

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 08/11/2023.



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



Guilherme Roncari Rocha

Estratégia com *tt*-farnesol, miricetina e composto 1771 associados à nanopartícula carreadora é eficaz na prevenção de biofilmes cariogênicos formados por *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* in vitro

Araraquara
2021



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



Guilherme Roncari Rocha

Estratégia com *tt*-farnesol, miricetina e composto 1771 associados à nanopartícula carreadora é eficaz na prevenção de biofilmes cariogênicos formados por *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* in vitro

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral, na Área de Materiais Dentários e Prótese

Orientador: Dra. Marlise Inêz Klein Furlan

Araraquara
2021

R672e

Rocha, Guilherme Roncari

Estratégia com tt-farnesol, miricetina e composto 1771 associados à nanopartícula carreadora é eficaz na prevenção de biofilmes cariogênicos formados por *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* in vitro. / Guilherme Roncari Rocha. -- Araraquara, 2021

78 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Marlise Inêz Klein Furlan

1. Biofilme. 2. Nanopartículas. 3. Microbiologia. 4. *Streptococcus mutans*. 5. *Candida albicans*. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Guilherme Roncari Rocha

Estratégia com *tt*-farnesol, miricetina e composto 1771 associados à nanopartícula carreadora é eficaz na prevenção de biofilmes cariogênicos formados por *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* in vitro

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Reabilitação Oral

Presidente e orientador Dra. MARLISE INÊZ KLEIN FURLAN

2º Examinador Dra. JOSIMERI HEBLING COSTA

3º Examinador Dra. CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA

4º Examinador Dra. CAROLINA PATRÍCIA AIRES

Araraquara, 08 de novembro 2021.

DADOS CURRICULARES

Guilherme Roncari Rocha

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

FILIAÇÃO: Luis Carlos Ferreira da Rocha (pai)
Zuleika Roncari Rocha (mãe)

2017/Atual Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, nível Doutorado
Universidade Estadual Paulista UNESP, Araraquara - Brasil

2015/2017 Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, nível Mestrado
Universidade Estadual Paulista UNESP, Araraquara - Brasil

2010/2014 Curso de Graduação em Odontologia
Universidade Estadual Paulista UNESP, Araraquara - Brasil

AGRADECIMENTOS

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

À

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2018/01429-4) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa. Agradeço também a oportunidade de desenvolver parte deste trabalho na Universidade de Rochester no período de janeiro de 2020 até janeiro de 2021 (BEPE – Processo nº 2019/22316-6) no laboratório da Dra. Danielle S. W. Benoit (*Department of Biomedical Engineering*), referência em desenvolvimento de novas tecnologias e materiais para serem utilizados em medicina.

Rocha GR. Estratégia com *tt*-farnesol, miricetina e composto 1771 associados à nanopartícula carreadora é eficaz na prevenção de biofilmes cariogênicos formados por *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* in vitro. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

O desenvolvimento de terapias eficazes para o controle de biofilme oral é um desafio. Agentes tópicos usados para tratar e/ou prevenir doenças orais causadas por biofilme, geralmente, não são mantidos na boca por um período suficiente para que os mesmos possam exercer seu potencial terapêutico máximo. Assim, foram desenvolvidas nanopartículas carreadoras (NPC) de fármaco que se aderem à hidroxiapatita, à película salivar e aos exopolissacarídeos. As NPC possuem elementos pH sensíveis para a liberação controlada de fármacos em nichos acídicos de biofilmes patogênicos. O *tt*-farnesol e miricetina podem ser carreados e liberados com sucesso pelas NPC, diminuindo a biomassa de biofilme de *Streptococcus mutans*. O composto 1771 é um novo fármaco para o controle da síntese de ácidos lipoteicóicos - estruturas da parede celular de espécies Gram-positivas - responsáveis por co-agregação microbiana. O biofilme de *S. mutans* e *Candida albicans* é extremamente patogênico levando ao desenvolvimento de lesões cáries severas em um curto período in vivo. Portanto, o objetivo foi investigar se o composto 1771 consegue ser carreado pela NPC e também o tratamento contendo a associação dos três fármacos (NPC-farnesol-miricetina-1771) consegue prevenir a formação do biofilme cariogênico mono-espécie formado por *S. mutans* com superfície tratada desde o início da formação (regime de prevenção) e multi-espécie formado por *S. mutans* e *C. albicans* sob o regime de prevenção e o biofilme tratado posteriormente a sua formação sobre a superfície (regime de controle) in vitro. Assim, foi necessário sintetizar uma nanopartícula e conferir sua interação com o composto 1771 e caracterizá-la, testando, posteriormente as soluções contra biofilmes cariogênicos. Os testes de caracterização da nanopartícula e da associação da nanopartícula com 1771 incluíram tamanho, carga (potencial zeta), absorbância, fluorescência, cromatografia de permeação em gel e ressonância magnética nuclear. O polímero criado foi formado por dois blocos sendo o bloco 1 (*corona*) responsável aderir aos exopolissacarídeos e película salivar por ser catiônica e carrear os fármacos: miricetina e composto 1771. O bloco 2 (*core*) é responsável por carrear fármacos insolúveis como o *tt*-farnesol, além de ser sensível ao pH, liberando-os principalmente com a queda do pH. Os testes de absorbância e fluorescência confirmaram a forte interação entre NPC com o composto 1771. Os demais testes caracterizaram a carga de superfície da NPC e tamanho de +23 mV e 48,3 d.nm para +32 mV e 48,3 para 75 d.nm pré/pós adição dos fármacos, respectivamente. Os testes microbiológicos foram: concentração antimicrobiana mínima usando culturas planctônicas e foram preparados dois regimes de tratamentos utilizando biofilmes formados sobre discos de hidroxiapatita com película salivar. Foi acompanhado o pH do meio de cultura, biomassa dos biofilmes e população. Foram realizadas microscopias confocal e eletrônica de varredura para caracterizar a estrutura tridimensional dos biofilmes. Menores concentrações dos fármacos carreados inibiram o crescimento bacteriano planctônico, mas não inibiram o crescimento do fungo e a NPC vazia não afetou ambos os microrganismos. A associação dos fármacos carreados previne a formação de biofilmes ao inibir a

queda do pH, crescimento da população microbiana e a produção de matriz extracelular, conseqüentemente, a biomassa. Ocorreu melhor eficácia nos tratamentos NPC-farnesol-1771 e NPC-farnesol-miricetina-1771 no regime de prevenção, mas não controlou no regime de tratamento. Portanto, a associação dos fármacos, especialmente *tt*-farnesol e composto 1771 associados ao sistema de carreamento preveniu a formação de biofilme multi-espécie sobre a superfície de hidroxiapatita.

Palavras – chave: Biofilme. Nanopartículas. Microbiologia. *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*.

Rocha GR. Strategy with *tt*-farnesol, myricetin and compound 1771 associated with nanoparticle carries is effective to preventing cariogenic biofilms formed by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* *in vitro*. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

ABSTRACT

The development of effective therapies for the control of oral biofilm is a challenge. Topical agents used to treat and/or prevent oral diseases caused by biofilms, generally, are not maintained in the mouth for a sufficient time to they exercise their maximum therapeutic potential. Thus, nanoparticle carries (NPC) have been developed to adhere on hydroxyapatite, pellicle, and exopolysaccharides. NPCs has pH sensitive elements for releasing drugs controlled at acidic niches of pathogenic biofilms. The *tt*-farnesol and myricetin can be successfully carried and released by NPCs, decreasing biomass of *Streptococcus mutans* biofilm. Compound 1771 is a new drug for controlling the synthesis of lipoteichoic acids - cell wall protein from Gram-positive bacteria - responsible for microbial co-aggregation. The biofilm of *S. mutans* and *Candida albicans* is extremely pathogenic, leading to the development of severe carious lesions in a short period *in vivo*. Therefore, the objective were investigate whether the compound 1771 can be carried by NPC and also the treatment containing the association of the three drugs (NPC-farnesol-myricetin-1771) can prevent mono-species biofilm formed by *S. mutans* with surface treated since the beginning of formation (prevention regimen) and multi-species formed by *S. mutans* and *C. albicans* under prevention regimen and control regimen (the biofilm was treated after stablished on the surface) *in vitro*. Thus, it was necessary to synthesize a nanoparticle and check the interaction with compound 1771 and characterize it, later testing the solutions against cariogenic biofilms. The tests for NPC-1771 characterization included size, zeta potential, absorbance, fluorescence, gel permeation chromatography and nuclear magnetic resonance. The polymer created was formed by two blocks, block 1 (corona) being responsible for adhering to exopolysaccharides and pellicle for being cationic nanoparticle and carrying the drugs: myricetin and compound 1771; and block 2 (core) is responsible for carrying insoluble drugs such as *tt*-farnesol, in addition to being pH sensitive, releasing them mainly as the pH drops. Absorbance and fluorescence tests confirmed the strong interaction between NPC and compound 1771. The other tests characterized the NPC's zeta-potential and size from +23 mV to 32 mV and from 48.3 to 75 d.nm pre/post drug association, respectively. The microbiological tests were made using minimum antimicrobial concentration using planktonic cultures. Two treatment regimens were prepared using biofilms formed on hydroxyapatite discs with pellicle. The pH of the culture medium, biomass of biofilms and population was monitored. Confocal and scanning electron microscopes were performed to characterize the three-dimensional structure. Lower concentrations of the drugs carried inhibited the planktonic bacterial growth but did not inhibit the fungus growth and the NPC free did not affect both microorganisms. The association of the drugs carried prevents the formation of biofilms by inhibiting the pH drop, microbial population and the production of extracellular matrix, consequently, biomass. The best efficacy occurred in the treatments NPC-farnesol-1771 and NPC-farnesol-myricetin-1771 in the prevention regimen. No treatments control biofilm formation in the control regimen.

Therefore, the association of drugs, especially *tt*-farnesol and compound 1771 associated to NPC prevented the biofilm formation on hydroxyapatite surface.

Keywords: Biofilm. Nanoparticle. Microbiology. *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 Cárie	18
3.2 Biofilme	18
3.2.1 Microrganismos.....	19
3.3 Tratamentos Tópicos	20
3.4 Sistema de Liberação de Fármacos – NPC	22
4 MATERIAL E MÉTODO	24
4.1 Nanopartícula Carreadora	24
4.1.1 Síntese da nanopartícula carreadora.....	25
4.2 Purificação e Modo de Armazenamento da NPC.....	26
4.3 Caracterização da NPC Livre.....	27
4.4 Preparo dos Fármacos e Armazenamento.....	27
4.5 Caracterização da NPC Associado ao Composto 1771.....	28
4.5.1 Absorbância do composto 1771.....	28
4.5.2 Fluorescência do composto 1771.....	29
4.5.3 Tamanho e potencial-zeta da NPC associada ou não aos fármacos.....	29
4.5.4 Caracterização da liberação do composto 1771.....	29
4.6 Preparo dos Tratamentos Tópicos.....	30
4.7 Concentração Inibitória Mínima.....	31
4.8 Coleta de Saliva e Formação da Película Salivar.....	32
4.9 Desenho Experimental.....	32
4.10 Formação do Inóculo.....	34
4.11 Análise do Biofilme.....	35
4.11.1 Determinação do pH do meio de cultura.....	35
4.11.2 Determinação da biomassa e da população microbiana.....	35
4.11.3 Microscopia confocal.....	36

4.11.4 Microscopia eletrônica de varredura.....	37
4.12 Análise dos Dados.....	37
5 RESULTADOS	38
5.1 Síntese das Nanopartícula Carreadora.....	38
5.2 Absorbância do Composto 1771.....	41
5.3 Fluorescência do Composto 1771	43
5.4 Tamanho e Potencial-Zeta da NCP Associada ou Não aos Fármacos.....	45
5.5 Caracterização da Liberação do Composto 1771.....	47
5.6 Concentração Inibitória Mínima	47
5.7 pH do Meio de Cultura	50
5.8 Biomassa	52
5.9 População Microbiana	53
5.10 Arquitetura Tridimensional dos Biofilmes	55
5.10.1 Microscopia confocal.....	55
5.10.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	57
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXO A.....	76
APÊNDICE A.....	78

1 INTRODUÇÃO

Muitas doenças infecciosas em humanos são causadas por biofilmes virulentos, incluindo aquelas que ocorrem na boca, por exemplo: cárie, doenças periodontais e a candidíase oral^{1,2}. A cárie dental é um problema de saúde pública mundial² e é caracterizada inicialmente pela desmineralização do esmalte por ácidos produzidos por microrganismos em biofilmes. Esta doença em humanos de todas as idades é uma das principais causas de visitas aos centros de emergência, bem como uma das maiores causas para ausência ao trabalho e à escola. O tratamento dessa doença é oneroso. Novas estratégias são necessárias, sendo a prevenção o melhor caminho a se seguir.

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 microbiana³⁻⁵. Na comunidade microbiana oral, *Streptococcus mutans* não é sempre a espécie predominante, mas está associada aos biofilmes cariogênicos⁶⁻⁸. Esta bactéria, além de produzir ácidos e ser tolerante aos mesmos, coordena a construção de biofilme quando sacarose e amido estão disponíveis na dieta, produzindo suas exoenzimas chamadas de glicosiltransferases (Gtfs). Estas enzimas também estão presentes na película salivar (i.e., película adquirida) e nas superfícies microbianas, sendo responsáveis pela produção dos exopolissacarídeos in situ, o mais abundante componente da matriz extracelular^{4,9,10}.

Os exopolissacarídeos sintetizados in situ permitem a adesão e acúmulo dos microrganismos nos dentes. Com o passar do tempo, estes polissacarídeos ajudam a construir a matriz tridimensional que envolve e protege as células, formando um ambiente altamente coesivo com difusão limitada. A GtfB e a GtfC produzem exopolissacarídeos do tipo α -1-3-glucanos, os quais são insolúveis em água e dão uma característica densa e impermeável à matriz extracelular dificultando o tamponamento promovido pela saliva (i.e., neutralização dos ácidos no biofilme) e a ação de antimicrobianos de ação tópica⁵. No entanto, a GtfC também produz exopolissacarídeos (glucano) solúvel em água e a GtfD sintetiza apenas exopolissacarídeos (glucano) solúvel; os glucanos solúveis possuem ligações glicosídicas do tipo α -1,6-^{4,5}. *S. mutans* também produz frutanos (exopolissacarídeos solúveis) via enzima Ftf, mas em menor quantidade. Esses exopolissacarídeos

também são importantes para a coesão do biofilme e servem como reserva de energia extracelular⁵.

Além de *S. mutans*, o fungo *Candida albicans* também tem sido encontrado frequentemente em números elevados em biofilmes, principalmente em lesões de cárie de rápida progressão¹¹⁻¹⁴. Esta espécie de fungo além de produzir ácidos, também sobrevive em ambientes ácidos, o que pode contribuir 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 hifas¹⁵. Este biofilme multi-espécie patogênico é associado ao desenvolvimento de lesões cariosas severas¹⁶ e também mimetiza biofilmes encontrados em próteses acrílicas^{17,18}. Ainda, *C. albicans* produz β -glucanos via várias glucosiltransferases (esses β -glucanos são polissacarídeos na parede celular e exopolissacarídeos na matriz), principalmente com ligações β -1,3 e β -1,6^{19,20}. Os β -glucanos podem ligar com fluconazol e anfotericina B, prevenindo a penetração desses fármacos antifúngicos para o interior dos biofilmes²⁰⁻²⁴.

As modalidades terapêuticas contemporâneas para o controle/modulação da formação do biofilme são limitadas. Digluconato de clorexidina 0,12% é um agente catiônico e antimicrobiano de amplo espectro que suprime os níveis de estreptococos do grupo mutans na saliva, mas não é adequado para uso preventivo e/ou terapêutico diário²⁵. Exopolissacarídeos da matriz extracelular do biofilme com carga negativa (devido à presença de ácidos nucleicos e ácidos lipoteicóico) afetam a penetração e a atividade antimicrobiana de clorexidina no interior dos biofilmes^{26,27}. Sobretudo, outra substância padrão ouro para prevenção da cárie é o flúor, entretanto oferece proteção incompleta contra a doença²⁸. O flúor está envolvido principalmente no processo de remineralização e afeta levemente o metabolismo bacteriano, acidificando o citoplasma dos microrganismos residentes nos biofilmes inibindo a ação de enzimas responsáveis pela glicólise, ou seja, reduzindo a produção de ácido²⁹. Portanto, novos agentes anti-biofilme têm sido amplamente pesquisados para encontrar uma solução que reduza a produção de matriz extracelular, buscando atraso ou controle da formação de biofilme.

Dentre os novos agentes anti-biofilme, três deles têm se destacando para o controle na formação dos biofilmes: o terpenóide *tt*-farnesol, o flavonóide miricetina e uma pequena molécula sintética denominada composto 1771. O *tt*-farnesol tem

como alvo a membrana citoplasmática, diminuindo a tolerância ao ácido (aciduricidade) de *S. mutans* pela redução na expressão do gene *atpD* que codifica um componente da bomba de prótons F-ATPase³⁰⁻³³. Esse terpenóide também é produzido como uma molécula de *quorum sensing* produzida por *C. albicans* em baixíssimas concentrações³⁴. *Quorum sensing* é um mecanismo de envio de sinais entre células afim de regular ecologicamente o microambiente, resumidamente, é uma forma de comunicação entre as células podendo controlar a expressão de genes que controlam a morfologia, formação de biofilme e outros fatores de virulência^{35,36}.

A miricetina é um inibidor eficaz da produção de exopolissacarídeos porque reduz a expressão dos genes *gtfBC* que codificam Gtfs e inibe a atividade dessas exoenzimas³⁷⁻³⁹. Em modelo animal de cárie induzida pela colonização de *S. mutans*, o tratamento tópico com uma combinação de *tt*-farnesol e miricetina e flúor reduziu a incidência e severidade de lesões de cárie sem afetar a microbiota comensal³⁸. Entretanto, esta combinação foi menos eficaz quando testada na prevenção de biofilmes v *S. mutans* e *C. albicans* in vitro⁴⁰.

O composto 1771 inibe a síntese de ácidos lipoteicóicos (componente da parede celular de bactérias Gram-positivas), estrutura responsável pela adesão entre os microrganismos; etapa essencial para formação de biofilmes^{41,42}. Esse composto, combinado com miricetina e flúor afeta a estruturação tridimensional de biofilmes de *S. mutans* in vitro e inibe o acúmulo de biofilme ao afetar a quantidade de ácidos lipoteicóicos (redução de 20%), dificultando a coagregação (reduzindo a população final do biofilme), reduzindo a produção de componentes da matriz (>74% dos exopolissacarídeos solúveis e insolúveis) e a microarquitetura 3D do biofilme comparados com o veículo⁴³. Portanto, esses agentes têm alvos diferentes e uma estratégia combinada poderia ser uma abordagem para reduzir a virulência do biofilme^{31,38}.

O desenvolvimento de novas terapias contra doenças causadas por biofilmes orais é um desafio, pois (1) falta de retenção de agentes exógenos introduzidos via regimes de tratamento padrão (i.e., aplicação tópica com exposições breves), (2) a eliminação rápida via fluxo salivar ou fricção com alimentos e músculos, e (3) a complexidade da construção do biofilme (fixação ou ação local destes agentes no interior da matriz). Agentes tópicos precisam ser retidos ou ter efeito prolongado sem

exibir atividade biocida de amplo espectro para prevenir a disrupção da microbiota oral complexa (comensal), trazidas com o seu uso contínuo. Concomitantemente, os agentes não podem formar complexos com as proteínas salivares que facilitam a eliminação rápida desses agentes.

Nanopartículas carreadoras de fármacos ou NPCs formadas por polímeros têm o potencial de enfrentar tais desafios na cavidade oral sem causarem efeitos colaterais, como demonstrado em estudos clínicos de terapia anticâncer^{44,45}. Nanopartículas são solúveis em soluções aquosas e permitem o ajuste preciso de sua composição química, tamanho, carga superficial e outras propriedades como reter e liberar fármacos no local desejado⁴⁶⁻⁴⁸. O conhecimento sobre a formação do biofilme e as mudanças que ocorrem dentro do mesmo (e.g., criação de nichos ácidos por causa da matriz extracelular rica em exopolissacarídeos) oferece a oportunidade de utilizar intervenção terapêutica baseada em nanomedicina.

Foi demonstrado que NPCs catiônicas aderem-se avidamente às superfícies de hidroxiapatita, película salivar (i.e., película adquirida) e matriz exopolissacarídica do biofilme⁴⁹. Estas podem ser manipuladas para carrear agentes e mantê-los no local de formação de biofilme, instalando-se em tais superfícies liberando os fármacos somente no local e tempo ideal, pois são sensíveis ao pH, realizando a liberação do fármaco quando for necessário^{49,50}. Essa abordagem terapêutica diminuiu a biomassa de biofilme in vitro de *S. mutans* e reduziu significativamente o número e a severidade de lesões de cárie em um modelo animal, após aplicação tópica de NPC-*tt*-farnesol⁴⁹. Entretanto, o efeito da estratégia NPC-*tt*-farnesol contra biofilmes multi-espécie formado por *S. mutans* e *C. albicans* foi reduzido, não prevenindo a formação do biofilme sobre discos de hidroxiapatita e não controlando fatores como a população microbiana, pH do meio de cultura e a matriz insolúvel de exopolissacarídeos⁵¹.

O *tt*-farnesol e miricetina foram testados e interagem bem com esse sistema de carregamento de fármacos, afetando o desenvolvimento de biofilme de *S. mutans* in vitro^{52,33}. Entretanto, o composto 1771 não foi testado com as NPCs. Este sistema contendo NP-*tt*-farnesol-miricetina e NP-*tt*-farnesol-miricetina-1771 não foram testados contra biofilmes multi-espécie formado por *S. mutans* e *C. albicans*. Isso se faz necessário porque a presença do fungo aumenta a dificuldade de controlar o crescimento do biofilme utilizando os tratamentos tópicos com os fármacos livres,

associação testada foi de *tt*-farnesol-miricetina-flúor e não houve redução de nenhum fator de virulência⁴⁰ e na associação de NP-*tt*-farnesol⁵¹.

7 CONCLUSÃO

Previne-se a formação de biofilmes cariogênicos mono-espécie formado por *S. mutans* e multi-espécie formado por *S. mutans* e *C. albicans* sobre a superfície de hidroxiapatita pela ação do sistema de liberação de fármacos controlado por pH nas associações: NPC-far-1771 e NPC-far-myr-1771. Especificamente,

1. Sintetizou-se nanopartícula carreadora NP52-1 (NPC) capaz de interagir com os três compostos distintos em sua estrutura, sendo eles: *tt*-farnesol, miricetina e composto 1771.
2. Preveniu-se diversos fatores de virulência de biofilmes cariogênicos (pH do meio de cultura, população microbiana e biomassa) mono e multi-espécie com as formulações NPC-far-1771 e NPC-far-myr-1771 no regime de prevenção utilizando apenas 4 tratamentos tópicos por 1,5 minutos. Nenhum dos tratamentos propostos controlou o biofilme depois de pré-formados na superfície no regime tratamento (2 tratamentos tópicos por 1,5 minutos).

REFERÊNCIAS*

1. Dye BA, Tan S, Smith V, Lewis BG, Barker LK, Thornton-Evans G et al. Trends in oral health status: United States, 1988-1994 and 1999-2004. *Vital Health Stat.* 2007; 11: 1-92.
2. 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): 380-87.
3. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res.* 2006; 85: 878-87.
4. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011; 45: 69–86.
5. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res.* 2013; 92(12): 1065-73.
6. 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: 708–16.
7. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986; 50: 353–80.
8. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011; 90(3): 294-303.
9. Klein MI, Duarte S, Xiao J, Mitra S, Foster TH, Koo H. Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in *Streptococcus mutans* biofilm development. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(3):837-41.
10. Koo H, Xiao J, Klein MI. Extracellular polysaccharides matrix--an often forgotten virulence factor in oral biofilm research. *Int J Oral Sci.* 2009; 1(4): 229-34.
11. 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: 1024-8.
12. Raja M, Hannan A, Ali K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. *Caries Res.* 2010; 44(3): 272-6.
13. 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.

* 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>

14. Young T, Alshanta OA, Kean R, Bradshaw D, Pratten J, Williams C et al. *Candida albicans* as an essential "keystone" component within polymicrobial oral biofilm models? *Microorganisms*. 2020; 9(1): 59.
15. Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS Pathog*. 2013; 9(10): e1003616.
16. 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.
17. Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel, Cury AA et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol*. 2008; 53(8): 755-64.
18. 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.
19. Kapteyn JC, Montijn RC, Dijkgraaf GJ, Van den Ende H, Klis FM. Covalent association of beta-1,3-glucan with beta-1,6-glucosylated mannoproteins in cell walls of *Candida albicans*. *J Bacteriol*. 1995; 177(13): 3788-92.
20. 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.
21. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B et al. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(2): 510-20.
22. 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: 171–75.
23. Vedyappan G, Rossignol T, d'Enfert C. Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(5): 2096-111.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Delahunty CM, Yates III JR, Lu B et al. *PLoS Pathog*. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. 2012; 8(4): e1002623.
28. Ten Cate JM. Novel anticaries and remineralizing agents: prospects for the future. *J Dent Res*. 2012; 91(9):813-5.

29. Marquis RE, Clock SA, Mota-Meira M. Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2003; 26(5): 493-510.
30. Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res.* 2011; 45(3): 243-63.
31. Koo H, Pearson SK, Scott-Anne K, Abranches J, Cury JA, Rosalen PL et al. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol Immunol.* 2002; 17(6): 337-43.
32. Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52(5): 782-9.
33. Sims KR Jr, Maceren JP, Liu Y, Rocha GR, Koo H, Benoit DSW. Dual antibacterial drug-loaded nanoparticles synergistically improve treatment of *Streptococcus mutans* biofilms. *Acta Biomater.* 2020; 115: 418-31.
34. Navarathna DH, Hornby JM, Hoerrmann N, Parkhurst AM, Duhamel GE, Nickerson KW. Enhanced pathogenicity of *Candida albicans* pre-treated with subinhibitory concentrations of fluconazole in a mouse model of disseminated candidiasis. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(6): 1156-9.
35. Polke M, Jacobsen ID. Quorum sensing by farnesol revisited. *Curr Genet.* 2017; 63(5): 791-7.
36. Padder SA, Prasad R, Shah AH. Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. *Microbiol Res.* 2018; 210: 51-8.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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): 61.
41. Richter SG, Elli D, Kim HK, Hendrickx AP, Sorg JA, Schneewind O et al. 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.
42. Paganelli FL, van de Kamer T, Brouwer EC, Leavis HL, Woodford N, Bonten MJ et al. Lipoteichoic acid synthesis inhibition in combination with antibiotics abrogates growth of multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents.* 2017; 49(3): 355-63.

43. 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.
44. Bourzac K. Nanotechnology: Carrying drugs. *Nature*. 2012; 491(7425): S58-60.
45. Benoit DSW, Sims KR Jr, Fraser D. Nanoparticles for Oral Biofilm Treatments. *ACS Nano*. 2019; 13(5): 4869-75.
46. Benoit DS, Durney AR, Anseth KS. Manipulations in hydrogel degradation behavior enhance osteoblast function and mineralized tissue formation. *Tissue Eng*. 2006; 12(6): 1663-73.
47. 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.
48. Benoit DSW, Sims KR Jr, Fraser D. Nanoparticles for Oral Biofilm Treatments. *ACS Nano*. 2019; 13(5): 4869-75.
49. 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; 9(3): 2390- 404.
50. Sims KR Jr, He B, Koo H, Benoit DSW. Electrostatic Interactions Enable Nanoparticle Delivery of the Flavonoid Myricetin. *ACS Omega*. 2020; 5(22): 12649-59.
51. Rocha GR, Klein MI. 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. FAPESP: 2011/03424-1.
52. Sims KR, Liu Y, Hwang G, Jung HI, Koo H, Benoit DSW. Enhanced design and formulation of nanoparticles for anti-biofilm drug delivery. *Nanoscale*. 2018; 11(1): 219-36.
53. James SL, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi CAN et al., GBD 2017 Disease and injury incidence and prevalence collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global burden of disease study 2017. *Lancet*. 2018; 392(10159): 1789-858.
54. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet*. 2007; 369(9555): 51-9.
55. Firestone AR, Navia JM. Sulcal plaque pH and remineralization of sulcal caries in rats exposed to dietary and water fluoride. *Caries Res*. 1988; 22(3): 177-80.
56. Klink T, Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T. Dental caries in rats associated with *Candida albicans*. *Caries Res*. 2011; 45(2): 100-6.
57. 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.

58. Parisotto TM, Stipp R, Rodrigues LK, Mattos-Graner RO, Costa LS, Nobre-dos-Santos M. Can insoluble polysaccharide concentration in dental plaque, sugar exposure and cariogenic microorganisms predict early childhood caries? A follow-up study. *Arch Oral Biol*. 2015; 60(8): 1091-7.
59. Kuramitsu HK. Molecular genetic analysis of the virulence of oral bacterial pathogens: an historical perspective. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 14(5): 331-44.
60. Hwang G, Klein MI, Koo H. Analysis of the mechanical stability and surface detachment of mature *Streptococcus mutans* biofilms by applying a range of external shear forces. *Biofouling*. 2014; 30(9): 1079-91.
61. Peterson BW, He Y, Ren Y, Zerdoum A, Libera MR, Sharma PK et al. Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. *FEMS Microbiol Rev*. 2015; 39(2): 234-45.
62. Clarke JK. On the Bacterial Factor in the Ætiology of Dental Caries. *Br J Exp Pathol*. 1924; 5(3): 141-7.
63. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am*. 1978; 238(1): 86-95.
64. Bowen WH. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13(2): 126-31.
65. Arnold FA, Likins RC, Russell AL, Scott DB, Fifteenth year of the grand rapids fluoridation study. *The Journal of the American Dental Association*. Volume 65, Issue 6, 1962, Pages 780-5, ISSN 0002-8177.
66. Bastos JRM, Aquilante AG, Almeida BS, Ramires I, Olympio KPK, Lauris JRP. Panorama da fluoretação da água de abastecimento público no Brasil e no mundo. *Rev. Inst Ciênc Saúde*. 2003; 21(2): 153-8.
67. Buzalaf MAR, Whitford GM. Fluoride metabolism. *Monogr Oral Sci*. 2011; 22: 20-36.
68. Palombo EA. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011; 2011: 680354.
69. Ribeiro SM, Fratuelli ÉDO, Bueno PCP, de Castro MKV, Francisco AA, Cavalcheiro AJ et al. Antimicrobial and antibiofilm activities of *Casearia sylvestris* extracts from distinct brazilian biomes against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *BMC Complement Altern Med*. 2019; 19(1): 308.
70. Park YK, Koo MH, Abreu JA, Ikegaki M, Cury JA, Rosalen PL. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr Microbiol*. 1998; 36(1): 24-8.
71. Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol*. 2000; 45(2): 141-8.
72. Wang Y, Newman MR, Ackun-Farmmer M, Baranello MP, Sheu TJ, Puzas JE et al. Correction to fracture-targeted delivery of β -Catenin agonists via peptide-functionalized nanoparticles augments fracture healing. *ACS Nano*. 2020; 14(4): 5149-50.
73. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. 1998; 56(11): 317-33.

74. Kim D, Hwang G, Liu Y, Wang Y, Singh AP, Vorsa N et al. Cranberry flavonoids modulate cariogenic properties of mixed-species biofilm through exopolysaccharides-matrix disruption. *PLoS One*. 2015; 10(12): e0145844.
75. Wu JZ, Williams GR, Li HY, Wang D, Wu H, Li SD et al. Glucose- and temperature-sensitive nanoparticles for insulin delivery. *Int J Nanomedicine*. 2017; 12: 4037-57.
76. Abbasi E, Milani M, Fekri Aval S, Kouhi M, Akbarzadeh A, Tayefi Nasrabadi H et al. Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. *Crit Rev Microbiol*. 2016; 42(2): 173-80.
77. Duvall CL, Convertine AJ, Benoit DS, Hoffman AS, Stayton PS. Intracellular delivery of a proapoptotic peptide via conjugation to a RAFT synthesized endosomolytic polymer. *Mol Pharm*. 2010; 7(2): 468-76.
78. Zhou J, Horev B, Hwang G, Klein MI, Koo H, Benoit DS. Characterization and optimization of pH-responsive polymer nanoparticles for drug delivery to oral biofilms. *J Mater Chem B*. 2016; 4(18): 3075-85.
79. Convertine AJ, Benoit DS, Duvall CL, Hoffman AS, Stayton PS. Development of a novel endosomolytic diblock copolymer for siRNA delivery. *J Control Release*. 2009; 133(3): 221-9.
80. Moad G, Rizzardo E, Thang SH. RAFT polymerization and some of its applications. *Chem Asian J*. 2013; 8(8): 1634-44.
81. Fu AS, von Recum HA. Affinity-based drug delivery. *Engineering Polymer Systems for Improved Drug Delivery*; Bader, R. A., Putnam, D. A., Eds.; Wiley, 2014; pp 429–52.
82. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008; 3(2): 163-75.
83. Lemos JA, Abranches J, Koo H, Marquis RE, Burne RA. Protocols to study the physiology of oral biofilms. *Methods Mol Biol*. 2010; 666: 87-102.
84. 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.
85. Houk KN, Leach AG, Kim SP, Zhang X. Binding affinities of host-guest, protein-ligand, and protein-transition-state complexes. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2003; 42(40): 4872-97.
86. Smith GJ, Markham KR. Tautomerism of flavonol glucosides: relevance to plant UV protection and flower colour. *J.Photochem. Photobiol*. 1998; 118: 99–105.
87. Newman MR, Benoit DSW. In vivo translation of peptide-targeted drug delivery systems discovered by phage display. *Bioconjug Chem*. 2018; 29(7): 2161-9.
88. Zhou LY, Zhu YH, Wang XY, Shen C, Wei XW, Xu T et al. Novel zwitterionic vectors: multi-functional delivery systems for therapeutic genes and drugs. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020; 18: 1999.

89. Liu Y, Shi L, Su L, van der Mei HC, Jutte PC, Ren Y et al. Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control. *Chem Soc Rev*. 2019; 48(2): 428-46.
90. Peulen TO, Wilkinson KJ. Diffusion of nanoparticles in a biofilm. *Environ Sci Technol*. 2011; 45(8): 3367-73.
91. Li X, Yeh YC, Giri K, Mout R, Landis RF, Prakash YS et al. Control of nanoparticle penetration into biofilms through surface design. *Chem Commun (Camb)*. 2015; 51(2): 282-5.
92. Piispanen AE, Bonnefoi O, Carden S, Deveau A, Bassilana M, Hogan DA. Roles of RAS1 membrane localization during *Candida albicans* hyphal growth and farnesol response. *Eukaryot Cell*. 2011; 10(11): 1473-84.