indesejadas como a de oxido-redução e ter um veículo concentrado isento de álcool na composição química bem como o flúor para influenciar no processo de remineralização.

#### **4.2 Teste dos agentes em biofilme simples de *S. mutans***

**Substrato:** Os microrganismos cresceram sobre a superfície 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 - Figura 7 - todos os demais experimentos que utilizam hidroxiapatita vem do mesmo fabricante e com as mesmas características).

**Película Adquirida:** Inicialmente foi coletada saliva. A produção de 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). Os doadores foram selecionados de acordo com os seguintes pré-requisitos: o doador saudável, deve fazer uso de dentifrícios que tenham como princípio ativo apenas o flúor na noite anterior e na manhã da coleta, não poderia ter se alimentado no dia da doação, não poderia ter ingerido antibióticos nos últimos 3 meses e não poderia ocorrer sangramento durante a mastigação do parafilme o que alteraria o conteúdo salivar.

Após término da coleta, a saliva humana foi misturada com tampão de adsorção - saliva artificial - (Tampão AB - 0,05M KCl; 0,02M KPO<sub>4</sub>; 0,02M CaCl<sub>2</sub>; 0,02M MgCl<sub>2</sub>) numa proporção de 1:1 (v/v) e adicionou-se



0,1 M PMSF ( *fenilmetilsulfonilflúor*, Sigma) à uma relação de 1:1000 (0,1 mM PMSF concentração final). Após isso, esse 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 reservada no gelo até a o momento de sua utilização.

A quantidade de 2,8 ml de saliva esterilizada foi depositada em cada poço da placa de 24 poços. Em seguida, cada aparato (Figura 7) com os discos previamente hidratados em água MiliQ 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 (75 rpm) durante 1 hora (h) para formação da película (SHA).

**Figura 7** - Aparato metálico que mantém os discos na posição vertical



Legenda: Aparato foi confeccionado com fio de CrNi (cromo-níquel). utilizado para confecção de aparelhos ortodônticos.

Fonte: Arquivo pessoal de Guilherme Roncari Rocha.

Os discos pré-fabricados de hidroxiapatita foram posicionados verticalmente no aparato confeccionado com fio ortodôntico dentro da placa de 24 poços.

**Preparo dos biofilmes:** O modelo utilizado foi o de biofilme simples de *S. mutans* UA159 ( $10^6$  UFC/mL). A alíquota da cepa, a qual estava armazenada em freezer -80°C, foi descongelada. e reativada em placa de ágar sangue. Após 48 horas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, foram colhidas de 5 a 10 colônias e inseridas dentro de meio líquido composto por triptona e extrato de levedura com 1% de glicose (TYE + 1% glicose) em tubo falcon de

15mL e armazenado na mesma estufa. Após 16-18 horas de crescimento, 500 µL deste tubo foi transferido para dois novos tubos falcon contendo 9,5 mL de TYE + 1% glicose (diluição 1:20). Ao inocular foi conferido a densidade ótica (DO) dos dois tubos (*S. mutans* 1; *S. mutans* 2). As DOs foram conferidas durante o experimento tendo a previsibilidade da curva de crescimento.

Após o período de formação da película salivar e concomitantemente o microrganismo chegar na DO desejada de  $0,728 \pm 0,247$  (correspondente à fase mid- log), foi pipetado 43,8µL de *S. mutans* para um volume final de 60mL de triptona e extrato de levedura + 1% sacarose. Uma alíquota 100 uL do mesmo foi coletado para plaqueamento, para controlar, padronizar e quantificar a quantidade de UFC inseridas para início do experimento. O meio de cultura com o microrganismo foi distribuído em placa de 24 poços sendo 2,8 mL em cada poço para na sequência realizados os tratamentos e posteriormente a imersão dos discos com a película adquirida tratada no meio. As placas foram incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

**Preparo dos tratamentos:** Devido aos resultados dos testes de compatibilidade dos fármacos de interesse com a nanopartícula os tratamentos foram realizados de forma livre ou seja, sem associação das nanopartículas aos fármacos, e os biofilmes foram submetidos a avaliação da biomassa e contagem de unidades formadoras de colônia. Além disso, foi avaliado o pH do meio de cultura.

O *tt*-farnesol isolado foi preparado na concentração de 200 mM e ao final do preparo deverá ter 4 mM para serem aplicados sobre a superfície. O composto 1771 foi solubilizado na concentração de 4,68 mM e ao final do preparo deverá ter 10 µg / mL para serem aplicados sobre a superfície. E o flúor foi preparado a 5000 ppm e que no final do preparo deverá ficar com 250 ppm de flúor. Sendo os veículos totalizando 5% de etanol e 0,0783% de DMSO.

Todos os tratamentos foram preparados minutos antes do horário de tratamento da película ou biofilme. Os tratamentos propostos foram: 1) *tt*-farnesol (Far); 2) composto 1771 (1771); 3) Far + 1771; 4) *tt*-farnesol + flúor

(250); 5) 1771 +

250; 6) Far + 1771 + 250; 7) 250; 8) Veículo (V – 5% etanol e 0,0783% DMSO),

conforme os volumes e concentrações especificados no Quadro 1.

**Quadro 1** - Volumes e concentrações dos reagentes usados para o preparo dos tratamentos

Reagentes (concentração inicial e final)	1	2	3	4	5	6	7	8
	Far (uL)	1771 (uL)	Far+1771 (uL)	Far+F (uL)	1771+F (uL)	Far+1771+ F (uL)	F (uL)	V (uL)
Tampão* (2,5 mM fosfato)	350	350	350	350	350	350	350	350
H <sub>2</sub> O (MilliQ)	121,68	124,36	123,91	96,68	99,36	98,91	97,14	122,14
Fluoreto (5000 ppm F - NaF2) = final 250 ppm	—	—	—	25	25	25	25	—
EtOH 99% (Sigma, molecular...) = final 5%	15,71	23,03	13,48	15,71	23,03	13,48	25,25	25,25
DMSO a 15% em água MilliQ = final 0,0783%	2,61	—	—	2,61	—	—	2,61	2,61
200 mM tt-farnesol (Far) = final 4 mM	10	—	10	10	—	10	—	—
4,68 mM Composto 1771 (2 mg/mL) = final 10 µg/mL	—	2,61	2,61	—	2,61	2,61	—	—
<b>Total volume (uL)</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>

\*DMSO: Dimetilsulfóxido, utilizado como solvente aprótico e polar de diversos produtos químicos, orgânicos e inorgânicos

\*EtOH 99%: Etanol a concentração de 99%

\*H<sub>2</sub>O (MilliQ): Água do tipo 1 obtida por processos de purificação

\*NaF<sub>2</sub>: Sal inorgânico, haleto alcalino, também utilizado fabricação de dentifrícios.

Fonte: Elaboração própria.

**Tratamento:** Os discos esterilizados de hidroxiapatita foram imersos em água MilliQ esterilizada durante 30 minutos para hidratação e, após este período, a saliva e a película adquirida foram colhidas e formadas conforme descrito previamente. Os discos foram colocados em posição vertical em placas de 24 poços com auxílio de um aparato (Figura 7), confeccionado com fio ortodôntico de aço inoxidável, com objetivo de evitar deposição microbiana auxiliada pela gravidade<sup>9,45</sup>.

Os aparatos com os discos foram então enxaguados em tampão AB e seguiram para tratamento da superfície da película adquirida nos discos de hidroxiapatita seguidos de novo enxague no tampão AB e posteriormente transferidos para o meio de cultura que continha os microrganismos (inóculo).

O tratamento foi aplicado na superfície do disco de hidroxiapatita com película salivar durante 1,5 minutos .. Os tratamentos foram realizados utilizando a técnica dogotejamento<sup>42,46</sup> (Figura 8). O aparato foi mergulhado 3

vezes em tampão AB previamente aos tratamentos e posteriormente, para retirar o excesso de meio de cultura e tratamento, respectivamente.

**Figura 8** - Técnica de tratamento por gotejamento



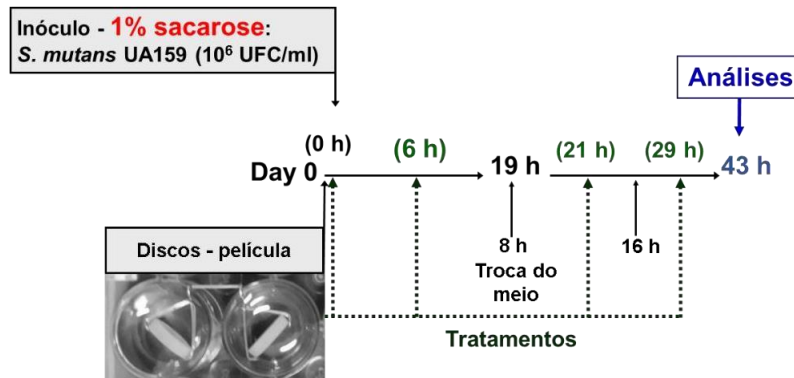
Legenda: Imagem demonstrando a aplicação do tratamento tópico sobre a superfície do disco sem causar atrito sobre a superfície ou acúmulo excessivo de tratamento por gravidade.

Fonte: Arquivo pessoal de Guilherme Roncari Rocha.

### **4.3 Desenho experimental**

Foram realizadas trocas no meio de cultura nos horários: 8 e 16 horas sendo medidos os pHs (pHmetro de mesa) dos poços nas placas já utilizadas. Os tratamentos foram realizados nos horários de 0, 6, 21 e 29 horas. Os biofilmes cresceram por 43 horas antes do processamento, seguindo o desenho experimental (Figura 9).

**Figura 9** - Desenho experimental confocal e regime de tratamentos



Legenda: As setas verdes pontilhadas representam a aplicação dos tratamentos com as soluções, as setas pretas sólidas representam as trocas de meio, ou seja 8h / 16h, respectivamente e a ilustração representa os discos de hidroxiapatita imersos em saliva para formação da película salivar.

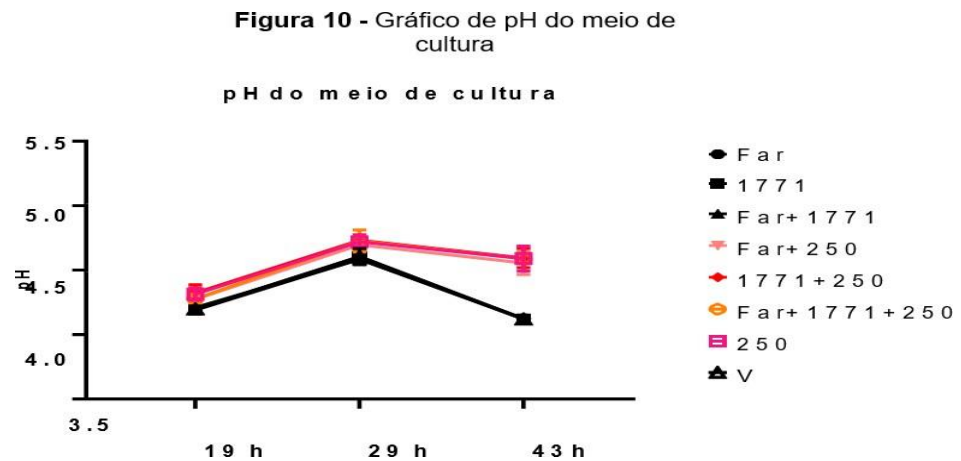
Fonte: Modificado de Horev et al.<sup>22</sup>.

#### 4.4 Análise dos dados

Foram coletados e organizados os resultados de quatro experimentos seguindo o desenho experimental acima descrito. A análise consiste em pH do meio de cultura, biomassa (mg) e unidades formadoras de colônia (UFC / biofilme). Foi utilizado o software Graphpad Prism 8 com nível de confiança de 95%.

## 5 RESULTADOS

Com relação as análises dos resultados de pH do meio de cultura, os dados nos mostraram que, todos os tratamentos que continham flúor em sua composição, obtiveram melhores condições de pH, embora ainda sim, estando abaixo do pH crítico de desmineralização do esmalte dental (Figura 10)

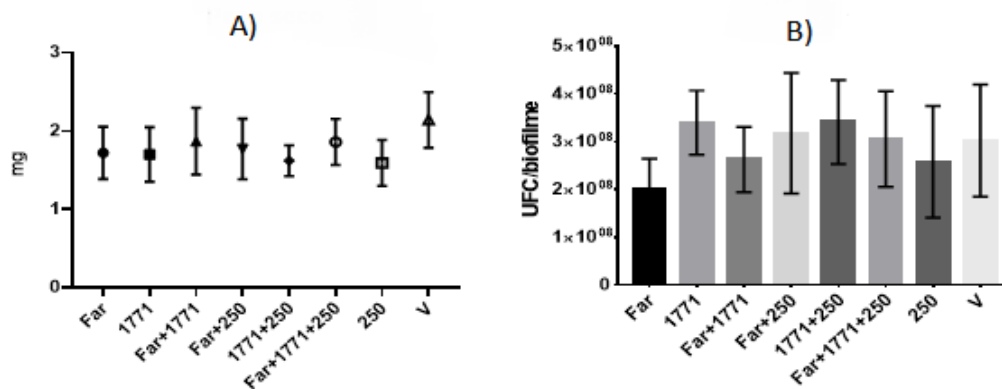


Legenda: Em cores marcantes estão os tratamentos que tinham o flúor na composição química (Far+250, 1771+250, Far+1771+250 e 250) e foram destacados desta maneira para deixar claro como eles melhoraram os valores de pH comparado aos demais tratamentos. O eixo x representando os valores de pH e o eixo y representando os tempos de medição.

Fonte: Elaboração própria

Quanto aos resultados de peso seco, os dados obtidos não mostraram diferenças estatísticas entre os tratamentos testados, quando comparados a solução veículo. Os resultados de UFC de *S. mutans* após 43hr, também não apresentaram diferenças estatísticas comparada ao veículo

**Figura 11** - Gráficos de peso seco e UFC de *S. mutans* após 43 horas



Legenda: Em A) Os valores obtidos de peso seco mostraram que não houve diferença estatística entre os tratamentos testados vs. veículo. B) Dados de UFC de *S. mutans* também mostrando que não houve diferença estatística nos tratamentos avaliados versus veículo. O teste utilizado em ambos os dados foi ANOVA-oneway com pós teste de Tukey, sendo  $\alpha = 0,05$ .

Fonte: Elaboração própria.

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que os tratamentos que continham o flúor na formulação apresentaram valores mais altos de pH comparados aos demais tratamentos (Figura 10). Qualquer formulação utilizada com o flúor alterou, mesmo que minimamente a quebra do açúcar e produção de ácidos pelos microrganismos presentes no biofilme. Mesmo que os valores de pH obtidos tenham sido abaixo do pH crítico para desmineralização de esmalte os resultados obtidos podem ser considerados favoráveis.

Os resultados de contagem de unidades formadoras de colônia e de biomassa do biofilme não mostraram diferença estatística entre os tratamentos propostos (vs. Veículo) (Figura 9). Mesmo com uma ação comprovada do *tt*-farnesol sobre os biofilmes de *S. mutans* a associação destes fármacos neste sistema não mostrou resultados positivos. Esses resultados podem ser atribuídos a concentração escolhida ou ao tempo de exposição dos tratamentos uma vez que foi utilizado um tempo reduzido de exposição equivalente a 1,5 minutos. O regime de dieta dos biofilmes aplicado com 1% de sacarose em todas as trocas de meio de cultura, sem ter momentos de escassez e fartura dificulta o tratamento dos biofilmes devido à grande quantidade de açúcar presente. Dessa forma, podemos sugerir quemomentos de escassez ou fartura de sacarose por exemplo, simula de forma mais próximo a realidade, a dieta do hospedeiro, deixando de certa forma mais propicio, otratamento dos biofilmes.

O desenvolvimento de novas terapias é de grande importância para auxiliar a população no controle de biofilmes. Analisando os resultados de estudos que estavam em andamento durante o desenvolvimento do presente projeto de pesquisa podemos notar que as todas as substancias utilizadas (farnesol, miricetina, composto 1771) tiveram eficácia antibiofilme e promoveram elevação do pH do meio. Além disso, foram obtidos resultados satisfatórios na eficácia do carregamento das nanopartículas com *tt*-farnesol e o composto 1771, causando um impedimento no crescimento da população bacteriana e fúngica<sup>20,21,47</sup>. Ainda, existem resultados que mostram a redução da deposição de matriz composta por polissacarídeos, quando comparados ao controle (NPC sem fármaco) e também foi verificada a redução da produção de ácido e a manutenção do pH do meio acima do limite de desmineralização do esmalte



dentário<sup>47</sup>. Os resultados dessas pesquisas são relevantes à Saúde Pública, pois sistemas de liberação de fármacos baseado em nanopartículas carreadoras (NPC) poderão se mostrar potenciais artefatos para aplicações clínicas e diárias (desde enxaguatórios bucais, cremes dentais e até materiais odontológicos de uso profissional) devido à sua solubilidade em água. Além de que, a flexibilidade química das nanopartículas permite a modificação dos elementos de liberação e inclusão de outras moléculas bioativas e fármacos. Dessa forma, as nanopartículas têm potencial para aplicações além da cavidade oral, pois os biofilmes são associados a muitas doenças infecciosas em vários nichos do corpo humano.

## 7 CONCLUSÃO

Os dados coletados no presente estudo não mostraram resultados satisfatórios no controle do biofilme *in vitro* de *S. mutans* formado sobre a superfície de hidroxiapatita. Contudo, novas abordagens foram testadas posteriormente, revelando potencial eficácia das NPC carreadoras de fármacos em tratamentos complementares antibiofilme, diminuindo a virulência, a acidez do meio e a produção de EPS. Além disso, foi verificada a eficácia antibiofilme das substâncias testadas, ofarnesol, a miricetina e o composto 1771.

## 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. Bourzac K. Nanotechnology: carrying drugs. *Nature*. 2012; 491(7425): S58-60.
3. 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.
4. 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.
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. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*. 2003; 149(Pt 2): 279-94
8. Takahashi N1, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011; 90(3): 294-303.
9. 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.
10. Mattos-Graner RO, Klein MI, Smith DJ. Lessons learned from clinical studies: roles of mutans streptococci in the pathogenesis of dental caries. *Curr Oral Health Rep*. 2014; 1: 70-8.

11. Hope CK, Wilson M. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(5): 1461-8.
12. Ten Cate JM. Novel anticaries and remineralizing agents: prospects for the future. *J Dent Res.* 2012; 91(9) : 813-5.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Richter SG, Elli D, Kim HK, Hendrickx AP, Sorg JA, Schneewind O, Missiakas D. Small molecule inhibitor of lipoteichoic acid synthesis is an antibiotic for Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(9): 3531-6.
17. Paganelli FL, van de Kamer T, Brouwer EC, Leavis HL, Woodford N, BontenMJ, Willems RJ, Hendrickx AP. Lipoteichoic acid synthesis inhibition in combination with antibiotics abrogates growth of multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents.* 2017; 49(3): 355-363.
18. Reichmann NT, Gründling A. Location, synthesis and function of glycolipids and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria of the phylum Firmicutes. *FEMS Microbiol Lett.* 2011; 319(2): 97-105.
19. Klein MI, Hwang G, Santos PHS, Campanella OH, Koo H. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015; 5 :10.
20. Lobo CIV, Lopes ACUA, Klein MI. Compounds with Distinct Targets Present Diverse Antimicrobial and Antibiofilm Efficacy against *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*, and Combinations of Compounds Potentiate Their Effect. *J Fungi (Basel).* 2021; 7(5): 340. Published 2021 Apr28. doi:10.3390/jof7050340.
21. Castillo Pedraza MC, de Oliveira Fratucelli ED, Ribeiro SM, Florez Salamanca EJ, da Silva Colin J, Klein MI. Modulation of Lipoteichoic Acids and Exopolysaccharides Prevents *Streptococcus mutans* Biofilm Accumulation. *Molecules.* 2020; 25(9): 2232. Published 2020 May 9. doi:10.3390/molecules25092232.

22. 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.
23. Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG. Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. *J Proteome Res*. 2007; 6(6): 2152-2160. doi:10.1021/pr060580k.
24. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem*. 2015; 7(4): 493-512. doi: 10.4155/fmc.15.6. Erratum in: *Future Med Chem*. 2015; 7(10): 1362. PMID: 25875875.
25. Stoodley P, Cargo R, Rupp CJ, Wilson S, Klapper I. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2002; 29(6): 361-367. doi:10.1038/sj.jim.7000282.
26. Armstrong WG. The composition of organic films formed on human teeth. *Caries Res*. 1967; 1(2): 89-103. doi:10.1159/000259504.
27. Rölla G, Ciardi JE, Bowen WH. Identification of IgA, IgG, lysozyme, albumin, alpha-amylase and glucosyltransferase in the protein layer adsorbed to hydroxyapatite from whole saliva. *Scand J Dent Res*. 1983; 91(3): 186-190. doi:10.1111/j.1600-0722.1983.tb00800.x.
28. Scheie AA, Kjeilen JC. Effects of chlorhexidine, NaF and SnF<sub>2</sub> on glucan formation by salivary and culture supernatant GTF adsorbed to hydroxyapatite. *Scand J Dent Res*. 1987; 95(6): 532-535. doi:10.1111/j.1600-0722.1987.tb01971.x.
29. Schilling KM, Bowen WH. The activity of glucosyltransferase adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. *J Dent Res*. 1988; 67(1): 2-8. doi:10.1177/00220345880670010201 9.
30. Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 2009; 299(1): 1-8. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01668.x.
31. Klinke T, Kneist S, de Soet JJ, et al. Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *Caries Res*. 2009; 43(2): 83-91. doi:10.1159/000204911.
32. Klinke T, Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T: Dental Caries in Rats Associated with *Candida albicans*. *Caries Res* 2011; 45: 100-106. doi:10.1159/000324809.

33. Peleg, A. Y., Hogan, D. A., & Mylonakis, E. (2010). Medically important bacterial-fungal interactions. *Nature reviews. Microbiology*, 8(5), 340-349. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2313>.
34. Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog*. 2010; 6(4): e1000886. Published 2010 Apr 29. doi:10.1371/journal.ppat.1000886.
35. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun*. 2014; 82(5): 1968-1981. doi:10.1128/IAI.00087-14
36. Quivey RG Jr, Kuhnert WL, Hahn K. Adaptation of oral streptococci to low pH. *Adv Microb Physiol*. 2000; 42: 239-274. doi:10.1016/s0065-2911(00)42004-7.
37. van Hijum SA, Kralj S, Ozimek LK, Dijkhuizen L, van Geel-Schutten IG. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006; 70(1): 157-176. doi:10.1128/MMBR.70.1.157-176.2006.
38. Vacca-Smith AM, Bowen WH. Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. *Arch Oral Biol*. 1998; 43(2): 103-110. doi:10.1016/s0003-9969(97)00111-8.
39. Benoit DSW, Sims KR Jr, Fraser D. Nanoparticles for Oral Biofilm Treatments. *ACS Nano*. 2019; 13(5): 4869-4875. doi:10.1021/acsnano.9b02816.
40. Gupta A, Landis RF, Rotello VM. Nanoparticle-Based Antimicrobials: Surface Functionality is Critical. *F1000Res*. 2016; 5: F1000 Faculty Rev-364. Published 2016 Mar 16. doi:10.12688/f1000research.7595.1.
41. Wang LS, Gupta A, Rotello VM. Nanomaterials for the Treatment of Bacterial Biofilms. *ACS Infect Dis*. 2016; 2(1): 3-4. doi:10.1021/acsinfecdis.5b00116.
42. Rocha GR, Florez Salamanca EJ, de Barros AL, Lobo CIV, Klein MI. Effect of *tt*-farnesol and myricetin on in vitro biofilm formed by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *BMC Complement Altern Med*. 2018; 18(1): 619.
43. Veloz JJ, Alvear M, Salazar LA. Antimicrobial and Antibiofilm Activity against *Streptococcus mutans* of individual and Mixtures of the Main Polyphenolic Compounds Found in Chilean Propolis. *Biomed Res Int*. 2019; 2019: 7602343.

44. Klein MI, Hwang G, Santos PHS, Campanella OH, Koo H. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015; 5: 10.
45. 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.
46. Kim D, Sengupta A, Niepa TH, Lee BH, Weljie A, Freitas-Blanco VS, Murata RM, Stebe KJ, Lee D, Koo H. *Candida albicans* stimulates *Streptococcus mutans* microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites. 2017; 30; 7: 41332.
47. Roncari Rocha G, Sims KR Jr, Xiao B, Klein MI, Benoit DSW. Nanoparticle carrier co-delivery of complementary antibiofilm drugs abrogates dual species cariogenic biofilm formation *in vitro*. *J Oral Microbiol.* 2021; 14(1): 1997230. Published 2021 Nov 25. doi:10.1080/20002297.2021.1997230.

## ANEXO A - COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DE RELATÓRIO FINAL

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
Sistema PIBIC

Início | Acesso Restrito

---

**Iniciação Científica**

**Orientador**  
MARLISE INÉZ KLEIN  
FURLAN

**Início**

**Trocar Senha**

**Editar dados**

**Meus Pedidos**

**Criar Pedido**

**Envio do relatório final**

**Formulário de Avaliação do Relatório Parcial**

**Substituições**

**Cancelamentos**

**Sair**

**Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica**

**Orientador** Envio do relatório final dos projetos

**Lista de pedidos**

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)  
**Status: Aprovado**  
- Análise: Relatório em acordo com as normas e ideais de apresentação. Verificação: Trabalho dentro do proposto e esperado.



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

**Status: Aprovado**

- Análise: Relatório muito bem estruturado em relação ao conteúdo e análise dos resultados. Assim como a discussão levando o aluno ao aprendizado dos passos da pesquisa. Resultados relevantes que permitem a continuação da pesquisa.

Verificação: Foram realizadas de acordo.

**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: Aprovado**

- Análise: A proposta do projeto foi avaliar a capacidade inibição das etapas iniciais na formação de biofilmes cariogênicos pelos extratos e pelas frações de *Casearia sylvestris*. Não pode se observar o parecer do orientador sobre o desenvolvimento do projeto. O projeto foi desenvolvido como proposto. Os resultados apresentados demonstraram as frações testadas se mostram promissoras para atividade antimicrobiana e antibiofilme. Assim, serão obtidas mais frações para estudos futuros para realizar a otimização de uma formulação para prevenir a formação de biofilme que causa cárie dentária. O relatório foi redigido apresentando tabelas dos resultados obtidos. Os pesquisadores não apresentaram discussão dos resultados, possivelmente pelo período curto da bolsa (3 meses).

Verificação: As atividades previstas no sub-projeto proposto foram desenvolvidas satisfatoriamente.

**42411** - Patogenicidade de interação microbiana em biofilme oral (**CHIARA MIKAELLA SOMOGYI CHRISTIANO**) (26/04/2017 - Renovação)

**Status: Aprovado**

- Análise: O relatório está bem descrito com objetivos claros, metodologia pertinente, resultados bem interpretados e discutidos, e conclusão que traz contribuição para a área: "o biofilme misto apresenta maior complexidade comparado a biofilmes simples, o que poderia influenciar a patogenicidade e justificar a ocorrência de cárie mais agressiva em crianças".

Verificação: Sim, com alterações bem justificadas: A alteração do projeto incluindo os testes de tolerância foi realizada para poder explicar melhor os dados bioquímicos, de expressão gênica e estrutura (confocal).

**41910** - Caracterização de biofilme formado por cepas de *Streptococcus mutans* mutantes knockout para os genes associados à presença de DNA extracelular e de ácidos lipoteicóicos na matriz extracelular de biofilmes cariogênicos (**ÉRIK DANTE DE OLIVEIRA FRATUCELLI**) (23/04/2017 - Renovação)

**Status: Aprovado**

- Análise: Apesar de não ter sido concluído, os resultados preliminares estão apresentados em consonância com os objetivos. A metodologia é criteriosa, levando a resultados consistentes. O projeto é de grande qualidade, tendo sido aprovado por pares quando apresentado na reunião anual da SBPqO e no CIC local.

Verificação: Houve a substituição do bolsista, mas as atividades previstas no sub-projeto proposto inicialmente foram mantidas.

**39550** - Caracterização de biofilme formado por cepas de *Streptococcus mutans* mutantes knockout para os genes associados à presença de DNA extracelular e de ácidos lipoteicóicos na matriz extracelular de biofilmes cariogênicos (**TATIANA FERNANDA NOVAIS**) (04/05/2016 - Renovação)

**Status: Aprovado**

- Análise: O relatório está muito bem redigido, com resultados, discussão e conclusões pertinentes. O relatório está bem extenso, até mais do que se espera de iniciação científica.

Verificação: sim

**37362** - Patogenicidade de interação microbiana em biofilme oral (**CHIARA MIKAELLA SOMOGYI CHRISTIANO**) (15/04/2016 - Nova)

**Status: Aprovado**

- Análise: O relatório tem objetivos claros, a metodologia é apresentada de forma detalhada e traz os resultados parciais bem delineados. Os autores relatam problemas no desenvolvimento integral do projeto e apontam a renovação da bolsa como o meio para prorrogar o prazo e concluí-lo.

Verificação: De acordo com o texto do relatório, algumas dificuldades foram encontradas na execução da etapa referente à expressão gênica, bem como alguns artigos foram publicados com dados diferentes dos encontrados. Assim, neste momento, foram apresentados os dados parciais, de forma adequada.

**35803** - Caracterização de biofilme formado por cepas de *Streptococcus mutans* mutantes knockout para os genes associados à presença de DNA extracelular e de ácidos lipoteicóicos na matriz extracelular de biofilmes cariogênicos (**TATIANA FERNANDA NOVAIS**) (17/05/2015 - Renovação)

**Status: Aprovado**

- Análise: O relatório está muito bem redigido e contempla todos os itens, com resultados relevantes

Verificação: sim

**29716** - Caracterização de biofilme formado por cepas de *Streptococcus mutans* mutantes knockout para os genes associados à presença de DNA extracelular e de ácidos lipoteicóicos na matriz extracelular de biofilmes cariogênicos (**TATIANA FERNANDA NOVAIS**) (02/04/2014 - Nova)

**Status: Aprovado**

- Análise: O relatório apresenta resultados interessantes, entretanto conforme descrito pela aluna, ainda serão realizados futuros ensaios para completar a determinação da composição bioquímica da matriz da matriz extracelular para uma melhor caracterização desses biofilmes. Acreditamos que com a finalização desse projeto, os resultados poderão ser publicados em revista científica.

Verificação: Esta de acordo