

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**FÁBIO RUAN LOUZEIRO LIMA**

**Avaliação da ação da DNase I em associação com a Clorexidina em biofilmes de  
*Streptococcus mutans* formados sob exposição a diferentes açúcares**

**FORTALEZA**

**2023**

**FÁBIO RUAN LOUZEIRO LIMA**

**Avaliação da ação da DNase I em associação com a Clorexidina em biofilmes de  
*Streptococcus mutans* formados sob exposição a diferentes açúcares**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.  
Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage.

**FORTALEZA**

**2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- L1a LIMA, FÁBIO RUAN LOUZEIRO.  
Avaliação da ação da DNase I em associação com a Clorexidina em biofilmes de *Streptococcus mutans* formados sob exposição a diferentes açúcares / FÁBIO RUAN LOUZEIRO LIMA. – 2023.  
87 f. : il.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage.
1. Cárie Dentária. 2. Desoxirribonucleases. 3. Carboidratos. 4. Matriz Extracelular. I. Título.  
CDD 616.9
-

**FÁBIO RUAN LOUZEIRO LIMA**

**Avaliação da ação da DNase I em associação com a Clorexidina em biofilmes de  
*Streptococcus mutans* formados sob exposição a diferentes açúcares**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.  
Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Germana Costa Paixão  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Profa. Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle  
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

A Deus.

Aos meus pais, Rosa e José Fabio.

A minha esposa Sara e minhas filhas, Marize e  
Melinda.

## AGRADECIMENTO

À **Universidade Federal do Ceará**, instituição que me honra ter feito parte.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM-UFC)**, meu grande respeito por fazer parte do seu corpo discente.

À **Faculdade de Medicina (FAMED/UFC)**.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio de número 88887.517793/2020-00, durante o mestrado.

À minha orientadora Profa. Dr. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage, pelo exemplo de pessoa, profissional, acadêmico, paciência e excelente orientação. Agradeço imensamente a oportunidade de ser o seu orientado.

Aos professores participantes da banca examinadora Profa. Dra. Germana Costa Paixão, Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante e Profa. Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos professores do PPGMM/UFC por compartilharem seus conhecimentos.

Às professoras Dras. Rossana de Aguiar Cordeiro e Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.

Ao Prof. Paulo Goberlânio de Barros Silva, por toda orientação e ensinamentos.

Aos funcionários do PPGMM, em especial a Carolinda Vilma Soares de Oliveira, pelas orientações e suporte.

Aos colegas da turma de mestrado: a cooperação entre nós é algo valioso que levarei para sempre de aprendizado durante este tempo.

Aos técnicos de laboratório, Antonia Karine Barros Nojosa, Manoel Florindo Junior, Maria Gleiciane da Rocha e Terezinha de Jesus Santos Rodrigues por toda a ajuda, ensinamento, paciência e suporte. Vocês foram imprescindíveis.

A todos os colegas de Pós-graduação, Weslanny de Andrade Moraes, Francisco Ruliglésio Rocha, Sussan Daniela Salazar Segales e Wanessa Fernandes Matias Regis, por toda a ajuda, apoio e amizade.

Aos alunos de graduação Vitor Hugo Vasconcelos Bueno e Rayssa Oliveira da Silveira por toda a ajuda no laboratório.

Aos meus pais, Rosa Marilene Louzeiro Girão e José Fábio de Girão Lima, que mantiveram toda a ajuda física, emocional e financeira por todo o tempo que precisei. Eles participaram de cada passo.

Aos meus sogros, Alzenir Eufrásio da Silva e Rejeane de Oliveira Costa Silva, que mantiveram todo o apoio nos momentos mais difíceis.

Às minhas filhas, Marize e Melinda. Tudo que faço é para vocês e por vocês.

Finalmente, para a minha esposa Sara Poulinne Costa Silva, pela paciência, suporte, abrigo, cumplicidade nesta jornada. Nada e por nada teria acontecido sem você.

“Em algum momento de nossas vidas somos alunos e professores. O importante é nunca deixarmos de aprender e ensinar algo.”

Renato Collyer

## RESUMO

Biofilme é um conjunto de microrganismos envoltos por uma matriz extracelular formada por substância polimérica extracelular (SPE) sintetizada pela própria população. *Streptococcus mutans* é uma bactéria associada à cárie dentária, cuja cariogenicidade é devida à produção de polissacarídeos extracelulares (PEC) sob a exposição de carboidratos presentes na dieta, principalmente a sacarose. O DNA extracelular tem um papel importante na produção de SPE e formação/manutenção de biofilmes. O digluconato de clorexidina 0,12% é um antisséptico utilizado como enxaguatório bucal e na prevenção de cáries. A DNase I é uma endonuclease que cliva DNA, removendo o DNA extracelular presente em biofilmes bacterianos. Objetivou-se avaliar *in vitro* o efeito antimicrobiano da associação de DNase I e Clorexidina 0,12% (CHX) em biofilmes de *S. mutans* formados em diferentes condições de exposição a açúcar: sacarose 10% (SC); glicose 5% + frutose 5% (GF) e controle com NaCl 0,9% (C). Secundariamente, objetivou-se avaliar a produção de PECs e número de células desses biofilmes. Biofilmes formados em fundo de poços de placas de microtitulação por 24 e 48 h ou crescidos 96 h sobre discos de hidroxiapatita, expostos à SC, GF ou C, foram tratados com NaCl 0,9%, CHX ou DNase + CHX. A DNase foi usada nos estágios iniciais enquanto a CHX foi aplicada nas últimas 24 de formação de biofilme. Os biofilmes em fundo de poço foram analisados quanto à biomassa por coloração por cristal violeta (CV) e quanto ao metabolismo de células viáveis por redução de MTT, ao passo que naqueles formados sobre os discos foram analisados PEC solúveis e insolúveis, contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e peso seco. A análise estatística foi realizada com ANOVA e Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Houve uma maior formação de biomassa em biofilmes de 48 h de SC (69%) em relação a G+F (55,33%) e C (34%) ( $p < 0,05$ ). Os grupos de tratamento apresentaram menor formação de biomassa de biofilme em relação ao grupo controle, mas não houve diferença entre associação ou não da CHX com a DNase. Biofilmes de 24 h SC (73,33%) apresentaram um maior metabolismo de células viáveis em relação a todos os outros grupos. O peso seco de biofilmes em SC (1,12 mg) ou G+F (0,77 mg) foi maior que C (0,17) ( $p < 0,05$ ), enquanto a contagem de UFC foi maior em G+F (6,02 UFC/ml/mg) apenas quando comparada à SC (5,01 UFC/ml/mg) ( $p < 0,05$ ). CHX reduziu UFC em SC, G+F e C em relação ao grupo de tratamento, independente do uso prévio de DNase ( $p < 0,05$ ). A quantidade de PEC solúvel e insolúvel foi mais alta em SC (1,95 e 3,41) que em G+F (1,6 e 2,28) e C (0,42 e 2,13), respectivamente ( $p < 0,05$ ). Dessa forma, a presença de carboidratos demonstrou um papel

importante no desenvolvimento do biofilme e na resposta em relação ao tratamento. No entanto, a DNase aplicada no início de formação do biofilme não potencializou o efeito antimicrobiano da CHX, devendo ser estudado uma melhor interação para uma estratégia terapêutica na prevenção de cáries.

**Palavras-chave:** Cárie Dentária, Desoxirribonucleases, Carboidratos, Matriz Extracelular

## ABSTRACT

Biofilm is a set of microorganisms surrounded by an extracellular matrix formed by extracellular polymeric substance (EPS) synthesized by the microbial population itself. *Streptococcus mutans* is a bacteria associated with dental caries, whose cariogenicity is due to the extracellular polysaccharide (PEC) production upon exposure to dietary carbohydrates, especially sucrose. Extracellular DNA plays an important role in SPE production and biofilm formation/maintenance. Chlorhexidine digluconate 0.12% is an antiseptic used as an oral rinse and to prevent dental caries. DNase I is an endonuclease that cleaves DNA, removing extracellular DNA present in bacterial biofilms. This study aimed to evaluate *in vitro* the antimicrobial effect of the association of DNase and Chlorhexidine 0.12% (CHX) in *S. mutans* biofilms formed under different conditions of exposure to sugar, as follows: sucrose 10% (SC); glucose 5% + fructose 5% (GF) and control with 0.9% NaCl (C). Secondly, the objective was to evaluate the production of PECs and the number of cells in these biofilms. Biofilms formed at the bottom of microtiter plate wells throughout 24 and 48 h or grown during 96 h on hydroxyapatite disks, containing SC, GF or C, were treated with 0.9% NaCl, CHX or DNase + CHX. DNase was used in the initial stages while CHX was applied in the last 24 h of biofilm formation. Statistical analysis was performed with ANOVA and Bonferroni ( $p < 0.05$ ). The amount of biomass was significantly higher in biofilms from 48 h of SC (69%) compared to G+F (55.33%) and C (34%) ( $p < 0.05$ ). The treatment groups showed lower biofilm biomass formation compared to the control group, but there was no difference between the association of CHX with DNase. 24-hour SC biofilms (73.33%) showed higher metabolism of viable cells compared to all other groups. The dry weight of biofilms in SC (1.12 mg) or G+F (0.77 mg) was higher than C (0.17) ( $p < 0.05$ ), while the CFU count was higher in G+ F (6.02 CFU/ml/mg) only when compared to SC (5.01 CFU/ml/mg) ( $p < 0.05$ ). CHX reduced CFU in SC, G+F and C compared to the treatment group, regardless of previous DNase use ( $p < 0.05$ ). The amount of soluble and insoluble PEC was higher in SC (1.95 and 3.41) than in G+F (1.6 and 2.28) and C (0.42 and 2.13), respectively ( $p < 0.05$ ). Thus, the presence of carbohydrates demonstrated an important role in the development of biofilm and response to treatment. However, DNase applied at the beginning of biofilm formation did not enhance the antimicrobial effect of CHX, and a better interaction should be studied for a therapeutic strategy in the prevention of dental caries.

**Keywords:** Dental Caries, Deoxyribonucleases, Carbohydrates, Extracellular Matrix.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Fluxo de Desmineralização e Remineralização no processo de cárie dentária. Adaptado de SELWITZ, 2007..... 25
- Figura 2 – Esquema do Experimento. Testes realizados por protocolo de formação de biofilme. Fonte: autor..... 39
- Figura 3 – Esquema de grupos em placa de 96 poços. 18 poços para biofilme de 24 h e 18 poços para biofilme de 48 h. Fonte: autor..... 43
- Figura 4 – Esquema total do experimento de formação de biofilme de *S. mutans* em placa de 96 poços. S: sacarose 10%. G+F: glicose 5% mais frutose 5%. C: controle. CHX: clorexidina 0,12%. Fonte: autor..... 44
- Figura 5 – Suportes confeccionados a partir de fio ortodôntico duro elástico redondo 0,18”. A: discos de hidroxiapatita; B: suporte para o disco, preso ao fio de apoio na placa de 24 poços; C: fio de apoio na placa de 24 poços (um para cada 04 poços); D: poço de placa de 24 poços. Fonte: autor..... 47
- Figura 6 – Placa de 24 poços com discos de hidroxiapatita em suportes de fios ortodônticos. Fonte: autor..... 47
- Figura 7 – Tubos de centrifugação de 50 ml seccionados com as soluções e os suportes ortodônticos com os discos HA em posição. Fonte: autor..... 48
- Figura 8 – Esquema total do experimento de formação de biofilme de *S. mutans* na superfície de discos de hidroxiapatita. S: sacarose 10%. G+F: glicose 5% mais frutose 5%. C: controle. CHX: clorexidina 0,12%. Fonte: autor..... 49
- Figura 9 – Esquema de grupos em placa de 24 poços. Fonte: autor..... 50
- Figura 10 – Coleta de biofilme formado sobre discos de hidroxiapatita. Fonte: autor..... 51
- Figura 11 – Curva Padrão Glicose para Polissacarídeo Solúvel. Fonte: autor..... 52
- Figura 12 – Biofilmes formados sem tratamento, apenas com exposição a diferentes açúcares em “a” (Média de Absorbância de Cristal Violeta em porcentagem) e “b” (Médias de Absorbância de MTT em porcentagem). SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. Letras diferentes denotam diferenças.  $p < 0,05$ , ANOVA..... 55
- Figura 13 – Biofilmes formados com exposição à sacarose 10% com tratamentos com CHX ou associação CHX e DNase I em “a” (Média de Absorbância de Cristal Violeta em porcentagem) e “b” (Médias de Absorbância de MTT

- em porcentagem). CHX: Clorexidina 0,12%. DNase: aplicação da enzima DNase. Letras diferentes denotam diferenças.  $p < 0,05$ , ANOVA..... 55
- Figura 14 – Biofilmes formados com exposição à glicose 5% e frutose 5% com tratamentos com CHX ou associação CHX e DNase I em “a” (Média de Absorbância de Cristal Violeta em porcentagem) e “b” (Médias de Absorbância de MTT em porcentagem). CHX: Clorexidina 0,12%. DNase: aplicação da enzima DNase. Letras diferentes denotam diferenças.  $p < 0,05$ , ANOVA..... 56
- Figura 15 – Biofilmes formados sem exposição a açúcares com tratamentos com CHX ou associação CHX e DNase I em “a” (Média de Absorbância de Cristal Violeta em porcentagem) e “b” (Médias de Absorbância de MTT em porcentagem). CHX: Clorexidina 0,12%. DNase: aplicação da enzima DNase. Letras diferentes denotam diferenças.  $p < 0,05$ , ANOVA..... 56
- Figura 16 – Médias de Peso seco em miligramas (n=18). Experimento realizado em triplicatas. Letras diferentes denotam diferenças ( $p < 0,05$ ), ANOVA..... 60
- Figura 17 – Médias de Redução de Peso seco em miligramas (n=18). Experimento realizado em triplicatas. SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle. CHX: Clorexidina 0,12%. DNase: aplicação da enzima DNase. Letras diferentes denotam diferenças ( $p < 0,05$ ), ANOVA..... 61
- Figura 18 – Médias de UFC/ml/mg (n=18) entre os grupos sem intervenção. UFC: Unidade Formadora de Colônia. SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle. Letras diferentes denotam diferenças ( $p < 0,05$ ), ANOVA..... 62
- Figura 19 – Médias de UFC/ml/mg de biofilmes de *S. mutans* formados sob exposição à sacarose 10%. Experimento realizado em discos de hidroxiapatita em triplicatas. CHX: Clorexidina 0,12%. DNase: aplicação da enzima DNase. Letras diferentes denotam diferenças.  $p < 0,05$ , ANOVA..... 63
- Figura 20 – Médias de UFC/ml/mg de biofilmes de *S. mutans* formados sob exposição à glicose 5% mais frutose 5%. CHX: Clorexidina 0,12%. DNase: aplicação da enzima DNase. Experimento realizado em discos de hidroxiapatita em triplicatas. Letras diferentes denotam diferenças.  $p < 0,05$ , ANOVA..... 64
- Figura 21 – Médias de UFC/ml/mg de biofilmes de *S. mutans* formados sem exposição aos açúcares. CHX: Clorexidina 0,12%. DNase: aplicação da enzima

	DNase. Experimento realizado em discos de hidroxiapatita em triplicatas. Letras diferentes denotam diferenças. $p < 0,05$ , ANOVA.....	65
Figura 22 –	Médias de UFC/ml/mg em LOG Redução (n=18). Experimento realizado em discos de hidroxiapatita em triplicatas. SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle. CHX: grupo de tratamento apenas com clorexidina em relação ao grupo sem tratamento. DNase + CHX: grupo de tratamento da associação de DNase com clorexidina em relação ao grupo sem tratamento. Letras diferentes denotam diferenças ( $p < 0,05$ ), ANOVA.....	66
Figura 23 –	Médias de Polissacarídeo Extracelular Solúvel (PECS/ $\mu$ g/mg de Peso Seco) sem intervenção (n=6) em triplicatas. SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle. Letras diferentes denotam diferenças ( $p < 0,05$ ), ANOVA.....	67
Figura 24 –	Médias de Polissacarídeo Extracelular Insolúvel (PECI/ $\mu$ g/mg de Peso Seco) sem intervenção (n=6) em triplicatas. SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle. Letras diferentes denotam diferenças ( $p < 0,05$ ), ANOVA.....	68
Figura 25 –	Médias de Polissacarídeo Extracelular Totais (PECT/ $\mu$ g/mg de Peso Seco) sem intervenção (n=6) em triplicatas. SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle. Letras diferentes denotam diferenças ( $p < 0,05$ ), ANOVA.....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características diferentes tipos de DNases. Adaptado de LAUKOVÁ <i>et al.</i> , 2020.....	32
Tabela 2 – Grupos experimentais no experimento em placas de 96 poços. SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle. CHX: Clorexidina 0,12%.....	40
Tabela 3 – Grupos experimentais no experimento com discos de hidroxiapatita. SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle. CHX: Clorexidina 0,12%.....	41
Tabela 4 – Média e desvio padrão biofilmes formados em placa de 96 poços. CV: Biomassa por coloração com Cristal Violeta. MTT: Avaliação de atividade metabólica. SC: Sacarose 10%. CHX: Clorexidina 0,12%. DNase: aplicação da enzima DNase. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle.....	54
Tabela 5 – Média e desvio padrão biofilmes formados em discos HA. SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle. CHX: Clorexidina 0,12%. DNase: aplicação da enzima DNase.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNase I	DNase
°C	Grau Celsius
BHI	Brain Heart Infusion (Infusão Cérebro Coração)
C	Controle
CHX	Clorexidina
eDNA	DNA extracelular
SPE	Substâncias Poliméricas Extracelulares
Ftf	Frutossiltransferase
G+F	Glicose + Frutose
Gtf	Glucossiltransferase
HA	Hidroxiapatita
MSB	<i>Mitis Salivarius</i> Bacitracina
MM	Massa Molar
PEC	Polissacarídeos Extracelulares
PECI	Polissacarídeos Extracelulares Insolúveis
PECS	Polissacarídeos Extracelulares Solúveis
PECT	Polissacarídeos Extracelulares Totais
Rpm	rotações por minuto
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
SC	Sacarose
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
DMSO	Dimetilsulfóxido

## LISTA DE SÍMBOLOS

® Marca Registrada

% Porcentagem

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	24
2.1	<b>Cárie dentária</b> .....	24
2.2	<i>Streptococcus mutans</i> .....	27
2.3	<b>Fatores de virulência</b> .....	29
2.3.1	<i>Formação de biofilme: Substâncias Poliméricas Extracelulares (SPE)</i> .....	29
2.3.2	<i>Produção de Polissacarídeos Extracelulares (PECs)</i> .....	30
2.4	<b>DNA extracelular (eDNA)</b> .....	30
2.5	<b>Estratégias como alvo eDNA - Enzima DNase</b> .....	31
2.6	<b>Clorexidina</b> .....	34
3.	<b>PERGUNTA de PARTIDA</b> .....	36
4.	<b>HIPÓTESE</b> .....	37
5.	<b>OBJETIVOS</b> .....	38
5.1	<b>Objetivo geral</b> .....	38
5.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	38
6.	<b>MATERIAIS e MÉTODOS</b> .....	39
6.1	<b>Cepas bacterianas</b> .....	39
6.2	<b>Delineamento experimental</b> .....	39
6.3	<b>Preparo dos açúcares</b> .....	41
6.4	<b>Condições de cultura bacteriana</b> .....	41
6.5	<b>Formação de biofilme em fundo de placas de 96 poços</b> .....	42
6.6	<b>Tratamento com clorexidina e DNase</b> .....	44
6.7	<b>Quantificação de biomassa</b> .....	45

<b>6.8</b>	<b>Determinação de atividade metabólica de células viáveis.....</b>	<b>45</b>
<b>6.9</b>	<b>Formação de biofilme em discos HA .....</b>	<b>46</b>
<b>6.10</b>	<b>Tratamento com a Clorexidina e DNase.....</b>	<b>49</b>
<b>6.11</b>	<b>Coleta do biofilme .....</b>	<b>50</b>
<b>6.12</b>	<b>Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) .....</b>	<b>51</b>
<b>6.13</b>	<b>Análise de peso seco de biofilme .....</b>	<b>51</b>
<b>6.14</b>	<b>Extração de polissacarídeos .....</b>	<b>52</b>
<b>6.15</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>53</b>
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
<b>7.1</b>	<b>Biofilmes formados em fundo de placa de 96 poços.....</b>	<b>53</b>
<b>7.1.1</b>	<i>Quantificação de biomassa .....</i>	<i>54</i>
<b>7.1.2</b>	<i>Determinação de metabolismo de células viáveis .....</i>	<i>57</i>
<b>7.1.3</b>	<i>Relação entre biomassa e metabolismo de células viáveis .....</i>	<i>57</i>
<b>7.2</b>	<b><i>Biofilmes formados em discos de HA.....</i></b>	<b>58</b>
<b>7.2.1</b>	<b><i>Relação de Peso Seco do biofilme de S. mutans.....</i></b>	<b>59</b>
7.2.1.1	Dados de Peso Seco sem tratamento.....	60
7.2.1.2	Relação de Redução de Peso Seco.....	60
<b>7.2.2</b>	<b><i>Relação de UFC.....</i></b>	<b>61</b>
7.2.2.1	Relação de UFC/mL/mg sem tratamento .....	61
7.2.2.2	Relação de UFC/mL/mg por grupo de açúcar.....	62
7.2.2.3	Relação de valor de LOG Redução de UFC/mL/mg.....	65
<b>7.2.3</b>	<b><i>Produção de Polissacarídeos Extracelulares Solúveis (PECS).....</i></b>	<b>66</b>
<b>7.2.4</b>	<b><i>Produção de Produção de Polissacarídeos Extracelulares Insolúveis (PECI)..</i></b>	<b>67</b>
<b>7.2.5</b>	<b><i>Produção de Polissacarídeos Extracelulares Totais (PECT).....</i></b>	<b>68</b>

<b>8.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>9.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cárie dentária é uma das doenças mais prevalentes e a doença crônica não transmissível mais comum em todo o mundo (WHO, 2020). Também é apontada como a doença crônica mais comum na infância, com aproximadamente 1,8 bilhão de novos casos anualmente no mundo, resultando em elevados gastos em tratamento (GLOBAL HEALTH METRICS *et al.*, 2017; XIAO *et al.*, 2019).

A cárie dentária é um processo dinâmico decorrente da presença de um consórcio de microrganismos embebidos em uma matriz polimérica que se adere à superfície dentária (FEJERSKOV, 1997), conhecido como biofilme dentário (MACHIULSKIENE *et al.*, 2020). O desenvolvimento da lesão cariosa é decorrente da desmineralização dos tecidos duros dentários e é promovida por ácidos produzidos por espécies acidogênicas e acidúricas presentes nesse biofilme que se estabelecem devido a mudanças no equilíbrio da comunidade microbiana presente, resultando em uma disbiose cuja principal causa é o consumo frequente de açúcares pela dieta (PITTS *et al.*, 2021).

Biofilmes são comunidades de microrganismos sésseis, heterogêneas e de relevância médica e odontológica expressiva. As interações entre esses microrganismos produzem uma matriz extracelular que os envolve, promovendo uma reserva de nutrientes, adesão a superfícies bióticas e abióticas bem como proteção contra agentes físicos e químicos, como resposta do hospedeiro e a agentes antimicrobianos (FLEMMING & WINGENDER, 2010; WILSON *et al.*, 2017). O arcabouço do biofilme consiste em um aglomerado de polímeros orgânicos, denominada substância polimérica extracelular (SPE). A SPE é formada por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos que interagem entre si e possuem adesão não covalente que permite uma coesão e viscoelasticidade à estrutura (KOO *et al.*, 2009; KARYAGINNI *et al.*, 2020).

Na formação do biofilme dentário, também denominado placa dentária, bactérias como *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Actinomyces* spp. aderem à superfície dentária através de interações específicas de receptor/adesina que dão início à colonização do local. Interações físicas e metabólicas ocorrem frequentemente entre diferentes microrganismos no biofilme e são afetadas diretamente por uma dieta rica em açúcar, o que ocasiona uma maior produção de polissacarídeos extracelulares (PEC) acarretando em biofilmes mais cariogênicos com

maior virulência e conseqüente aumento da progressão da doença cárie (BOWEN *et al.*, 2018).

A microbiota associada à cárie é um ecossistema complexo em que várias bactérias potencialmente podem causar a desmineralização da estrutura dentária. *Streptococcus mutans* é uma espécie de bactéria Gram positiva, frequentemente associada à cárie dentária que corresponde a apenas 0,1% da comunidade do biofilme dentário, 0,7-1,6% em lesões cariosas, onde 0,02% em lesões cáries fechadas ativas em dentina, 0,48% em cavidades com dentina exposta e 0,73% em lesões cariosas em esmalte, não sendo portanto, um fator exclusivo para o avanço do processo de cárie. No entanto, esse microrganismo possui mecanismos de boa adesão à estrutura dentária, capacidades acidúricas e acidogênicas que contribuem para uma vantagem competitiva (SIMÓN-SORO *et al.*, 2014; ZHENG, 2015).

*S. mutans* utiliza uma variedade de carboidratos como substratos, principalmente a sacarose, para produção de PECs solúveis e insolúveis, que aumentam a adesão e coesão da matriz do biofilme (SIMÓN-SORO & MIRA, 2015; KOO *et al.*, 2017; BOWEN *et al.*, 2018). Sabe-se que essas substâncias são produzidas através de enzimas e que os glucanos promovem adesão e acúmulo dos microrganismos em superfícies e entre si, e os frutanos estão associados à reserva energética. Assim, PECs são fatores de virulência que aumentam a capacidade cariogênica, estabilidade e resistência a antissépticos e a antimicrobianos, como à clorexidina (ROZEN *et al.*, 2004; CROSS *et al.* 2007; KLEIN *et al.*, 2015). Os PECs de glucanos e frutanos interagem com o DNA extracelular formando complexos que compõem a matriz de SPE. Sabe-se que são produzidos através de enzimas, em que os glucanos promovem adesão e acúmulo dos microrganismos em superfícies e entre si, e os frutanos estão associados à reserva energética. (CROSS *et al.* 2007; KLEIN *et al.*, 2010; KLEIN *et al.*, 2015).

O DNA extracelular (eDNA) é outro importante fator na formação e na estabilidade da estrutura da matriz do biofilme (DAVIES, 2003; MONTANARO *et al.*, 2011; GUO *et al.*, 2021), pois PECs (glucanos e frutanos) interagem com o DNA extracelular formando complexos que compõem a matriz de SPE. Dessa forma, abordagens terapêuticas que tenham como alvo a dissolução da matriz com ação no ácido nucleico podem ter efeitos sinérgicos em combinação com irrigantes antimicrobianos ou antissépticos orais.

A redução de placa dental é almejada como prevenção na prática odontológica e um método utilizado é o uso de agentes antimicrobianos, como a clorexidina. Utilizada como

antisséptico oral, essa substância age como bacteriostático quando em menores concentrações e como bactericida em maiores concentrações e por possuir ação tanto em bactérias Gram-positivas quanto em bactérias Gram-negativas, é bastante utilizada na odontologia (SREENIVASAN & GAFFAR, 2002; KARPINSKI & SZKARADKIEWICZ, 2015; SUSUKI *et al.*, 2020). No entanto, sua atividade é diminuída em biofilmes maduros por ter a ação antimicrobiana reduzida nas camadas mais profundas (SUSUKI *et al.*, 2020).

Estratégias antibiofilmes estão sendo consideradas com o objetivo de diminuir a formação de SPE e favorecer a penetração de agentes antimicrobianos. Uma alternativa para essa finalidade é manter a concentração baixa de eDNA com desoxirribonucleases (DNases). As DNases são enzimas que catalisam a clivagem hidrolítica de ligações fosfodiéster na estrutura do DNA. Estudos com a enzima DNase em biofilmes de *E. faecalis* (LI *et al.*, 2012) e *Pseudomonas aeruginosa* (WHITCHURCH *et al.*, 2002; DAS *et al.*, 2017) demonstraram uma maior susceptibilidade dos biofilmes à clorexidina. Alguns estudos avaliaram a ação da enzima em biofilmes de *S. mutans* (KARYGIANNI *et al.*, 2020; KARYGIANNI *et al.*, 2021), no entanto sem avaliar de acordo com a cariogenicidade do biofilme.

No presente estudo, objetivou-se avaliar a ação da clorexidina a 0,12% em associação com a enzima DNase I, em condições diferentes de exposição a açúcares, comparadas à presença de sacarose. A hipótese de estudo é que o uso da enzima DNase I por agir na matriz do biofilme potencializa a ação antimicrobiana da clorexidina a 0,12% por agir clivando ligações da matriz do biofilme e facilitar o processo do antimicrobiano às células bacterianas, principalmente em condições onde o biofilme é mais cariogênico, ou seja, com maior concentração de PECs.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Cárie dentária

Conceitos sobre a etiologia da cárie dentária têm sido propostos ao longo do tempo. Ao final do século XIX, MILLER (1890), trabalhando nos laboratórios de Robert Koch, propôs a teoria quimioparasita da cárie dentária, a qual seria causada por dois fatores: produção de ácidos e ação de germes. Em 1924, uma espécie bacteriana de uma lesão cariosa foi isolada e, por se assemelhar com uma forma mutante de cocos, foi denominada *Streptococcus mutans* (CLARKE, 1924). Nas décadas de 50 e 60, começaram os primeiros estudos em modelos animais e, em 1976, com a descrição da hipótese da placa específica a qual determinadas espécies eram responsáveis pela perda de estrutura dentária, o foco principal era o *S. mutans*. Na década de 80, a hipótese da placa inespecífica propôs a visão que toda a massa biológica (placa dentária) estava relacionada com a enfermidade (THEILADE, 1986). COYKENDALL (1989) publicou um estudo com a classificação e identificação da espécie viridans do gênero *Streptococcus*, identificando a taxonomia de várias espécies como *S. salivarius*. MARSH (1994) propôs a teoria da placa ecológica, aceita nos dias atuais, que locais sadios possuem microrganismos associados às enfermidades e que a doença cárie é um desequilíbrio da microbiota residente.

Os dentes são compostos de uma camada dura superficial sobre uma camada menos mineralizada, a dentina. A superfície dentária, o esmalte dentário, é constituído em sua maior parte por hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , um mineral muito insolúvel que confere a dureza à estrutura dentária, e em menor parte de impurezas como carbono e flúor (DAWES, 2003). Quando em contato com a água, uma pequena quantidade de hidroxiapatita se dissolve liberando íons cálcio, fosfato e hidróxido e o processo continua até atingir um patamar de saturação entre a água e o mineral. Desse modo, em condições ácidas (valores baixos de pH), as concentrações de hidróxido são reduzidas e para manter o equilíbrio, as concentrações de cálcio e fosfato teriam de aumentar. A saliva e o fluido presente na placa bacteriana contêm íons de cálcio, fosfato e hidróxido e em concentrações superiores na maior parte do tempo, portanto a estrutura dentária só irá dissolver nestes fluidos caso o pH diminua a um determinado valor, denominado pH crítico. O valor de pH crítico varia entre indivíduos, em um valor aproximado de 5.5, podendo ser mais elevado em pessoas com baixas concentrações de cálcio e fosfato (MARSH, 1995).

A cárie é uma doença multifatorial, mediada pela presença de biofilmes (placa dentária) e modulada pela dieta que ocorre quando o processo de remineralização dentária é menor em relação ao de desmineralização, principalmente no caso de dietas ricas em açúcares que aceleram esse processo (CURY *et al.*, 2017). A oxidação é a principal via metabólica para produção de energia em que os microrganismos presentes no biofilme dental metabolizam tais açúcares, produzindo ácidos e ocasionando destruição da estrutura dentária (Figura 1). A doença ocorre em locais de desequilíbrios no biofilme em consequência de pressões seletivas correlacionadas com oferta de nutrientes e com o pH (MACHIULSKIENE *et al.*, 2020).

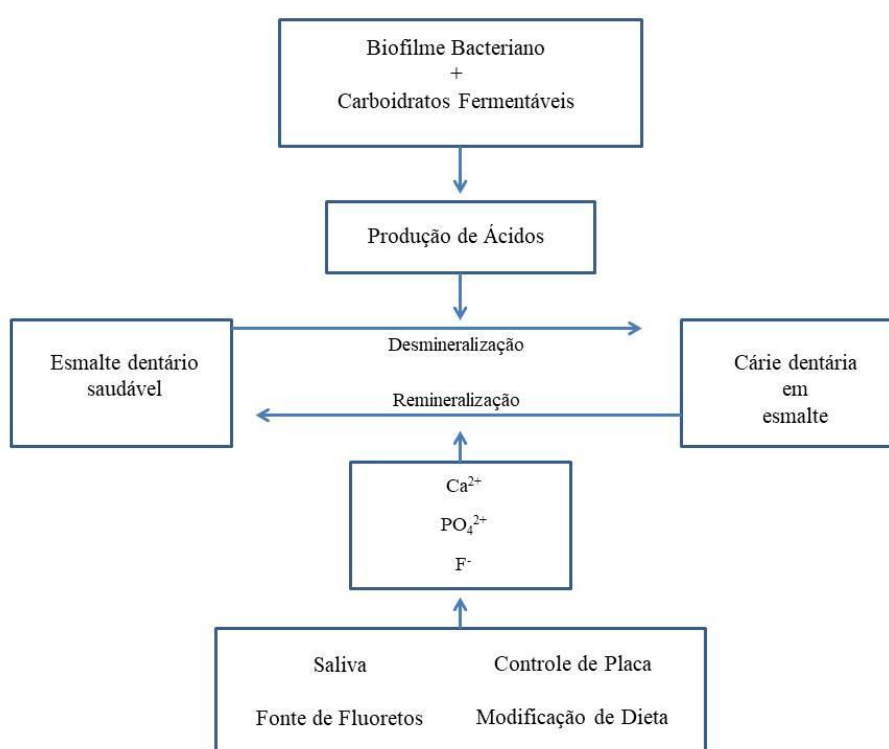


Figura 1: Fluxo de Desmineralização e Remineralização no processo de cárie dentária. Adaptado de SELWITZ, 2007.

A taxa de produção de ácidos na placa bacteriana depende, além do fluxo salivar e capacidade de tamponamento salivar, da quantidade e duração da exposição a açúcares (MARSH, 1995). O termo açúcar representa carboidratos fermentáveis e englobam monossacarídeos que não podem ser hidrolisados a uma forma mais simples, como a glicose e frutose, e dissacarídeos, formados pela união de dois monossacarídeos por ligações glicosídicas, como a sacarose. A glicose participa da composição de carboidratos mais simples, como a sacarose, e também daqueles mais complexos como o amido. Células usam a glicose como fonte de energia e intermediário metabólico (PAES LEME *et al.*, 2006. CAI *et*

*al.*, 2016; BEZERRA *et al.*, 2018). A frutose é um monossacarídeo predominante em várias frutas, como maçãs e laranjas. Os vegetais podem conter de 1% a 2% de seu peso na forma de frutose livre e mais 3% de frutose sob a forma de sacarose (BARREIROS *et al.*, 2005).

A sacarose é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e outra de frutose que pode ser encontrada em quase todos os alimentos processados, agindo como um aditivo para melhorar o sabor, bem como participar do processo de conservação. Está presente na cana de açúcar, açúcar de beterraba, melaço, xarope de bordo, xarope de milho, açúcar de bordo, frutas, vegetais e mel. Trata-se do açúcar mais cariogênico já reconhecido na literatura, facilmente fermentado em ácidos pelos microrganismos acidogênico, sendo o único carboidrato que altera a matriz do biofilme formado, aumentando sua cariogenicidade (PAES LEME *et al.*, 2006; CAI *et al.*, 2016).

Os microrganismos necessitam de energia para a biossíntese de novas macromoléculas, que é a maior demanda energética da célula e, para isso, oxidam compostos orgânicos (carboidratos) (LIBERATO & OLIVEIRA, 2019). A placa dentária é um ambiente que predomina a anaerobiose e devido à escassez de oxigênio, a fermentação é a forma de metabolização dos açúcares. A oferta de monossacarídeos fermentáveis é fornecida de sacarose ou glicose diretamente da dieta ou indiretamente por carboidratos mais complexos (como o amido) degradados por enzimas presentes na saliva (amilase) ou bacterianas. A sacarose é hidrolisada por enzimas bacterianas (invertase, frutossiltransferases ou glucossiltransferases) em glicose e frutose que são monossacarídeos facilmente fermentados pela maioria das bactérias presentes no biofilme, pela via glicolítica e produzindo não apenas ácido láctico, mas também acético e fórmico (SHEIHAM, 2001).

Ao contrário das superfícies epiteliais da cavidade oral, a superfície dentária é a única onde não ocorre um “não-descamamento”, facilitando a ancoragem para um desenvolvimento do biofilme (COSTALONGA & HEIZBERG, 2014), por conseguinte a formação e aderência de biofilmes sobre a estrutura dentária é um fator de virulência importante para o desenvolvimento de lesões de cárie. O estabelecimento da placa dental permite a interação de uma comunidade microbiana complexa produzindo substâncias poliméricas extracelulares que fortalecem a matriz do biofilme, aumentando a adesão e resistência dos microrganismos a antimicrobianos. Apesar de cerca de 200-300 espécies bacterianas estarem associadas à placa dentária, *Streptococcus mutans* é constantemente descrito como associado à cárie dentária, principalmente por seus fatores patogênicos (CURY *et al.*, 2000; SCHLAFER *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

## 2.2 *Streptococcus mutans*

O gênero *Streptococcus*, pertencente da família *Streptococcaceae*, caracterizados por microrganismos esféricos agrupados em cadeias, gram-positivos, medindo aproximadamente 0,5 a 0,75  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Em 1924, um microrganismo foi isolado de uma lesão de cárie por Clarke, assemelhando-se a uma forma mutante de cocos, sendo assim denominado *Streptococcus mutans*. Trata-se de uma bactéria anaeróbia facultativa,  $\alpha$ -hemolítica ou não hemolítica e fermentadora de açúcares, sendo o mais estudado como potencial agente etiológico da cárie dentária (CLARKE, 1924; CONSTERTON *et al.*, 1999). De acordo com a base de dados em Human Oral Microbiome Database (HOMD) ([www.homd.org](http://www.homd.org)), representa cerca de 30% da microbiota da cavidade oral e cerca de 15% em biofilmes dentais de adultos saudáveis (COSTALONGA & HERZBERG, 2014).

A publicação da sequência completa do genoma da cepa UA159 de *S. mutans*, uma bactéria isolada de uma criança com cáries ativas, forneceu informações mais completas sobre sua adaptação de sobrevivência no ambiente bucal, defesa contra fatores do hospedeiro e uso de produtos genéticos que mantêm seu nicho contra concorrentes microbianos. O genoma de *S. mutans* UA159, uma cepa sorotipo *c* de acordo com a estrutura química do polissacarídeo de ramnose-glicose da parede celular, é organizado em um único cromossomo circular de aproximadamente 2.030 pares de base. O genoma da cepa UA159 (ATCC® 700610™) está depositado no banco de dados *GenBank* do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) com o identificador de acesso AE014133 (AJDIC *et al.*, 2002).

Os principais fatores de virulência de *S. mutans* são capacidade de colonizar a superfície dentária, a síntese de glucanos, metabolismo de polissacarídeos como reserva, produção de ácidos e formação de biofilme (BANAS, 2004). Seu genoma contém diversos maquinários enzimáticos para metabolismo de glicose, frutose, sacarose, lactose, galactose, manose, celobiose,  $\beta$ -glucosídeos, trealose, maltose/maltodextrose, rafinose, ribulose, melibiose, isomaltossacarídeos, amido e, possivelmente, sorbose. O percurso glicolítico completo foi encontrado na cepa UA159 que leva à produção de piruvato e posterior redução em vários produtos da fermentação (ácido lático, fórmico e acético). Esses processos metabólicos são importantes para a oxidação de NADH, bem como a síntese de ATP. As enzimas responsáveis pelo metabolismo do piruvato incluem piruvato desidrogenase, piruvato formato liase, fosfoacetilase, acetato quinase, lactato desidrogenase, álcool desidrogenase e acetoína desidrogenase (AJDIC *et al.*, 2002).

*S. mutans* produzem ao menos três tipos de glicosiltransferases (GTF): GtfB, GtfC e GtfD, que são enzimas que hidrolisam a sacarose em glicose e frutose e ainda polimerizam as moléculas de glicose liberadas, formando os polissacarídeos extracelulares (PECs) ou denominados glucanos que servem como reserva de energia para as células (BOWEN & KOO, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2021). A GtfB sintetiza principalmente glucanos insolúveis em água, a GtfC produz uma mistura de glucanos solúveis e insolúveis e a GtfD sintetiza predominantemente glucanos solúveis (AOKI *et al.*, 1986; HANADA & KURAMITSU, 1988; 1989). Diversos tipos de glucanos são produzidos e esses variam na sua solubilidade em água, dependendo do tipo e da proporção das ligações entre as moléculas de glicose. Os insolúveis em água são aqueles nos quais prevalecem as ligações do tipo  $\alpha$ -(1-3) e são considerados os mais importantes na formação de uma matriz extracelular insolúvel, essencial para o acúmulo de *S. mutans* no biofilme. A sacarose é o único substrato para esse polímero insolúvel, contribuindo para uma maior cariogenicidade por *S. mutans* (RÖLLA *et al.*, 1989). Os glucanos solúveis, ricos em ligações tipo  $\alpha$ -(1-6), parecem funcionar como um reservatório extracelular de açúcares, sendo hidrolisados por outras exoenzimas, denominadas dextranases (KLAHAN *et al.*, 2018). A presença desses glucanos aumenta a força de adesão em superfícies e a arquitetura estrutural do biofilme (KLEIN *et al.* 2015).

A síntese de frutanos também ocorre extracelularmente a partir da ligação de moléculas de frutose liberadas pela hidrólise da sacarose, sendo sintetizados pela enzima frutossiltransferase (Ftf). Embora se demonstre que o frutano pode contribuir para a formação de biofilme ao interagir com o glucano, eles são solúveis em água e, portanto, seu papel na formação da matriz extracelular de PEC é limitado. Acredita-se que o principal papel dos frutanos na virulência de *S. mutans* seja o fato de atuarem como reservatórios extracelulares de substratos, durante os períodos de escassez de nutrientes (ROZEN *et al.*, 2004). Quando na presença de sacarose, *S. mutans* pode absorver esse açúcar, no entanto ele também pode ser metabolizado extracelularmente formando os PECs que podem ser reinternalizados por permeases (OLIVEIRA *et al.* 2021). O que o diferencia é a capacidade de modulação rápida para a produção de PECs e formação de biofilmes cariogênicos quando na presença de substratos, como a sacarose. Já a glicose e frutose contribuem para a formação de SPE e aumento da matriz de biofilme (PAES LEME *et al.*, 2006; LEMOS & BURNE, 2008; KLEIN *et al.*, 2015).

O *S. mutans* apresenta uma forte acidogenicidade (produção de ácidos orgânicos) e aciduridade (capacidade de resistir e crescer em um ambiente com pH baixo), entretanto,

não é sempre o mais presente e várias espécies possuem semelhante resistência à acidez. A tolerância a acidez é baseada na presença de uma membrana, ácido-estável, F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase de translocação de prótons que pode manter o pH intracelular por volta de 7.5 e os genes que codificam estes componentes estão presente no genoma (QUIVEY *et al.*, 2001).

## **2.3 Fatores de virulência**

Como já mencionado, a *S. mutans* possui vários mecanismos que possibilitam manter seu nicho ecológico na cavidade oral e contra a defesa do hospedeiro, estando relacionados principalmente ao seu metabolismo (BANAS, 2004; PEDRAZA *et al.*, 2017; CAI *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2018; GUO *et al.*, 2021).

### **2.3.1 Formação de biofilme: Substâncias Poliméricas Extracelulares (SPE)**

A importância das substâncias poliméricas extracelulares tem sido mais aprofundada e associada à matriz do biofilme nos últimos anos já que os próprios microrganismos produzem exopolissacarídeos, ácidos nucleicos (eDNA e eRNA), proteínas e lipídeos que são responsáveis pela adesão microbiana entre si e em superfícies do ambiente. Desse modo, a SPE modela a camada mais externa do biofilme que é composta por uma malha hidratada e aniônica de exopolímeros de bactérias e moléculas do meio aprisionadas (FLEMMING *et al.*, 2016).

A adesão bacteriana em uma superfície abiótica é impulsionada principalmente por forças não específicas enquanto a adesão a superfícies bióticas é geralmente impulsionada por mecanismos moleculares, como adesinas. A fixação inicial inespecífica é reversível, o que permite o retorno da bactéria à forma planctônica (Koo *et al.*, 2017). A fixação irreversível pode ser alcançada por adesinas na superfície celular que se ligam ao substrato. Após essa fixação, a adesão celular ocorre quando as células adjacentes são conectadas por vários componentes da SPE, portanto, quanto mais produção de SPE, maior o fortalecimento da adesão (PANLILIO & RICE, 2021).

A presença de substratos, o tipo de microrganismos, presença de antimicrobianos e estresse são fatores que afetam a estrutura e a composição de SPE. As biomoléculas que as compõem podem estar associadas à superfície celular ou secretadas na região extracelular. Em biofilmes orais, proteínas salivares oriundas da dieta são componentes da estrutura da matriz e

auxiliam na adesão e nutrição microbiana. A SPE do biofilme serve como uma barreira física protegendo de perigos do ambiente; sua produção na superfície dentária aumenta o acúmulo microbiano e de substratos, consequentemente levando a um maior desenvolvimento do biofilme (CAI *et al.*, 2016; BOWEN *et al.*, 2018). A SPE, também, interage com antimicrobianos reduzindo a atividade antibacteriana, porque os microrganismos ficam envolvidos apresentando tolerância a antimicrobianos, como a clorexidina (KLEIN *et al.*, 2015; BOTELHO *et al.*, 2016; KOO *et al.*, 2017).

### **2.3.2 Produção de Polissacarídeos Extracelulares (PECs)**

Os PECs são macromoléculas compostas de dez ou mais açúcares conectados através de ligações glicosídicas, possuem a capacidade de armazenar nutrientes e fornecer proteção. Essas substâncias são atributos importantes para a persistência e virulência de *S. mutans*, principalmente em períodos de ausência de substratos. A produção de PECs solúveis e insolúveis já denominados glucanos por glucosiltransferases de *S. mutans* é favorecida em uma matriz rica em SPE. Frutanos também são produzidos por frutosiltransferases, porém em menor quantidade. A maturação deste processo auxilia em nichos de proteção e de manutenção de um pH ácido, contribuindo para um caráter virulento e persistência do biofilme e progressão da cárie dental (KOO *et al.*, 2017; XIA *et al.*, 2019).

Biofilmes dentários são ricos em polissacarídeos que constituem cerca de 40% do seu peso seco, podendo ser solúveis ou insolúveis. Os insolúveis dão uma característica densa e impermeável à matriz extracelular e podem prevenir a neutralização da acidez do biofilme pela saliva. Períodos de “fome” e “abundância” de carboidratos (“feast” e “famine”) alteram o metabolismo bacteriano, resultando em reservas do excesso desses componentes para aqueles momentos de necessidade energética. A produção de PECs por microrganismos que compõem biofilmes orais é proporcional à disponibilidade de substratos e consequentemente o aumento de síntese de SPE (GUO *et al.*, 2015; DIAZ-GARRIDO, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017; LOBO *et al.*, 2019).

### **2.4 DNA extracelular (eDNA)**

O genoma bacteriano, geralmente, é uma única molécula de DNA em fita dupla e a bactéria também possui extensões extracromossomais de DNA denominados plasmídeos.

Além disso, o DNA pode estar presente fora da célula, localizado na matriz do biofilme, sendo denominado DNA extracelular (eDNA) (PANLILIO & RICE, 2021).

A primeira observação de DNA como componente da matriz de biofilmes foi descrita em 1956, ao se utilizar uma enzima bovina denominada DNase I, tendo sido possível reduzir a viscosidade do biofilme (CATLIN, 1956). A presença de eDNA melhor descrita depois em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus intermedius* e *Streptococcus mutans* (WHITCHURCH *et al.*, 2002) e sua presença em biofilmes bacterianos, animais, seres humanos em sedimentos oceânicos é um indício de um importante papel no microbioma de seres vivos (DELL'ANNO *et al.*, 2005; TETZ *et al.*, 2009). Provavelmente, esse componente é gerado a partir de células vivas através de vesículas de membranas compostas de lipídeos ou que sofreram lise em uma subpopulação da comunidade. Estudos têm evidenciado a presença de eDNA independente da presença de lise celular e em *S. mutans*, tal presença é produto de autólise podendo o eDNA ser secretado via microvesículas (WHITCHURCH *et al.*, 2002; PERRY *et al.*, 2009; BARNES *et al.*, 2012).

Acredita-se que o eDNA esteja envolvido no fornecimento de substratos para as células adjacentes, na integridade e na manutenção da estrutura tridimensional de biofilmes, estabilização de cargas e na troca de material genético (PERRY *et al.*, 2009; SCHLAFER *et al.*, 2017; PEDRAZA *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2018). Estudos têm demonstrado que ocorre uma maior formação de biofilme na presença de eDNA fragmentado do que na presença de eDNA íntegro, além de uma maior formação também na presença de um DNA genômico fragmentado, uma explicação para isso pode ser uma melhor interação entre o eDNA e proteínas presentes na matriz do biofilme (DENG *et al.*, 2020).

O eDNA pode contribuir para um aumento da matriz extracelular através do aumento de produção de glucanos e conseqüentemente, um aumento de adesão (PEDRAZA *et al.*, 2017), formação de biofilme, estabilidade e integridade estrutural (PETERSEN *et al.*, 2005). Uma maior adesão de biofilmes em discos de hidroxiapatita foi demonstrada na presença de eDNA e sacarose, enquanto que nenhum efeito foi encontrado na ausência de açúcares, assim o eDNA por contribuir para a estabilidade do biofilme dental, pode potencializar o aparecimento e severidade da cárie dentária (SCHLAFER *et al.*, 2017).

## **2.5 Estratégias como alvo eDNA - Enzima DNase I**

Uma vez que o eDNA tem um papel importante na formação e adesão do biofilme, a utilização da DNase I por ter como alvo esse componente da matriz tem sido considerada como estratégia no combate a biofilmes cariogênicos. A DNase é uma enzima denominada endonuclease, capaz de hidrolisar as ligações entre nucleotídeos produzindo mono e oligodesoxirribonucleotídeos com os grupos 5'-fostato e 3'-OH. As ligações fosfodiéster são extremamente estáveis para sofrerem uma hidrólise espontânea, por isso existe a necessidade de acelerar a velocidade dessa hidrólise (NISHINO & MORIKAWA, 2002). Estas enzimas possuem um papel crucial no processo de reparo do DNA e podem ser divididas em duas famílias, DNase I e II, que se diferenciam de acordo com suas propriedades biológicas e biomecânicas, bem como pela produção específica em tecidos. A família da DNase I inclui 4 tipos (DNase I, DNase1L1, DNase1L2 e DNase1L3), enquanto que a família da DNase II inclui três tipos de DNases (DNase II $\alpha$ , DNase II $\beta$  e L-DNase II) (MANUALS THERMO FISHER, 2016; LAUKOVÁ *et al.*, 2020). Diferenças estão dispostas na tabela 1.

Tabela 1- Características diferentes tipos de DNases. Adaptado de LAUKOVÁ *et al.*, 2020.

Nome	Família DNase I		Família DNase II				
	DNase I	DNase1L3	DNase 1L1	DNase1L2	DNase II $\alpha$	DNase II $\beta$	L-DNase II
Massa Molecular	38	33	34	33	43	40	27
pH ideal	6,5-8	6,5-8	6,5-8	5,6	4,8-5,2	4,8-5,2	4,8-5,2
Ativação por Mg <sup>2+</sup> e Ca <sup>2+</sup>	+	+	+	+	-	-	-
Inibição por EDTA/EGTA	+	+	+	+	-	-	-
Inibição por Actina G	+	-	-	-	-	-	-
Orgãos que produzem	Pâncreas	Baço, fígado	Músculos, miocárdio	Cérebro, pulmões, placenta e pele	Todos os tecidos	Glândulas salivares	Baço
Gene que codifica	<i>DNASE1</i>	<i>DNASE1L3</i>	<i>DNASE1L1</i>	<i>DNASE1L2</i>	<i>DNASE2</i>	<i>DNASE2B</i>	<i>SERPINB1</i>
Localização no gene humano	16p13.3	3p14.3	Xq28	16p13.3	19p13.2	1p22.3	6q25.2
Número de exóns	17	8	10	7	6	6	9

A DNase I é ativa em um pH de 6.5-8, cliva DNA dupla fita de 100 a 500 vezes mais efetivamente que DNA fita simples e é produzida pela maioria dos órgãos do sistema digestivo humano (TAKESHITA *et al.*, 2000). Desempenha importantes papéis fisiológicos como a digestão de nucleoproteínas extracelulares, prevenindo reações imunes, e a redução da sua atividade, pode contribuir para o desenvolvimento de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LEFFER *et al.*, 2015). Aliado a isso, pelo DNA contribuir para a alta viscosidade da secreção pulmonar, o tratamento com DNase I apresentou efeitos positivos em fibrose cística, asma, doença pulmonar obstrutiva e doenças pulmonares crônicas, ao diminuir os níveis de DNA nos alvéolos pulmonares (LAUKOVÁ *et al.*, 2020). A DNase II, primeiramente denominada “DNase ácida”, foi posteriormente definida dessa maneira para diferenciar da DNase I (CUNNINGHAM & LASKOWSKI, 1953). Embora funcione como uma endonuclease geral, que cliva o DNA sem especificidade de sequência aparente, sua interação física com o DNA possui algumas preferências e limitações. A enzima foi primeiramente descoberta em mamíferos, porém apenas em estudos em *C. elegans*, um nemátodo, suas funções foram mais compreendidas, possuindo uma variada distribuição tecidual, melhor atividade em pH ácido, não requer cofatores para um efeito catalítico eficiente e está associada com lisossomos (SULSTON, 1976; HEDGECOCK *et al.*, 1983; EVANS & AGUILERA, 2003). Por sua limitação em condições ácidas e atividade mais inespecífica na clivagem de nucleotídeos, a DNase II é preterida em relação à DNase I em dissolução de biofilmes (EVANS & AGUILERA, 2003; VARELA-RAMIREZ *et al.*, 2017) .

Durante estudos em biofilmes de *P. aeruginosa*, foi avaliado através de métodos colorimétricos e eletroforese a presença de DNA extracelular e gerado uma hipótese da importância do papel do DNA na formação de biofilmes. Ao adicionar DNase I ao meio de cultura, houve uma forte inibição de formação de biofilme, no entanto não do crescimento bacteriano (O'TOOLE & KOLTER, 1998).

WHITCHURCH *et al.* (2002) investigou a ação da enzima também em *P. aeruginosa* em condições planctônicas, apresentando nenhuma ou poucas células aderidas, e em biofilmes de 12, 36, 60 h apresentando dissolução e de 84 h em menor grau. Esses resultados indicam que o tratamento com DNase I pode ser benéfico em estágios iniciais de formação de biofilme e na prevenção de infecções por *P. aeruginosa*. TETZ *et al.* (2008) demonstrou a redução em 28% a 70% da biomassa de biofilmes de 24 h de *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus*

*aureus*, *Streptococcus pyogenes*, e *Acinetobacter baumannii* concentrações de DNase que variaram de 0,5 a 1,000 µg/ml.

Em biofilmes de 6 dias de formação de *Streptococcus pneumoniae* (HALL-STOODLEY *et al.*, 2008), houve redução com tratamentos por 15 min com a enzima em concentrações de 1, 100 µg/ml e 1 mg/ml. Em tratamentos por todo o experimento com DNase I em concentrações 0,001 mg/ml ou 0,002 mg/ml em biofilmes de *A. oris*, *C. albicans*, *F. nucleatum*, *S. mutans*, e *S. oralis*, houve redução do biofilme (KARYGIANNI *et al.*, 2020). No entanto, em exposições em tempos específicos, não houve mudanças mensuráveis nos biofilmes bacterianos (KARYGIANNI *et al.*, 2021).

Em biofilmes de *S. mutans* e *C. albicans* patógenos cariogênicos e relacionados com biofilmes orais, a DNase I apresentou efeito significativo na diminuição de formação de biofilmes duoespécie nos estágios iniciais e de viabilidade celular (GUO *et al.*, 2021). Um estudo relacionando a ação da DNase na presença de sacarose mais amido (KLEIN *et al.*, 2010) encontrou uma redução de aproximadamente 30% na biomassa de biofilme de *S. mutans* em relação aos biofilmes não tratados, enquanto que na presença apenas de sacarose, não obteve uma diferença significativa de biomassa. O eDNA pode ser uma alternativa como alvo pela enzima DNase I na dissolução de biofilmes orais e na prevenção de cáries.

## 2.6 Clorexidina

A clorexidina (CHX) é um dos antissépticos mais utilizados da desinfecção de pele e mucosas e possui duas formas de atuação de acordo com os dois tipos de sais dos quais é proveniente: digluconato, um antimicrobiano de características desinfetantes e sanitizantes, e o dicloridrato, mais utilizado para agir na parede do intestino recuperando e estabilizando a integridade da microbiota intestinal. Na odontologia, o digluconato é utilizado em enxaguatórios e irrigações orais, ajudando no controle de doenças biofilme dependentes como a cárie dentária, na descontaminação da orofaringe e desinfecção para o tratamento endodôntico. Trata-se de uma molécula catiônica composta por duas estruturas simétricas com quatro anéis de clorofenil e dois grupos biguanida ligados por uma ponte hexametileno. Sua atividade biológica se deve à presença de cloro simples em ambos os anéis fenólicos que a constitui, sua fórmula química é  $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$  (STEINBERG & ROTHMAN, 1996; KARPINSKI & SZKASRADKIEWICZ, 2015).

Como antisséptico oral é utilizado geralmente na concentração de 0,12%, enquanto que como desinfetante em tratamentos endodônticos, geralmente na concentração de 2%. Em concentrações a partir de 2%, a clorexidina é bactericida causando dano à parede bacteriana. Seu mecanismo de ação consiste na ruptura da parede celular microbiana e precipitação dos componentes internos com conseqüente morte celular. Em doses menores a 2%, inibe o transporte de açúcar, a produção de ácido e inibe a ação de enzimas responsáveis pela manutenção de um pH intracelular bacteriano (SCREENIVASAN *et al.*, 2002; MARTI *et al.*, 2014). Tem sido demonstrado ser uma substância segura e estável na redução de biofilmes bacterianos (JONES, 1997).

A clorexidina atua na prevenção da cárie dentária através do controle da placa bacteriana. Por sua natureza dicídica (interage fortemente com ânions), persiste com sua atividade antisséptica conferindo sua característica de substantividade, ou seja, a capacidade de se aderir à superfície dentária e então, ser lentamente liberada (SUSUKI *et al.*, 2020). Para ocorrer sua atividade, a clorexidina deve alcançar a superfície dentária em sua forma ativa, já resultando em reduções de unidades formadoras de colônias bacterianas. Essa redução persiste por algumas horas devido à sua substantividade (JONES, 1997). A relação de adesão da clorexidina na superfície dentária, bloqueio de grupos ácidos de glicoproteínas salivares e precipitação de fatores de aglutinação ácida e deslocamento de cálcio na saliva interferem na aderência bacteriana (RÖLLA & MELSEN, 1975).

A ação antibacteriana da CHX tem sido demonstrada na literatura (EMILSON, 1977) e a ação antibiofilme tem sido demonstrada em biofilmes de *Candida albicans* (ALVENDAL *et al.*, 2020), *Enterococcus faecalis* (LI *et al.*, 2012) *S. mutans* (VITKOV *et al.*, 2005; SUSUKI *et al.*, 2020), *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus oralis* (SUSUKI *et al.*, 2020) e em biofilmes formados em peças protéticas (ANDRADE *et al.*, 2012). A associação da CHX a outros agentes com características antimicrobianas, como nanopartículas de sílica (LI *et al.*, 2016), com o objetivo de aprimorar suas atividades tem sido descrito na literatura. A associação de tratamentos enzimáticos (proteínase K e DNase I) demonstrou uma inibição da formação e da integridade estrutural de biofilmes de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Actinomyces oris*, *Veillonella dispar* e *Candida albicans* (GRÄNICHER *et al.*, 2021). A combinação de enzimas que causam ruptura da matriz de biofilme com agentes antissépticos é uma abordagem promissora para controle de biofilmes orais.

### 3. PERGUNTA DE PARTIDA

A clorexidina a 0,12% tem a sua atividade antisséptica potencializada em biofilmes maduros quando da aplicação prévia da enzima DNase I em biofilmes de *Streptococcus mutans* formados sob a exposição de sacarose, glicose e frutose ou ausência de exposição a açúcares?

#### 4. HIPÓTESE

Considerando que a presença de eDNA parece ter um importante papel na integridade e na manutenção da estrutura tridimensional de biofilmes, o uso prévio de nucleases como a DNase I, visando hidrolisar ligações entre nucleotídeos, pode potencializar o efeito antisséptico da clorexidina quando aplicada em biofilmes maduros de *S. mutans*, ainda que esses biofilmes tenham sido formados em diferentes condições de substância polimérica extracelular determinada pela exposição a diferentes açúcares.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo geral:

Avaliar ação antisséptica da clorexidina quando associada com a DNase na formação de biofilmes de *Streptococcus mutans*, formados sob a exposição à sacarose, frutose e glicose ou ausência de açúcares.

### 5.1 Objetivos específicos:

Quantificar a biomassa e metabolismo de células viáveis em biofilmes de *S. mutans* formados em placa na presença de sacarose, glicose e frutose ou ausência de exposição aos açúcares e expostos à DNase e CHX.

Quantificar o número de UFCs e peso seco na exposição aos açúcares, e tratamento com CHX ou a associação de CHX e DNase I em biofilme de *S. mutans* formados sobre discos de hidroxiapatita posicionados verticalmente.

Analisar a produção de polissacarídeos extracelulares solúveis (PECS) e insolúveis (PECI) em biofilmes de *S. mutans* formados sobre discos de hidroxiapatita quanto à exposição sacarose, glicose mais frutose ou ausência de exposição aos açúcares.

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Cepa Bacteriana

O estudo foi realizado *in vitro* utilizando a cepa ATCC UA159 de *Streptococcus mutans*, armazenada a  $-80^{\circ}$ , fornecida pelo Laboratório de Microbiologia do curso de Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará (UFC).

### 6.2 Delineamento experimental

O presente estudo foi dividido em duas fases, nos quais os grupos experimentais foram divididos de acordo a exposição aos diferentes açúcares durante a formação do biofilme em fundo de placa de microtitulação de 96 poços (Kasvi<sup>®</sup>, Curitiba, PR, Brasil) ou sobre discos de hidroxiapatita (HA) (diâmetro de 05 mm, Clarkson Chromatography Inc., PA, EUA) (GUGGENHEIM *et al.* 2001; CCAHUANA VÁSQUEZ & CURY, 2010; MARTTINEN *et al.* 2013).

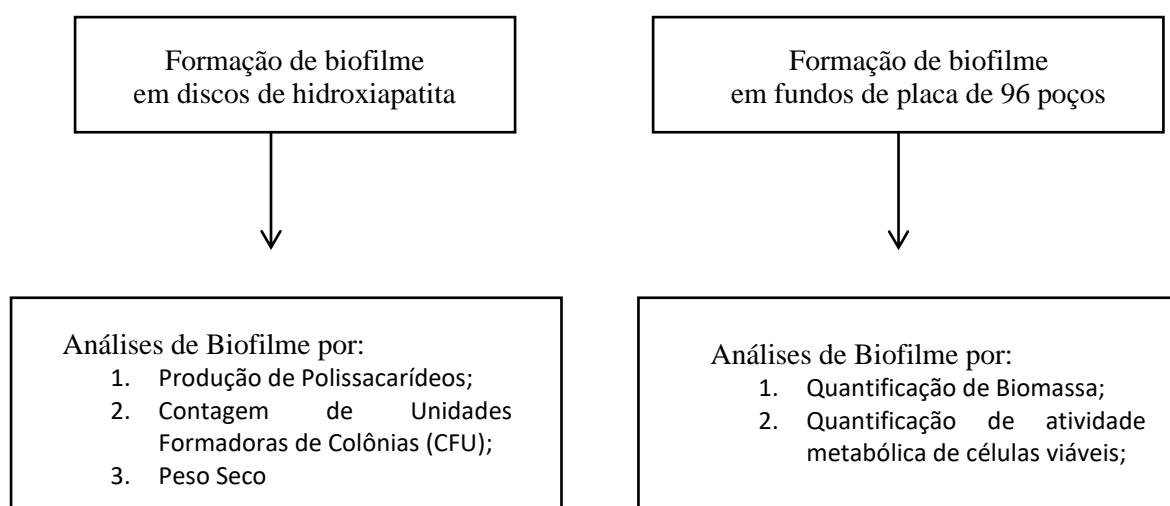


Figura 2: Esquema do Experimento. Testes realizados por protocolo de formação de biofilme. Fonte: autor.

Em biofilmes formados em placas de 96 poços foi utilizado um delineamento fatorial (3x3x2) *in vitro* com os fatores em estudo: açúcares em três níveis (ausência de açúcar, glicose 5% + frutose 5% e sacarose 10%), DNase associada à CHX em três níveis (ausência de aplicação de DNase e de aplicação de CHX; ausência de DNase com aplicação de CHX com 11 h ou 35 h de formação do biofilme; aplicação de DNase na 0 h e 24 h de formação do biofilme em associação com a clorexidina) e fator tempo (24 e 48 horas), resultando em 18 grupos experimentais com 3 replicatas biológicas (experimentos) e duas replicatas técnicas (biofilmes em cada experimento). A escolha das concentrações dos açúcares foi baseada em estudos anteriores realizados em biofilme de *S. mutans* para observar uma maior formação de biofilme e de unidades formadoras de colônias, simulando a influência da dieta e dos substratos mais disponíveis na cavidade oral (CCAHUANA VÁSQUEZ & CURY, 2010). A concentração de DNase I foi baseada em estudos anteriores (KARYGIANNI *et al.*, 2020). Os grupos são demonstrados na tabela 2:

Tabela 2- Grupos experimentais no experimento em placas de 96 poços. SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle. CHX: Clorexidina 0,12%.

Nome do Grupo	Tempo de Biofilme	Características do grupo
SC	24 e 48 h	Biofilme exposto à sacarose a 10%
SC/CHX	24 e 48 h	Biofilme exposto à sacarose a 10% e CHX
SC/DNase/CHX	24 e 48 h	Biofilme exposto à sacarose a 10%, DNase e CHX a 0,12%
G+F	24 e 48 h	Biofilme exposto à glicose 5% + frutose 5%
G+F/CHX	24 e 48 h	Biofilme exposto à glicose 5% + frutose 5% e CHX a 0,12%
G+F/DNase/CHX	24 e 48 h	Biofilme exposto à glicose 5% + frutose 5%, DNase e CHX a 0,12%
C	24 e 48 h	Biofilme exposto à solução de NaCl 0,9%
C/CHX	24 e 48 h	Biofilme exposto à solução de NaCl 0,9% e CHX a 0,12%
C/DNase/CHX	24 e 48 h	Biofilme exposto solução de NaCl 0,9%, DNase e CHX a 0,12%

Em biofilmes formados em discos de HA, foi utilizado um delineamento fatorial (3x3) *in vitro* com os fatores em estudo: açúcares em três níveis (ausência de açúcar, glicose5%+frutose5% e sacarose10%) e DNase associada à CHX em três níveis (ausência de DNase e CHX; ausência de DNase e de aplicação de CHX com 72 h de formação do biofilme e DNase com 8 h e CHX com 72 h de formação do biofilme), constituindo 9 grupos experimentais com 3 replicatas biológicas e duas replicatas técnicas como descritos na tabela 3.

Tabela 3- Grupos experimentais no experimento com discos de hidroxiapatita. SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle. CHX: Clorexidina 0,12%.

Nome do Grupo	Características do grupo
SC	Biofilme exposto à sacarose a 10%
SC/CHX	Biofilme exposto à sacarose a 10% e CHX
SC/DNase/CHX	Biofilme exposto à sacarose a 10%, DNase e CHX a 0,12%
G+F	Biofilme exposto à glicose 5% + frutose 5%
G+F/CHX	Biofilme exposto à glicose 5% + frutose 5% e CHX a 0,12%
G+F/DNase/CHX	Biofilme exposto à glicose 5% + frutose 5%, DNase e CHX a 0,12%
C	Biofilme exposto à solução de NaCl 0,9%
C/CHX	Biofilme exposto à solução de NaCl 0,9% e CHX a 0,12%
C/DNase/CHX	Biofilme exposto solução de NaCl 0,9%, DNase e CHX a 0,12%

### 6.3 Preparo dos açúcares

Os carboidratos foram preparados a partir de produtos P.A. de sacarose, glicose e frutose (Neon Comercial Ltda – Brasil ) diluídos em água destilada estéril, filtrados em membrana com poros de diâmetro de 0,22 µm (Kasvi<sup>®</sup>, Curitiba, Brasil) e armazenados em tubos de centrifugação estéreis para pronto uso. As concentrações finais foram sacarose a 10%, glicose a 5% mais frutose a 5%.

### 6.4 Condições de cultura bacteriana

Os microrganismos estavam conservados em meio caldo BHI (Brain Heart Infusion: Difco, Detroit, MI, EUA) adicionado com glicerina PA (Dinâmica Química Contemporânea, 99,50%). Após crescimento por 18 h em caldo BHI para ressuspensão, o microrganismo foi semeado em meio ágar sangue de carneiro 5% (Base Columbia, PLASTLABOR LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) e incubado a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 48 h. Então, dez colônias foram escolhidas e incubadas em caldo BHI por 18 horas. Após o tempo determinado, a solução foi lavada com PBS (Salina tamponada com Fosfato), ressuspensa em BHI e ajustada a turbidez da escala McFarland equivalente a 0,5 para obtenção do inóculo bacteriano. A densidade da suspensão foi determinada com espectrofotômetro (Genesys 20, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) ajustado em 600 nm, com uma absorbância final do inóculo entre 0,11-0,14. Como referência para a inicialização da leitura do aparelho foi utilizado PBS (BARBOSA *et al.*, 2016; BALDINO *et al.*, 2021). Todo inóculo bacteriano foi submetido ao teste de Gram.

### **6.5 Formação de biofilme em fundo de placas de 96 poços**

O biofilme foi cultivado em fundo de microplacas de microtitulação de 96 poços para a realização dos testes de cristal violeta e redução de MTT (LIAO *et al.*, 2014). Os poços foram adicionados de 100 µl de caldo BHI e 100 µl de inóculo bacteriano, em que 18 poços foram incubados por 24 h e 18 poços foram incubados por 48 h em estufa bacteriológica a 37° e 5% CO<sub>2</sub>. Um esquema de grupos está demonstrado na figura 3. Inicialmente, a placa foi incubada por 6 h para promover a adesão inicial dos microrganismos. Então, após este tempo, foram realizadas 6 exposições aos grupos de SC, G+F e C com intervalo de uma hora entre as exposições (nos horários de 13:00, 14:00, 15:00, 16:00, 17:00 e 18:00). Após cada exposição, o meio foi removido e o poço preenchido com 200 µl da solução do grupo correspondente. Após cinco minutos, a solução foi removida, o poço foi lavado por 3 vezes com 0,89 NaCl, adicionado um novo meio e a placa reposicionada em estufa bacteriológica. Após a última exposição, os poços foram lavados com 200 µl de PBS por três vezes para a remoção de células planctônicas e não aderidas e, adicionado um novo meio de BHI adicionado de 0.1 mM de glicose. Para os biofilmes de 48 h, o procedimento foi repetido por mais um dia. O experimento foi realizado em triplicata. O procedimento total é demonstrado na figura 4.

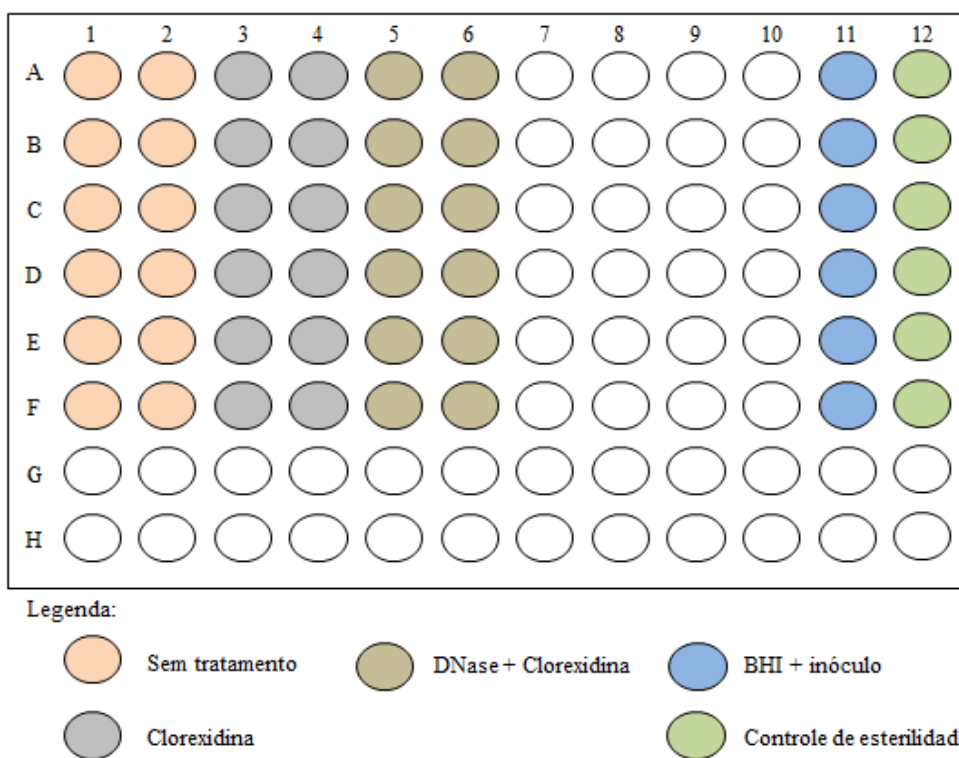


Figura 3: Esquema de grupos em placa de 96 poços. 18 poços para biofilme de 24 h e 18 poços para biofilme de 48 h. Fonte: autor.

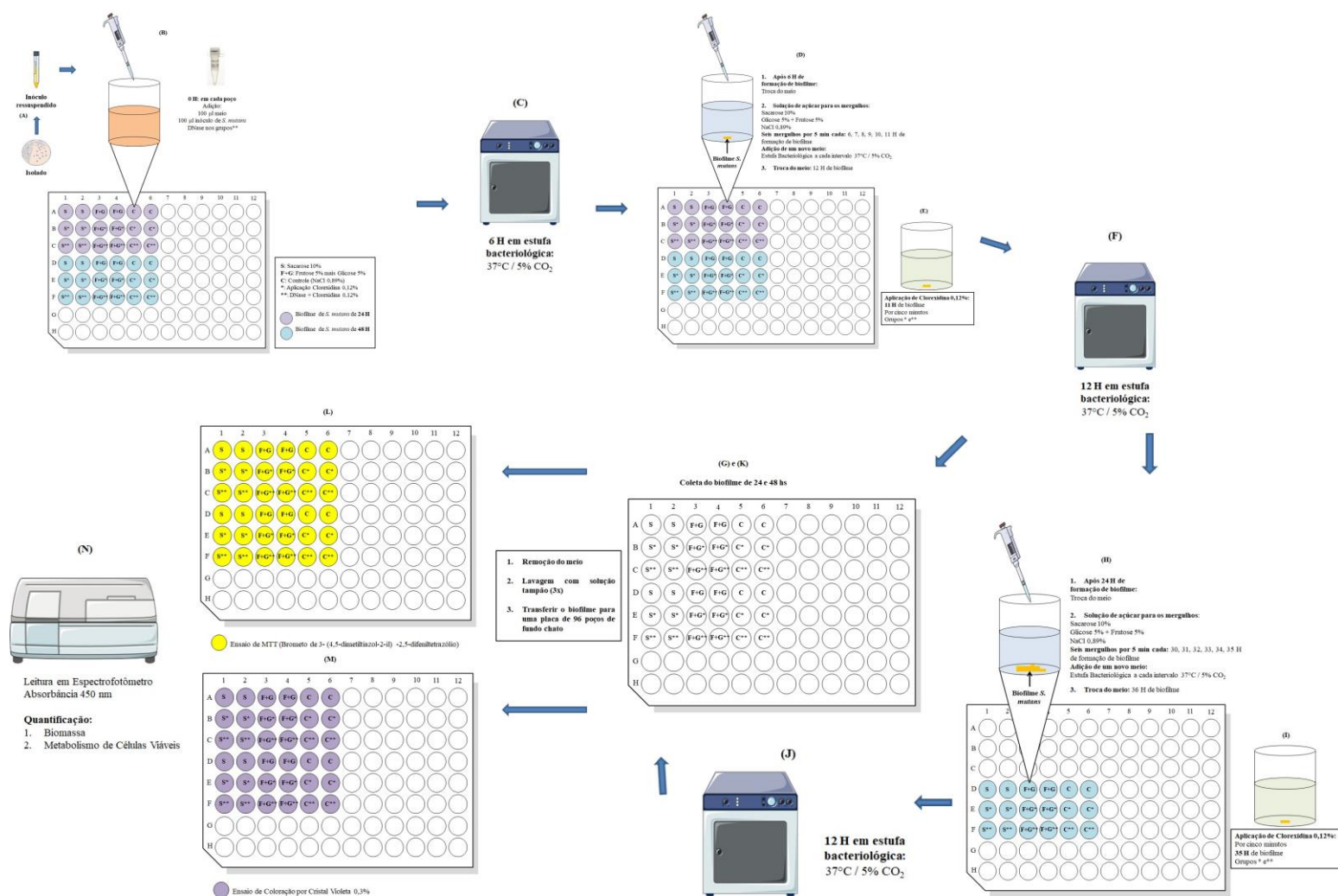


Figura 4: Esquema total do experimento de formação de biofilme de *S. mutans* em placa de 96 poços. S: sacarose 10%. G+F: glicose 5% mais frutose 5%. C: controle. CHX: clorexidina 0,12%. Fonte: autor.

## 6.6 Tratamento com clorexidina e DNase

O digluconato de clorexidina a 0,12% foi preparado e doado pela farmácia-escola da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE) da Universidade Federal do

Ceará. A clorexidina foi diluída em água destilada estéril até atingir a concentração desejada. A concentração de diluição em meio BHI da enzima DNase I (Invitrogen, Thermo Fisher, USA) foi de 0,002 mg/ml, de acordo com um estudo prévio (KARYGIANNI *et al.*, 2020). A aplicação da enzima se deu a partir da hora 0 de adição do inóculo aos poços. A ação da enzima permaneceu por 6 h até a primeira exposição aos grupos de carboidratos e ser realizada uma nova troca de meio. Após a sexta e a última exposição da solução de carboidrato correspondente ou 0,89 NaCl, foi adicionado 1 ml de CHX aos poços correspondentes, por 5 min. Os grupos que não foram expostos à clorexidina foram adicionados de 0,89% NaCl durante o mesmo tempo.

### **6.7 Quantificação de biomassa**

O ensaio de cristal violeta (CV) foi utilizado para a quantificação de biomassa. Posterior à remoção do meio, os poços foram lavados com 200 µl de PBS. Então, o fundo dos poços foi raspado e os biofilmes transferidos para uma placa de 96 poços de fundo chato. Foram adicionados 200 µl de metanol para a fixação do biofilme nos poços, por 15 min. Passado o tempo de ação, o metanol foi removido e 100 µl de 0,3% de solução de cristal violeta foram adicionados aos poços contendo apenas biofilmes secos. Após 20 min, o excesso de CV foi removido através da lavagem por 3 vezes com NaCl 0,89% estéril. 200 µl de ácido acético a 33% foram adicionados, e a placa foi incubada por 5 min. A placa foi levada para leitura em espectrofotômetro para a detecção de absorbância em 450 nm. Um poço com meio estéril foi utilizado como controle negativo. O procedimento foi realizado em triplicatas (SUN *et al.*, 2019).

### **6.8 Determinação de atividade metabólica de células viáveis**

O ensaio de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) foi utilizado para estimar a atividade metabólica de células vivas. Após a remoção do meio, os poços foram lavados 3 vezes com PBS, e então adicionado 200 µl de MTT (Invitrogen<sup>TM</sup>, NY, EUA) em concentração de 0,5 mg/ml. Após a ação por 3 h, envolto em papel alumínio abrigado de luz, a solução foi removida, e foi adicionado 100 µl de DMSO (Dimetilsulfóxido – Dinâmica<sup>®</sup>, Diadema, SP, Brasil), um solvente orgânico para dissolver os cristais de formazan formados. Após a ação do DMSO por 30 min, o meio foi transferido para uma placa

de fundo chato e lido em espectrofotômetro com uma absorvância de 450 nm. O procedimento foi realizado em triplicatas (SHUI *et al.*, 2021).

### 6.9 Formação de biofilme sobre discos HA

Os biofilmes de *S. mutans* foram formados em discos de hidroxiapatita posicionados em suportes confeccionados com fios ortodônticos de 0,8 mm (Morelli – Sorocaba, SP, Brasil), de acordo com o descrito por MARTTINEN *et al.* (2013) com modificações quanto a retenção dos discos, em triplicatas. O suporte de fio ortodôntico em contato com o disco foi soldado no suporte de fio posicionado na placa. Os discos e fios foram autoclavados previamente ao uso em tubos contendo água destilada. Os discos foram dispostos nos suportes em posição levemente inclinada simulando a estrutura dentária (figura 5). Então, os suportes de fios com os discos foram posicionados nos poços da placa de microtitulação, sem tocar o fundo, em que os poços foram preenchidos com 1 ml do inóculo bacteriano e 1 ml de caldo BHI (Figura 6).

A placa foi incubada por 8 h para promover a adesão inicial de microrganismos. Após a adesão, o meio foi trocado por um novo com a adição de 0.1 mM de glicose (D ANIDRA, DEXTROSE P.A.-A.C.S. Neon Comercial LTDA, São Paulo, SP, Brasil) e incubado por mais 16 h em 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em estufa bacteriológica, de acordo com CCAHUANA VÁSQUEZ & CURY (2010).

Após as 16 h, foi realizada a troca do meio novamente. Os dispositivos com os discos foram expostos (submersos) 7 vezes ao dia (08:00, 09:00, 10:00, 11:00, 12:00, 13:00, 14:00), durante 5 min, a um meio com SC, G+F ou C. Tubos de centrifugação de 50 ml (Kasvi®, Curitiba, Brasil) foram seccionados no marcador de 10 ml, esterilizados e a região inferior foi utilizada para depositar as soluções de açúcares ou NaCl 0,89%. Os suportes de fios ortodônticos com os discos foram cuidadosamente retirados da placa de 24 poços com uma pinça clínica e posicionados nos tubos seccionados com as soluções (figura 7). Após cada exposição, os discos foram lavados 3 vezes com NaCl 0,89%, reposicionados na placa de 24 poços e recolocados na estufa bacteriológica. Após 8 h da primeira troca do meio, o meio dos poços foi removidos com pipeta e os poços foram lavados com PBS para remoção de células não aderidas e, então, um novo meio adicionado. O procedimento foi repetido por mais 64 h relativos à maturação, completando 88 h de formação do biofilme. O experimento foi realizado em triplicatas. O procedimento total é demonstrado na figura 8.

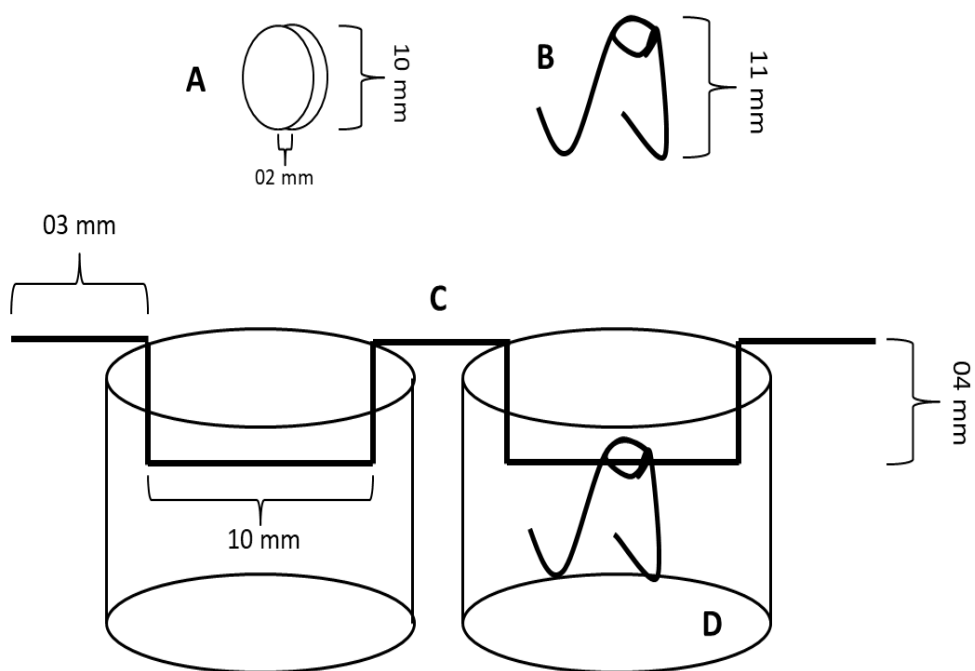


Figura 5: Suportes confeccionados a partir de fio ortodôntico duro elástico redondo 0,18". A: discos de hidroxiapatita; B: suporte para o disco, preso ao fio de apoio na placa de 24 poços; C: fio de apoio na placa de 24 poços (um para cada 04 poços); D: poço de placa de 24 poços. Fonte: autor.

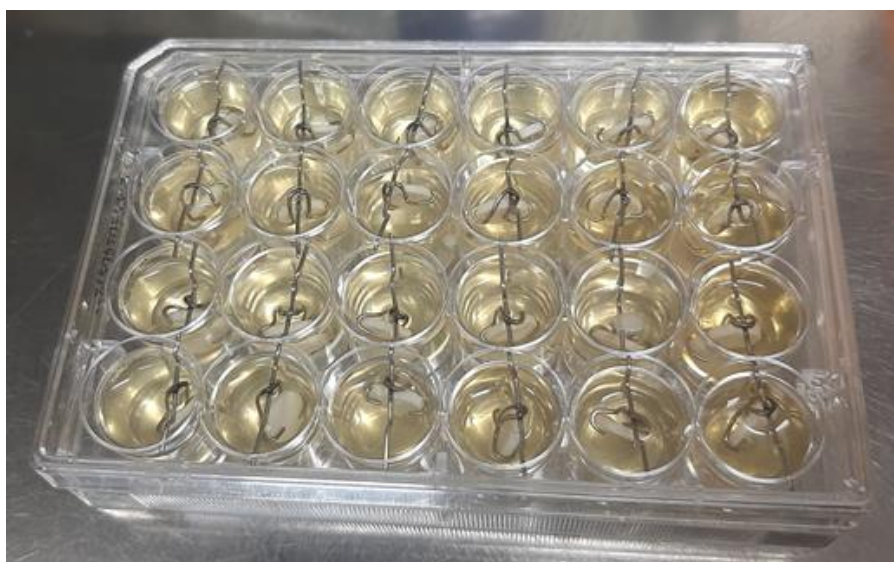


Figura 6: Placa de 24 poços com discos de hidroxiapatita em suportes de fios ortodônticos. Fonte: autor.

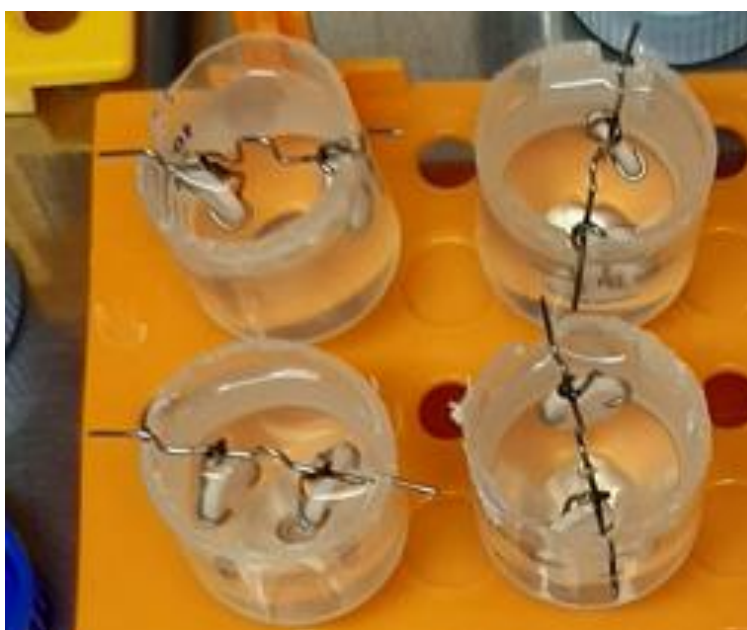
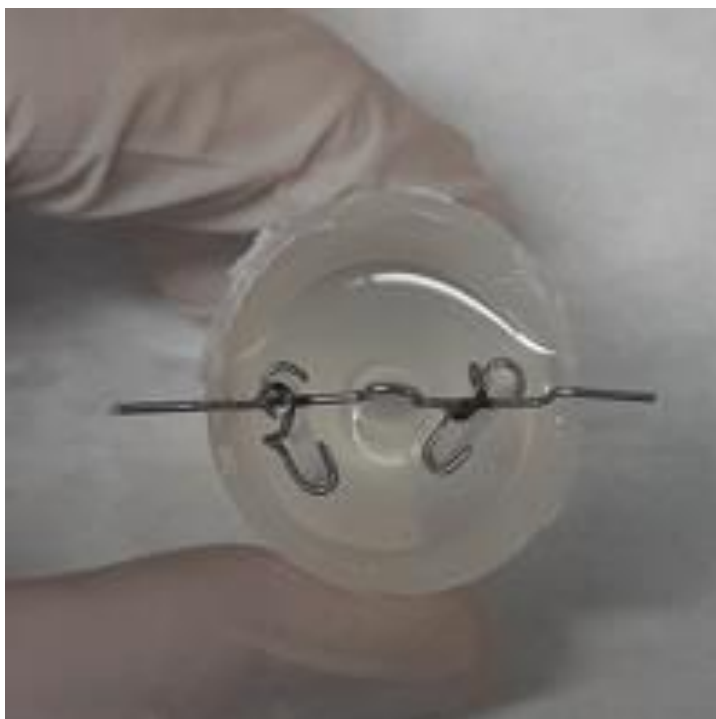
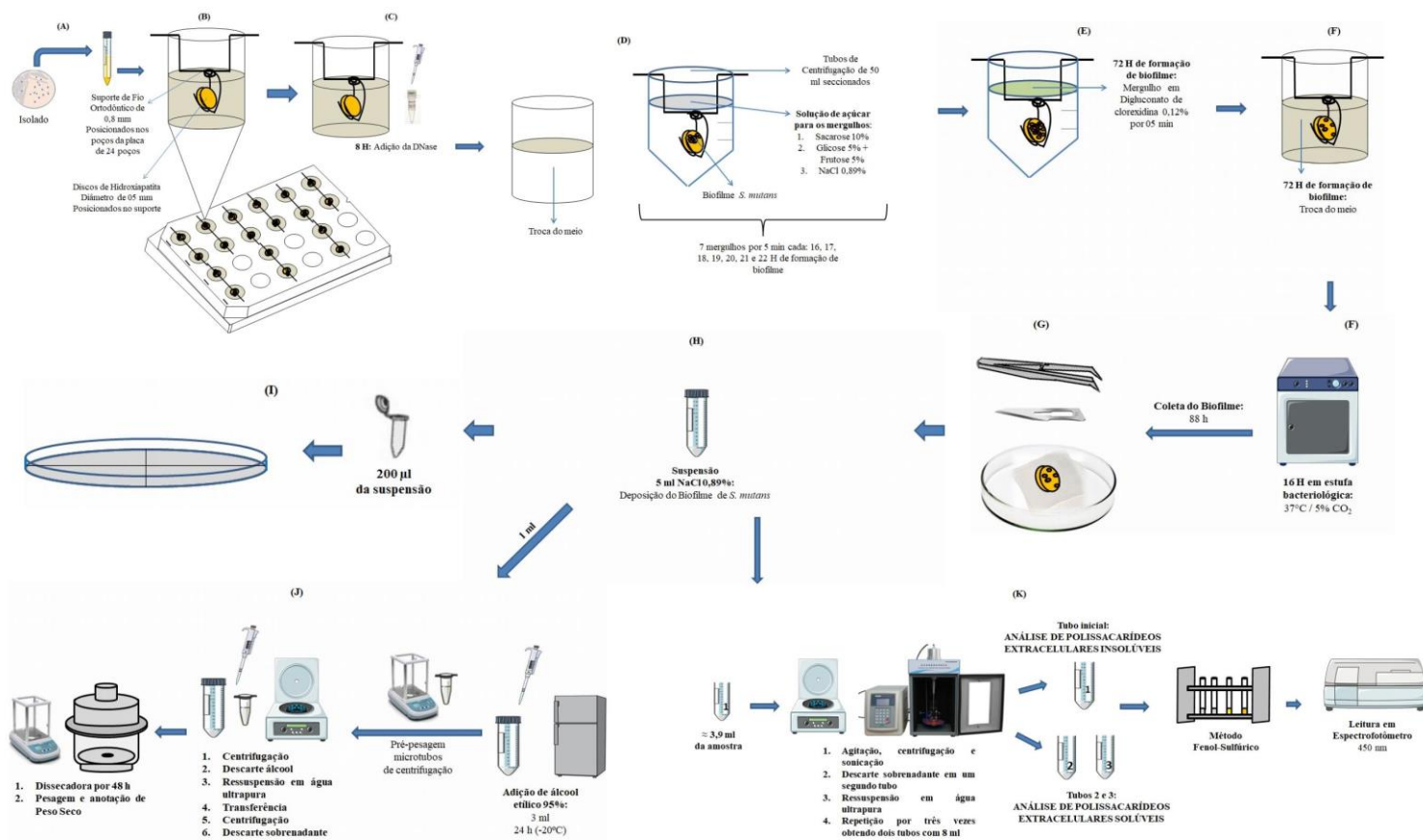


Figura 7: Tubos de centrifugação de 50 ml seccionados (superior) com as soluções e os suportes ortodônticos com os discos HA em posição (inferior). Fonte: autor.



### Legenda:

- A - *S. mutans* ressuspendido  
 B - 0 H: Adição inóculo e meio BHI  
 C - 8 H: Troca do meio e adição DNase  
 D - 16 H: Troca do meio. Realizado primeiro mergulho na solução de açúcar correspondente  
 E - 72 H: Mergulho em digluconato de clorexidina 0,12% por cinco minutos  
 F - Troca de meio e colocado em estufa bacteriológica  
 G - 88H: Coleta do biofilme com o auxílio de placa de vidro, pinça clínica, bisturi n° 11 e gaze estéreis  
 H - Biofilme depositado em um tubo de centrifuga com 5 ml de solução de NaCl 0,89%  
 I - 200 µl da suspensão diluído em série e realizado plaqueamento para contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)  
 J - 1 ml da suspensão utilizado para determinação de Peso Seco de biofilme  
 K - Aproximadamente 3,9 ml da amostra utilizado para determinação de Polissacarídeos Solúveis (PECS) e INSOLÚVEIS (PECI)

Figura 8: Esquema total do experimento de formação de biofilme de *S. mutans* na superfície de discos de hidroxiapatita. S: sacarose 10%. G+F: glicose 5% mais frutose 5%. C: controle. CHX: clorexidina 0,12%. Fonte: autor.

## 6.10 Tratamento com a Clorexidina e DNase

As mesmas condições de preparo e concentrações de clorexidina e da enzima DNase I utilizadas em biofilmes formados em placa de 96 poços foram usadas. Um esquema na figura 9 demonstra o protocolo de tratamento com clorexidina e associação com DNase I e de exposição à sacarose 10%, glicose 5% mais frutose 5% ou solução de NaCl a 0,89%. A aplicação da enzima foi realizada em adição ao meio na primeira troca de 8 h do meio

suplementado apenas com glicose a 0,1 MM, permanecendo por 16 h de ação. Os grupos de tratamento com clorexidina foram mergulhados na solução, depositada nos tubos de centrifugação seccionados, com 72 h de formação do biofilme, por 5 minutos. Os grupos que não foram mergulhados em clorexidina foram mergulhados em NaCl 0,89% durante o mesmo período de tempo. O procedimento foi realizado em triplicatas.

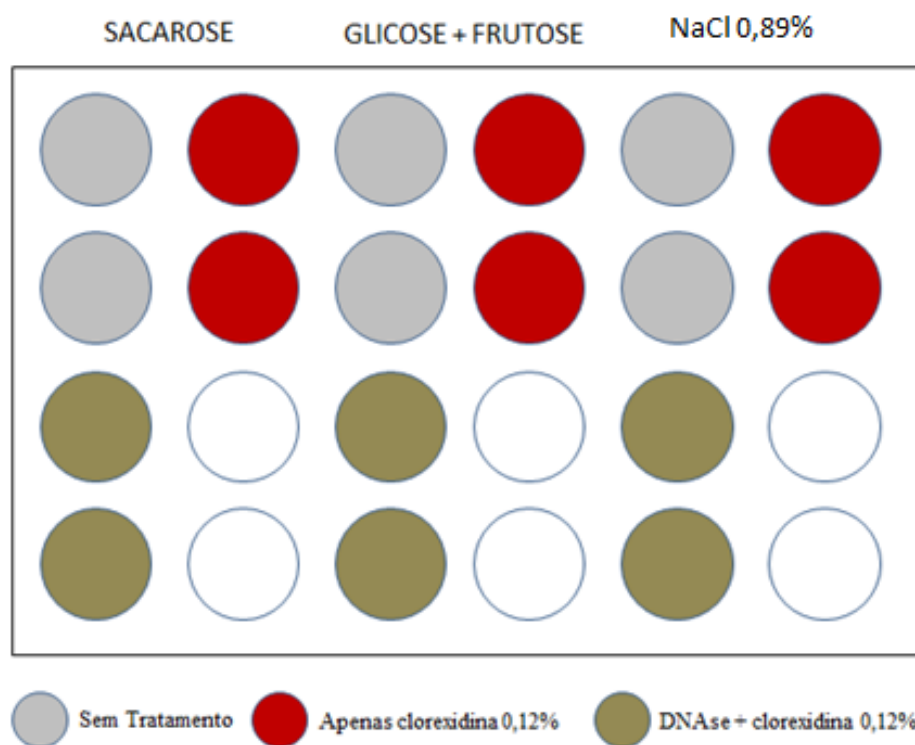


Figura 9: Esquema de grupos em placa de 24 poços. Fonte: autor.

### 6.11 Coleta do Biofilme

Em discos de hidroxiapatita, após a maturação do biofilme e tratamento nos grupos correspondentes, ao final de 88 h, as partes superior e laterais dos discos de hidroxiapatita foram gentilmente raspadas (figura 10) com o auxílio de pinças e lâminas de bisturi de aço carbono n.º 11 (SOLIDOR<sup>®</sup>, Lamedid, Barueri, SP, Brasil), e depositados em tubos de centrífuga de 15 ml contendo 5 ml de NaCl 0,89% e mantidos em gelo. Os tubos foram sonicados por 45 segundos, com intervalos de 15 s, sob refrigeração em um aparelho sonicador de alta potência (Digital Sonifer 450. Branson Ultrasonics Corporation 50/60Hz, 4<sup>a</sup>, Danbury, Connecticut, EUA).



Figura 10: Coleta de biofilme formado sobre discos de hidroxiapatita. Fonte: autor.

### 6.12 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

De cada amostra contida nos tubos de centrífugas, 200  $\mu$ l da suspensão foram transferidos para tubos de microcentrífuga, diluídos em série (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 e 1:1,000,000) e semeados em meio MSB (Mitis Salivarius com bacitracina e telurito de potássio). Após 48 h de incubação das placas, foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e valores finais expressados em UFC/ml/mg, associado ao peso seco do biofilme. Placas contendo entre 30 a 300 colônias foram contadas (KÖHLER & BRATTHALL, 1979).

### 6.13 Análise de Peso Seco de biofilme

A quantidade de 1 ml da suspensão coletada descrita anteriormente foi transferida para um novo tubo de centrífuga de 15 ml. Então, 3 ml de etanol P.A. 95% (DINÂMICA<sup>®</sup>, Diadema, SP, Brasil) frio (- 20 °C) foram adicionados (três vezes o volume da suspensão). Após 24 h, as suspensões foram agitadas e centrifugadas (durante 10 min em uma temperatura de 4 °C), em que o sobrenadante foi descartado, o *pellet* ressuscitado com 01 ml de água ultrapura, realizada homogeneização em agitador, transferência para um tubo de microcentrífuga e colocado em centrífuga por cinco minutos (180 g), em temperatura de 04°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado. Por fim, os tubos de microcentrífuga contendo os precipitados foram armazenados em uma dissecadora e, após 72 h, pesados em balança

(modelo: Auw220D; Shimadzu, Tóquio/Japão) com precisão de 5 casas decimais (Xiao *et al.*, 2007).

#### 6.14 Extração de Polissacarídeos

A extração dos polissacarídeos foi realizada utilizando a metodologia descrita por Lins de Sousa *et al.* (2015) com modificações. Após a coleta descrita anteriormente, uma parte do sobrenadante foi coletada, adicionado álcool PA e armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  pelo período mínimo de 18 h, enquanto um precipitado suspenso em 01 ml de água ultrapura foi utilizado para polissacarídeos insolúveis. Esse procedimento foi repetido em triplicata. O sobrenadante foi utilizado para a análise de polissacarídeo extracelular solúvel pelo método do ácido fenil-sulfúrico de Dubois *et al.*, 1956. Para a normalização dos dados de polissacarídeos solúveis, foi preparada uma curva padrão de glicose (figura 11) de concentrações 0,0025%, 0,0050%, 0,0075%, 0,01% e 0,0125%. As amostras foram lidas em espectrofotômetro em uma absorvância de 490 nm.

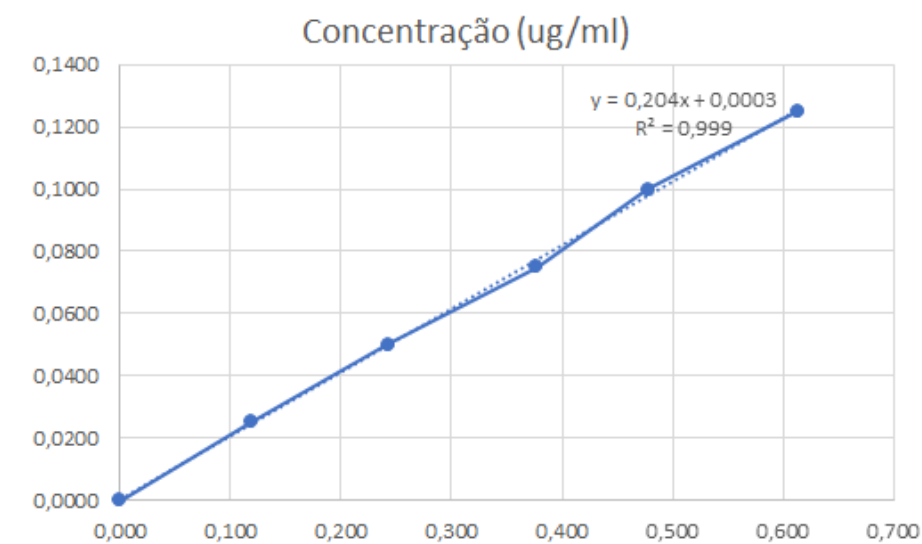


Figura 11: Curva Padrão Glicose para Polissacarídeo Solúvel. Fonte: autor.

O precipitado foi utilizado para a extração dos polissacarídeos insolúveis em água e solúveis em álcali. Para isso, foi utilizado NaOH 1 N (1% de peso seco de biofilme/0,3 ml de NaOH 1 N). Então, 950  $\mu\text{l}$  do sobrenadante que foi recolhido anteriormente, foram centrifugados e o precipitado foi ressuspensionado em NaOH 1N. Esse procedimento foi repetido 3 vezes. A quantidade total de carboidratos também foi determinada pelo método do ácido

fenol-ácido sulfúrico. Para a normalização dos dados de polissacarídeos insolúveis, foi preparada uma curva padrão de glicose com NaOH de concentrações 0,0025%, 0,0050%, 0,0075%, 0,01% e 0,0125%. As amostras foram lidas em espectrofotômetro em uma absorvância de 490 nm (Dubois *et al.*, 1956; Lins de Sousa *et al.*, 2015).

Os dados de absorvância de polissacarídeos solúveis e insolúveis foram calculados proporcionalmente ao peso seco do biofilme, obtendo-se um dado final em  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de peso seco.

#### **6.14 Análise estatística**

Os dados dos efeitos da CHX ou em associação com a enzima DNase e da exposição à sacarose 10%, glicose 5% e frutose 5% ou solução de NaCl a 0,89% na formação de biofilme de *S. mutans* foram expressos em forma de média e desvio-padrão e comparados por meio do teste ANOVA ou ANOVA-2-way (independentes ou para medidas repetidas), seguido de pós-teste de Bonferroni. Os valores em que  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises foram realizadas usando o software SPSS® versão 22.0.

### **7. RESULTADOS**

#### **7.1 Biofilmes formados em fundo de poços**

Os valores de média e desvio padrão estão dispostos na tabela 4.

Tabela 4 – Média e desvio padrão biofilmes formados em placa de 96 poços. CV: Biomassa por coloração com Cristal Violeta. MTT: Avaliação de atividade metabólica. SC: Sacarose 10%. CHX: Clorexidina 0,12%. DNase: aplicação da enzima DNase. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle.

	Grupos: Biofilme em placa de 96 poços								
	SC	SC/ CHX	SC/DNase/ CHX	G+F	G+F/ CHX	G+F/DNase/ CHX	C	C/CHX	C/DNase/ CHX
<b>CV (%)</b>									
24h	22,67 ±0,52	16,00 ±1,27	17,67 ±0,52	24,50 ±1,64	17,33 ±2,58	22,33 ±4,03	24,33 ±8,02	18,83 ±6,01	14,33 ±3,39
48h	69,00 ±35,43	38,67 ±17,50	39,83 ±26,74	55,33 ±36,87	30,83 ±25,26	28,33 ±18,98	34,00 ±16,48	26,00 ±19,61	22,00 ±16,04
<b>MTT (%)</b>									
24h	73,33 ±16,62	12,17 ±3,06	15,33 ±4,97	48,17 ±2,93	11,50 ±5,13	10,83 ±3,43	39,00 ±2,53	14,67 ±4,41	10,33 ±3,39
48h	35,17 ±2,14	15,50 ±5,13	17,50 ±5,75	34,50 ±7,53	17,67 ±6,56	15,17 ±4,96	30,50 ±9,18	14,17 ±5,46	14,17 ±5,46

A maior formação de biomassa estava presente no grupo formado sob exposição à sacarose de 48 h ( $69,0 \pm 35,4$ ), indicando uma maior formação de matriz de biofilme por *S. mutans* na presença deste açúcar. O menor valor de biomassa foi encontrado na ausência de açúcares em biofilmes de 24 h ( $14,3 \pm 3,4$ ), indicando a importância de substratos para o desenvolvimento da matriz do biofilme. O maior valor de metabolismo de células viáveis foi em biofilmes de 24 h formados em exposição à sacarose ( $73,3 \pm 16,6$ ), indicando que a presença de sacarose resulta em maiores interações metabólicas do que na presença de glicose e frutose em biofilmes de *S. mutans*, enquanto que o menor valor foi encontrado em biofilmes de 24 e 48 h formados na ausência de exposição a açúcares ( $10,3 \pm 3,4$ ).

### 7.1.1 Quantificação de biomassa

Os valores de quantificação de biomassa foram transformados em porcentagem (figuras 12a, 13a, 14a e 15a).

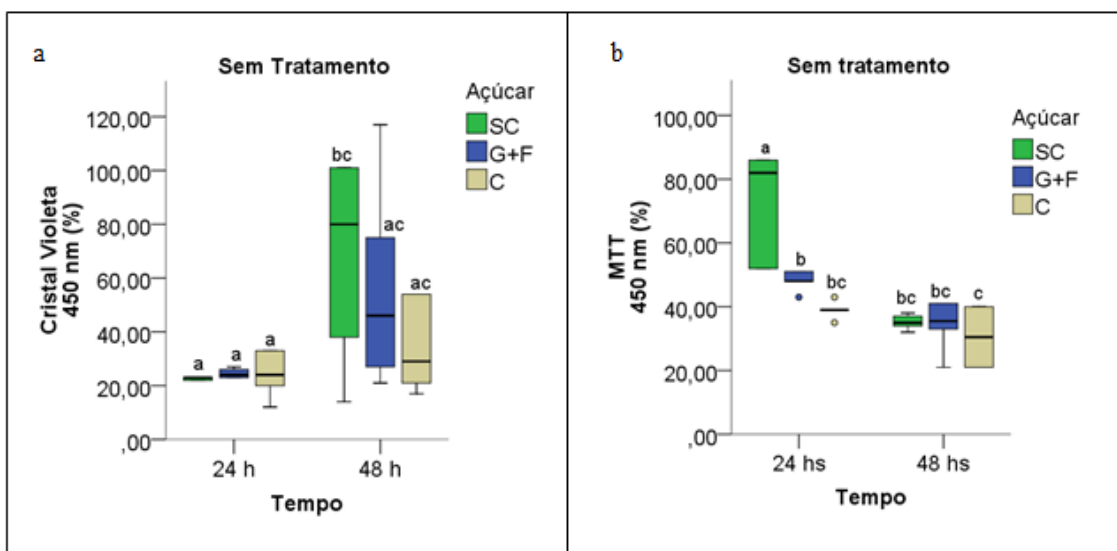


Figura 12: Biofilmes formados sem tratamento, apenas com exposição a diferentes açúcares em “a” (Média de Absorbância de Cristal Violeta em porcentagem) e “b” (Médias de Absorbância de MTT em porcentagem). SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. Letras diferentes denotam diferenças.  $p < 0,05$ , ANOVA.

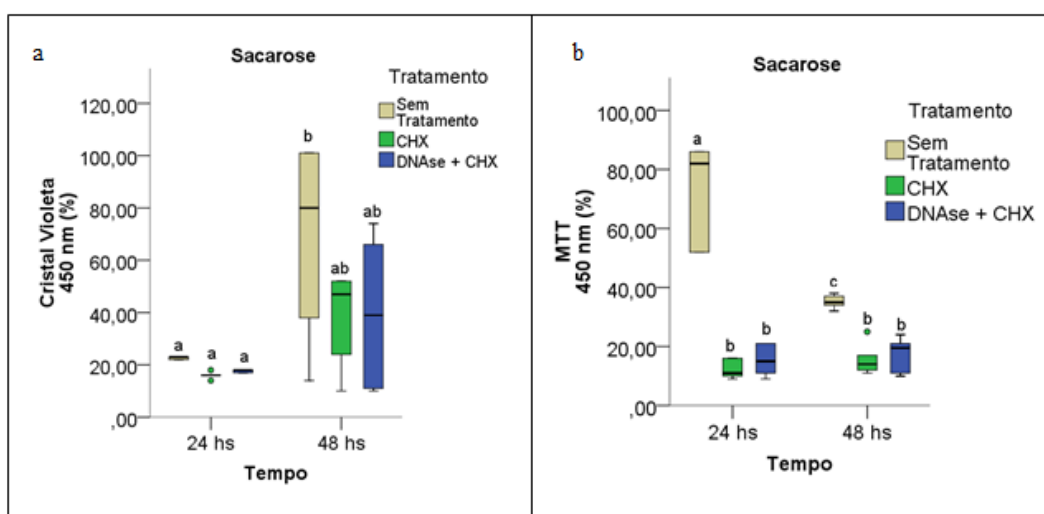


Figura 13: Biofilmes formados com exposição à sacarose 10% com tratamentos com CHX ou associação CHX e DNase I em “a” (Média de Absorbância de Cristal Violeta em porcentagem) e “b” (Médias de Absorbância de MTT em porcentagem). CHX: Clorexidina 0,12%. DNase: aplicação da enzima DNase. Letras diferentes denotam diferenças.  $p < 0,05$ , ANOVA.

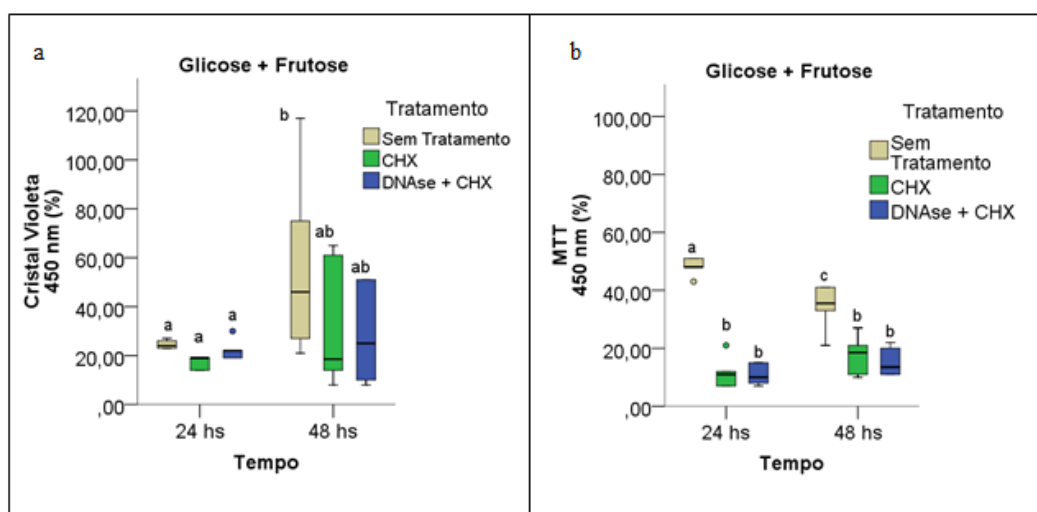


Figura 14: Biofilmes formados com exposição à glicose 5% e frutose 5% com tratamentos com CHX ou associação CHX e DNase I em “a” (Média de Absorbância de Cristal Violeta em porcentagem) e “b” (Médias de Absorbância de MTT em porcentagem). CHX: Clorexidina 0,12%. DNase: aplicação da enzima DNase. Letras diferentes denotam diferenças.  $p < 0,05$ , ANOVA.

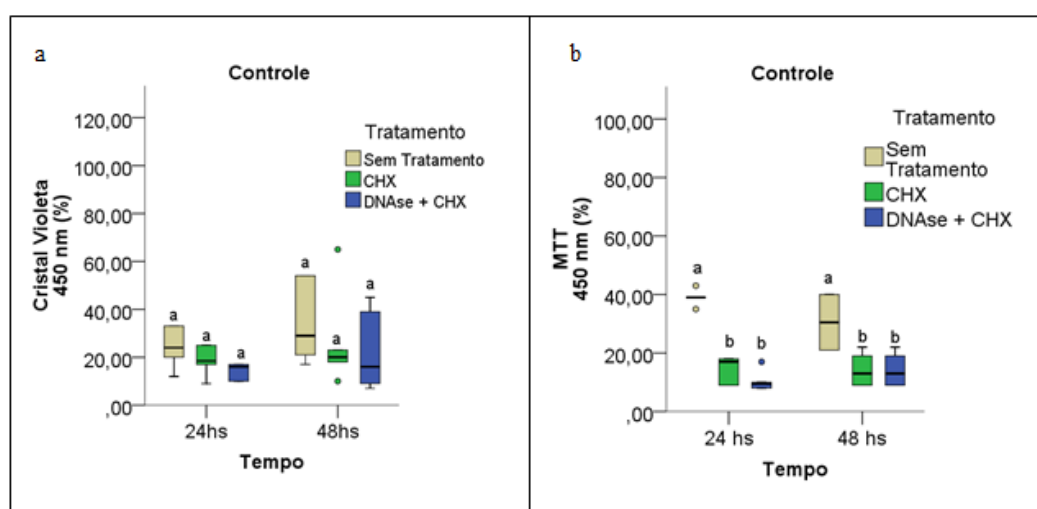


Figura 15: Biofilmes formados sem exposição a açúcares com tratamentos com CHX ou associação CHX e DNase I em “a” (Média de Absorbância de Cristal Violeta em porcentagem) e “b” (Médias de Absorbância de MTT em porcentagem). CHX: Clorexidina 0,12%. DNase: aplicação da enzima DNase. Letras diferentes denotam diferenças.  $p < 0,05$ , ANOVA.

Comparando apenas o grupo de açúcares sem tratamento, apenas o grupo de sacarose em biofilme de 48 h teve mais biomassa com diferença estatisticamente significante

( $p < 0,05$ ) em relação aos biofilmes formados por 24 h. As condições de exposição aos açúcares não diferiram entre si no tempo de 24 h ou de 48 h de formação do biofilme.

Em relação aos tratamentos, embora haja uma tendência numérica de diminuição da biomassa nos biofilmes formados por 48 h nos grupos expostos à sacarose e solução de NaCl 0,89% com o tratamento combinado de DNase e CHX, essa tendência não foi estaticamente significativa.

### **7.1.2 Determinação de metabolismo de células viáveis**

Os valores de quantificação do metabolismo de células viáveis foram transformados em porcentagem (figuras 12b, 13b, 14b e 15b). Entre os grupos de açúcares sem tratamento, o biofilme formado por 24 h na presença de sacarose apresentou um valor mais elevado estatisticamente em relação a todos os outros grupos, mesmo aqueles grupos de biofilme formados durante 48 h. Esse resultado indica uma maior atividade celular devido à presença de sacarose até atingir um equilíbrio em um biofilme maduro no tempo de 48 h. O grupo exposto à glicose e frutose formado por 24 h apresentou valor estatisticamente maior apenas em relação ao grupo sem exposição a açúcares formados por 48 h. Biofilmes formados por 48 h não diferiram entre si, sugerindo um equilíbrio das células do biofilme em relação aos substratos.

Os grupos de tratamento em biofilmes formados sob exposição à sacarose apresentaram valor inferior significativo em relação aos grupos controles, tanto no tempo de 24 h como no de 48 h. O mesmo foi observado no grupo de glicose e frutose e no grupo de solução salina, entretanto em valores menores ( $p < 0,05$ ). No entanto, a DNase não potencializou a diminuição do metabolismo promovida pela exposição à CHX.

### **7.1.3 Relação entre biomassa e células viáveis**

Os grupos de intervenção com mergulhos em sacarose apresentaram uma inversão quanto à biomassa e metabolismo. Biofilmes de 24 h não apresentaram diferença de biomassa entre todos os grupos (13a), enquanto que a porcentagem de células viáveis apresentou um elevado valor significativo do grupo controle em relação aos grupos de tratamento (13b),

indicando que a CHX e DNase obtiveram um menor impacto na biomassa do que em relação ao metabolismo. Biofilmes de 48 h apresentaram resultados similares, pois os grupos de tratamento foram inferiores ao grupo controle. Os grupos com mergulhos em glicose e frutose com biofilmes formados em 24 h apresentaram uma diferença dos grupos de tratamento em relação ao grupo controle quanto ao metabolismo (14b), enquanto que não houve diferença quanto à biomassa (14a), assim como apresentado na presença de sacarose. Em biofilmes de 48 h, ambos os testes apresentaram valores inferiores dos grupos de tratamento em relação ao grupo controle, no entanto houve diferença significativa apenas quanto ao metabolismo.

Os grupos com mergulhos em solução salina não apresentaram diferença quanto à biomassa, nem em biofilmes de 24 h e nem em de 48 h. Quanto ao metabolismo, houve diferença dos grupos de intervenção em relação ao controle em ambos os tempos de formação de biofilme (Figuras 15a e 15b). Na ausência dos carboidratos, não houve muita variação entre biomassa e metabolismo.

## **7.2 Biofilmes formados em discos de HA**

Os valores de média e desvio padrão estão dispostos na tabela 5.

Tabela 5 – Média e desvio padrão biofilmes formados em discos HA. SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle. CHX: Clorexidina 0,12%. DNase: aplicação da enzima DNase.

	Grupos								
	SC/DNase			G+F	G+F/DNase		C/DNase		
	SC	SC/CHX	/CHX	G+F	/CHX	/CHX	C	C/CHX	/CHX
<b>PEC</b>									
Total	5,35 ±1,59	3,22 ±0,58	3,53 ±0,69	3,89 ±1,39	3,06 ±0,74	2,95 ±0,41	2,54 ±0,33	2,57 ±0,84	2,21 ±0,30
Solúvel	1,95 ±1,31	0,98 ±0,17	1,11 ±0,48	1,60 ±0,93	0,90 ±0,39	0,96 ±0,52	0,42 ±0,29	0,47 ±0,31	0,44 ±0,33
Insolúvel	3,41 ±0,89	2,24 ±0,72	2,42 ±0,78	2,28 ±0,60	2,17 ±0,47	1,99 ±0,22	2,13 ±0,38	2,10 ±0,61	1,77 ±0,35
<b>Peso seco</b>									
Bruto	1,12 ±0,58	0,60 ±0,22	0,63 ±0,15	0,77 ±0,29	0,45 ±0,05	0,55 ±0,28	0,17 ±0,10	0,18 ±0,10	0,13 ±0,05
Redução	-	0,60 ±0,21	0,60 ±0,15	-	0,45 ±0,05	0,55 ±0,28	-	0,18 ±0,09	0,13 ±0,05
<b>CFU</b>	5,01 ±0,77	2,47 ±0,13	3,50 ±0,28	6,02 ±0,47	4,03 ±0,46	3,88 ±0,08	5,69 ±0,09	3,07 ±0,27	3,82 ±0,43
CFU redução	-	2,53 ±0,89	1,51 ±0,84	-	1,99 ±0,86	2,14 ±0,40	-	2,62 ±0,32	1,86 ±0,36

Biofilmes de *S. mutans* formados na presença de sacarose apresentaram uma maior produção de PEC solúveis ( $5,3 \pm 1,6$ ), PEC insolúveis ( $3,41 \pm 0,9$ ), PEC totais ( $5,35 \pm 1,6$ ) e Peso Seco ( $1,1 \pm 0,6$ ). Esse resultado indica a formação de maior quantidade de biofilme e produção de polissacarídeos, principalmente insolúveis, resultando em um biofilme mais cariogênico. No entanto, houve um maior valor de UFC em biofilmes formados na presença de glicose e frutose ( $6,0 \pm 0,5$ ), sugerindo uma menor formação de matriz de biofilme e maior presença de células bacterianas.

Os grupos de tratamento apresentaram uma maior redução de peso seco na presença de sacarose em CHX ( $0,60 \pm 0,2$ ) e CHX + DNase I ( $0,60 \pm 0,1$ ). Por outro lado, o único grupo que apresentou um valor de redução maior no tratamento de associação ( $0,55 \pm 0,2$ ) foi o de glicose e frutose em relação apenas a tratamento com CHX ( $0,45 \pm 0,1$ ). A relação de redução de UFC/mg/ml (em LOG) apresentou um resultado similar.

### 7.2.1 Relação de Peso Seco do biofilme de *S. mutans*

### 7.2.1.1 Dados de Peso Seco sem tratamento

Os dados de peso seco em miligramas estão demonstrados na figura 16. O grupo de mergulho em sacarose apresentou um valor superior aos outros grupos. O grupo de mergulho em glicose e frutose apresentou um valor superior ao grupo de mergulho em NaCl 0,89% ( $p < 0,05$ ).

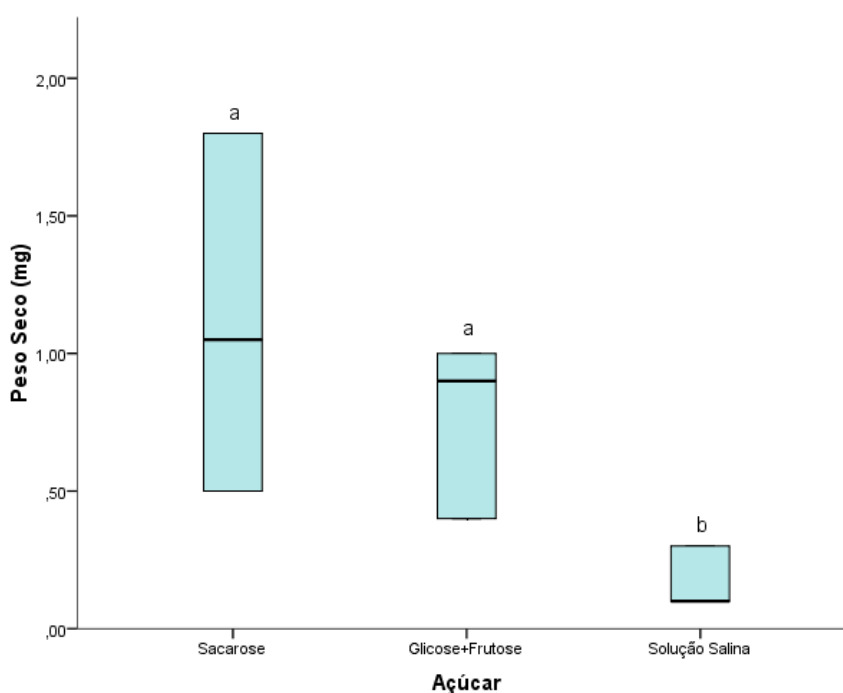


Figura 16: Médias de Peso seco em miligramas (n=18). Experimento realizado em triplicatas. Letras diferentes denotam diferenças ( $p < 0,05$ ), ANOVA.

### 7.2.1.2 Relação de Redução de Peso Seco

O valor de Redução de Peso Seco é calculado pela diferença entre o grupo controle pelo grupo de intervenção (figura 17). Não houve diferença estatística entre o grupo de tratamento com CHX e de associação CHX e DNase em exposição à SC. O mesmo foi observado no grupo controle. Em contrapartida, no grupo de exposição G+F, houve um maior valor numérico de redução na associação de tratamento do que em CHX sozinha, apesar de não ter sido um valor estaticamente significativo. A associação CHX+DNase não foi potencializada em biofilmes menos cariogênicos.

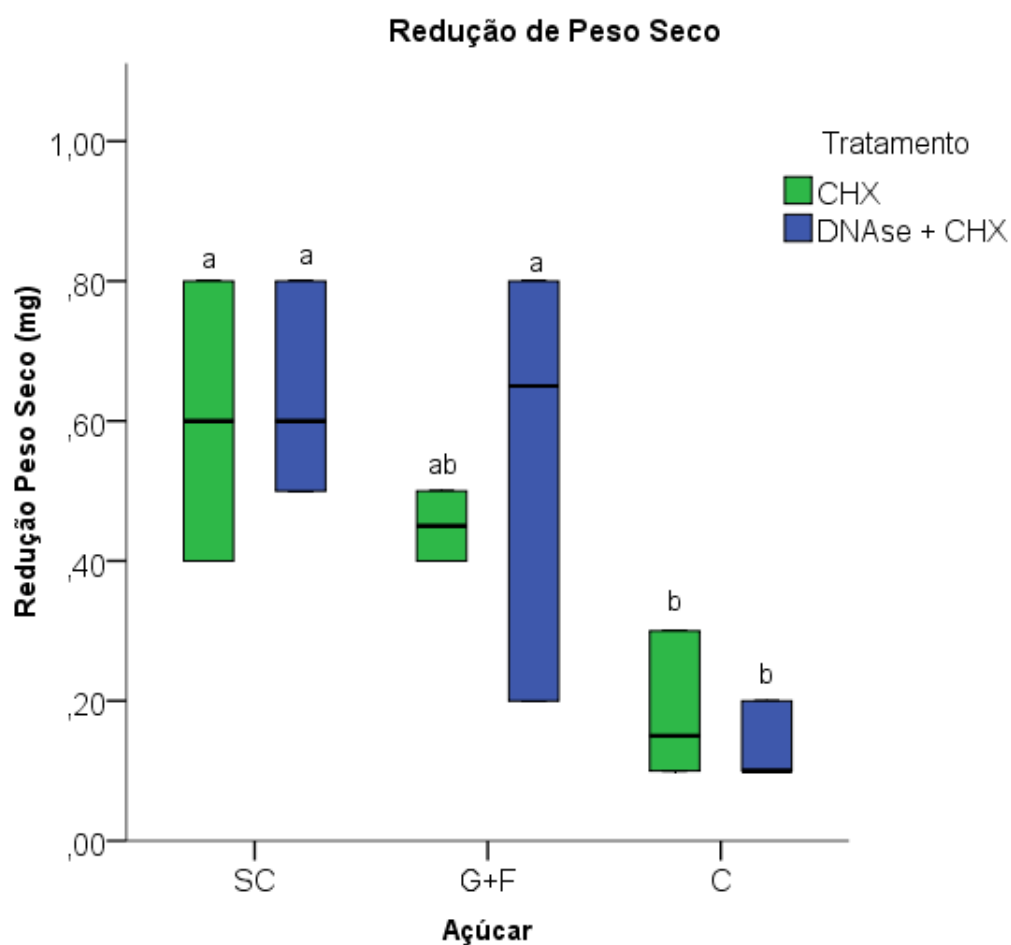


Figura 17: Médias de Redução de Peso seco em miligramas (n=18). Experimento realizado em triplicatas. SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle. CHX: Clorexidina 0,12%. DNase: aplicação da enzima DNase. Letras diferentes denotam diferenças ( $p < 0,05$ ), ANOVA.

## 7.2.2 Relação de UFC

### 7.2.2.1 Relação de UFC/ml/mg sem tratamento

O grupo de mergulho em glicose e frutose apresentou um valor significativo mais elevado de UFC em relação ao grupo de mergulho em sacarose ( $p < 0,05$ ) (figura 18). Os dois grupos não diferiram do grupo controle.

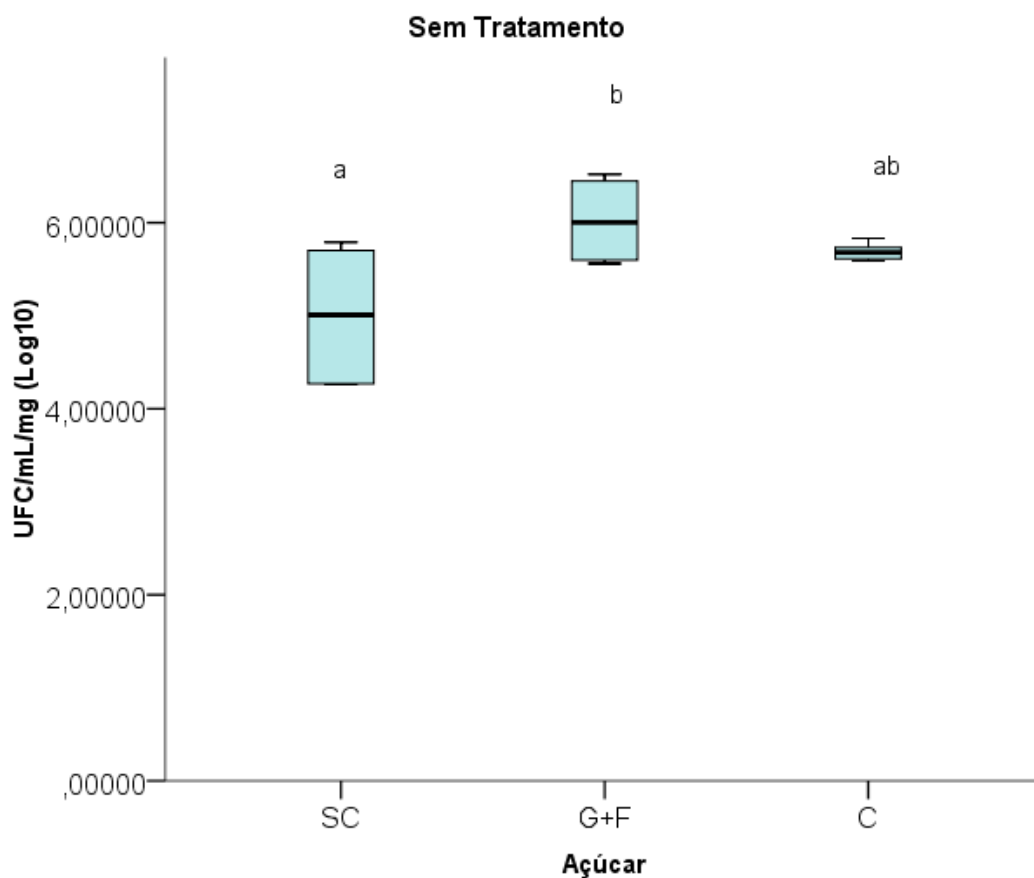


Figura 18: Médias de UFC/ml/mg (n=18) entre os grupos sem intervenção. UFC: Unidade Formadora de Colônia. SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle. Letras diferentes denotam diferenças ( $p < 0,05$ ), ANOVA.

#### 7.2.2.2 Relação de UFC/ml/mg por grupo de açúcar

A fim de investigar a formação de UFC, os gráficos foram divididos por exposição de açúcares. Houve redução significativa em todos os números de UFC nos grupos de tratamento em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), como esperado em relação à CHX. No entanto, não houve uma potencialização da associação DNase/CHX nos grupos SC e C (figuras 19 e 21), e sim um decréscimo da ação da clorexidina nesses biofilmes de *S. mutans*. Quanto ao grupo de a exposição à glicose mais frutose (figura 20), não houve diferença estatística diferente entre os grupos de tratamento.

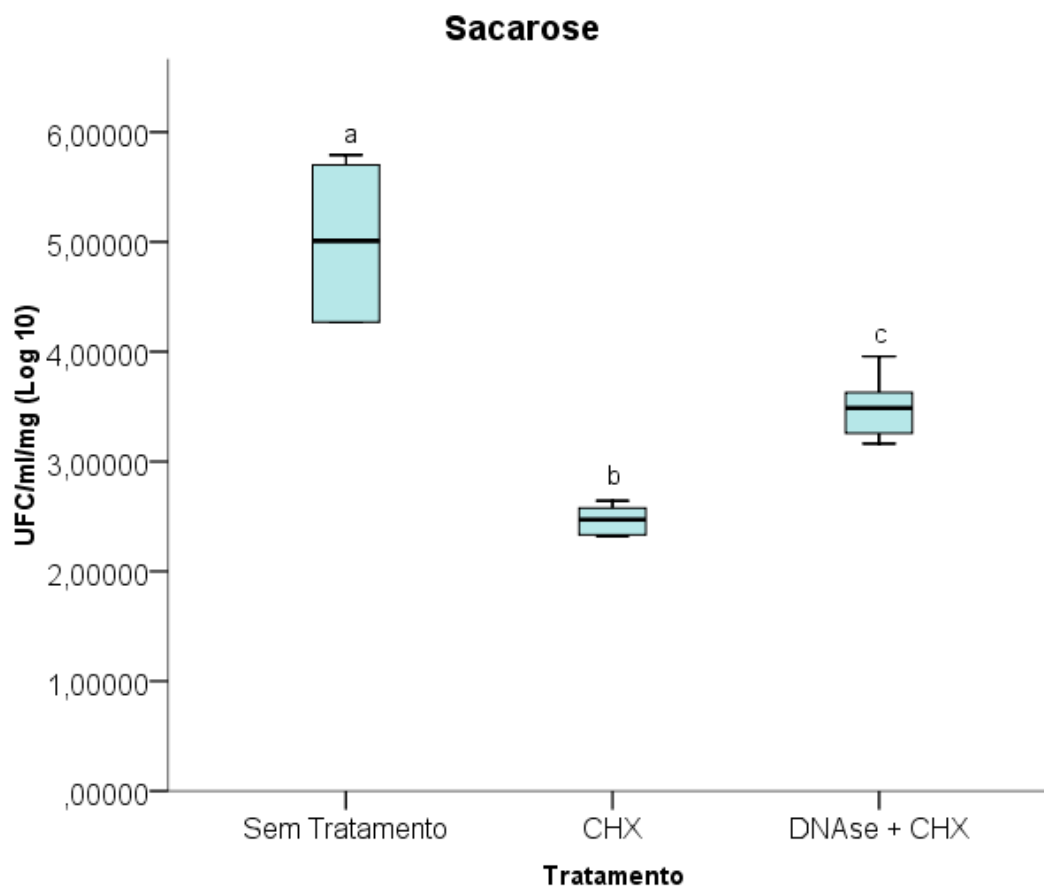


Figura 19: Médias de UFC/ml/mg de biofilmes de *S. mutans* formados sob exposição à sacarose 10%. Experimento realizado em discos de hidroxiapatita em triplicatas. CHX: Clorexidina 0,12%. DNase: aplicação da enzima DNase. Letras diferentes denotam diferenças.  $p < 0,05$ , ANOVA.

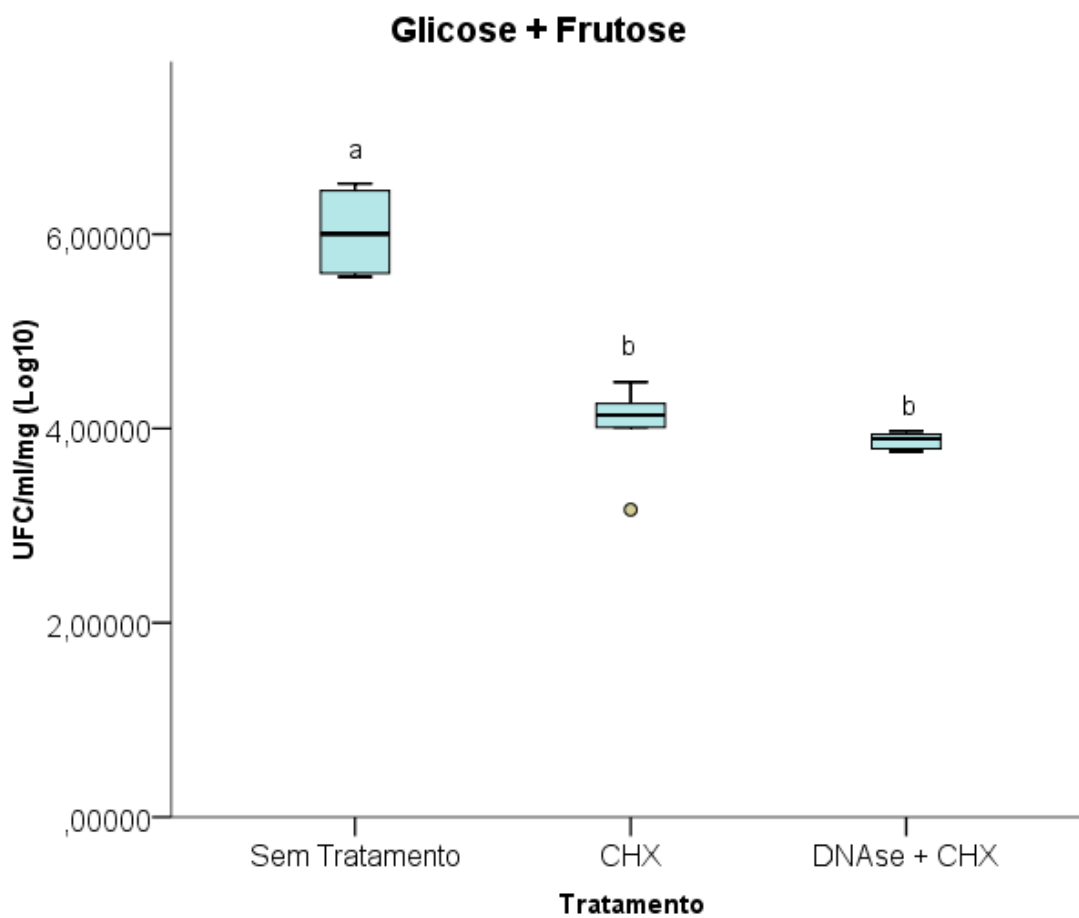


Figura 20: Médias de UFC/ml/mg de biofilmes de *S. mutans* formados sob exposição à glicose 5% mais frutose 5%. CHX: Clorexidina 0,12%. DNase: aplicação da enzima DNase. Experimento realizado em discos de hidroxiapatita em triplicatas. Letras diferentes denotam diferenças.  $p < 0,05$ , ANOVA.

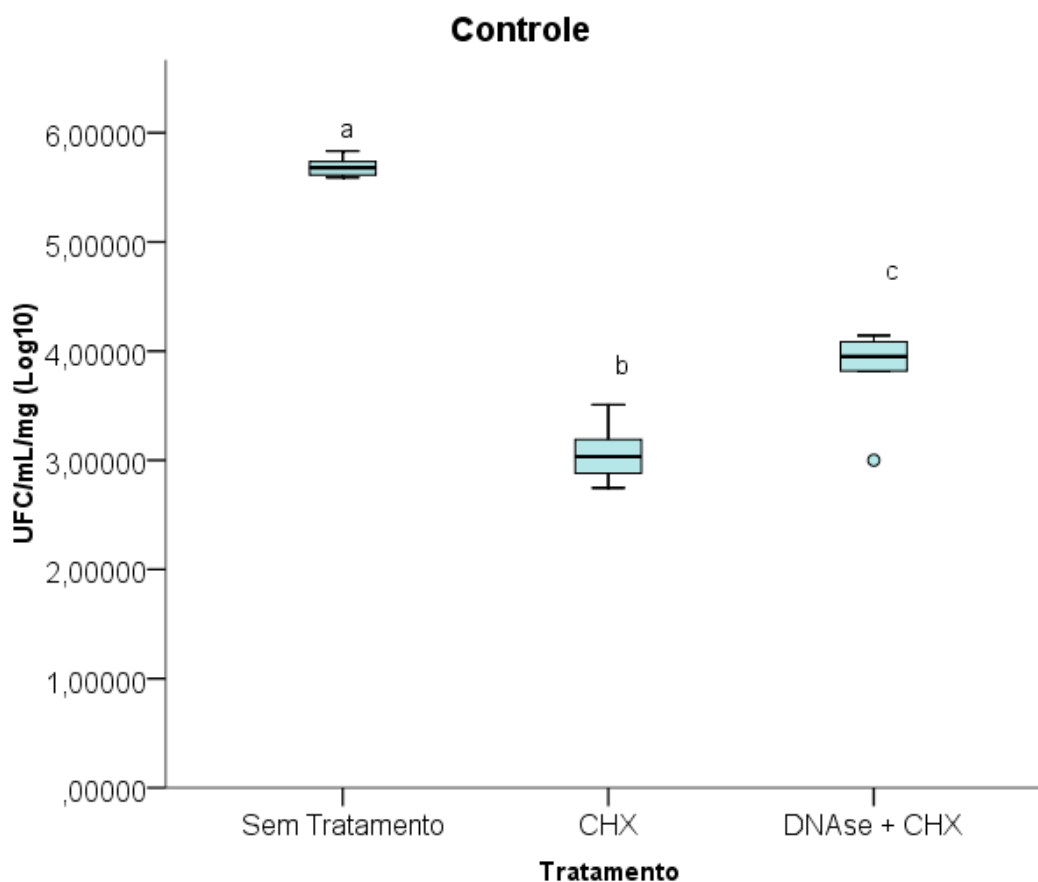


Figura 21: Médias de UFC/ml/mg de biofilmes de *S. mutans* formados sem exposição aos açúcares. CHX: Clorexidina 0,12%. DNase: aplicação da enzima DNase. Experimento realizado em discos de hidroxiapatita em triplicatas. Letras diferentes denotam diferenças.  $p < 0,05$ , ANOVA.

### 7.2.2.3 Relação de valor de LOG Redução de UFC/ml/mg

Os valores de LOG redução são calculados pela diferença do grupo controle pelo grupo de intervenção (figura 22). Observou-se um valor menor do grupo DNase/CHX na presença de sacarose e solução salina em relação a CHX. Aliado a isso, houve um valor maior do grupo de mergulho em sacarose em relação aos outros grupos, no entanto não houve diferença estatística significativa. ( $p < 0,05$ ).

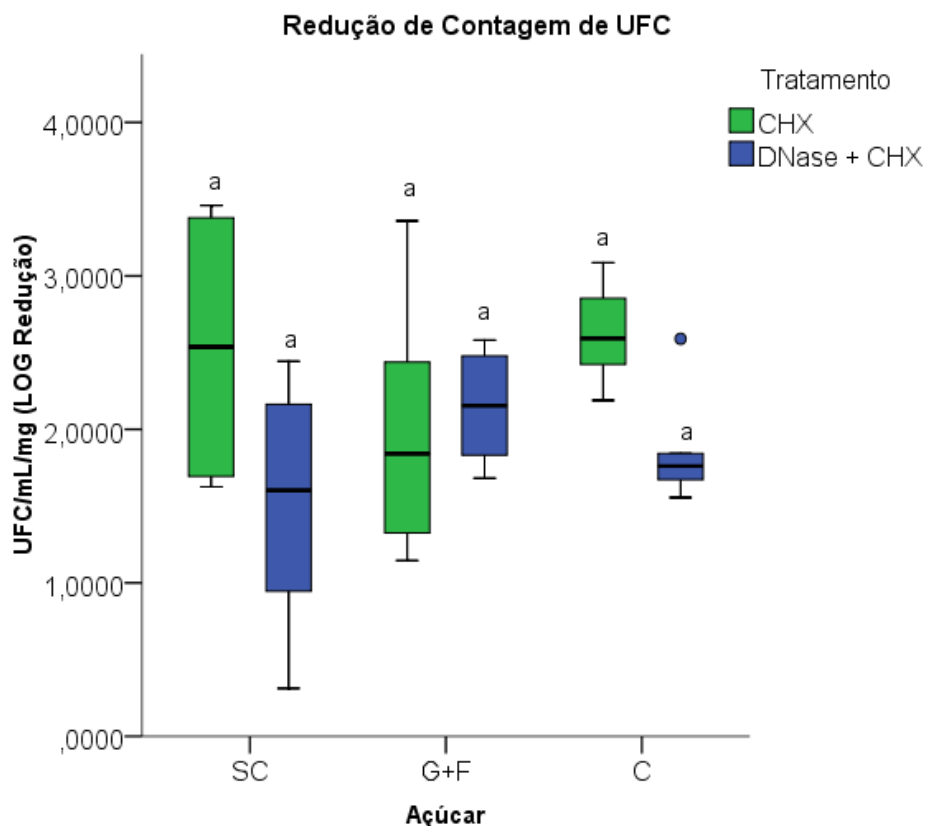


Figura 22: Médias de UFC/ml/mg em LOG Redução (n=18). Experimento realizado em discos de hidroxiapatita em triplicatas. SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle. CHX: grupo de tratamento apenas com clorexidina em relação ao grupo sem tratamento. DNase + CHX: grupo de tratamento da associação de DNase com clorexidina em relação ao grupo sem tratamento. Letras diferentes denotam diferenças ( $p < 0,05$ ), ANOVA.

### 7.2.3 Produção de Polissacarídeos Extracelulares Solúveis (PECS)

Como esperado, a produção de Polissacarídeos Extracelulares Solúveis por biofilme de *S. mutans* no grupo de mergulho em sacarose apresentou um valor mais elevado, no entanto sendo estatisticamente significante apenas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (figura 23). No entanto, apesar do grupo G+F não ter apresentado diferença significativa em relação ao grupo controle, este grupo apresentou um valor relativamente próximo do grupo SC.

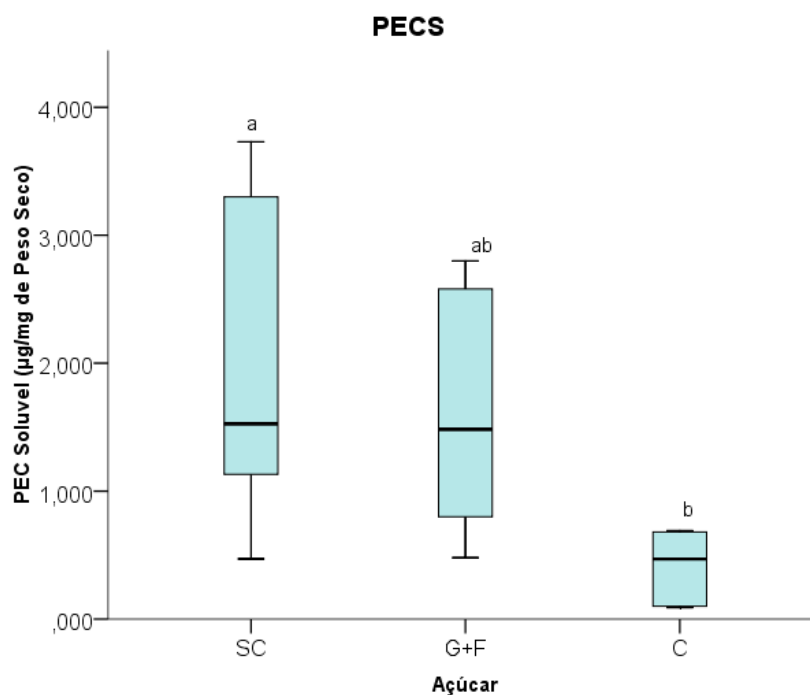


Figura 23: Médias de Polissacarídeo Extracelular Solúvel (PECS/ $\mu\text{g}/\text{mg}$  de Peso Seco) sem intervenção ( $n=6$ ) em triplicatas. SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle. Letras diferentes denotam diferenças ( $p<0,05$ ), ANOVA.

#### 7.2.4 Produção de Polissacarídeos Extracelulares Insolúveis (PECI)

A produção de Polissacarídeos Extracelulares Insolúveis por biofilme de *S. mutans* no grupo de mergulho em sacarose apresentou um valor estatístico ( $p<0,05$ ) superior aos outros grupos (figura 24). Por outro lado, não houve diferença estatística entre o grupo de glicose e frutose e o grupo controle.

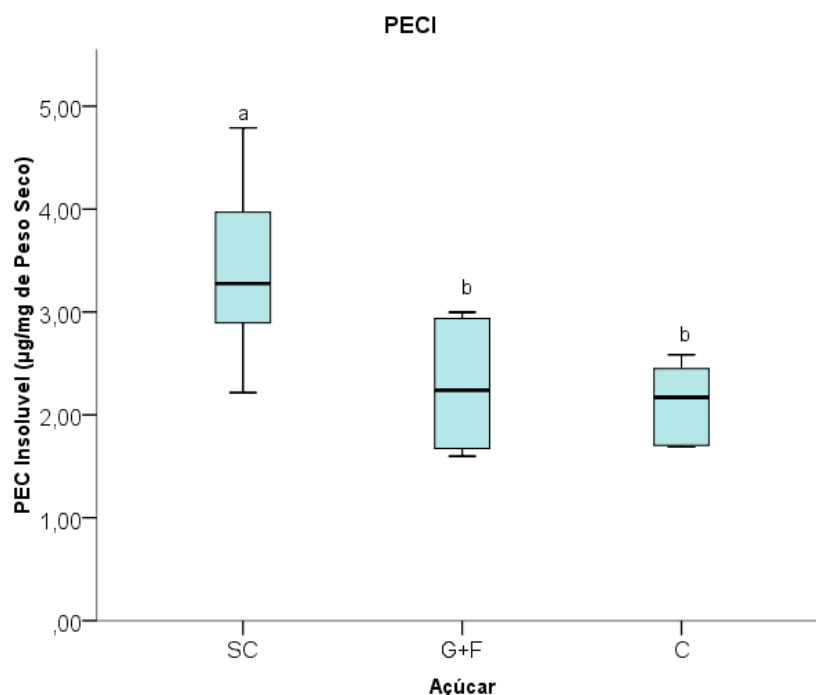


Figura 24: Médias de Polissacarídeo Extracelular Insolúvel (PECI/ $\mu\text{g}/\text{mg}$  de Peso Seco) sem intervenção ( $n=6$ ) em triplicatas. SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle. Letras diferentes denotam diferenças ( $p<0,05$ ), ANOVA.

### 7.2.5 Produção de Polissacarídeos Extracelulares Totais (PECT)

Os Polissacarídeos Extracelulares Totais (PECT) foram analisados através da soma dos polissacarídeos extracelulares solúveis e polissacarídeos extracelulares insolúveis (figura 25). A produção de Polissacarídeos Extracelulares Solúveis por biofilme de *S. mutans* no grupo de mergulho em sacarose apresentou um valor mais elevado em relação aos outros grupos, no entanto estatisticamente superior apenas em relação ao grupo controle. O grupo glicose e frutose apresentou um maior valor numérico em relação ao grupo controle, mas não houve diferença estatística ( $p<0,05$ ).

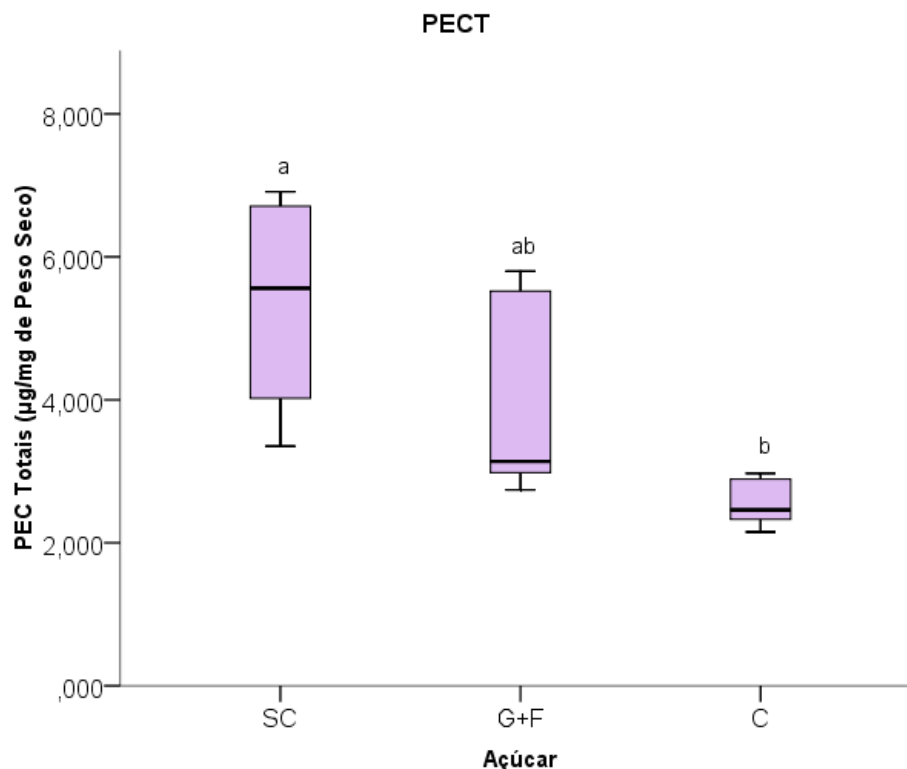


Figura 25: Médias de Polissacarídeo Extracelular Totais (PECT/ $\mu\text{g}/\text{mg}$  de Peso Seco) sem intervenção ( $n=6$ ) em triplicatas. SC: Sacarose 10%. G+F: Glicose 5% mais Frutose 5%. C: Controle. Letras diferentes denotam diferenças ( $p<0,05$ ), ANOVA.

## 8. DISCUSSÃO

A formação de biofilme é um fator de virulência relevante em doenças crônicas, sendo um tema bastante estudado devido ao aumento de resistência bacteriana e da necessidade de novas alternativas terapêuticas (CONSTERTON et al, 1999; DAVIES, 2003; FLEMMING & WINGENDER, 2010; KOO et al, 2017). O DNA extracelular (eDNA) é um importante componente da matriz de muitos biofilmes bacterianos, contribuindo para a integridade da estrutura e adesão da mesma a superfícies (WHITCHURCH et al, 2002; MONTANARO et al, 2011; GUO et al, 2021). A doença cárie está relacionada com a deposição de biofilme bacteriano na superfície dentária. O eDNA pode aumentar a síntese de glucanos e promover uma maior adesão e estabilidade desses biofilmes ao dente. Estudos tem demonstrado a importância desse fator em biofilmes orais, principalmente relacionados ao microrganismo *Streptococcus mutans* (SCHLAFER et al., 2017; PEDRAZA et al., 2017; KIM et al., 2018; GUO et al., 2021).

Biofilmes cariogênicos estão diretamente relacionados com a exposição a carboidratos fermentáveis presentes na dieta, principalmente sacarose, glicose e frutose. Estudos mostram a importância da duração e frequência destas exposições na formação da placa dentária e do potencial cariogênico (CURY *et al.*, 2000; CAI *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

No presente estudo, os biofilmes foram formados em diferentes circunstâncias de oferta de carboidratos. O eDNA é um componente estrutural importante da matriz de biofilme de vários patógenos (WHITCHURCH *et al.*, 2002; MONTANARO *et al.*, 2011; PANLILIO & RICE, 2021), em biofilmes dentais (SCHLAFER *et al.*, 2017) e, especificamente, em biofilmes de *S. mutans* (KIM *et al.*, 2018; GUO *et al.*, 2021). Considerando intervir na estabilidade de biofilmes de *S. mutans*, investigamos o tratamento com a enzima DNase na ruptura de biofilmes para potencializar a ação da clorexidina 0,12%. A avaliação da atividade antisséptica da clorexidina e em associação com a DNase foi realizada utilizando a cepa ATCC UA159 de *S. mutans*.

Os dados obtidos de biomassa e metabolismo indicam que a presença de sacarose facilita a produção de SPE, aumentando a estrutura à medida que há um amadurecimento do biofilme. Em contraste, a atividade metabólica decresce provavelmente em virtude de um menor número de células em relação à composição do biofilme. A presença dos outros açúcares apresentou um comportamento no mesmo sentido, mas em valores menores, sugerindo uma menor cariogenicidade em relação à sacarose. Estudos *in vitro* de biofilme de *S. mutans* realizados em blocos de esmalte de dentes bovinos relatam uma maior produção de SPE na presença de sacarose, consequentemente um maior desenvolvimento e formação de biofilme (DIAZ-GARRIDO *et al.* 2016; OLIVEIRA *et al.* 2017) e avaliando em comparação aos outros açúcares, constataram uma menor produção na presença de outros açúcares.

Os valores de biomassa obtidos indicam uma redução em relação ao grupo controle e os valores de metabolismo de células viáveis apresentaram uma redução mais significativa. Estes resultados estão de acordo com a atividade antisséptica da clorexidina (SUSUKI *et al.*, 2020). A DNase I age na remoção de DNA extracelular e na ruptura da estrutura do biofilme, bem como na adesão inicial de biofilmes mono e multiespecie (DAS *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2021). Os resultados do presente estudo não indicaram uma diferença significativa quanto à CHX sozinha ou associada à DNase I, sugerindo que a concentração e exposição da enzima não foi suficiente para remoção do eDNA e uma desorganização do biofilme.

O número de UFC do grupo glicose com frutose foi significativamente maior em relação aos outros grupos e não houve diferença entre o grupo sacarose e o grupo controle. Isso sugere uma maior formação de células em detrimento de matriz de biofilme, proporcionalmente. Pode implicar também que biofilmes formados na presença de sacarose apresentem uma matriz com mais SPE e mais densa, com menor presença de células bacterianas. A glicose e a frutose também fazem parte do biofilme dental, influenciando a patologia da cárie dentária servindo como reserva nutricional em tempos de escassez. Esses carboidratos também podem potencializar a adesão bacteriana ao tecido dentário (ROZEN *et al.*, 2004). OLIVEIRA *et al.* (2017) utilizando um modelo experimental similar ao presente estudo não encontrou uma diferença significativa entre as exposições aos diferentes açúcares. Esse comportamento pode estar relacionado com a maior quantidade de exposições (8x) ou a concentração (glicose 5,25% e frutose 5,25%) utilizada nestes estudos.

A adição de DNase em estágios iniciais de formação do biofilme associada com a aplicação de CHX nos estágios finais de formação apresentou um valor superior de UFC em relação à CHX sozinha. Esse resultado sugere que o tratamento inicial com a enzima tenha diminuído a formação inicial de biofilme, porém pelo intervalo relativamente longo até a aplicação de CHX, houve uma nova formação de estrutura do biofilme, não ocorrendo uma sinergia entre os dois tratamentos.

Estudos tem demonstrado que a DNase age na estrutura do biofilme e não na redução de UFC, ou seja, possuindo ação antibiofilme e não antimicrobiana. TETZ *et al.* (2008) não obteve uma diferença significante na contagem de UFC em biofilmes de 24 h de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. pyogenes* utilizando a DNase em uma concentração de 5 µg/ml. No entanto, obteve uma redução de UFC ao associar a enzima com ampicilina e levofloxacina, indicando um impacto positivo para uma melhor ação de antibióticos. Apesar de partir do mesmo princípio, no presente estudo não foi obtido esse resultado em relação à clorexidina, podendo estar relacionado com a diferença de concentração da enzima e tempo de formação de biofilme. Entretanto, DENG *et al.* (2022), mesmo utilizando concentração mais altas da enzima em biofilmes de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, obteve o mesmo padrão de resultados em relação ao número de UFC.

Nossos resultados condizem, também, com o descrito na literatura em biofilmes de *S. mutans*, em que mesmo variando a concentração de DNase (0.001 mg/mL, 0.002 mg/mL) ou o intervalo de aplicação da enzima (0h, 17h, 40h) não houve alteração do número de UFC em relação ao grupo controle (KARYGINANNI *et al.*, 2020; 2021). GRÄNICHER *et*

*al.* (2021) avaliando a interação da DNase I com a CHX, associada a outra enzima (Proteinase K), obteve uma maior redução de UFC. No entanto, não houve um grupo de apenas CHX e DNase I.

A densidade do biofilme é um marcador para a quantificação de crescimento do microrganismo. A desvantagem dessa medida é a não diferenciação entre os componentes do biofilme e a matriz extracelular. No entanto, é um método de fácil elaboração que fornece um dado absoluto do crescimento bacteriano (WILSON *et al.*, 2017). Os achados no presente estudo sobre a produção de peso seco corroboram com o encontrado na literatura em relação à presença de sacarose na formação de biofilme de *S. mutans* (CURY *et al.*, 2010; CAI *et al.*, 2016; 2018; BOTELHO *et al.*, 2016), inclusive na presença de tratamento com clorexidina 0,12% (CCAHUANA-VASQUEZ & CURY, 2010). OLIVEIRA *et al.* (2010) obteve uma diferença significativa de maior produção de peso seco na presença de sacarose (em abundância e escassez) em relação à presença de glicose mais frutose. No presente estudo, apesar de numericamente superior em relação à sacarose, esta diferença não foi significativa.

KLEIN *et al.* (2010), avaliando biofilmes formados por 44 h e com a aplicação da enzima DNase por 14 h apresentaram uma redução de peso seco em aproximadamente 30% em relação aos biofilmes não tratados. No entanto, esse resultado foi obtido na presença de sacarose e amido, enquanto na presença apenas de sacarose, não houve uma diferença significativa de peso seco. Esse achado foi similar ao encontrado no presente estudo.

Polissacarídeos extracelulares são fatores de virulência em biofilmes orais, estando diretamente relacionados com a disposição de substratos. Podem ser solúveis ou insolúveis e são calculados de acordo com a proporção de miligramas de peso seco de biofilme formado (GUO *et al.*, 2015; LOBO *et al.*, 2019). Nesse contexto, no presente estudo, a quantidade de PECs solúveis foi significativamente maior nos grupos de sacarose e glicose com frutose em relação ao grupo controle, não havendo diferença entre estes grupos. Esse resultado sugere que apesar da sacarose ser um açúcar mais cariogênico, o *S. mutans* é capaz de produzir polissacarídeos solúveis na presença de monossacarídeos glicose e frutose com a mesma eficiência, aumentando a adesão de microrganismos à placa dentária e funcionando como reserva energética em momentos de escassez de nutrientes (CURY *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Os PECs insolúveis são produzidos por enzima GTFs a partir da sacarose que geram pontos sítios de ligação e adesão à estrutura dentária e facilitam a adesão de novos microrganismos (BOWEN & KOO, 2011; GUO *et al.*, 2015). Nesse trabalho, o grupo de

sacarose apresentou um valor estatisticamente superior em relação ao grupo G+F e ao C, demonstrando o papel deste substrato na virulência de biofilmes de *S. mutans*. Como esperado, não houve diferença estatística entre o grupo G+F e C indicando que estes açúcares não estão relacionados com a produção de PEC insolúveis. Estudos em diferentes formações de biofilme de *S. mutans* e com exposições a diferentes substratos, inclusive amido, apresentam o mesmo resultado (BOTELHO *et al.*, 2016; CAI *et al.*, 2016; DIAZ-GARRIDO *et al.* 2016; OLIVEIRA *et al.* 2017).

A soma dos dois tipos de polissacarídeos extracelulares (PECs Totais) não apresentou diferença estatística entre os grupos SC e G+F, apesar de um valor numérico maior do grupo SC. Esse resultado sugere que o microrganismo não tem uma predileção pela produção de PEC e que esse fator é determinado pela oferta e escassez de nutrientes.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A enzima DNase I não potencializou a ação da clorexidina a 0,12%. Esse resultado pode estar relacionado com o tempo de intervalo entre a aplicação dos dois tratamentos (72 h), onde a ação da enzima perdeu o efeito de ruptura de biofilme de *S. mutans*.

A sacarose é o carboidrato que induz uma maior produção de SPE e polissacarídeos extracelulares insolúveis por *S. mutans*.

A presença de glicose e frutose induz uma maior contagem de UFC em relação à sacarose. Esse fato pode estar atribuído a uma menor formação de matriz de biofilme e, conseqüentemente, uma presença de mais células.

A presença de açúcares são fatores relevantes para o entendimento da dinâmica do desenvolvimento de biofilmes orais, podendo ser consideradas em estudos *in vitro*.

O estabelecimento de um modelo de biofilme utilizando hidroxiapatita que se assemelhe a estrutura dental e a utilização de mergulhos que simulem a dieta são condições que trazem uma maior confiabilidade para estudos *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

AJDIC, D.; MCSHAN, W. M.; MCLUGHLIN, R. E.; SAVIC, G.; CHANG, J.; CARSON, M. B. *et al.* Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 99, n. 22, p. 14434-9, 2002.

ALVENDAL, C.; MOHANTY, S.; BOHM-STARKE, N.; BRAUNER, A. Anti-biofilm activity of chlorhexidine digluconate against *Candida albicans* vaginal isolates. . **PLoS ONE**, v. 15, n. 9, 2020.

ANDRADE, I. M.; CRUZ, P. C.; SILVA-LOVATO, C. H.; SOUZA, R. F.; SOUZA-GUGELMIN, M. C. M.; PARANHOS, H. F. O. Effect of Chlorhexidine on Denture Biofilm Accumulation. **Journal of Prosthodontics**, v. 21, p. 2–6, 2012.

AOKI, H.; SHIROZA, T.; HAYAKAWA, M.; SATO, S.; KURAMITSU, H. K. Cloning of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. **Infection and Immunity**, v. 53, n. 3, p. 587-594, 1986.

BALDINO, M. E. L.; MEDINA-SILVA, R.; SUMIENSKI, J.; FIGUEIREDO, M. A.; SALUM, F. G.; CHERUBINI, K. Nystatin effect on chlorhexidine efficacy against *Streptococcus mutans* as planktonic cells and mixed biofilm with *Candida albicans*. **Clinical Oral Investigations**, v. 26, p. 633–642, 2021.

BANAS, J. Virulence Properties of *Streptococcus mutans*. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 1267-1277, 2004.

BARBOSA, J. O.; ROSSONI, R. D.; VILELA, S. F. G.; DE ALVARENGA, J. A.; VELLOSO, M.; DOS S., PRATA, M. C. DE A.; JUNQUEIRA, J. C. *Streptococcus mutans* Can Modula-te Biofilm Formation and Attenuate the Virulence of *C. albicans*. **PLoS ONE**, v.11, n. 3, p. 16, 2016.

BARNES, A. M.; BALLERING, K. S.; LEIBMAN, R. S.; WELLS, C. L.; DUNNY, G. M. *Enterococcus faecalis* produces abundant extracellular structures containing DNA in the absence of cell lysis during early biofilm formation. **MBio**, v. 3, n. 4, p. 00193–00112, 2012.

BARREIROS, R. C.; BOSSOLAN, G.; TRINDADE, C. E. P. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 377-389, 2005.

BEZERRA, N. V. F.; BRITO, A. C. M.; MEDEIROS, M. M. D.; LEITE, K. L. F. *et al.* Glucose supplementation effect on the acidogenicity, viability, and extracellular matrix of *Candida* single- and dual-species biofilms. **J Invest Clin Dent**, v. 10, n. 3, e12412, 2019.

BOTELHO, J. N.; VILLEGAS-SALINAS, M.; TRONCOSO-GAJARDO, P.; GIACAMAN, R. A.; CURY, J. A. Enamel and dentine demineralization by a combination of starch and sucrose in a biofilm – caries model. **Brazilian Oral Research**, v. 30, n. 1, e52, 2016.

BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. **Caries Research**, v.45, p. 69–86, 2011.

BOWEN, W. H.; BURNE, R. A.; WU, H.; KOO, H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. **Trends Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 229–242, 2018.

CAI, J-N.; JUNG, J-E.; DANG, M-H.; KIM, M-A. *et al.* Functional Relationship between Sucrose and a Cariogenic Biofilm Formation. **Plos One**, v. 11, n. 6, 2016.

CAI, J-N.; JUNG, J-E.; LIN, M-H.; CHOI, H-M.; JEON, J-G. Sucrose challenges to *Streptococcus mutans* biofilms and the curve fitting for the biofilm changes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 94, n. 17, 2018.

CARLSSON, J. **Cariology today**. Ed. B. Guggenheim: Basel:Karger, p. 205–211, 1983.

CATLIN, B. W. Extracellular deoxyribonucleic acid of bacteria and a deoxyribonuclease inhibitor. **Science**, v. 124, p. 441–442, 1956.

CCAHUANA-VASQUEZ, R. A.; CURY, J. A. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Brazilian Oral Research**, v. 24, n. 2, p. 135- 141, 2010.

CLARKE, J. K. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 5, n. 3, p. 141-146, 1924.

COSTALONGA, M.; HERZBERG, M. C. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. **Immunology Letters**, v. 162, p. 22–38, 2014.

COSTERTON, J. W.; STEWART P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v. 284, n. 5418, 1999.

COYKENDALL, A. L. Classification and identification of the viridans streptococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, n. 3, p. 315-28, 1989.

CROSS, S. E.; KRETH, J.; ZHU, L.; SULLIVAN, R.; SHI, W. *et al.* Nanomechanical properties of glucans and associated cell surface adhesion of *Streptococcus mutans* probed by atomic force microscopy under in situ conditions. **Microbiology**, v. 153, p. 3124–3132, 2007.

CUNNINGHAM, L.; LASKOWSKI, M. Presence of two different deoxyribonucleodepolymerases in veal kidney. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 11, p. 590-591, 1953.

CURY J. A.; REBELO M. A.; DEL BEL CURY A. A.; DERBYSHIRE M.T.; TABCHOURY C. P. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Research**, v. 34, p. 491–497, 2000.

CURY J. A.; TENUTA, L. M. A.; TABCHOURY, C. P. M. Bioquímica oral. **Odontologia Essencial**. São Paulo: Artes Médicas, 2017.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 144-122, 2003.

DAS, T.; SIMONE, M.; IBUGO, A.; WITTING, P. K.; MANEFIELD, M.; MANOS, J. Glutathione Enhances Antibiotic Efficiency and Effectiveness of DNase I in Disrupting *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms While Also Inhibiting Pyocyanin Activity, Thus Facilitating Restoration of Cell Enzymatic Activity, Confluence and Viability. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 2429, 2017.

DAWES, C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? **Journal Canadian Dental Association**, v. 69, n. 11, p. 722-4, 2003.

DELL'ANNO, A.; BOMPADRE, S.; DANOVARO, R. Quantification, base composition, and fate of extracellular DNA in marine sediments. **Limnology Oceanography**, v. 47, p. 899–905, 2002.

DENG, B.; GHATAK, S.; SARKAR, S.; SINGH, K. *et al.* Novel bacterial diversity and fragmented eDNA identified in hyperbiofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* rugose small colony variant. **iScience**, v. 23, n. 2, 2020.

DIAZ-GARRIDO, N.; LOZANO, C.; GIACAMAN, R. A. Frequency of sucrose exposure on the cariogenicity of a biofilm-caries model. **European Journal of Dentistry**, v. 10, p. 345-50, 2016.

DUBOIS, M; GILLES, K; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. A colorimetric method for the determination of sugars. **Nature**, v. 168, n. 4265, p. 350-356, 1956.

EVANS, C. J; AGUILERA, R. J. DNase II: genes, enzymes and function. **Gene**, v. 322, p. 1–15, 2003.

FEJERSKOV, O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 25, p. 5-12, 1997.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 623-33, 2010.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S. A.; KJELLEBERG, S. Biofilms: An emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 563–575, 2016.

FRANK, K.L.; PATEL, R. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 10, p. 4728-42, 2007.

GENG, Y. F.; YANG, C.; ZHANG Y. *et al.* An innovative role for luteolin as a natural quorum sensing inhibitor in *Pseudomonas aeruginosa*. **Life Sciences**, v. 274, 2021.

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; DESVAUX, M.; HEBRAUD, M.; MORETRO, T.; LANGSRUD, SIMÕES, M. Intra-and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 841-867, 2015.

GLOBAL HEALTH METRICS. Injury I, Prevalence C: Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: A systematic analysis for the global burden of disease study 2016. **Lancet**, v. 390, p. 1211–1259, 2017.

GRÄNICHER, K. A.; KARYGIANNI, L.; ATTIN, T.; THURNHEER, T. Low Concentrations of Chlorhexidine Inhibit the Formation and Structural Integrity of Enzyme-Treated Multispecies Oral Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. 741863, 2021.

GRELA, E.; KOZLOWSKA, J.; GRABOWIECKA, A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. **Acta Histochemica**, v. 120, n.4, p. 303-311, 2018.

GUGGNHEIM, B.; GIERTSEN, E.; SCHUPBACH, P.; SHAPIRO, S. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. **Journal of Dental Research**, v. 80, p. 363–370, 2001.

GUO, H.; CHEN, Y.; GUO, W.; CHEN, J. Effects of extracellular DNA on dual-species biofilm formed by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Microbial Pathogenesis**, v. 154, n. 104838, 2021.

GUO, L.; MCLEAN, J. S.; LUX, R.; HE, X.; SHI, W. The well-coordinated linkage between acidogenicity and aciduricity via insoluble glucans on the surface of *Streptococcus mutans*. **Scientific Reports**, v. 5, n. 18015, 2015.

HANADA, N.; KURAMITSU, H. K. Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* gtfC gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. **Infection and Immunity**, v. 56, p. 1999-2005, 1988.

HANADA, N.; KURAMITSU H. K. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* gtfD gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. **Infection and Immunity**, v. 57, p. 2079-2085, 1989.

HEDGECOCK, E. M.; SULSTON, J. E.; THOMSON, J. N.. Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 220, p. 1277 – 1279, 1983.

JONES, C. G. Chlorhexidine: is it still the gold standard? **Periodontology 2000**, v. 15, p. 55–62, 1997.

KARPINSKI, T.M.; SZKARADKIEWICZ, A. K. Chlorhexidine – pharmacobiological activity and application. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 7, p. 1321-1326, 2015.

KARYGIANNI, L.; ATTIN, T.; THURNHEER, T. Combined DNase and Proteinase Treatment Interferes with Composition and Structural Integrity of Multispecies Oral Biofilms **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 4, p. 983, 2020.

KARYGIANNI, L.; PAQUÉ, P. N.; ATTIN, T.; THURNHEER, T. Single DNase or Proteinase Treatment Induces Change in Composition and Structural Integrity of Multispecies Oral Biofilms. **Antibiotics**, v. 10, n. 4, p. 400, 2021.

KIM, M.; JEON, J.; KIM, J. *Streptococcus mutans* extracellular DNA levels depend on the number of bacteria in a biofilm. **Scientific Reports**, v. 8, n. 13313, 2018.

KLAHAN, P.; OKUYAMA, M.; JINNAI, K.; MA, M.; KIKUCHI, A.; KUMAGAI, Y. *et al.* Engineered dextranase from *Streptococcus mutans* enhances the production of longer isomaltooligosaccharides. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 82, n. 9, p. 1480-7, 2018.

KLEIN, M. I.; DEBAZ, L.; AGIDI, S.; LEE, H.; XIE, G.; LIN, AH-M. *et al.* Dynamics of *Streptococcus mutans* Transcriptome in Response to Starch and Sucrose during Biofilm Development. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, 2010.

KLEIN, M. I.; HWANG, G.; SANTOS, P. H. S.; CAMPANELLA, H.; KOO, H. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. 10, 2015.

KOO, H.; FALSETTA, M. L.; KLEIN, M. I. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. **Journal of Dental Research**, v. 92, p. 1065–1073, 2013.

KOO, H.; ALLAN, R. N.; HOWLIN, R. P.; HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 740–755, 2017.

KÖHLER, B.; BRATTHALL D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 9, p. 584-588, 1979.

LAUKOVÁ, L.; KONECŇNÁ, B.; JANOVICOVÁ, L.; VLKOVÁ, B.; CELEC P. Deoxyribonucleases and Their Applications in Biomedicine. **Biomolecules**, v. 10, p. 1036, 2020.

LEFFER, J.; CIACMA, K.; GULLSTRAND, B.; BENGTSASON, A. A.; MARTIN, M.; BLOM, A. M. A subset of patients with systemic lupus erythematosus fails to degrade DNA

from multiple clinically relevant sources. **Arthritis Research & Therapy**, v. 17, n. 1, p. 205, 2015.

LEMOS, J. A.; BURNE, R. A. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. **Microbiology**, v. 154, p. 3247-55, 2008.

LI, W.; LIU, H.; XU, Q. Extracellular dextran and DNA affect the formation of *Enterococcus faecalis* biofilms and their susceptibility to 2% Chlorhexidine. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 7, p. 894-98, 2012.

LI, X. C. H.; WONG, C. H.; NG, T. W.; ZHANG, C.; LEUNG, K.; JIN, L. The spherical nanoparticle-encapsulated chlorhexidine enhances anti-biofilm efficiency through an effective releasing mode and close microbial interactions. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 2471–2480, 2016.

LIAO, S.; KLEIN, M. I.; HEIM, K. P.; FAN Y. *et al.* *Streptococcus mutans* Extracellular DNA Is Upregulated during Growth in Biofilms, Actively Released via Membrane Vesicles, and Influenced by Components of the Protein Secretion Machinery. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 13, p. 2355–236, 2014.

LIBERATO, M. C. T C.; OLIVEIRA, M. S. C. **Química - Bioquímica**. 2ª ed. Fortaleza/CE: UECE, 2019.

LINS De SOUSA, D.; ARAÚJO LIMA, R.; ZANIN, I. C.; KLEIN, M. I.; JANAL, M. N.; DARTE, S. Effect of twice-daily blue light treatment on matrix-rich biofilm development. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0131, 2015.

LOBO, C. I. V.; RINALDI, T. B.; CHRISTIANO, C. M. S.; LEITE, L. de S. *et al.* Dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* exhibit more biomass and are mutually beneficial compared with single-species biofilms. **Journal of Oral Microbiology**, v. 11, n. 1, 2019.

MACHIULSKIENE, V.; CAMPUS, G.; CARVALHO, J. C.; DIGE, I. *et al.* Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. **Caries Research**, v. 54, n. 1, p. 7-14, 2020.

MAJANGA, V.; VIRIRI, S. A Survey of Dental Caries Segmentation and Detection Techniques. **Scientific World Journal**, v. 2022, n. 8415705, 2022.

MARSH, P. D.; BRADSHAW, D. J. Dental plaque as a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 169-75, 1995.

MARTTINEN A. M.; HAUKIOJA A. L.; KESKIN M.; SODERLING, E. M. Effects of *Lactobacillus reuteri* PTA 5289 and *L. paracasei* DSMZ16671 on the adhesion and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. **Current Microbiology**, v. 67, p. 193–9, 2013.

MARTI, L. M.; MATA, M.; FERRAZ-SANTOS, B.; AZEVEDO, E. R. *et al.* Addition of Chlorhexidine Gluconate to a Glass Ionomer Cement: A Study on Mechanical, Physical and Antibacterial Properties. **Brazilian Dental Journal**, v. 25, n. 1, p. 33-37, 2014.

MILLER, W. D. The micro-organisms of the human mouth. **The S.S. White Manufacturing Co.**, Philadelphia, 1890.

MOMENI, S. S.; CHAZAL, T.; GRENETT, H.; WHIDDOH, J.; MOSER, S. A.; CHILDERS, N. K. *Streptococcus mutans* serotypes and collagen-binding proteins *Cnm/Cbm* in children with caries analysed by PCR. **Molecular Oral Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 64-73, 2019.

MONTANARO, L.; POGGI, A.; VISAI, L. *et al.* Extracellular DNA in biofilms. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 9, p. 824-83, 2011.

NAVES, P.; DEL PRADO, G.; HUELVES, L.; GRACIA, M.; RUIZ, V.; BLANCO, J.; SORIANO, F. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microbial pathogenesis**, v. 45, n. 2, p. 86-91, 2008.

NISHINO, T.; MORIKAWA, K. Structure and function of nucleases in DNA repair: shape, grip and blade of the DNA scissors. **Oncogene**, v. 21, n. 58, p. 9022-9032, 2002.

OLIVEIRA, B. E. C.; CURY, J. A.; RICOMINI FILHO, A. P. Biofilm extracellular polysaccharides degradation during starvation and enamel demineralization. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, e0181168, 2017.

OLIVEIRA, B. E. C.; RICOMINI FILHO, A. P.; BURNE, R. A.; ZENG, L. The Route of Sucrose Utilization by *Streptococcus mutans* Affects Intracellular Polysaccharide Metabolism. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 295, 1998.

PAES LEME, A. F. *et al.* The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. **Journal of Dental Research**, v. 85, n.10, p.878-87, 2006.

PANLILIO, H.; RICE, C. V. The role of extracellular DNA in the formation, architecture, stability, and treatment of bacterial biofilms. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 118, n. 6, p. 1–13, 2021.

PEDRAZA, M. C. C.; NOVAIS, T. F.; FAUSTOFERRI, R. C.; QUIVEY JR., R. G. *et al.* Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of *Streptococcus mutans* biofilms. **Biofouling**, n. 33, n. 9, p. 722–740, 2017.

PECKYS, D. B.; BAUDOIN, J. P.; EDER, M.; WERNER, U.; JONGE, N. Epidermal growth factor receptor subunit locations determined in hydrated cells with environmental scanning electron microscopy. **Scientific Reports**, v.3, n. 2626, 2013.

PECKYS, D. B.; BAUDOIN, J. P.; HANNIG, M. Oil droplet formation on pellicle covered tooth surfaces studied with environmental scanning electron microscopy. **Journal of Microscopy**, v. 274, n. 3, p. 158–167, 2019.

PERRY, J. A.; CVITKOVITCH, D. G.; LÉVESQUE, C. M. Cell death in *Streptococcus mutans* biofilms: a link between CSP and extracellular DNA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 299, n. 2, p. 261-6, 2009.

PITTS, N. B.; TWETMAN, S.; FISHER, J.; MARSH, O. D. Understanding dental caries as a non-communicable disease. **British Dental Journal**, v. 231, n. 12, 2021.

QUIVEY, R. G.; KUHNERT, W. L.; HAHN, K. Genetics of acid adaptation in oral *Streptococci*. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 12, p. 301–314, 2001.

RAO, A. P.; AUSTIN, R. D. Serotype specific polymerase chain reaction identifies a higher prevalence of *streptococcus mutans* serotype *k* and *e* in a random group of children with dental caries from the Southern region of India. **Contemporary Clinical Dentistry**, v.5, p. 296-301, 2014.

RÖLLA, G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferases and polysaccharides. **Scand J Dent Res**. Apr;97(2):115-9. 1989.

RÖLLA, G.; MELSEN, B. On the mechanism of plaque inhibition by chlorhexidine. **Journal of Dental Research**, v. 54, p. 57-62, 1975.

ROZEN, R.; STEINBERG, D.; BACHRACH, G. *Streptococcus mutans* fructosyltransferase interactions with glucans. **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, n. 1, p. 39-43, 2004.

SCREENIVASAN, P.; GAFFAR, A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, p. 965–974, 2002.

SCHLAFER, S.; MEYER, R. L.; DIGE, I.; REGINA, V. R. Extracellular DNA Contributes to Dental Biofilm Stability. **Caries Research**, v. 51, p. 436–442, 2017.

SELWITZ, R. H.; ISMAIL, A. I.; PITTS, N. B. Dental caries. **Lancet**, v. 369, n. 9555, p. 51-9, 2007.

SHEIHAM, A. Dietary effects on dental diseases. **Public Health Nutrition**, v. 4, n. 2B, p. 569-91, 2001.

SHUI, Y.; JIANG, Q.; LYU, X.; WANG, L. *et al.* Inhibitory effects of sodium new houthuyfonate on growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. **Microbial Pathogenesis**, v. 157, n. 104957, 2021.

SIMÓN-SORO, A.; GUILLEN-NAVARRO, M.; MIRA A. Metatranscriptomics reveals active bacterial composition in caries lesions. **Journal of Oral Microbiology**, v. 6, n. 1, 2014.

SIMÓN-SORO, A.; MIRA, A. Solving the etiology of dental caries. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 2, 2015.

STEINBERG, D.; ROTHMAN, M. Antibacterial effect of chlorhexidine on bacteria adsorbed onto experimental dental plaque. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 26, p. 109-115, 1996.

SULSTON, J .E. Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London: Biological Sciences**, v. 275, p. 287-297, 1976.

SUN, Y.; PAN, Y.; SUN, Y.; LI, M.; HUANG, S. *et al.* Effects of Norspermidine on Dual-Species Biofilms Composed of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. **BioMed Research International**, 2019.

SUZUKI, Y.; OHSUMI, T.; ISONO, T.; NAGATA, R.; HASEGAWA, T.; TAKENAKA, S. *et al.* Effects of a sub-minimum inhibitory concentration of chlorhexidine gluconate on the development of in vitro multi-species biofilms. **Biofouling**, v. 36, n. 2, p. 146-158, 2020.

TAKESHITA, H.; MOGI, K.; YASUDA, T.; NAKAJIMA, T.; NAKASHIMA, Y. *et al.* Mammalian deoxyribonucleases I are classified into three types: Pancreas, parotid, and

pancreas-parotid (mixed), based on differences in their tissue concentrations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p. 481–484, 2000.

TETZ, G. V.; ARTEMENKO, N. K.; TETZ, V. V. Effect of DNase and Antibiotics on Biofilm Characteristics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 1204–1209, 2009.

THEILADE, E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases, v. 3, n. 10, p. 905-911, 1986.

THERMO FISHER. **Product Information**. DNase I, RNase-free. Pub. No. MAN0012000. Rev. Date 05 April (Rev. B.00). 2016.

VAN STRYDONCK, D. A.; SLOT, D. E.; VAN DER VELDEN, U.; VAN DER WEIJDEN, F. Effect of a chlorhexidine mouth rinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, p. 1042–1055, 2012.

VARELA-RAMIREZ, A.; ABENDROTH, J.; MEJIA, A. A.; PHAN, I. Q.; LORIMER, D. *et al.* Structure of acid deoxyribonuclease. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 10, p. 6217-6227, 2017.

VILA, T.; KONG, E. F.; MONTELONGO-JAUREGUI, D. *et al.* Therapeutic implications of *C. albicans* - *S. aureus* mixed biofilm in a murine subcutaneous catheter model of polymicrobial infection. **Virulence**, v. 12, n. 1, 2021.

VITKOV, L.; HERMANN, A.; KRAUTGARTNER, W. D.; HERRMANN, M.; FUCHS, K.; KLAPPACHER, M. *et al.* Chlorhexidine-Induced Ultrastructural Alterations in Oral Biofilm. **Microscopy Research and Technique**, v. 68, p. 85–89, 2005.

WANG, Y. M.; VAN EYS, J. Nutritional significance of fructose and sugar alcohols. **Annual Review of Nutrition**, v. 1, p. 437-75, 1981.

WILSON, C.; LUKOWICZ, R.; MERCHANT, S.; VALQUIER-FLYNN, H.; CABALLERO, J.; SANDOLVAL, J. *et al.* Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. **Research and Reviews: Journal of Engineering and Technology**, v. 6, n. 4, 2017.

WHITCHURCH, C. B.; TOLKER-NIELSEN, T.; RAGAS, P. C. *et al.* Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science**, v. 295, n. 5559, p. 1487, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Oral Health: Achieving better oral health as part of the universal health coverage and noncommunicable disease agendas towards 2030. **Geneva: World Health Organization**, 2020.

XIA, S.; ZHAI, Y.; WANG, X.; FAN, Q. *et al.* Phosphorylation of polysaccharides: A review on the synthesis and bioactivities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 184, p. 946–954, 2021.

XIAO J.; ZUO Y.; LIU Y.; LI J.; HAO Y.; ZHOU, X. Effects of *Nidus Vespae* extract and chemical fractions on glucosyltransferases, adherence and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, v. 52, n. 9, p. 869–875, 2007.

XIAO, J.; ALKHERS, N.; KOPYCKA-KEDZIERAWSKI, D. T. *et al.* Prenatal Oral Health Care and Early Childhood Caries Prevention: A Systematic Review and Meta-analysis. **Caries Research**, v. 53, n. 4, p. 411–421, 2019.

ZHENG, X *et al.* Combinatorial Effects of Arginine and Fluoride on Oral Bacteria. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 2, p. 344–353, 2015.