

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

DANIELA ALEJANDRA CUSICANQUI MÉNDEZ

**Efeito da aplicação da arginina sobre a composição e metabolismo  
de biofilmes microcosmos de saliva e prevenção da  
desmineralização do esmalte**

BAURU  
2022

DANIELA ALEJANDRA CUSICANQUI MÉNDEZ

**Efeito da aplicação da arginina sobre a composição e metabolismo  
de biofilmes microcosmos de saliva e prevenção da  
desmineralização do esmalte**

Tese constituída por artigos apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Cruvinel da Silva

BAURU

2022

Cusicanqui Méndez, Daniela Alejandra

Efeito da aplicação da arginina sobre a composição e metabolismo de biofilmes microcosmos de saliva e prevenção da desmineralização do esmalte / Daniela Alejandra Cusicanqui Méndez. -- Bauru, 2022.

108p. : il. ; 31 cm.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Cruvinel da Silva

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:



Data: 4 de março 2022

Comitê de Ética da FOB-USP  
Protocolo nº: 90551018.8.0000.5417  
Data: 05/03/2021

## ERRATA

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Odontologia de Bauru  
Assistência Técnica Acadêmica  
Serviço de Pós-Graduação



## FOLHA DE APROVAÇÃO


Tese apresentada e defendida por  
**DANIELA ALEJANDRA CUSICANQUI MENDEZ**  
e aprovada pela Comissão Julgadora  
em 30 de março de 2022.





Prof. Dr. **GLÁUBER CAMPOS VALE**  
UFP





Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **ELIANA MITSUE TAKESHITA NAKAGAWA**  
UnB

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **DANIELA RIOS HONÓRIO**  
FOB-USP

Prof. Dr. **THIAGO CRUVINEL DA SILVA**  
Presidente da Banca  
FOB - USP

  
**Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte**  
Presidente da Comissão de Pós-Graduação  
FOB-USP

 Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 | Bauru-SP | CEP 17012-901 | C.P. 73  
 <https://posgraduacao.fob.usp.br>  
 14 | 3235-8223 / 3226-6097 / 3226-6096  
 [posgrad@fob.usp.br](mailto:posgrad@fob.usp.br)

 [posgraduacaofobusp](#)  
 [@posgradfobusp](#)  
 [fobuspoficial](#)  
 [@Fobpos](#)

---

---

## DEDICATÓRIA



Ao meu amado marido **Filipe**.

Ao meu mais precioso presente **Matias**.

A mis amados papás **José y Teresa**.

A mis queridos hermanos **José y Claudia**.

A mis queridos sobrinos **Fabian, Franco, Leandro y Luciana**.

A mi cuñada **Karen** y sobrina **Maria Belén**.

Aos meus sogros **Meire e Paulo**.

---

---

---

---

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**,

Pai, passou-se mais uma longa jornada de estudos e O Senhor me deu saúde e muitas bênçãos. Agradeço porque pude sentir sua presença desde o momento que fui aprovada até o momento final desta fase. Agradeço por todos os momentos felizes e mesmo pelos não tão felizes, pois cada um deles me trouxe aprendizados. Peço para que O Senhor seja sempre o Primeiro na minha vida, quem me conduza pelo caminho da vida. Faça que este Doutorado não seja apenas um benefício para mim, mas também para o próximo.

Ao meu marido **Filipe**,



Meu amor, como expressar tudo que você significou neste período? Lendo os agradecimentos que coloquei na minha dissertação de mestrado, vejo que escrevi um milhão de coisas que você fez por mim, que pensei que nunca poderiam ser superadas. Mas no período do “nosso Doutorado” (porque você sabe que não teria conseguido sem você), vejo que você se entregou plenamente para me ajudar. Você é incrível.

Amor, você me ensina, me aconselha, me cuida, me apoia, comemora comigo, me levanta, me abraça no meio do choro, me acompanha, você faz tudo por mim e não tenho palavras para expressar a minha gratidão. Durante todo o desenvolvimento desta pós-graduação, você esteve não apenas presencialmente, mas na minha mente e no meu coração... Esta tese é inteiramente sua. Te amo como nunca ninguém te amou, como nunca eu amei e desejo com todas as minhas forças passar o resto da minha vida ao teu lado. Obrigada amor por mais esta conquista que é nossa.

Ao meu filho **Matias**.

Meu bebê, apesar de você estar no nosso coração já há muito tempo, Deus nos concedeu a bênção de te ter fisicamente na fase final deste Doutorado. Ficou comigo por vários dias escrevendo esta tese, dando chutinhos para eu não desistir, para me lembrar que você é a minha motivação, para me esforçar mais e te dar tudo do melhor. aguardo ansiosa para te ver, te abraçar e te beijar. Te amo loucamente.

---

---

---

---

A mis queridos papás **José y Teresa,**



Papitos, agradezco el incentivo inicial para poder graduarme como dentista y especialista. Muchas gracias por el apoyo incondicional durante la maestría y ahora finalmente en el doctorado. Agradezco por cada palabra de ánimo y de sabios consejos. Agradezco por que en cada duda ustedes tuvieron la palabra correcta en la punta de la lengua. Muchas gracias por todo el amor, por siempre recomendarme aspirar por más y nunca rendirme. Los amo incondicionalmente hasta la eternidad.

A mis queridos hermanos **José y Claudia,**

Ustedes son mis segundos papás, inteligentes, trabajadores y luchadores. Les agradezco porque ustedes siempre me mostraron que luchar da frutos y que no podemos rendirnos. Los amo muchísimo.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Thiago Cruvinel da Silva,**



Muitos anos se foram e eu me lembro como se fosse ontem a nossa primeira reunião. Agradeço a vida acadêmica que o senhor me ajudou a construir e agora agradeço por este Doutorado, por confiar em mim para a execução deste projeto, pelos projetos dos meus orientados de iniciação científica e de muitas pesquisas paralelas que sonhei realizar e o senhor permitiu. Agradeço por toda a ajuda e desejo muita saúde e sucesso hoje e sempre.

**À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),**

Pela concessão da bolsa de doutorado no período compreendido entre abril do 2017 até fevereiro do 2019.

**À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),**

Pela concessão da bolsa de doutorado (processo nº 2018/01654-8) e o auxílio regular à pesquisa (processo nº 2018/03866-2), essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

---

---



---

---

À minha querida amiga **Maricel**,



Obrigada pela colaboração na orientação dos meninos, por me auxiliar e acompanhar no desenvolvimento de pesquisas na área da Endodontia. Quem me acompanhou em grande parte na minha pesquisa, sempre disposta a trabalhar e ajudar, sem importar o horário nem quanto iria durar o experimento. Sempre de bom humor, sempre com uma ideia nova para pesquisar, sempre com uma bactéria nova para cultivar. Uma pessoa que ama microbiologia, ama as nossas filhas bactérias, cuida zelosamente de

nossas pipetas e garrafas de reagentes, ama milhões de placas de Petri de todas as cores e tamanhos, ama placas de 6, 24, 48 e 96 poços e fluxos laminares tanto quanto eu. Prepara BHI pensando em que talvez eu possa precisar. Obrigada por me mostrar sempre o lado bom e engraçado das coisas. Amiga, ainda temos muito para oferecer e o mundo está prestes a nos conhecer. Ninguém falou que seria fácil e não podemos desistir porque o que nos aguarda é grandioso.

À minha querida amiga **Jessica**,



Amiga, teu alto astral e maravilhosa atitude sempre foram essenciais para levar de maneira mais amena este Doutorado. Agradeço principalmente teu apoio emocional e, por muitas vezes, tua companhia durante a fase mais desafiadora do meu Doutorado, ao lado da tão temida cortadeira. Amiga, admiro você de uma maneira inexplicável. Agradeço por todos os conselhos e ensinamentos. Te desejo sempre bençãos e conquistas. Você é um exemplo para mim de perseverança, superação

e tudo nos braços da humildade. Melhor professora que conheço!

Ao **Centro Integrado de Pesquisa da FOB-USP (CIP)**, no período inicial do meu Doutorado na pessoa do **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira** e no final nas pessoas das **Profas. Dras. Ana Carolina Magalhães e Ana Flávia Sanches Borges**,

---

---



Posso me expressar com muito carinho ao CIP, pois foi meu segundo lar durante toda a minha vida de pós-graduanda. Suas instalações altamente preparadas e variedade de equipamentos nos fornecem todas as condições para poder desenvolver pesquisas de alta qualidade. Agradeço

todas as pesquisas que eu pude realizar neste local, todos os alunos que pude colaborar, todos os dias e noites. Os finais de semana e feriados que passei aqui foram muito proveitosos e posso falar com toda sinceridade que eu desfrutava demais trabalhar neste estabelecimento. Sinto e sentirei muita falta do meu tão querido CIP.

Aos técnicos do **CIP, Marcelo Milanda, Márcia Graef e Rafaela Alves,**



Agradeço muito pela ajuda durante todos estes anos de trabalho laboratorial. Após o falecimento do nosso querido técnico da Odontopediatria, **Evandro Dionisio**, vocês me acolheram ainda mais e de uma maneira mágica, me dando dicas, ensinando novas

técnicas, fornecendo materiais e reagentes. Agradeço por tantos momentos felizes de companheirismo. Agradeço a confiança, sempre o bom humor e aquele semblante alegre que me recebia todos os dias em nosso CIP querido. Vocês moram no meu coração.

Às minhas colegas da pós-graduação, principalmente **Estefi e Anna Paola,**



Amigas, agradeço por todos os momentos vividos de risadas e de companheirismo, pois tornaram tudo mais meigo e divertido. Estefi, minha companheira por estes 7 anos, passamos por muitas coisas que nos ensinaram muito. Tua calma e perseverança me

mantiveram firme e te agradeço por isso. Anna, você chegou brilhando, para nos dar alegrias e te agradeço por ser tão transparente e parceira. Amigas, desejo que apesar da distância que teremos, possamos manter nossa amizade forte e vital. Muito êxito

---

---

---

---

nos seus caminhos, vocês são talentosíssimas e tenho certeza de que só virão conquistas maravilhosas para vocês.

Aos **meus orientados** de iniciação científica,



Querida **Veridiana** e queridos **João** e **Eric**, muito obrigada pela oportunidade de participar da vida científica de vocês. Vocês me deram muitas alegrias em cada apresentação de congresso e relatórios de altíssima qualidade. Desejo uma vida cheia de sucesso e satisfações. Moram no meu coração.

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Bauru,

Prof. Dr. **Paulo Sergio Santos**, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Flaviana Bombarda de Andrade**, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. **Daniela Rios**, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Paula Jorge**, Prof. Dr **Natalino Lourenço Neto**, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Thais Marchini de Oliveira** e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. **Maria Aparecida de Andrade Machado**, que participaram da minha formação durante estes anos de Doutorado.

À disciplina de **Odontopediatria e seus funcionários**.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo**, na pessoa do seu Diretor, **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**, pelos 7 anos de pós-graduação.

---

---

---

---

## Só o começo

Eu aprendi qual é o valor de um sonho alcançar  
Eu entendi que o caminho pedras terá  
Eu vi em campo aberto se erguer construção  
E foi com muitas pedras, E foi com muitas mãos

Eu vi o meu limite vir diante de mim  
Eu enfrentei batalhas que eu não venci  
Mas o troféu não é quem não fracassou  
Eu tive muitas quedas, mas não fiquei no chão

E ao olhar pra trás, tudo que passou  
Venho agradecer quem comigo estava  
Ergo minhas mãos, pra reconhecer

Que hoje eu sou, quem eu sou  
Pois Sua mão me acompanhava  
Mas eu sei, não é o fim  
É só o começo da jornada  
E eu abro o meu coração  
Pra minha nova história

Vejo vitórias, hoje eu olho pra trás  
E a minha frente eu sei que tem muito mais  
Eu sei que minha jornada aqui só começou  
E ao longo dessa estrada  
Sozinha eu não estou

Pedro Valença

---

---

*Resumo*

---

---

## RESUMO

O objetivo do presente estudo *in vitro* foi determinar o efeito de duas diferentes concentrações da arginina (2,5% e 8%), associada ou não ao fluoreto de sódio a 1.450 ppm, sobre a composição e metabolismo de biofilmes microcosmos de saliva e prevenção e controle da desmineralização do esmalte dentário. Amostras de saliva provenientes de três adultos livres de cárie foram utilizadas como inóculos para a obtenção de um pool microbiológico que foi utilizado como estoque inicial para o crescimento de biofilmes microcosmos sobre blocos de esmalte bovino. O estudo foi dividido em três fases: i) determinação das condições de crescimento dos biofilmes microcosmos de saliva, ii) efeito da arginina combinada ou não ao fluoreto de sódio sobre o crescimento de biofilmes e iii) efeito do tratamento com arginina combinada ou não ao fluoreto de sódio sobre biofilmes crescidos por 3 dias. A composição e viabilidade dos biofilmes foram determinadas pela contagem de unidades formadoras de colônia de micro-organismos totais, estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e lactobacilos, crescidas sobre Agar Soja Triptona Sangue, Agar Mitis Salivarius, Agar Mitis Salivarius Sacarose Bacitracina e Agar Rogosa com ácido acético glacial a 0,13%, respectivamente. A vitalidade dos biofilmes intactos foi determinada por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). O metabolismo dos biofilmes foi determinado pela quantificação de polissacarídeos extracelulares insolúveis (AlexaFluor e CalcoFluor em MCVL), pela redução de resazurina (método colorimétrico) e concentração de L-lactato em meio de cultura (método de espectrofotometria enzimática). A desmineralização do esmalte foi determinada pela quantidade de cálcio liberado em meio de cultura por método Arsenazo III e perda mineral integrada e profundidade de lesão por microrradiografia transversal. As análises estatísticas foram realizadas pelos testes de Kruskal Wallis e post-hoc de Dunn ( $P < 0,05$ ). Os biofilmes crescidos em meio McBain suplementado com sacarose a 0,2% e PIPES a 25 mmol/L em anaerobiose apresentaram resultados adequados para ensaios laboratoriais com arginina, considerando a composição, a viabilidade e a vitalidade dos biofilmes, bem como a reprodutibilidade dos resultados. Observou-se efeito antibiofilme sinérgico da arginina e fluoreto de sódio pela redução da viabilidade, vitalidade e formação de polissacarídeos extracelulares de biofilmes que cresceram ou foram tratados pelos reagentes. Adicionalmente, o metabolismo de resazurina foi

---

---

---

---

reduzido pelos reagentes em ambas as condições de crescimento e tratamento. Porém, a produção de ácido láctico foi significativamente reduzida apenas pelo tratamento com arginina a 8% e por ambas as combinações de arginina e NaF. A concentração de cálcio liberado em meio de cultura foi significativamente menor em todos os grupos de crescimento, exceto arginina a 2,5%, e nos grupos de tratamento com arginina a 8% e ambas as combinações com fluoreto de sódio. Entretanto, todos os demais parâmetros de desmineralização do esmalte foram similares entre todos os grupos. Portanto, os resultados do presente estudo demonstraram um efeito sinérgico da combinação da arginina e do fluoreto de sódio sobre o crescimento e tratamento de biofilmes de microcosmos de saliva, reduzindo a viabilidade, vitalidade e metabolismo, desacelerando o processo de perda mineral mesmo em condições de alta disponibilidade de sacarose, contudo sem evitar o desenvolvimento de lesão no esmalte.

**Palavras-chave:** Cárie Dentária. Biofilme. Esmalte. Arginina. Fluoreto.

---

---

*Abstract*



---

---

## ABSTRACT

### **Effect of the application of arginine on the composition and metabolism of salivary microcosm biofilms to prevent the enamel demineralization**

The aim of the present study was to determine the effect of two different concentrations of arginine (2.5% and 8%), combined or not with 1,450 ppm sodium fluoride, on the composition and metabolism of salivary microcosm biofilms, and prevention and control of the enamel demineralization. Saliva samples collected from 3 free-carries adults were used as inocula to obtain a microbial pool to grow microcosm biofilms on bovine enamel blocks. This study was divided in 3 phases: i) to determine the adequate growth conditions of salivary microcosm biofilms, ii) to evaluate the effect of arginine combined or not with sodium fluoride on biofilm growth, and iii) to assess the effect of treatments with arginine combined or not with sodium fluoride on 3-day biofilms. The composition and viability of biofilms were determined by the colony forming unit counts of total microorganisms, total streptococci, mutans streptococci, and total lactobacilli grown on Tryptic Soy Blood Agar, Mitis Salivarius Agar, Mitis Salivarius Bacitracin Agar, and Rogosa Agar with 0.13% glacial acetic acid, respectively. The vitality of intact biofilms was determined in a confocal scanning laser microscope (CSLM). The metabolism of biofilms was determined by the quantification of insoluble extracellular polysaccharides (AlexaFluor and CalcoFluor in CSLM), resazurin assay (colorimetric method), and determination of the concentration of L-lactate in culture media (spectrophotometric enzymatic method). The enamel demineralization was assessed by the concentration of calcium released in culture media by Arsenazo III method, and integrated mineral loss and lesion depth by transversal microradiography. Statistical analyses were performed by Kruskal Wallis and Dunn's post-hoc tests ( $P < 0,05$ ). The biofilms grown in modified McBain with 0.2% sucrose and 25 mmol/L PIPES in anaerobic conditions presented adequate outcomes to laboratorial essays with arginine, regarding composition, viability, and vitality of biofilms, as well as the reproductibility of results. It was observed a synergic antibiofilm effect of arginine and sodium fluoride by the reduction of the viability, vitality, extracellular polysaccharides, and the metabolism of resazurin in biofilms that grew or were treated by the reagents. However, the production of lactic acid was significantly reduced only in treatments with 8% arginine and both combinations of arginine and sodium fluoride. The concentration

---

---

---

---

of calcium released in culture media was significantly lower in all groups of biofilm growth, except for 2.5% arginine, and in the treatment groups with 8% arginine and both combinations of arginine and sodium fluoride. Distinctly, the other parameters of enamel demineralization were similar among all groups. Therefore, these findings showed a synergic effect of arginine plus sodium fluoride during the biofilm growth, and also to treat salivary microcosm biofilms, reducing the viability, vitality, and metabolism, slowing the mineral loss even in conditions with high availability of sucrose; however, no avoiding the development of enamel lesions.

**Keywords:** Dental Caries. Biofilm. Enamel. Arginine. Fluoride.

---

---

---

---

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### - FIGURAS

#### ARTIGO 1

- Figura 1. Variação dos valores de pH ao longo do tempo, de acordo com as diferentes condições de crescimento dos biofilmes..... 40
- Figura 2. Contagens de lactobacilos totais (A, B), estreptococos do grupo mutans (C, D), estreptococos totais (E, F) e micro-organismos totais (G, H) após 3 e 7 dias de crescimento, respectivamente. Os diagramas de caixa representam os valores das medianas, com percentis de 25 e 75. Letras minúsculas sobrescritas representam diferenças estatísticas entre os grupos do mesmo período de crescimento e as letras maiúsculas correspondem às diferenças estatísticas entre o mesmo grupo microbiano entre diferentes períodos de crescimento de biofilme..... 41
- Figura 3. Vitalidade (A, B), biovolume de células vivas (C, D) e matriz extracelular (E, F) dos biofilmes crescidos por 3 e 7 dias, respectivamente. Os diagramas de caixa representam os valores das medianas, com percentis de 25 e 75. Letras minúsculas sobrescritas representam diferenças estatísticas entre os grupos do mesmo período de crescimento e as letras maiúsculas correspondem às diferenças estatísticas entre o mesmo grupo microbiano entre diferentes períodos de crescimento de biofilme. .... 43
- Figura 4. Imagens de biofilmes intactos de microcosmos salivares tratados com as seguintes condições: (A e a) 25 ANA, biofilmes de 3 dias; (B e b) 50 ANA, biofilmes de 3 dias; (C e c) 25 MICRO, biofilmes de 3 dias; (D e d) 50 MICRO, biofilmes de 3 dias; (E e e) 25 ANA, biofilmes de 7 dias; (F e f) 50 ANA, biofilmes de 7 dias; (G e g) 25 MICRO, biofilmes
- 
-

---

---

de 7 dias; (H e h) 50 MICRO, biofilmes de 7 dias. As letras maiúsculas e minúsculas correspondem respectivamente às vistas frontal e de perfil dos biofilmes. Diferentes cores de emissões de fluorescência indicam células viáveis (verde), células mortas (vermelha), Matriz extracelular (azul)..... 44

Figura 5. Curvas representando perfis de conteúdo mineral após crescimento dos biofilmes sobre blocos de esmalte bovino. As curvas vermelhas representam o perfil do conteúdo mineral do esmalte (área controle) e as curvas azuis representam o perfil do conteúdo mineral do esmalte desmineralizado (área teste). As condições de crescimento são expressas a seguir: (a) 25 ANA, biofilme de 3 dias; (b) 50 ANA, biofilme de 3 dias; (c) 25 MICRO, biofilme de 3 dias; (d) 50 MICRO, biofilme de 3 dias; (e) 25 ANA, biofilme de 7 dias; (f) 50 ANA, biofilme de 7 dias; (g) 25 MICRO, biofilme de 7 dias; (h) 50 MICRO, biofilme de 7 dias..... 45

## ARTIGO 2

Figura 1. Variação dos valores de pH ao longo do tempo, de acordo com as diferentes condições de crescimento de biofilme. .... 61

Figura 2. Contagem de lactobacilos totais (A), estreptococos do grupo mutans (B), estreptococos totais (C) e microrganismos totais (D), de acordo com as diferentes condições de crescimento de biofilme. Diagramas de caixa representam os valores das medianas, percentis 25 e 75 e limite inferior e superior do intervalo de confiança de 95%. Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos..... 62

Figura 3. Biovolumes de células vivas (A), células mortas (B), polissacarídeos extracelulares alfa ( $\alpha$ -PECs) (C) e polissacarídeos extracelulares beta ( $\beta$ -PECs) (D), de acordo com as diferentes condições de crescimento. Diagramas de caixa representam os valores das medianas, percentis

---

---

---

---

25 e 75 e limite inferior e superior do intervalo de confiança de 95% das marcações dos corantes em microscopia confocal de varredura a laser. Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas..... 64

Figura 4. Imagens de biofilmes intactos de microcosmos salivares crescidos nas seguintes condições: meio de crescimento McBain modificado com sacarose a 0,2% (A), NaF a 1.450 ppm (B), arginina a 2,5% (C), arginina a 2,5% + NaF a 1.450 ppm (D), arginina a 8% (E) e (F) arginina a 8% + NaF a 1.450 ppm. Diferentes cores de emissões de fluorescência indicam células viáveis (verde), células mortas (vermelha),  $\alpha$ -PECs (violeta) e  $\beta$ -PECs (azul)..... 65

Figura 5. Imagens de microradiografias transversais (amplificação 10T) e curvas representando perfis de conteúdo mineral após 5 dias de crescimento dos biofilmes sobre blocos de esmalte bovino. As curvas vermelhas representam o perfil do conteúdo mineral do esmalte (área controle) e as curvas azuis representam o perfil do conteúdo mineral do esmalte desmineralizado (área teste)..... 66

### **ARTIGO 3**

Figura 1. Variação dos valores de pH ao longo do tempo, de acordo com as diferentes condições de tratamento dos biofilmes..... 82

Figura 2. Contagem de lactobacilos totais (amarelo), estreptococos do grupo mutans (azul escuro), candida (verde), estreptococos totais (azul claro) e microrganismos totais (vermelho) de acordo com as diferentes condições de tratamento. Os valores demonstrados correspondem às médias e desvios-padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. .... 83

---

---

- 
- 
- Figura 3. Porcentagem da redução do metabolismo de resazurina de acordo com as diferentes condições de tratamento. Diagramas de caixa representam os valores das medianas, percentis 25 e 75 e limite inferior e superior do intervalo de confiança de 95% das marcações dos corantes em microscopia confocal de varredura a laser. Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas..... 84
- Figura 4. Biovolumes de células vivas (A), células mortas (B), polissacarídeos extracelulares alfa ( $\alpha$ -PECs) (C) e polissacarídeos extracelulares beta ( $\beta$ -PECs) (D), de acordo com as diferentes condições de tratamento. Diagramas de caixa representam os valores das medianas, percentis 25 e 75 e limite inferior e superior do intervalo de confiança de 95% das marcações dos corantes em microscopia confocal de varredura a laser. Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas..... 86
- Figura 5. Imagens de biofilmes intactos de microcosmos salivares tratados com as seguintes condições: meio de crescimento McBain modificado com sacarose a 0,2% (A), NaF a 1.450 ppm (B), arginina a 2,5% (C), arginina a 2,5% + NaF a 1.450 ppm (D), arginina a 8% (E) e (F) arginina a 8% + NaF a 1.450 ppm. Diferentes cores de emissões de fluorescência indicam células viáveis (verde), células mortas (vermelha),  $\alpha$ -PECs (violeta) e  $\beta$ -PECs (azul)..... 87
- Figura 6. Imagens de microradiografias transversais (amplificação 10T) e curvas representando perfis de conteúdo mineral após 7 dias de crescimento dos biofilmes sobre blocos de esmalte bovino. As curvas vermelhas representam o perfil do conteúdo mineral do esmalte (área controle) e as curvas azuis representam o perfil do conteúdo mineral do esmalte desmineralizado (área teste)..... 89
- 
-

---

---

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

- Tabela 1. Concentração de ácido láctico (mmol/L) de acordo com as diferentes condições de crescimento de biofilme. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ..... 42
- Tabela 2. Medidas de tendência central dos valores de perda mineral integrada (%vol.mm), profundidade de lesão ( $\mu\text{m}$ ) e concentração de cálcio liberado ( $\mu\text{g/mL}$ ) após 3 e 7 dias de crescimento de biofilmes de acordo com as diferentes condições ..... 46

### ARTIGO 2

- Tabela 1. Metabolismo de resazurina (% redução) e ácido láctico (mmol/L). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ..... 63
- Tabela 2. Vitalidade e espessura dos biofilmes intactos de microcosmos de saliva de acordo com as diferentes condições de crescimento. A porcentagem é representada pela razão do biovolume de células vivas pelo biovolume total de células vivas e mortas. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ..... 66
- Tabela 3. Medidas de tendência central dos valores de perda mineral integrada (%vol.mm), profundidade de lesão ( $\mu\text{m}$ ) e concentração de cálcio liberado ( $\mu\text{g/mL}$ ) após 5 dias de crescimento de biofilmes de acordo com os diferentes grupos ..... 67
- 
-

---

---

### ARTIGO 3

- Tabela 1. Concentração de ácido láctico (mmol/L) após as diferentes condições de tratamento. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ..... 85
- Tabela 2. Vitalidade e espessura dos biofilmes intactos de microcosmos de saliva de acordo com as diferentes condições de tratamento. A porcentagem é representada pela razão do biovolume de células vivas pelo biovolume total de células vivas e mortas. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ..... 88
- Tabela 3. Medidas de tendência central dos valores de perda mineral integrada (%vol.mm), profundidade de lesão ( $\mu\text{m}$ ) e concentração de cálcio liberado ( $\mu\text{g/mL}$ ) após 7 dias de crescimento de biofilmes de acordo com os diferentes grupos de tratamento ..... 89
- 
-



---

---

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

NaF	Fluoreto de sódio
ARG	Arginina
F-ARG	Combinação Fluoreto de sódio e arginina
UFC	Unidades formadoras de colônias
PECs	Polissacarídeos extracelulares
MCVL	Microscopia confocal de varredura a laser
ADS	Sistema arginina deiminase
TMR	Microrradiografia transversal

---

---

---

---

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>ARTIGOS .....</b>	<b>31</b>
2.1	ARTIGO 1 - Viabilidade, vitalidade e atividade metabólica de biofilmes de microcosmos de saliva e seus efeitos sobre a desmineralização do esmalte, considerando diferentes condições de crescimento .....	31
2.2	ARTIGO 2 - Efeito da arginina associada ou não ao fluoreto de sódio sobre o crescimento de biofilmes microcosmos salivares e prevenção da desmineralização do esmalte .....	53
2.3	ARTIGO 3 - Efeito antimicrobiano e antibiofilme da arginina combinada ou não ao fluoreto de sódio para o controle da desmineralização do esmalte ....	72
<b>3</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>99</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>103</b>
	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>105</b>

---

---

# *1 Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

O desequilíbrio do relacionamento harmônico entre os diversos componentes de um microbioma pode conduzir ao processo de doenças bucais (MARSH, 2006). O acúmulo do biofilme dentário pode ser considerado um promotor da alteração da composição microbiológica local. A fermentação de carboidratos provenientes da dieta por micro-organismos acidogênicos promove a queda do pH (BEIGHTON, 2005), o que promove a seleção (MARSH, 2006) e predomínio dos micro-organismos acidúricos na composição do biofilme (LIMA; COELHO; PINHEIRO; RÔÇAS *et al.*, 2011; PAES LEME; KOO; BELLATO; BEDI *et al.*, 2006). Desta forma, a acidogenicidade do biofilme aumenta, fazendo com que o pH permaneça cada vez mais tempo abaixo dos valores críticos para a desmineralização (CUMMINS, 2013; KIDD; FEJERSKOV, 2004). Quanto maior a exposição dos tecidos dentários a condições críticas de pH, maiores serão as chances de evidenciação de sinais clínicos da cárie dentária, como manchas brancas e cavidades em esmalte e dentina (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). Entretanto, qualquer lesão, em qualquer estágio de destruição tecidual, não-cavitada ou cavitada, pode se tornar inativa, independentemente de ser restaurada ou não (LO; SCHWARZ; WONG, 1998). Para que o sucesso do controle da progressão da doença seja alcançado localmente, a contagem de micro-organismos deve ser equilibrada pela modificação ambiental em favor de não-acidúricos.

O metabolismo microbiano de açúcares produz ácidos através de uma via glicolítica comum, a via de Embden-Meyrhopf-Parnas. Quando carboidratos são disponibilizados em grandes quantidades, estreptococos orais, incluindo estreptococos do grupo mutans e não-mutans (HAMILTON; ELLWOOD, 1983; TAKAHASHI; NYVAD, 2011; VAN HOUTE; DE MOOR; JANSEN, 1970) e *Actinomyces* (HAMILTON; ELLWOOD, 1983) são capazes de estocar esse excedente na forma de polissacarídeos intracelulares que, em momentos de escassez, podem ser utilizados como fonte de energia para a produção de ácidos.

Além dessa via de produção energética, alguns micro-organismos são capazes de gerar energia através do metabolismo de glicoproteínas salivares. A maioria dos estreptococos não-mutans podem utilizar arginina e peptídeos contendo arginina

---

disponíveis na saliva através do sistema arginina-deaminase (ADS), capaz de degradar a molécula de arginina em amônia e dióxido de carbono com produção de ATP. No geral, essa via metabólica produz compostos alcalinos e neutraliza o pH intracelular e do meio (BURNE; MARQUIS, 2000). O sistema ADS é útil para estreptococos não-mutans, não apenas para a produção de energia, mas também para a sobrevivência dos micro-organismos sob condições ácidas extremas.

A produção de amônia via ADS resulta em aumento do pH citoplasmático e ambiental, beneficiando os micro-organismos orais das seguintes formas: 1) protegendo-os contra a morte por ácidos (BURNE; MARQUIS, 2000), 2) provendo vantagens bioenergéticas que incluem aumento do pH e síntese de ATP (BURNE; MARQUIS, 2000; POOLMAN; DRIESSEN; KONINGS, 1987), e 3) mantendo um meio com pH relativamente neutro, menos favorável ao crescimento de micro-organismos cariogênicos (BURNE; MARQUIS, 2000; MARQUIS; BENDER; MURRAY; WONG, 1987). Dessa forma, a habilidade do biofilme em produzir compostos alcalinos é fundamental para a manutenção de condições de saúde e homeostase do pH (KLEINBERG, 2002; TAKAHASHI; NYVAD, 2011). Portanto, o sistema ADS é talvez a via de homeostase e de pH mais significativa em biofilmes orais que influencia a suscetibilidade ou a resistência à cárie dentária (NASCIMENTO; BROWNGARDT; XIAOHUI; KLEPAC-CERAJ *et al.*, 2014; ZHENG; HE; WANG; ZHOU *et al.*, 2017).

Além disso, os compostos alcalinos produzidos pelas bactérias podem influenciar a ecologia do biofilme e o balanço químico entre os minerais dentários, ao neutralizar os efeitos do baixo pH resultante da produção de ácidos pelos micro-organismos, por meio do metabolismo de carboidratos provenientes da dieta (DAWES; DIBDIN, 2001; DIBDIN; DAWES, 1998; SISSONS; CUTRESS; PEARCE, 1985; SISSONS; HANCOCK; CUTRESS, 1988). Consequentemente, a produção de compostos alcalinos tem potencial para ser um fator endógeno inibidor da cárie dentária (BURNE; MARQUIS, 2000).

Neste sentido, a arginina incorporada aos dentifrícios para o tratamento de sensibilidade dentinária poderia beneficiar a prevenção da cárie dentária. A arginina é metabolizada por bactérias arginolíticas que produzem substâncias semelhantes à amônia (WIJEYEWEERA; KLEINBERG, 1989), promovendo um aumento de pH no biofilme (BURNE; MARQUIS, 2000; HUANG; EXTERKATE; TEN CATE, 2012; LIU; NASCIMENTO; BURNE, 2012). Estudos clínicos demonstraram que os indivíduos

---

livres de cárie têm níveis de arginina muito elevados na saliva (VAN WUYCKHUYSE; PERINPANAYAGAM; BEVACQUA; RAUBERTAS *et al.*, 1995) e maior atividade do sistema ADS no biofilme e saliva do que os indivíduos com lesão de cárie (NASCIMENTO; GORDAN; GARVAN; BROWNGARDT *et al.*, 2009). A arginina também pode ter efeito na co-agregação entre as bactérias e a formação e viabilidade do biofilme (BERNIER; HA; KHAN; MERRITT *et al.*, 2011; BORRIELLO; RICHARDS; EHRLICH; STEWART, 2006; SATO; NAKAZAWA, 2014; ZHU; WEISS; OTTO; FEY *et al.*, 2007).

Portanto, o desenvolvimento de novos estudos *in vitro* sobre o efeito da arginina associada ou não ao flúor na prevenção da desmineralização do esmalte dentário, pela ação da modificação do metabolismo de micro-organismos de biofilmes dentários complexos, é de fundamental importância para o melhor entendimento da efetividade e benefício do emprego deste aminoácido como um agente auxiliar para a manutenção da saúde bucal.

---

---

*2 Artigos*

## 2 ARTIGOS

### 2.1 Artigo 1 - Viabilidade, vitalidade e atividade metabólica de biofilmes de microcosmos de saliva e seus efeitos sobre a desmineralização do esmalte, considerando diferentes condições de crescimento

Daniela Alejandra Cusicanqui Méndez<sup>a</sup>, Marília Afonso Rabelo Buzalaf<sup>b</sup>, Juliano Pelim Pessan<sup>c</sup>, Thiago Cruvinel da Silva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo

<sup>b</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo

<sup>c</sup>Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista

#### **Autor correspondente:**

Thiago Cruvinel da Silva

Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Alameda Dr. Ótávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Vila Universitária, 17012-901, Bauru-SP, Brasil

Fone: +55 14 3235 8318 Telefax: +55 14 3223 4679

Email: [thiagocruvinel@fob.usp.br](mailto:thiagocruvinel@fob.usp.br)

---



## **Viabilidade, vitalidade e atividade metabólica de biofilmes de microcosmos de saliva e seus efeitos sobre a desmineralização do esmalte, considerando diferentes condições de crescimento**

### **RESUMO**

**Introdução:** Os resultados obtidos em estudos *in vitro* utilizando modelos de biofilme dependem de condições laboratoriais predefinidas e controladas.

**Objetivo:** Comparar a viabilidade, a vitalidade e o metabolismo de biofilmes de microcosmos de saliva e seus efeitos sobre a desmineralização do esmalte, considerando situações distintas de crescimento em relação ao tamponamento, atmosfera de incubação e tempo.

**Métodos:** Amostras de saliva de 3 adultos foram utilizadas para obter um pool microbiológico para o crescimento dos biofilmes. Os biofilmes cresceram em meio McBain modificado com sacarose a 0,2% e PIPES (25 ou 50 mmol/L) em anaerobiose ou microaerofilia, constituindo os seguintes grupos: a) McBain com PIPES a 25 mmol/L em anaerobiose (25 ANA), b) McBain com PIPES a 50 mmol/L em anaerobiose (50 ANA), c) McBain com PIPES a 25 mmol/L em microaerofilia (25 MICRO) e d) McBain com PIPES a 50 mmol/L em microaerofilia (50 MICRO). Os meios foram trocados a cada 24 h até completar 3 e 7 dias de crescimento. Os grupos foram avaliados de acordo com os seguintes desfechos: concentração de ácido láctico (método espectrofotométrico enzimático), viabilidade de grupos microbianos específicos (unidades formadoras de colônia), valores de pH (eletrodo), vitalidade, biovolumes de células vivas e de matriz extracelular de biofilmes intactos (microscopia confocal de varredura a laser), concentração de cálcio liberado (método Arsenazo III), perda mineral integrada e profundidade de lesão (microrradiografia transversal) A análise estatística foi realizada pelos testes de Kruskal Wallis e post-hoc de Dunn ( $P < 0,05$ ).

**Resultados:** A vitalidade e o biovolume de matriz extracelular foram maiores nos biofilmes que cresceram em anaerobiose. A viabilidade de lactobacilos totais foi maior no grupo 25 ANA, que também apresentou menores valores de pH. Não foram

---

observadas diferenças significativas no metabolismo de ácido láctico, concentração de cálcio liberado, perda de dureza superficial e profundidade de lesão.

**Conclusões:** A atmosfera de crescimento do biofilme de microcosmos de saliva interferiu na viabilidade, vitalidade e produção de matriz extracelular, porém sem causar alterações no metabolismo ácido e desmineralização do esmalte.

**Palavras chave:** Biofilme, Cárie Dentária, Saliva, Modelos Experimentais, Estudo in vitro

---

---

## INTRODUÇÃO

Por muito tempo, os estreptococos do grupo mutans foram considerados os principais patógenos relacionados à cárie dentária, sendo este grupo de micro-organismos o mais utilizado em pesquisas laboratoriais para o estudo do efeito preventivo de agentes antimicrobianos (TWETMAN, 2018). Porém, ele tem sido detectado em biofilmes simbióticos em indivíduos livres de cárie, mostrando a relevância da disbiose do biofilme para o desenvolvimento da doença. Os avanços nas pesquisas dos biofilmes cariogênicos revelaram a grande diversidade da sua composição microbiana e da matriz polimérica extracelular em que se encontram (BOWEN; BURNE; WU; KOO, 2018). De fato, biofilmes complexos interagem com fatores externos que comprometem não apenas o seu desenvolvimento, mas também a sua composição, tornando-os mais ou menos virulentos (SIM; DASHPER; REYNOLDS, 2016). Portanto, pesquisas têm sido desenvolvidas na tentativa de manter ou devolver a homeostase ao microbioma oral e assim prevenir doenças bucais (TWETMAN, 2018).

Os estudos *in vitro* têm um papel importante na sequência lógica da pirâmide de nível de evidência científica. Eles são destinados a entender os mecanismos de ação dos fenômenos ocorridos por meio de modelos que tentam simular as condições naturalmente observadas em humanos. Os testes de agentes antimicrobianos para a prevenção da cárie se baseiam em modelos de biofilme com substrato dentário, caracterizado por episódios de desmineralização e remineralização que ocorrem de maneira dinâmica durante o desenvolvimento do biofilme, que pode culminar na perda mineral e desenvolvimento de lesão como resultado do metabolismo ácido dos micro-organismos (FARIAS; CARVALHO; MÉNDEZ; CRUVINEL *et al.*, 2020).

Um bom modelo de biofilme deve ser representativo da diversidade natural do microbioma humano, assim como o meio de crescimento e a atmosfera de incubação (SIM; DASHPER; REYNOLDS, 2016). Biofilmes artificiais multiespécies se dividem em duas categorias: consórcios complexos ou microcosmos. Os consórcios contêm espécies cultiváveis representativas de ecossistemas que colonizam a cavidade bucal, assim como fungos e bactérias ATCC. Este modelo pode variar de duas até múltiplas cepas (biofilme polimicrobiano) (CHEVALIER; RANQUE; PRÊCHEUR, 2018). Em modelos de microcosmos, o inóculo é constituído por saliva (CAVALCANTI; BERTOLINI; DA SILVA; DEL-BEL-CURY *et al.*, 2014), placa dentária (DE OLIVEIRA; CRUVINEL; CUSICANQUI MÉNDEZ; DIONÍSIO *et al.*, 2018) ou tecido cariado

---

coletado de cavidades (MÉNDEZ; GUTIERREZ; DIONÍSIO; OLIVEIRA *et al.*, 2018), que mantêm a biodiversidade, relações ecológicas, estrutura heterogênea e pH de biofilmes coletados clinicamente, porém crescidos em condições laboratoriais controladas, tais como o substrato de crescimento, meio de crescimento, fonte e frequência de nutrientes, tempo de crescimento e atmosfera de incubação (FARIAS; CARVALHO; MÉNDEZ; CRUVINEL *et al.*, 2020; MÉNDEZ; GUTIERREZ; DIONÍSIO; OLIVEIRA *et al.*, 2018; SIM; DASHPER; REYNOLDS, 2016; SISSONS, 1997).

Portanto, este estudo teve como objetivo comparar a viabilidade, a vitalidade e o metabolismo de biofilmes de microcosmos de saliva e seus efeitos sobre a desmineralização do esmalte, considerando situações distintas de crescimento em relação ao tamponamento, atmosfera de incubação e tempo.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Coleta de saliva*

Este estudo foi inicialmente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo (CEEA: 90551018.8.0000.5417). Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, saliva total estimulada pela mastigação de parafilm foi coletada de três adultos que preencheram os seguintes critérios de inclusão: (1) idade entre 20 e 35 anos, (2) sem lesão de cárie ativa, (3) estado de saúde geral satisfatório, sem o diagnóstico de doenças infecciosas, síndromes e/ou doenças congênitas ou adquiridas e (4) sem uso de antibióticos por três meses antes da coleta. Os participantes foram orientados a não escovar os dentes por 24 h e não ingerir alimentos por 2 h antes da coleta de saliva. Após a coleta, as amostras foram filtradas e diluídas em glicerol a 60% e armazenadas a -80°C até o momento do uso.

### *Preparação e seleção de amostras de dentárias*

Cem blocos de esmalte (4 x 4 x 3 mm) foram confeccionados em máquina de corte de semi-precisão (Buehler, Enfield, CT, EUA). As amostras foram fixadas em discos de acrílico com cera e as superfícies de esmalte foram lixadas e polidas em politriz metalográfica (Arotec, Cotia, Brasil) utilizando discos de carboneto de silício (lixas de polimento 600, 800 e 1.200 graus de papéis Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Buehler Ltd., Lake Bluff, EUA) resfriados com água. Para padronização inicial, a dureza superficial dos blocos foi

---

determinada em microdurômetro (Micromet 5114 hardness tester, Buehler LTD, Lake Bluff, IL, USA). Blocos com  $\pm 10\%$  da média da dureza superficial de todos as amostras foram descartados. Dois terços da superfície de cada bloco foram protegidas com esmalte de unhas para obter áreas de controle para análise de microrradiografia transversal (TMR). Posteriormente os blocos foram fixados no Active Attachment Biofilm Model from Amsterdam e autoclavados a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 min, como descrito por Méndez et al. (Méndez, Gutierrez et al. 2018).

#### *Ativação do inóculo*

Um volume de 400  $\mu\text{L}$  do inóculo salivar foi adicionado a 10 mL de meio McBain modificado [2.5 g  $\text{L}^{-1}$  mucina, 2.0 g  $\text{L}^{-1}$  peptona, peptona caseína 2.0 g  $\text{L}^{-1}$ , 1.0g $\text{L}^{-1}$  extrato de levedura, 0.35 g  $\text{L}^{-1}$  NaCl, 0.2g $\text{L}^{-1}$  KCl, 0.2g $\text{L}^{-1}$  CaCl<sub>2</sub>, 0.001 g  $\text{L}^{-1}$  hemina, 0.0002 g  $\text{L}^{-1}$  vitamina K1, 50 mmol  $\text{L}^{-1}$  PIPES, água deionizada/L pH 7.0] (McBain, Sissons et al. 2005), com adição de sacarose a 0,2% e, em seguida, incubado anaerobicamente a  $37^{\circ}\text{C}$  overnight. Posteriormente, o inóculo salivar ativado foi adicionado ao meio McBain modificado na proporção 1:1. Então, alíquotas de 1,5 mL foram distribuídas uniformemente em cada poço de uma placa de 24 poços, nos quais foram inseridos os blocos de esmalte adaptados aos modelos de biofilme, incubados por mais 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$  em anaerobiose.

#### *Divisão dos grupos experimentais e crescimento de biofilme*

Três fatores foram considerados para a definição dos grupos experimentais: as concentrações da solução tampão PIPES para a suplementação do meio de crescimento (25 ou 50 mmol/L), o tipo da atmosfera de incubação dos modelos de biofilme (anaerobiose ou microaerofilia) e o tempo de crescimento dos biofilmes (3 ou 7 dias). Os grupos foram assim denominados: 25 ANA, 50 ANA, 25 MICRO e 50 MICRO, crescidos por 3 ou 7 dias. Cada grupo foi composto por um total de 9 amostras de biofilmes, crescidos em triplicata em 2 repetições.

A suspensão do inóculo foi misturada com o meio McBain modificado com PIPES (25 ou 50 mmol/L) e sacarose a 0,2% na proporção 1:1. Alíquotas de 1,5 mL foram distribuídas uniformemente em cada poço de uma placa de 24 poços e, em seguida, o modelo de biofilme contendo blocos de esmalte foi adaptado e incubado por 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$  em anaerobiose (ANA) ou microaerofilia (MICRO). Os meios de cultura modificados foram renovados a cada 24 h durante 3 ou 7 dias. Posteriormente, os

---

blocos de esmalte foram cuidadosamente removidos com pinças e transferidos para 3 mL de meio tamponado de água peptonada (BPW) [20 g de água peptonada tamponada, água deionizada/L, pH 7,2], suplementado com sacarose a 0,2%, e incubado a 37°C na atmosfera correspondente ao grupo que pertenciam por 3 h. Alíquotas de 200 µL de meio BPW foram coletadas de cada amostra e transferidas para microtubos, os quais foram mantidos a 85°C por 5 min para interromper a produção de ácido láctico. Em seguida, os microtubos foram armazenados a -20°C até o momento da análise.

#### *Determinação do pH e da concentração de cálcio liberado em meio de cultura*

Os valores de pH dos meios de crescimento foram mensurados a cada 24 h pela utilização de um eletrodo (Kasvi, Benchtop phmeter, China). O meio de cada poço foi armazenado separadamente em tubos de microcentrífuga a -80 °C até o momento da análise de cálcio.

A análise de cálcio no meio de cultura foi realizada por espectrofotometria. Alíquotas de 5 µL de cada amostra foram utilizados, permitindo volumes padronizados de padrões de cálcio (variando de 40 a 200 mM de cálcio). Um volume de 50 µL do reagente Arsenazo III foi usado como agente colorimétrico (Vogel, Chow et al. 1983, Tenuta, Del Bel Cury et al. 2006), e as leituras da amostra foram realizadas em um leitor de microplacas (Synergy H1, BioTek Instruments Inc., EUA). Cinquenta microlitros de água deionizada e 5 µL das amostras ou das soluções padrão foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços. Posteriormente, o reagente colorimétrico foi adicionado uniformemente em cada poço da placa. Então as placas foram agitadas durante 60 s no leitor de microplaca, permitindo a reação entre a amostra e o Arsenazo III antes de obtenção da absorbância resultante em 610 nm.

#### *Análise da produção de ácido láctico*

As concentrações de L-lactato foram determinadas pelo método espectrofotométrico enzimático, baseado na conversão de L-lactato em piruvato e na concomitante conversão de NAD em NADH. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (Synergy H1, BioTek Instruments Inc., EUA) no comprimento de onda de 340 nm. Os valores de absorbância foram convertidos para concentrações de ácido láctico de acordo com os parâmetros estabelecidos por uma curva padrão, com valores variando entre 0 e 3 mM de L-lactato.

---

### *Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)*

Os biofilmes foram dispersos conforme descrito por Méndez et al. (Cusicanqui Méndez, Gutierrez et al. 2018). Alíquotas de 25 µL de cada diluição foram inoculadas em placas de Petri contendo Ágar Sangue de Soja Triptona, Ágar Mitis Salivarius, Ágar Mitis Salivarius contendo bacitracina a 0,2% e sacarose a 20% e Ágar Rogosa com ácido acético glacial a 0,13%, para determinação de microrganismos totais, estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e lactobacilos totais, respectivamente. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 48–72 h, sendo as contagens de UFC/mL determinadas em determinadas em contador de colônias manual (CP-608, Phoenix Lufesco, Araraquara/SP, Brasil).

### *Vitalidade de biofilmes intactos e matriz extracelular*

Para evitar a autofluorescência dos tecidos dentários, biofilmes microcosmos salivares foram cultivados em blocos de vidro especiais (4 × 4 × 1 mm), com uma rugosidade superficial de 1.200 grit (Menzel, Braunschweig, Alemanha). Os blocos de vidro foram divididos de acordo com os grupos experimentais citados anteriormente. Após o 3º e 7º dia de crescimento dependendo ao grupo testado, as amostras foram lavadas três vezes em 1,5 mL de CPW e coradas com 15 µL do kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD® BacLight (Invitrogen Molecular Probes, EUA) e mantidas no escuro por 15 min. Posteriormente, os biofilmes foram lavados em água destilada e corados novamente com 15 µL de Calcofluor (White Calcofluor, Sigma Chemicals Co., EUA) à temperatura ambiente no escuro por 1 min. Por fim, as amostras foram novamente enxaguadas em água deionizada. Quatro locais representativos de cada amostra foram visualizados em um microscópio confocal Leica TCS-SPE invertido (Micro Systems Engineering GmbH, Alemanha), e as imagens foram corrigidas e sintetizadas no software Leica LAS AF Lite (Leica, Alemanha) e analisados para determinar o biovolume de bactérias vivas, polissacarídeos extracelulares e vitalidade de biofilmes intactos pela razão entre os sinais verdes e a soma dos sinais verdes e vermelhos.

### *Microradiografia transversal (TMR)*

Os blocos de esmalte foram seccionados em sentido perpendicular para a evidência das áreas desmineralizadas. Posteriormente, os fragmentos foram polidos manualmente com lixas de papel de 600-800 grãos até atingir uma espessura de 80-90 µm e fixados em um dispositivo contendo uma escala de calibração de

---

alumínio com 14 níveis. As microrradiografias foram produzidas em lâminas de vidro especiais contendo filme radiográfico (SD-Q/SD-S, Konica Minolta), por meio de um equipamento gerador de raios-X (Softex; Tokio, Hhonsu, Japão) a 20 kV e 20 mA (a uma distância de 42 cm) por aproximadamente 13 min. As imagens produzidas nas lâminas de vidro foram analisadas em um microscópio óptico com objetiva 20x (Zeiss; Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha), com uma câmera CCD (EOS 550D, Canon, Tokio, Japão) acoplada a um microcomputador. O conteúdo mineral foi calculado com base na fórmula descrita por Angmar *et al* (1963). Os valores de perda mineral integrada ( $\Delta Z, \% \text{ vol.} \mu\text{m}$ ) e a profundidade de lesão (LD,  $\mu\text{m}$ ) foram determinados.

#### *Análise estatística*

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 21.0 (IBM® SPSS® Statistics, Nova York, EUA). A hipótese de distribuição normal dos dados foi rejeitada pelo teste de Shapiro-Wilk. Portanto, as diferenças entre os grupos foram detectadas pelos testes não paramétricos para amostras independentes, Kruskal Wallis e testes post-hoc de Dunn. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

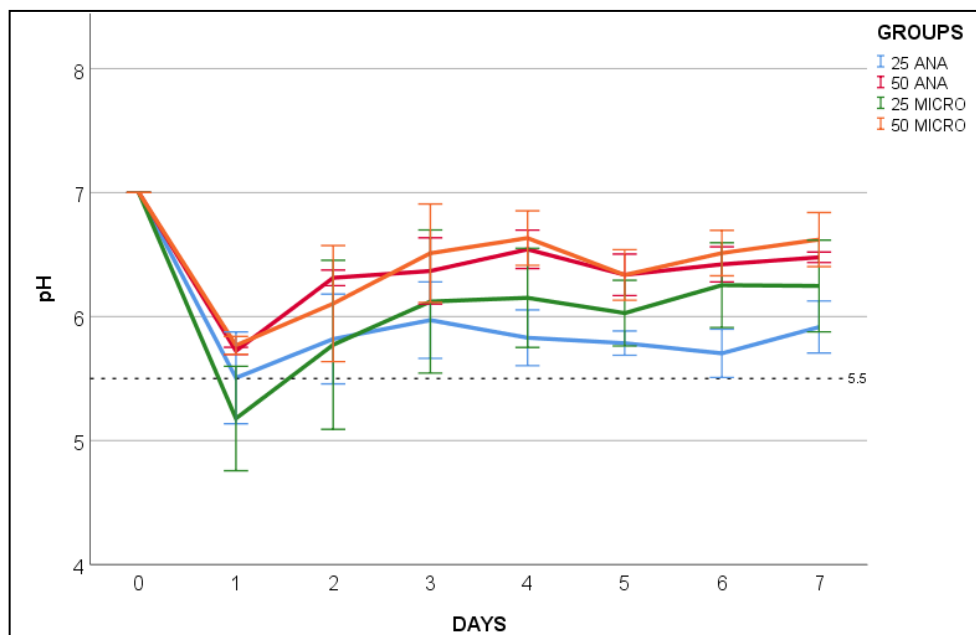
## **Resultados**

### ***pH***

As flutuações dos valores de pH são apresentadas na Figura 1. Nota-se valores mais altos de pH em condições de crescimento com PIPES a 50 mmol/L, independentemente do tipo de atmosfera de incubação. Os valores de pH dos meios suplementados com PIPES a 25 mmol/L se aproximaram mais dos valores de pH crítico para desmineralização do esmalte. Contudo, os valores foram estabilizados em  $\text{pH} > 5,5$  em todos os grupos a partir do 2º dia de crescimento.

---

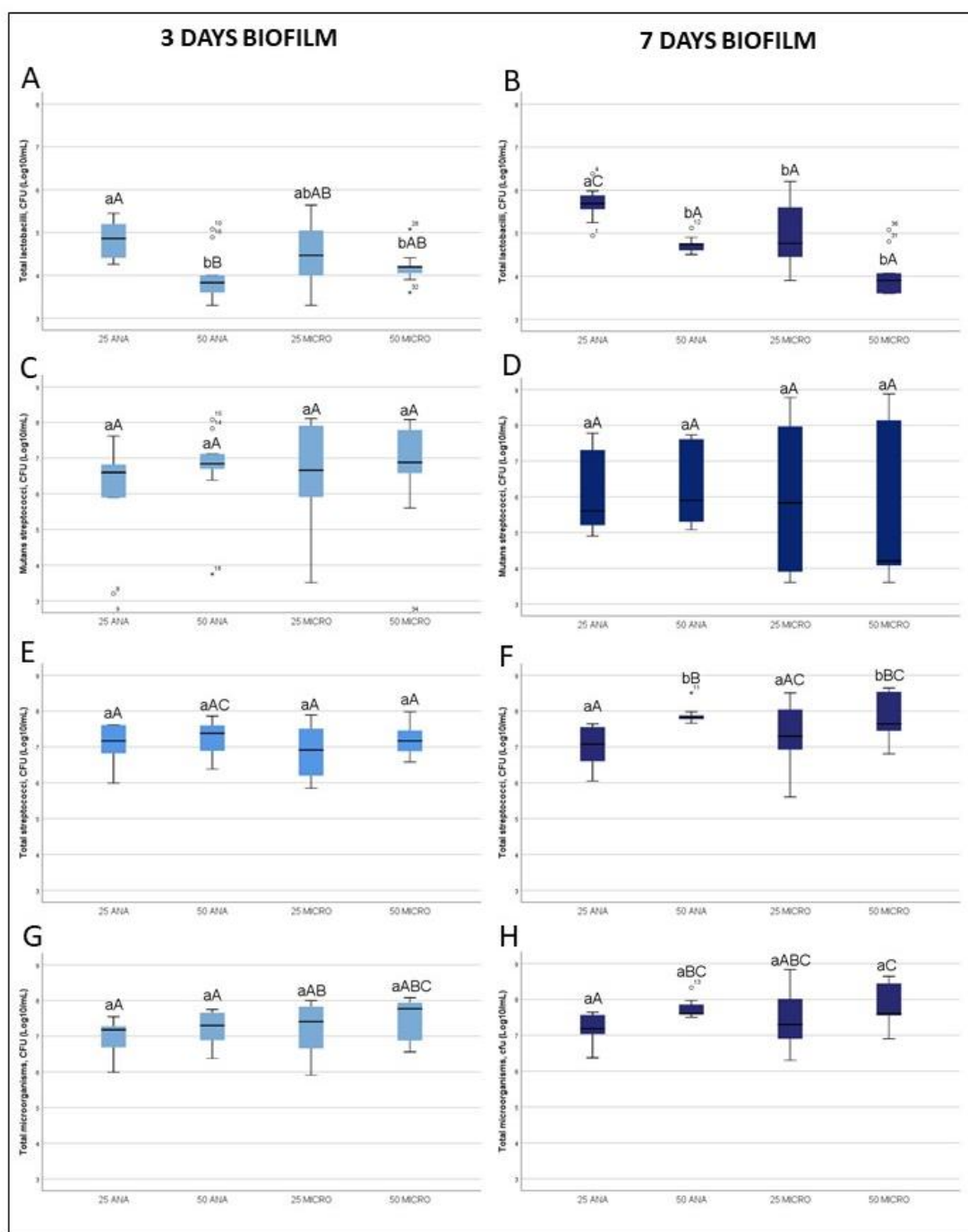




**Figura 1.** Variação dos valores de pH ao longo do tempo, de acordo com as diferentes condições de crescimento dos biofilmes.

### ***Viabilidade dos biofilmes***

Os resultados das contagens de UFC para os diferentes grupos de micro-organismos são apresentados na Figura 2. O crescimento de lactobacilos totais foi significativamente maior no grupo 25 ANA em comparação a todos os demais grupos aos 3 e 7 dias, exceto pela similaridade ao grupo 25 MICRO aos 3 dias. A viabilidade dos estreptococos totais e micro-organismos totais foi significativamente maior aos 7 dias nos grupos com PIPES a 50 mmol/L em comparação aos 3 dias, independente da atmosfera de incubação. Não foram observadas diferenças significantes nas contagens de estreptococos do grupo mutans.



**Figura 2.** Contagens de lactobacilos totais (A, B), estreptococos do grupo mutans (C, D), estreptococos totais (E, F) e micro-organismos totais (G, H) após 3 e 7 dias de crescimento, respectivamente. Os diagramas de caixa representam os valores das medianas, com percentis de 25 e 75. Letras minúsculas sobrescritas representam diferenças estatísticas entre os grupos do mesmo período de crescimento e as letras maiúsculas correspondem às diferenças estatísticas entre o mesmo grupo microbiano entre diferentes períodos de crescimento de biofilme.

### Concentração de ácido láctico

As concentrações de ácido láctico no meio BPW são apresentadas na Tabela 1. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Entretanto, nota-se uma tendência de aumento das concentrações nos grupos MICRO após 7 dias de crescimento.

**Tabela 1.** Concentração de ácido láctico (mmol/L) de acordo com as diferentes condições de crescimento de biofilme. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos

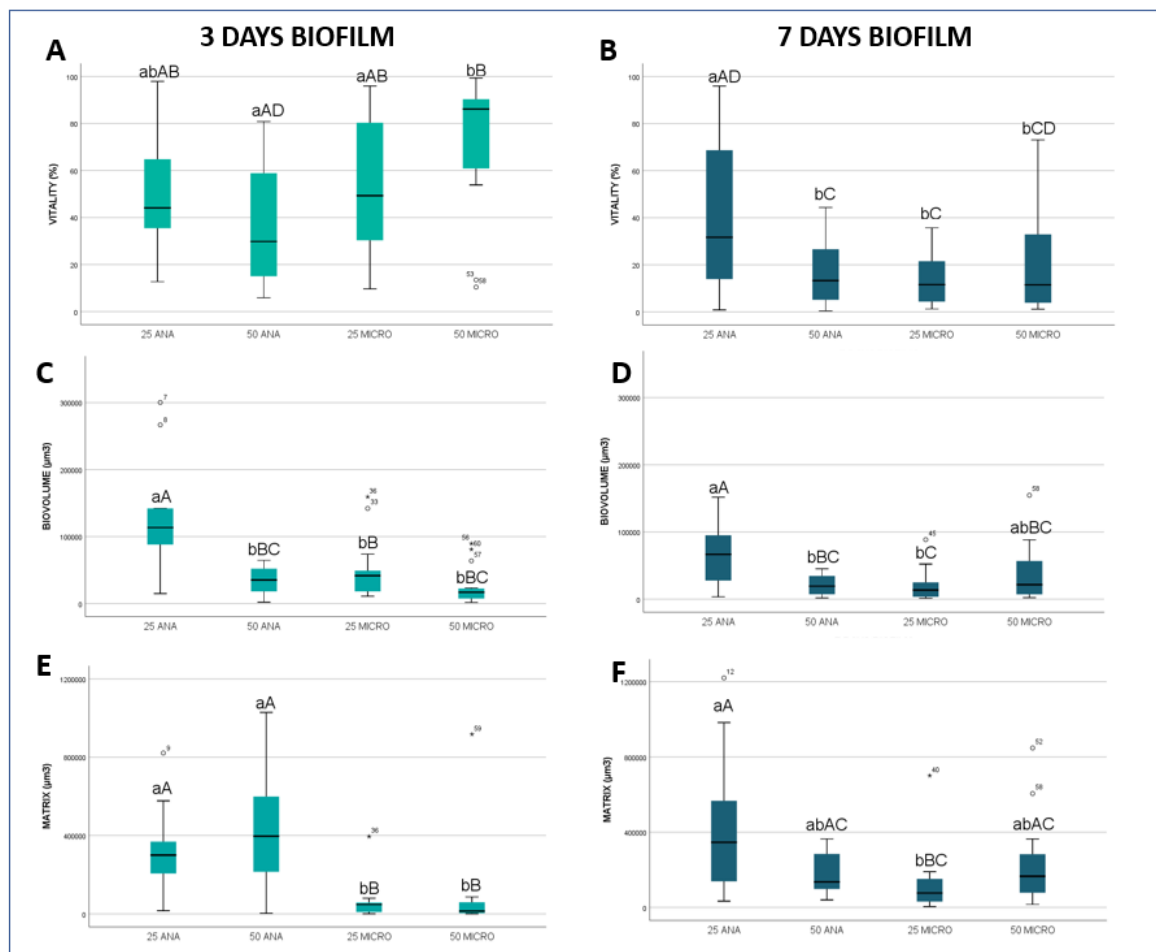
	Grupos	Média ( $\pm$ DP)	Mediana (II)	IC (95%)	
				Inferior	Superior
3 Days	25 ANA <sup>a</sup>	435,86 $\pm$ 163,32	324,19(325,07)	310,32	561,40
	50 ANA <sup>a</sup>	431,02 $\pm$ 166,38	337,40(232,65)	303,13	558,91
	25 MICRO <sup>a</sup>	468,63 $\pm$ 253,08	305,40(582,91)	274,09	663,17
	50 MICRO <sup>a</sup>	559,35 $\pm$ 292,07	325,36(557,00)	334,84	783,85
7 Days	25 ANA <sup>a</sup>	473,61 $\pm$ 183,12	337,11(359,59)	332,86	614,38
	50 ANA <sup>a</sup>	436,05 $\pm$ 153,24	356,79(233,50)	318,27	553,85
	25 MICRO <sup>a</sup>	540,09 $\pm$ 216,50	629,25(405,50)	373,68	706,51
	50 MICRO <sup>a</sup>	588,42 $\pm$ 183,87	688,34(357,21)	447,11	729,74

### Vitalidade, biovolume e matriz extracelular de biofilmes intactos

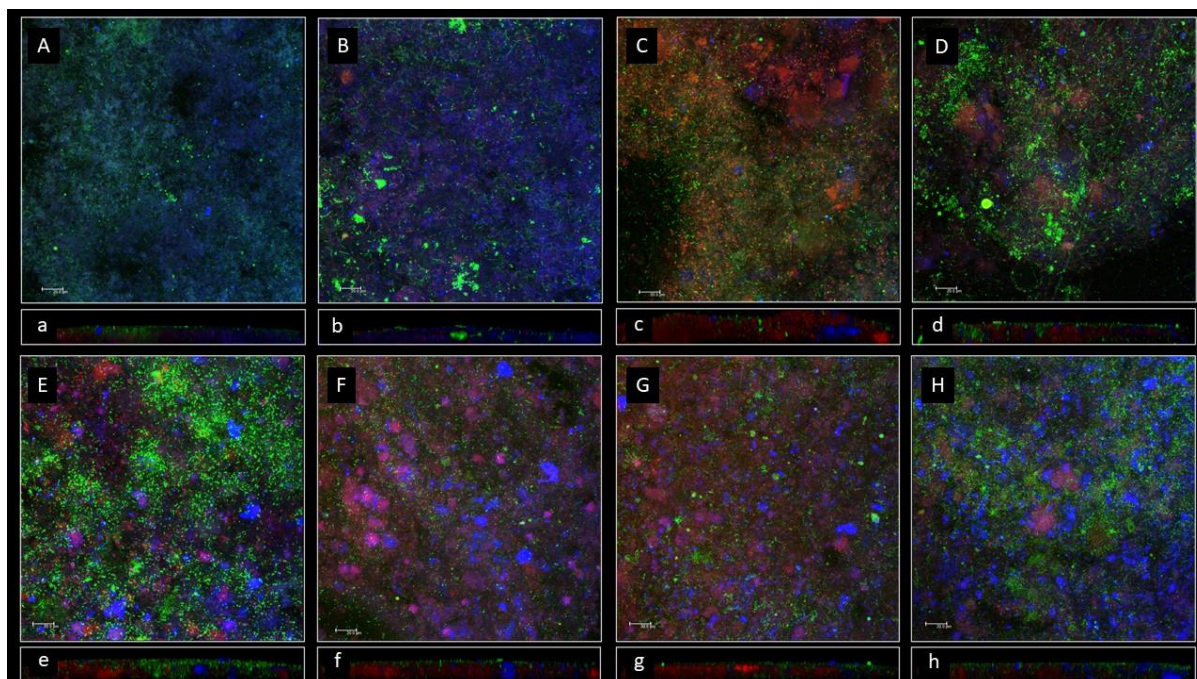
A vitalidade dos biofilmes intactos (Figuras 3 e 4) foi estatisticamente maior nos grupos 50 MICRO (aos 3 dias) e 25 ANA (aos 7 dias). Nota-se uma maior estabilidade na vitalidade de biofilmes do grupo 25 ANA entre os tempos de 3 e 7 dias (similares estatisticamente) quando comparada aos outros grupos (diferentes estatisticamente).

Os biovolumes de células vivas (Figuras 3 e 4) foram estatisticamente maiores no grupo 25 ANA em comparação a todos os grupos e em ambos os períodos de crescimento, exceto pela similaridade ao grupo 50 MICRO aos 7 dias.

Os biovolumes de matriz extracelular foram estatisticamente maiores nos grupos ANA após 3 dias de crescimento, independentemente da concentração de PIPES. Já no período de 7 dias, o biovolume médio de matriz extracelular do grupo 25 ANA foi maior que os demais grupos, porém significativamente diferente apenas que o grupo 25 MICRO (Figuras 3 e 4).



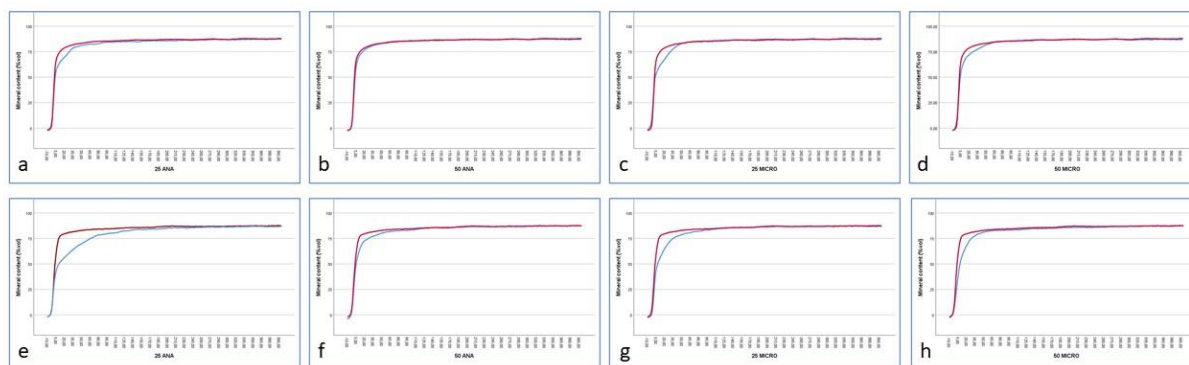
**Figura 3.** Vitalidade (A, B), biovolume de células vivas (C, D) e matriz extracelular (E, F) dos biofilmes crescidos por 3 e 7 dias, respectivamente. Os diagramas de caixa representam os valores das medianas, com percentis de 25 e 75. Letras minúsculas sobrescritas representam diferenças estatísticas entre os grupos do mesmo período de crescimento e as letras maiúsculas correspondem às diferenças estatísticas entre o mesmo grupo microbiano entre diferentes períodos de crescimento de biofilme.



**Figura 4.** Imagens de biofilmes intactos de microcosmos salivares tratados com as seguintes condições: **(A e a)** 25 ANA, biofilmes de 3 dias; **(B e b)** 50 ANA, biofilmes de 3 dias; **(C e c)** 25 MICRO, biofilmes de 3 dias; **(D e d)** 50 MICRO, biofilmes de 3 dias; **(E e e)** 25 ANA, biofilmes de 7 dias; **(F e f)** 50 ANA, biofilmes de 7 dias; **(G e g)** 25 MICRO, biofilmes de 7 dias; **(H e h)** 50 MICRO, biofilmes de 7 dias. As letras maiúsculas e minúsculas correspondem respectivamente às vistas frontal e de perfil dos biofilmes. Diferentes cores de emissões de fluorescência indicam células viáveis (verde), células mortas (vermelha), matriz extracelular (azul).

### Desmineralização do esmalte

Os resultados relacionados à desmineralização do esmalte são apresentados na Figura 5 e Tabela 2. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos aos 3 ou 7 dias, considerando os valores de perda mineral integrada, profundidade de lesão e concentração de cálcio liberado no meio de crescimento.



**Figura 5.** Curvas representando perfis de conteúdo mineral após crescimento dos biofilmes sobre blocos de esmalte bovino. As curvas vermelhas representam o perfil do conteúdo mineral do esmalte (área controle) e as curvas azuis representam o perfil do conteúdo mineral do esmalte desmineralizado (área teste). As condições de crescimento são expressas a seguir: (a) 25 ANA, biofilme de 3 dias; (b) 50 ANA, biofilme de 3 dias; (c) 25 MICRO, biofilme de 3 dias; (d) 50 MICRO, biofilme de 3 dias; (e) 25 ANA, biofilme de 7 dias; (f) 50 ANA, biofilme de 7 dias; (g) 25 MICRO, biofilme de 7 dias; (h) 50 MICRO, biofilme de 7 dias.

**Tabela 2.** Medidas de tendência central dos valores de perda mineral integrada (%vol.mm), profundidade de lesão ( $\mu\text{m}$ ) e concentração de cálcio liberado ( $\mu\text{g/mL}$ ) após 3 e 7 dias de crescimento de biofilmes de acordo com as diferentes condições

Grupos	3 Dias		
	Perda mineral integrada (%vol $\mu\text{m}$ )	Profundidade de lesão ( $\mu\text{m}$ )	Cálcio liberado ( $\mu\text{g/mL}$ )
	Mediana (II)	Mediana (II)	Mediana (II)
25 ANA	1120(1841,25) <sup>a</sup>	54,91(89,62) <sup>a</sup>	70,18(6,45) <sup>a</sup>
50 ANA	812,50(1083,33) <sup>a</sup>	54,91(77,46) <sup>a</sup>	70,74(10,33) <sup>a</sup>
25 MICRO	1270,00(1070,00) <sup>a</sup>	51,50(35,00) <sup>a</sup>	74,66(18,11) <sup>a</sup>
50 MICRO	997,50(981,67) <sup>a</sup>	49,42(44,99) <sup>a</sup>	77,61(23,54) <sup>a</sup>
Grupos	7 Dias		
	Perda mineral integrada (%vol $\mu\text{m}$ )	Profundidade de lesão ( $\mu\text{m}$ )	Cálcio liberado ( $\mu\text{g/mL}$ )
	Mediana (II)	Mediana (II)	Mediana (II)
25 ANA	2290,00(3003,33) <sup>a</sup>	79,85(143,89) <sup>a</sup>	105,20(74,62) <sup>a</sup>
50 ANA	1316,67(1438,33) <sup>a</sup>	87,50(97,42) <sup>a</sup>	86,99(28,99) <sup>a</sup>
25 MICRO	900,00(1975,83) <sup>a</sup>	31,15(101,00) <sup>a</sup>	101,16(37,99) <sup>a</sup>
50 MICRO	1514,58(415,83) <sup>a</sup>	74,75(39,14) <sup>a</sup>	83,82(28,36) <sup>a</sup>

## Discussão

Os achados do presente estudo demonstraram condições de viabilidade, vitalidade e matriz extracelular de biofilmes de microcosmos de saliva dependentes da concentração de agente tamponador, tipo de atmosfera de incubação e tempo de crescimento, contudo sem modificar parâmetros relacionados ao metabolismo ácido e a desmineralização do esmalte.

A capacidade tampão dos meios de crescimento utilizados em estudos *in vitro* é um fator pouco discutido na literatura, apesar de apresentar um papel fundamental desempenhado pela saliva na cavidade bucal. Em nosso estudo, a quantidade de solução tampão e o tempo de crescimento do biofilme foram parâmetros que afetaram o pH do meio. Estudos demonstraram a existência de uma forte correlação entre altos níveis de micro-organismos acidogênicos e acidúricos e a baixa capacidade tampão da saliva (BHAYAT; AHMAD; HIFNAWY; MAHROUS *et al.*, 2013). Tais evidências parecem suportar os nossos resultados, pela observação do aumento significativo da contagem de lactobacilos totais nos grupos 25 ANA e 25 MICRO após 3 dias e no 25 ANA após 7 dias de crescimento. Nessas circunstâncias, a incidência de cárie dentária é aumentada (HEGDE *et al.*, 2019).

Embora não sejam os únicos responsáveis pela doença, os estreptococos do grupo mutans são um grupo bastante representativo para o processo de cárie dentária, com importante participação na fermentação de carboidratos, síntese de polímeros para formação da matriz extracelular a partir da sacarose e capacidade satisfatória de desenvolvimento em condições de estresse ambiental, principalmente em pH baixos (LEMOS; PALMER; ZENG; WEN *et al.*, 2019). Embora a contagem desse grupo bacteriano tenha sido similar entre todas as condições de crescimento de biofilme, a variância dos dados foi menor em condições de anaerobiose, notavelmente após 3 dias de crescimento. Aliás, no geral nota-se uma menor variância de dados em todos os grupos crescidos em anaerobiose, denotando uma melhor reprodutibilidade de resultados relacionados à viabilidade microbiana em relação aos biofilmes crescidos em microaerofilia.

A saliva mostra-se um inóculo ideal para o crescimento de biofilmes em modelos *in vitro*, pois é fácil de ser coletada, envolve poucos processos laboratoriais para poder ser utilizada, pode ser imediatamente aplicada e não demanda vários dias para o

---



crescimento microbiano (FARIAS; CARVALHO; MÉNDEZ; CRUVINEL *et al.*, 2020). Neste sentido, todas as condições experimentais foram capazes de produzir biofilmes viáveis por meio da utilização da saliva. Além disso, a acidogenicidade dos biofilmes de microcosmos de saliva foi notada pelos baixos valores de pH desde as primeiras horas de crescimento, com aumento após 48 h e estabilização ao longo do tempo. Nossos resultados estão de acordo com os relatos prévios da literatura (FARIAS; CARVALHO; MÉNDEZ; CRUVINEL *et al.*, 2020; HUANG; EXTERKATE; TEN CATE, 2012).

Sem dúvida, o tempo de crescimento do biofilme se relaciona com o aumento de sua complexidade assim como ocorre na cavidade bucal em locais de difícil remoção mecânica do biofilme, conhecidos como locais de estagnação (EXTERKATE; CRIELAARD; TEN CATE, 2010; HUANG; EXTERKATE; TEN CATE, 2012). Biofilmes crescidos em microaerofilia apresentaram uma redução significativa da vitalidade ao longo do tempo (redução de 267,47% no grupo 25 MICRO e redução de 225,98% no grupo 50 MICRO), o que pode ser um viés para a interpretação de resultados de efeitos antimicrobianos de agentes específicos. A tendência natural de redução da vitalidade de biofilmes poderia, por exemplo, maximizar a ação de produtos que, na verdade, não apresentassem qualquer potencial antibiofilme. Contrariamente, os biofilmes crescidos com PIPES a 25 mmol/L em anaerobiose apresentaram estabilidade da vitalidade ao longo do tempo (redução de apenas 28,89%, sem diferença estatisticamente significativa).

A estrutura tridimensional do biofilme é um fator que deve ser considerado para testar a atividade antibiofilme de agentes específicos. A matriz extracelular é responsável pela adesão à superfície do substrato, volume, heterogeneidade espacial e química, interações sinérgicas e competitivas e maior resistência frente ao efeito de antimicrobianos (LI; BOWDEN, 1994; FLEMMING; WINGENDER; SZEWZYK; STEINBERG *et al.*, 2016). A matriz contém metabólitos microbianos, microorganismos mortos e células próprias do hospedeiro como células epiteliais descamadas, além de fibronectina, laminina, colágeno e constituintes salivares e açúcares (CHEVALIER; RANQUE; PRÊCHEUR, 2018). Os grupos crescidos em condições de anaerobiose apresentaram maior produção de matriz extracelular após 3 dias de crescimento, porém esses resultados parecem ser mais estáveis no grupo 25 ANA ao longo do tempo.

---

Os biofilmes podem ser cultivados em diferentes sistemas, divididos em dois grandes grupos: abertos e fechados. Entre os sistemas fechados se destacam a placa ágar e placas de cultura celular de múltiplos poços (TOTIAM; GONZÁLEZ-CABEZAS; FONTANA; ZERO, 2007; LEDDER; MADHWANI; SREENIVASAN; DE VIZIO *et al.*, 2009). Uma melhoria deste sistema foi o Active Attachment Model Amsterdam, um modelo caracterizado por uma tampa metálica onde se aderem até 24 substratos para o crescimento de biofilmes, que são simultaneamente cultivados no interior dos poços de placas de 24 poços (EXTERKATE; CRIELAARD; TEN CATE, 2010). Este modelo versátil permite experimentos de alto rendimento, para testes envolvendo múltiplos tipos de substratos ou diferentes tipos de condições de crescimento ou tratamento, mantendo a individualidade das condições teste dentro de cada poço (EXTERKATE; CRIELAARD; TEN CATE, 2010; SILVA; PEREIRA; EXTERKATE; BAGNATO *et al.*, 2012).

O metabolismo de ácido láctico dos biofilmes foi similar entre todos os grupos, bem como a concentração do cálcio liberado no meio de cultura, a perda mineral integrada e a profundidade de lesão. Isso demonstra a capacidade dos diferentes protocolos em produzir biofilmes acidogênicos na presença de disponibilidade irrestrita de sacarose durante todo o período experimental. Portanto, existe a possibilidade de modificação dos parâmetros de viabilidade, vitalidade e metabolismo de biofilmes em outras condições de suplementação de carboidratos fermentáveis, como a disponibilidade intermitente de sacarose.

Em conclusão, as características dos biofilmes de microcosmos de saliva foram diretamente influenciadas pela concentração do agente tamponador, tipo de atmosfera de incubação e tempo de crescimento. Em relação à atmosfera de incubação, os biofilmes crescidos em anaerobiose apresentaram menor variabilidade dos resultados de viabilidade de micro-organismos, maior vitalidade de biofilme e biovolume de matriz extracelular ao longo do tempo. Entretanto, o metabolismo de ácido láctico e todos os parâmetros de desmineralização do esmalte foram similares entre os grupos.

---

### Conflitos de interesses

Os autores declaram não possuir conflitos de interesses.

### Agradecimentos

Os autores agradecem as Profas. Dras. Ana Carolina Magalhães e Ana Flávia Sanches Borges pelo acesso ao Centro Integrado de Pesquisas da FOB-USP. Também agradecem os técnicos Marcelo Milanda, Márcia Graef e Rafaela Alves pela assistência durante os ensaios laboratoriais. Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de auxílio regular de pesquisa (Processo nº 2018/03866-2) e bolsa Doutorado (Processo nº 2018/01654-8).

### Referências

BHAYAT, A.; AHMAD, M. S.; HIFNAWY, T.; MAHROUS, M. S. *et al.* Correlating dental caries with oral bacteria and the buffering capacity of saliva in children in Madinah, Saudi Arabia. **J Int Soc Prev Community Dent**, 3, n. 1, p. 38-43, Jan 2013.

BOWEN, W. H.; BURNE, R. A.; WU, H.; KOO, H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. **Trends Microbiol**, 26, n. 3, p. 229-242, 03 2018.

CAVALCANTI, Y. W.; BERTOLINI, M. M.; DA SILVA, W. J.; DEL-BEL-CURY, A. A. *et al.* A three-species biofilm model for the evaluation of enamel and dentin demineralization. **Biofouling**, 30, n. 5, p. 579-588, 2014.

CHEVALIER, M.; RANQUE, S.; PRÊCHEUR, I. Oral fungal-bacterial biofilm models in vitro: a review. **Med Mycol**, 56, n. 6, p. 653-667, Aug 01 2018.

DE OLIVEIRA, F. S.; CRUVINEL, T.; CUSICANQUI MÉNDEZ, D. A.; DIONÍSIO, E. J. *et al.* The in vitro effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy on dental microcosm biofilms from partially erupted permanent molars: A pilot study. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, 21, p. 163-167, Mar 2018.

---

EXTERKATE, R. A.; CRIELAARD, W.; TEN CATE, J. M. Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. **Caries Res**, 44, n. 4, p. 372-379, 2010.

FARIAS, A. L.; CARVALHO, L. P. F.; MÉNDEZ, D. A. C.; CRUVINEL, T. *et al.* Characterization of polymicrobial biofilms obtained from saliva or carious lesions in dentin. **Biofouling**, 36, n. 7, p. 877-887, 08 2020.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nat Rev Microbiol**, 14, n. 9, p. 563-575, 08 2016.

HEGDE, M. N.; ATTAVAR, S. H.; SHETTY, N.; HEGDE, N. D. *et al.* Saliva as a biomarker for dental caries: A systematic review. **J Conserv Dent**, 22, n. 1, p. 2-6, 2019 Jan-Feb 2019.

HUANG, X.; EXTERKATE, R. A.; TEN CATE, J. M. Factors associated with alkali production from arginine in dental biofilms. **J Dent Res**, 91, n. 12, p. 1130-1134, Dec 2012.

LEDDER, R. G.; MADHWANI, T.; SREENIVASAN, P. K.; DE VIZIO, W. *et al.* An in vitro evaluation of hydrolytic enzymes as dental plaque control agents. **J Med Microbiol**, 58, n. Pt 4, p. 482-491, Apr 2009.

LEMOS, J. A.; PALMER, S. R.; ZENG, L.; WEN, Z. T. *et al.* The Biology of. **Microbiol Spectr**, 7, n. 1, 01 2019.

LI, Y. H.; BOWDEN, G. H. Characteristics of accumulation of oral gram-positive bacteria on mucin-conditioned glass surfaces in a model system. **Oral Microbiol Immunol**, 9, n. 1, p. 1-11, Feb 1994.

MÉNDEZ, D. A. C.; GUTIERREZ, E.; DIONÍSIO, E. J.; OLIVEIRA, T. M. *et al.* Effect of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic therapy on dentin caries microcosms. **Lasers Med Sci**, 33, n. 3, p. 479-487, Apr 2018.

SILVA, T. C.; PEREIRA, A. F.; EXTERKATE, R. A.; BAGNATO, V. S. *et al.* Application of an active attachment model as a high-throughput demineralization biofilm model. **J Dent**, 40, n. 1, p. 41-47, Jan 2012.

---

---

SIM, C. P.; DASHPER, S. G.; REYNOLDS, E. C. Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents. **J Dent**, 50, p. 1-11, 07 2016.

SISSONS, C. H. Artificial dental plaque biofilm model systems. **Adv Dent Res**, 11, n. 1, p. 110-126, Apr 1997.

TOTIAM, P.; GONZÁLEZ-CABEZAS, C.; FONTANA, M. R.; ZERO, D. T. A new in vitro model to study the relationship of gap size and secondary caries. **Caries Res**, 41, n. 6, p. 467-473, 2007.

TWETMAN, S. Prevention of dental caries as a non-communicable disease. **Eur J Oral Sci**, 126 Suppl 1, p. 19-25, 10 2018.

---

---

## **2.2 ARTIGO 2 - Efeito da arginina associada ou não ao fluoreto de sódio sobre o crescimento de biofilmes microcosmos salivares e prevenção da desmineralização do esmalte**

Daniela Alejandra Cusicanqui Méndez<sup>a</sup>, Maricel Rosário Cardenas Cuellar<sup>b</sup>, Flaviana Bombarda de Andrade<sup>b</sup> Marília Afonso Rabelo Buzalaf<sup>c</sup>, Thiago Cruvinel da Silva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo

<sup>b</sup>Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo

<sup>c</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo

### **Autor correspondente:**

Thiago Cruvinel da Silva

Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Alameda Dr. Otávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Vila Universitária, 17012-901, Bauru-SP, Brasil

Fone: +55 14 3235 8318 Telefax: +55 14 3223 4679

Email: [thiagocruvinel@fob.usp.br](mailto:thiagocruvinel@fob.usp.br)

---

## **Efeito da arginina associada ou não ao fluoreto de sódio sobre o crescimento de biofilmes microcosmos salivares e prevenção da desmineralização do esmalte**

### **RESUMO**

O presente estudo objetivou avaliar o efeito da arginina a 2,5% e 8%, associada ou não ao fluoreto de sódio a 1.450 ppm sobre a composição, metabolismo de biofilmes de microcosmos salivares e desmineralização do esmalte. Amostras de saliva de três adultos foram usadas para obter um pool microbiológico para o crescimento dos biofilmes. Os biofilmes cresceram sobre blocos de esmalte e foram distribuídos nos seguintes grupos: a) McBain modificado a 0,2% (controle), b) arginina a 2,5%, c) arginina a 8%, d) fluoreto de sódio (NaF), e) fluoreto de sódio e arginina a 2,5% e f) fluoreto de sódio e arginina a 8%. Os meios contendo os reagentes foram trocados a cada 24 h por 5 dias. A viabilidade do biofilme foi determinada pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de microrganismos totais, estreptococos totais, estreptococos mutans e lactobacilos. A vitalidade de biofilmes intactos e a produção de polissacarídeos extracelulares (PECs) foram determinadas por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). O metabolismo dos biofilmes foi determinado pelo ensaio de resazurina e pela quantificação da concentração de ácido láctico em meio de cultura. A prevenção da desmineralização foi determinada pela mensuração do pH dos meios de crescimento microbiano, quantidade de cálcio liberado em meio de cultura pelo método Arsenazo III e perda mineral integrada e profundidade de lesão determinadas por microrradiografia transversal. A análise estatística foi realizada pelos testes de Kruskal Wallis e post-hoc de Dunn ( $P < 0,05$ ). A adição de arginina a 2,5% reduziu significativamente a contagem de lactobacilos, enquanto a adição de arginina a 8% e das combinações de NaF e arginina reduziram significativamente a contagem de todos os grupos de microrganismos. A arginina a 8% combinada ou não ao NaF reduziu a vitalidade de biofilme, a produção de PECs e a concentração de cálcio liberado. Entretanto, nenhuma condição de crescimento foi capaz de reduzir significativamente a perda mineral integrada e a profundidade de lesão. Portanto, as combinações de arginina e NaF apresentaram melhores atividades antimicrobiana e antibiofilme sobre microcosmos salivares, contribuindo para a desaceleração da desmineralização, contudo sem prevenir o desenvolvimento de lesões em esmalte.

**Palavras chave:** Cárie dentária, biofilme, microrganismos, arginina, prevenção e controle

---

## 1. INTRODUÇÃO

A lesão de cárie está relacionada à virulência dos microrganismos presentes no biofilme dentário [Neves et al., 2017]. A estrutura de biofilmes polimicrobianos se caracteriza por ser tridimensional e composta não apenas por células, mas também por uma matriz de exopolissacarídeos extracelulares [Bowen et al., 2018]. O ciclo de vida do biofilme dentário se inicia pela formação da película adquirida sobre a superfície dos dentes, com a posterior adesão de microrganismos capazes de iniciar a produção da matriz extracelular, responsável por favorecer a co-agregação celular e indicar o amadurecimento do biofilme [Chevalier et al., 2018]. Por fim, ocorre a degradação e recolonização do biofilme [Kumar et al., 2017].

A ingestão periódica de carboidratos fermentáveis e a adesão do biofilme sobre a superfície dentária por longos períodos de tempo induzem alterações metabólicas e de composição do biofilme, favorecendo o predomínio de microrganismos acidúricos e acidogênicos, tais como estreptococos do grupo mutans e lactobacilos totais [Takahashi and Nyvad, 2011; Neves et al., 2017], e consequente quedas do pH como resultado da glicólise bacteriana [Burne and Marquis, 2000], produzindo a desmineralização dos tecidos dentários [Valm, 2019].

No entanto, tal processo é dinâmico, com períodos intermitentes de desmineralização e remineralização, que ocorre principalmente pelo tamponamento salivar, presença de peptídeos salivares e micro-organismos residentes associados à saúde bucal, que podem ser capazes de neutralizar ácidos pela hidrólise de uréia e arginina em amônia, por meio do sistema arginina-deiminase (sistema ADS) [Huang et al., 2015]. Tais mecanismos podem diminuir a quantidade de micro-organismos acidogênicos e acidúricos e prevenir a desmineralização do esmalte [Nascimento et al., 2009; Zheng et al., 2017]. O sistema ADS está presente em microrganismos específicos da microbiota bucal, tais como estreptococos gordonii, estreptococos sanguinis, estreptococos intermedius, estreptococos cristatus, estreptococos australis e estreptococos parasanguis [Huang et al., 2015].

A arginina é um aminoácido naturalmente encontrado no soro, no plasma e na saliva [Albaugh et al., 2017; Bel'skaya et al., 2021]. No mercado já estão disponíveis dentifrícios contendo arginina, com a finalidade de dessensibilizar os dentes por meio do selamento dos túbulos dentinários, imitando o processo natural da saliva [Midha et

---



al., 2021]. Aparentemente, a aplicação de arginina a 8% é capaz de diminuir a hipersensibilidade dentinária [Hirsiger et al., 2019]. Entretanto, ainda não existem estudos demonstrando que a concentração de arginina comercialmente disponível é capaz de modular o biofilme aderido sobre o esmalte e controlar o processo de cárie dentária. Neste sentido, este estudo *in vitro* teve por objetivos determinar os efeitos de duas diferentes concentrações de arginina, associadas ou não ao fluoreto de sódio, sobre a composição, metabolismo e vitalidade de biofilmes microcosmos de saliva, bem como sobre a prevenção da desmineralização do esmalte dentário, considerando alta disponibilidade de sacarose.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi inicialmente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo (CEEA: 90551018.8.0000.5417).

### 2.1. Grupos experimentais

Os biofilmes foram divididos em 6 grupos experimentais: 1) McBain modificado (controle), 2) arginina a 2,5% (ARG 2,5), 3) arginina a 8% (ARG 8), 4) fluoreto de sódio a 1.450 ppm (NaF), 5) NaF + arginina a 2,5% (NaF + ARG 2,5) e 6) NaF + arginina a 8% (NaF + ARG 8). Cada grupo foi composto por um total de 9 amostras de biofilmes, crescidos em triplicata em 2 repetições.

### 2.2. Preparação e seleção de amostras dentárias

Sessenta coroas de incisivos bovinos recém-extraídas foram armazenadas em solução de timol a 0,1% a 4°C. em seguida, 100 blocos de esmalte (4 x 4 x 3 mm) foram confeccionados em máquina de corte de semi-precisão (Buehler, Enfield, CT, EUA). As amostras foram fixadas em discos de acrílico com cera e as superfícies de esmalte foram lixadas e polidas em politriz metalográfica (Arotec, Cotia, Brasil) utilizando discos de carboneto de silício (lixas de polimento 600, 800 e 1.200 graus de papéis Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Buehler Ltd., Lake Bluff, EUA) resfriados com água. Para padronização inicial, a dureza superficial dos blocos foi determinada em microdurômetro (Micromet 5114 hardness tester, Buehler LTD, Lake Bluff, IL, USA). Blocos com  $\pm 10\%$  da média da dureza superficial de todos os blocos foram descartados. Dois terços da superfície de cada bloco foram protegidas com esmalte de unhas para obter áreas de controle

---

para análise de microrradiografia transversal (TMR). Posteriormente os blocos foram fixados no Active Attachment Biofilm Model from Amsterdam e autoclavados a 121°C por 15 min, como descrito por Méndez et al. [Méndez et al., 2018].

### 2.3. Coleta de saliva

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, saliva total estimulada pela mastigação de parafilm foi coletada de três adultos que preencheram os seguintes critérios de inclusão: (1) idade entre 20 e 35 anos, (2) sem lesão de cárie ativa, (3) estado de saúde geral satisfatório, sem o diagnóstico de doenças infecciosas, síndromes e/ou doenças congênitas ou adquiridas e (4) sem uso de antibióticos por três meses antes da coleta. Os participantes foram orientados a não escovar os dentes por 24 h e não ingerir alimentos por 2 h antes da coleta de saliva. Após a coleta, as amostras foram filtradas e diluídas em glicerol a 60% e armazenadas a -80°C até o momento do uso.

### 2.4. Ativação dos inóculos salivares e contaminação dos blocos de esmalte

Um volume de 400 µL do inóculo salivar foi adicionado a 10 mL de meio McBain modificado [2.5 g L<sup>-1</sup> mucina, 2.0 g L<sup>-1</sup> peptona, pepetona caseína 2.0 g L<sup>-1</sup>, 1.0g L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 0.35 g L<sup>-1</sup> NaCl, 0.2g L<sup>-1</sup> KCl, 0.2g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 0.001 g L<sup>-1</sup> hemina, 0.0002 g L<sup>-1</sup> vitamina K1, 25 mmol L<sup>-1</sup> PIPES, deionized water, pH 7.0] [McBain et al., 2005], com adição de sacarose a 0,2% e, em seguida, incubado anaerobicamente a 37°C overnight. Posteriormente, o inóculo salivar ativado foi adicionado ao meio McBain modificado na proporção 1:1. Então, alíquotas de 1,5 mL foram distribuídas uniformemente em cada poço de uma placa de 24 poços, nos quais foram inseridos os blocos de esmalte adaptados aos modelos de biofilme, incubados por mais 24 h a 37°C em anaerobiose.

### 2.5 Crescimento dos biofilmes

Os biofilmes cresceram sob condições variáveis, determinadas pela adição de arginina a 2,5% ou 8% combinada ou não ao fluoreto de sódio a 1.450 ppm. Os reagentes foram adicionados ao meio de crescimento McBain modificado contendo o agente tamponador PIPES a 25 mmol/L e sacarose a 0,2%, de acordo com os 6 grupos experimentais. Os meios de cultura foram renovados a cada 24 h até se completarem os 5 dias de crescimento. A cada dia, o meio de crescimento foi coletado

---

para a determinação do pH com uso de eletrodo (Benchtop phmeter, Kasvi, China) e para estocagem a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise de cálcio liberado. Ao final do 5<sup>o</sup> dia, os blocos de esmalte foram cuidadosamente removidos com pinças e transferidos para 3 mL de meio tamponado de água peptonada (BPW) [20 g de água peptonada tamponada, água deionizada/L, pH 7,2], suplementado com sacarose a 0,2% e incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  em anaerobiose por 3 h. Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de meio BPW foram coletadas de cada amostra e transferidas para microtubos, os quais foram mantidos a  $85^{\circ}\text{C}$  por 5 min para interromper a produção de ácido láctico. Em seguida, os microtubos foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise.

#### *2.6. Análise da produção de ácido láctico*

As concentrações de L-lactato foram determinadas pelo método espectrofotométrico enzimático, baseado na conversão de L-lactato em piruvato e na concomitante conversão de NAD em NADH. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (Synergy H1, BioTek Instruments Inc., EUA) no comprimento de onda de 340 nm. Os valores de absorbância foram convertidos para concentrações de ácido láctico de acordo com os parâmetros estabelecidos por uma curva padrão, com valores variando entre 0 e 3 mM de L-lactato.

#### *2.7. Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)*

Os biofilmes foram dispersos conforme descrito por Méndez et al. (Cusicanqui Méndez, Gutierrez et al. 2018). Alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  de cada diluição foram inoculadas em placas de Petri contendo Ágar Sangue de Soja Triptona, Ágar Mitis Salivarius, Ágar Mitis Salivarius contendo bacitracina a 0,2% e sacarose a 20%, ou Ágar Rogosa com ácido acético glacial a 0,13%, para determinação de microrganismos totais, estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e lactobacilos totais, respectivamente. Em seguida, as placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48–72 h, sendo as contagens de UFC/mL determinadas em um contador de colônias manual (CP-608, Phoenix luferco, Ararquara/SP, Brasil).

#### *2.8. Determinação da quantidade de cálcio liberado no meio de cultura*

A análise de cálcio no meio de cultura foi realizada por espectrofotometria. Alíquotas de 5  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram utilizados, permitindo volumes padronizados de padrões de cálcio (variando de 40 a 200 mM de cálcio). Um volume de 50  $\mu\text{L}$  do

---

reagente Arsenazo III foi usado como agente colorimétrico [Vogelet al., 1983; Tenuta et al., 2006], e as leituras da amostra foram realizadas em um leitor de microplacas (Synergy H1, BioTek Instruments Inc., EUA). Cinquenta microlitros de água deionizada e 5 µL das amostras ou das soluções padrão foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços. Posteriormente, o reagente colorimétrico foi adicionado uniformemente em cada poço da placa. Então as placas foram agitadas durante 60 s no leitor de microplaca, permitindo a reação entre a amostra e o Arsenazo III antes de obtenção da absorbância resultante em 610 nm.

### 2.9. Ensaio metabólico de resazurina

Para o ensaio de resazurina, uma solução estoque de resazurina (1,25 mg/mL) foi diluída em PBS para atingir a concentração final de 0,0016%. Seguindo a divisão dos grupos testados, biofilmes foram cultivados no fundo de placas de 24 poços por um período de 5 dias para análise metabólica. Os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS para remoção de células pobremente aderidas. Alíquotas de 500 µL/poço foram uniformemente dispensadas e os biofilmes incubados por 2 h. A intensidade da fluorescência (FI) de cada poço foi registrada à temperatura ambiente no aparelho de leitor de microplacas (Synergy H1, BioTek Instruments Inc., EUA), com excitação em 485 nm e emissão em 580 nm. A intensidade de fluorescência (IF) de resazurina diluída a 0,0016% em PBS foram detectados em triplicata para cada placa de 24 poços. O efeito dos reagentes sobre o metabolismo dos biofilmes foi determinado com base na porcentagem de redução de IF em relação ao grupo controle, calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{IF(\%redução)} = [(IF_{\text{teste}} - IF_{\text{blank}}) / (IF_{\text{grupo controle}} - IF_{\text{blank}})] \times 100, \text{ onde}$$

**blank representa a média dos poços contendo apenas resazurina diluída em PBS, sem contato com biofilmes**

### 2.10. Vitalidade de biofilmes intactos, biovolume, polissacarídeos extracelulares e espessura de biofilmes intactos

Para evitar a autofluorescência dos tecidos dentários, biofilmes microcosmos salivares foram cultivados em blocos de vidro especiais (4 × 4 × 1 mm), com uma rugosidade superficial de 1.200 grit (Menzel, Braunschweig, Alemanha). Os blocos de vidro foram divididos de acordo com os grupos experimentais citados anteriormente. Nas últimas 24 h do crescimento dos biofilmes, 20 µL do corante Alexafluor O 488

---

(Molecular Probes Inc., EUA) a 2  $\mu\text{mol/L}$  foram adicionados ao meio renovado e novamente incubado. Após o 5<sup>o</sup> dia de crescimento, as amostras foram lavadas três vezes em 1,5 mL de CPW e coradas com 15  $\mu\text{L}$  do kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD® BacLight (Invitrogen Molecular Probes, EUA) e mantidas no escuro por 15 min. Posteriormente, os biofilmes foram lavados em água destilada e corados novamente com 15  $\mu\text{L}$  Calcofluor (White Calcofluor, Sigma Chemicals Co., EUA) à temperatura ambiente no escuro por 1 min. Por fim, as amostras foram novamente enxaguadas em água deionizada. Quatro locais representativos de cada amostra foram visualizados em um microscópio confocal Leica TCS-SPE invertido (Micro Systems Engineering GmbH, Alemanha), e as imagens foram corrigidas e sintetizadas no software Leica LAS AF Lite (Leica, Alemanha) e analisados para determinar o biovolume de bactérias vivas, polissacarídeos extracelulares e vitalidade de biofilmes intactos pela razão entre os sinais verdes e a soma dos sinais verdes e vermelhos, bem como para a mensuração da espessura do biofilme em  $\mu\text{m}$ , considerando o ponto mais externo da superfície mais espessa de cada biofilme e o ponto mais profundo em contato com o bloco de vidro.

#### *2.11. Microrradiografia transversal (TMR)*

Os blocos de esmalte foram seccionados em sentido perpendicular para a evidenciação das áreas desmineralizadas. Posteriormente, os fragmentos foram polidos manualmente com lixas de papel de 600-800 grãos até atingir uma espessura de 80-90  $\mu\text{m}$  e fixados em um dispositivo contendo uma escala de calibração de alumínio com 14 níveis. As microrradiografias foram produzidas em lâminas de vidro especiais contendo filme radiográfico (SD-Q/SD-S, Konica Minolta), por meio de um equipamento gerador de raios-X (Softex; Tokio, Hhonsu, Japão) a 20 kV e 20 mA (a uma distância de 42 cm) por aproximadamente 13 min. As imagens produzidas nas lâminas de vidro foram analisadas em um microscópio óptico com objetiva 20x (Zeiss; Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha), com uma câmera CCD (dispositivo de carga acoplada, Canon, Tokio, Japão) e um microcomputador acoplados. O conteúdo mineral foi calculado com base na fórmula descrita por Angmar B, Carlström D, Glas JE (1963). Os valores de perda mineral integrada ( $\Delta Z, \% \text{ vol.} \mu\text{m}$ ) e a profundidade de lesão (LD,  $\mu\text{m}$ ) foram determinados.

#### *2.12. Análise estatística*

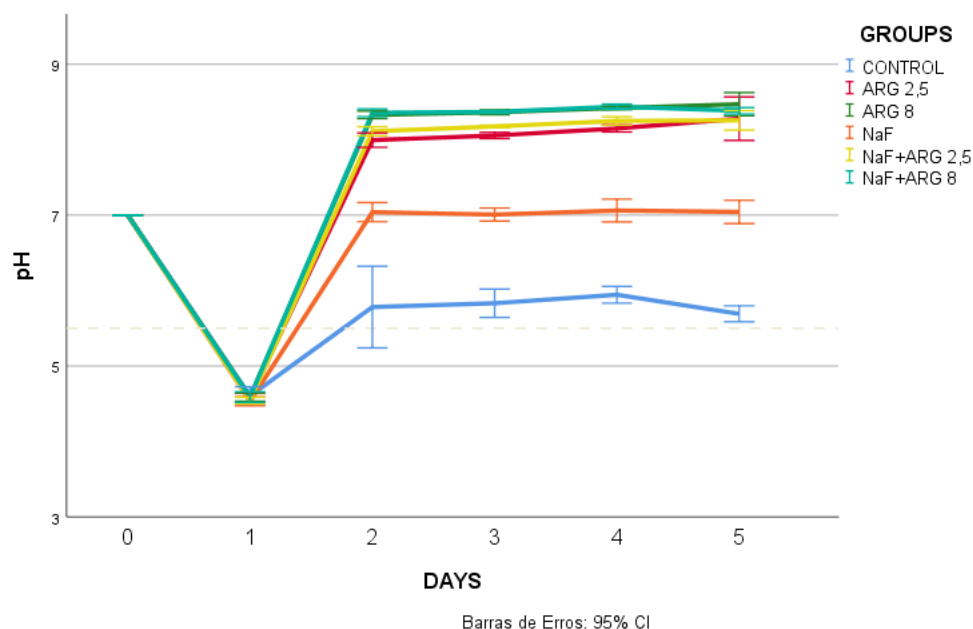
---

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 21.0 (IBM® SPSS® Statistics, Nova York, EUA). A hipótese de distribuição normal dos dados foi rejeitada pelo teste de Shapiro-Wilk. Portanto, as diferenças entre os grupos foram detectadas pelos testes não paramétricos para amostras independentes, Kruskal Wallis e testes post-hoc de Dunn. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

### 3. RESULTADOS

#### pH

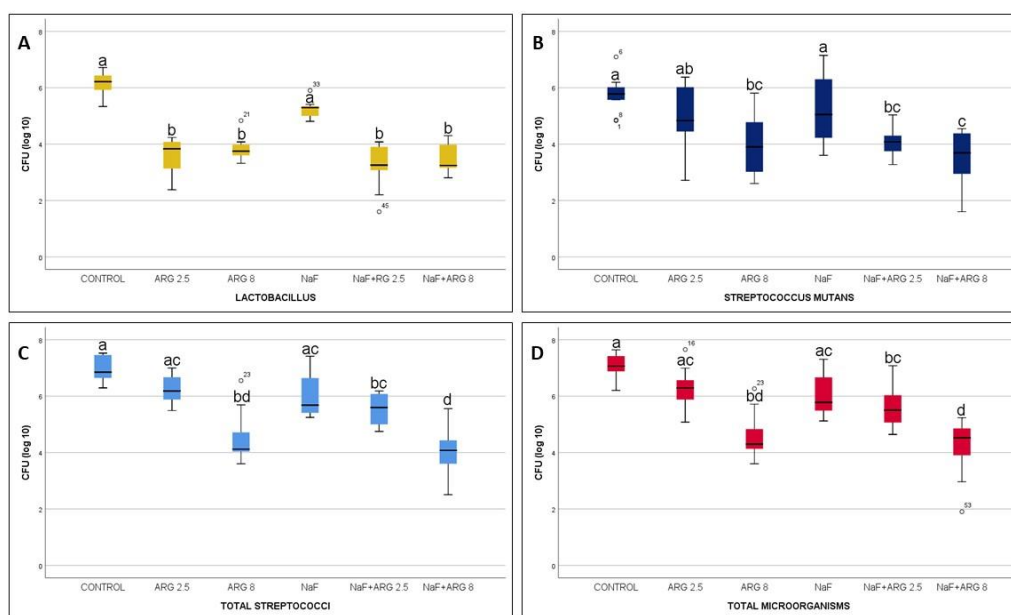
A curva que evidencia o pH é expressa na Figura 1. O pH do meio de crescimento sofreu uma acentuada queda no primeiro dia, atingindo valores próximos a 4,6. A adição de arginina aumentou os valores de pH até valores próximos a 8,0, independentemente da sua concentração e combinação com NaF. Já a adição de NaF conseguiu neutralizar o meio até valores de pH próximos a 7,0. Os valores foram mantidos estáveis do segundo ao quinto e último dia de crescimento.



**Figura 1.** Variação dos valores de pH ao longo do tempo, de acordo com as diferentes condições de crescimento de biofilme.

### Viabilidade

A contagem de UFCs são apresentadas na Figura 2. A adição de arginina diminuiu a contagem de lactobacilos totais independentemente da concentração (redução de aproximadamente 2,5 log<sub>10</sub>). O mesmo padrão de redução foi observado para todos os outros grupos de microrganismos, exceto pela adição de arginina a 2,5% sem flúor.



**Figura 2.** Contagem de lactobacilos totais (A), estreptococos do grupo mutans (B), estreptococos totais (C) e microrganismos totais (D), de acordo com as diferentes condições de crescimento de biofilme. Diagramas de caixa representam os valores das medianas, percentis 25 e 75 e limite inferior e superior do intervalo de confiança de 95%. Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

### Ensaio de metabolismo: resazurina e ácido lático

Os dados correspondentes à porcentagem de redução metabólica são demonstrados na Tabela 1. O metabolismo de resazurina foi reduzido em todos os grupos testes, especialmente pela adição de arginina a 8%, NaF + arginina a 2,5% e NaF + arginina a 8% (98,51%, 91,85% e 98,65%, respectivamente). Não foram evidenciadas alterações significativas na concentração de ácido lático nos diferentes grupos.

**Tabela 1.** Metabolismo de resazurina (% redução) e ácido láctico (mmol/L). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos

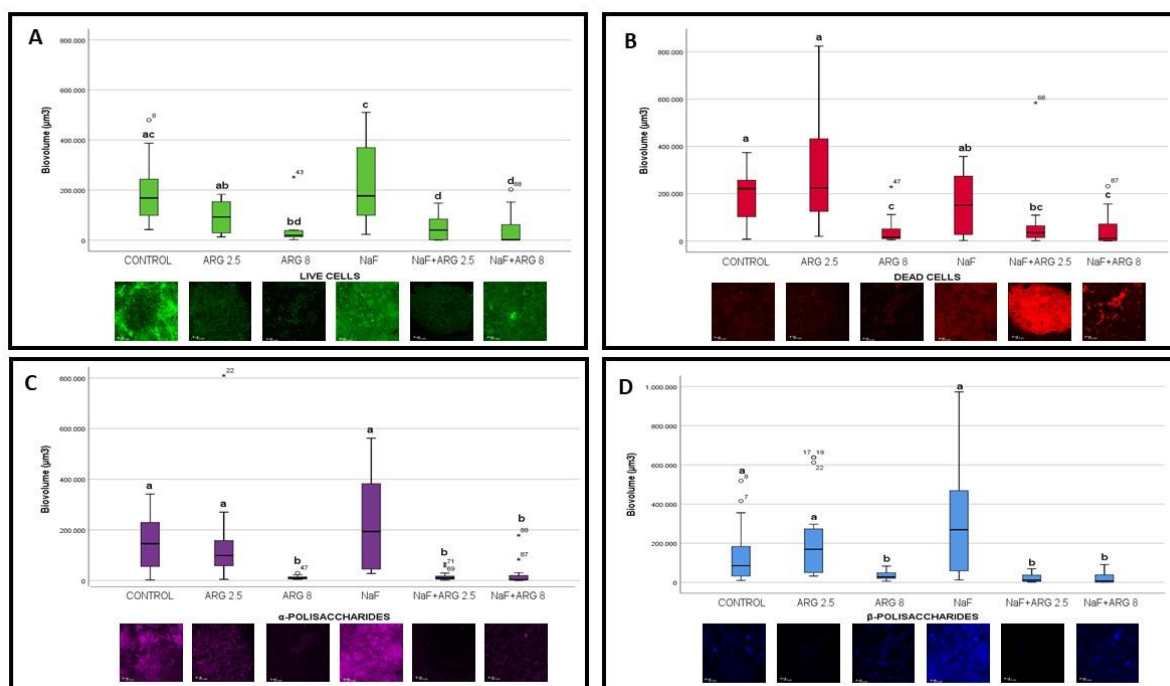
Groups	Porcentagem de redução (%)				Concentração de ácido láctico (mmol L <sup>-1</sup> )			
	Média (±DP)	Mediana	IC(95%)		Média (±DP)	Mediana	IC (95%)	
			Inferior	Superior			Inferior	Superior
<b>CONTROL</b>	0,00±15,75 <sup>a</sup>	-4,33	-12,11	12,11	1,97±0,82 <sup>a</sup>	1,75	1,34	2,60
<b>ARG 2,5</b>	39,02±34,63 <sup>b</sup>	50,48	12,40	65,64	1,58±0,20 <sup>a</sup>	1,68	1,42	1,73
<b>ARG 8</b>	98,01±1,77 <sup>c</sup>	98,51	96,65	99,37	1,54±0,16 <sup>a</sup>	1,59	1,41	1,65
<b>NaF</b>	30,10±20,34 <sup>b</sup>	38,25	14,47	45,73	1,50±0,14 <sup>a</sup>	1,54	1,39	1,60
<b>NaF+ARG 2,5</b>	62,70±54,66 <sup>bc</sup>	91,85	20,69	104,72	1,65±0,43 <sup>a</sup>	1,54	1,33	1,99
<b>NaF+ARG 8</b>	98,62±1,02 <sup>c</sup>	98,65	97,83	99,41	1,61±0,22 <sup>a</sup>	1,63	1,44	1,78

*Vitalidade de biofilmes intactos, biovolume, polissacarídeos extracelulares e espessura dos biofilmes intactos*

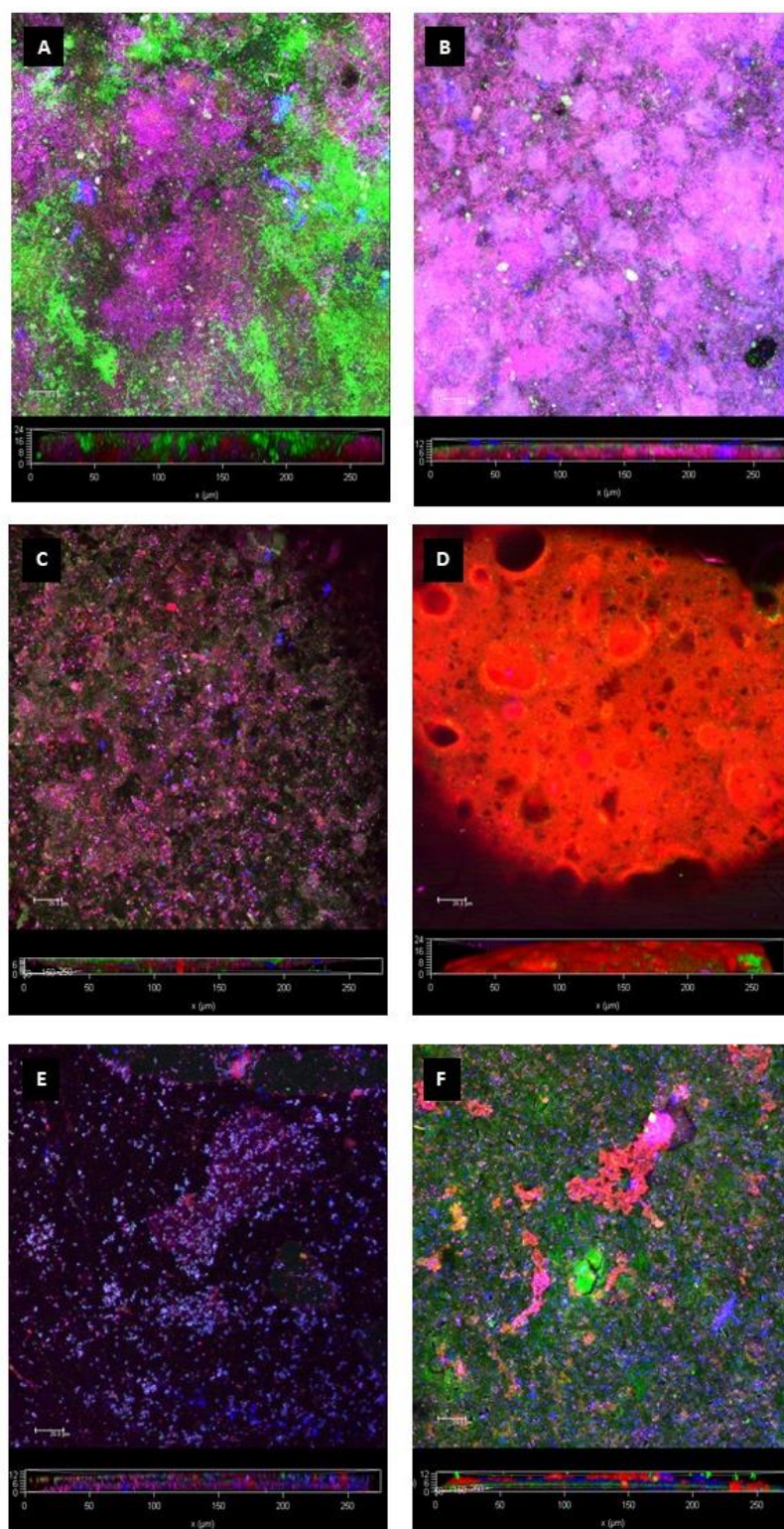
Os biovolumes de células vivas, mortas e tipos de polissacarídeos extracelulares são mostrados nas Figuras 3 e 4. A arginina a 8% sozinha e ambas as combinações de arginina e NaF reduziram o biovolume de células vivas e a produção de polissacarídeos alfa e beta.

A vitalidade e espessura dos biofilmes intactos estão representadas na Tabela 2. Observou-se uma diminuição da vitalidade dos biofilmes dos grupos ARG 2,5, NaF+ARG 2,5 e NaF+ARG 8, embora sem diferença estatisticamente significativa devido à alta variância dos dados. A espessura dos biofilmes que cresceram em meio com arginina a 8% combinada ao NaF foi significativamente menor que dos demais grupos de estudo.





**Figura 3.** Biovolumes de células vivas (A), células mortas (B), polissacarídeos extracelulares alfa ( $\alpha$ -PECs) (C) e polissacarídeos extracelulares beta ( $\beta$ -PECs) (D), de acordo com as diferentes condições de crescimento. Diagramas de caixa representam os valores das medianas, percentis 25 e 75 e limite inferior e superior do intervalo de confiança de 95% das marcações dos corantes em microscopia confocal de varredura a laser. Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas.



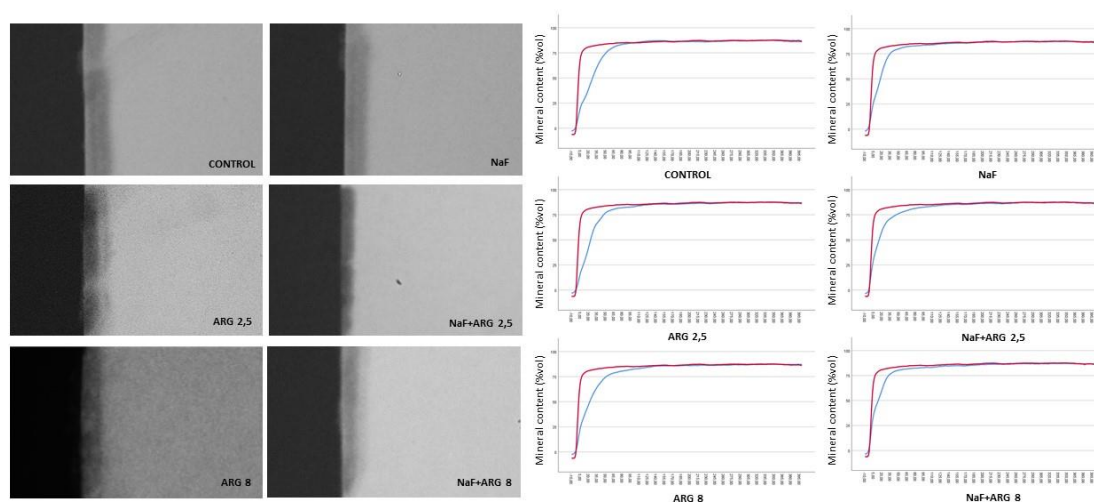
**Figura 4.** Imagens de biofilmes intactos de microcosmos salivares crescidos nas seguintes condições: meio de crescimento McBain modificado com sacarose a 0,2% (A), NaF a 1.450 ppm (B), arginina a 2,5% (C), arginina a 2,5% + NaF a 1.450 ppm (D), arginina a 8% (E) e (F) arginina a 8% + NaF a 1.450 ppm. Diferentes cores de emissões de fluorescência indicam células viáveis (verde), células mortas (vermelha),  $\alpha$ -PECs (violeta) e  $\beta$ -PECs (azul).

**Tabela 2.** Vitalidade e espessura dos biofilmes intactos de microssistemas de saliva de acordo com as diferentes condições de crescimento. A porcentagem é representada pela razão do biovolume de células vivas pelo biovolume total de células vivas e mortas. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas

Grupos	Vitalidade (%)			Espessura ( $\mu\text{m}$ )		
	Média ( $\pm\text{DP}$ )	IC (95%)		Média ( $\pm\text{DP}$ )	IC (95%)	
		Inferior	Superior		Inferior	Superior
<b>Controle</b>	52,16 $\pm$ 22,20 <sup>ac</sup>	39,92	63,57	15,61 $\pm$ 6,55 <sup>ab</sup>	15,01	22,00
<b>ARG 2,5</b>	24,08 $\pm$ 16,91 <sup>b</sup>	19,09	37,11	20,14 $\pm$ 7,40 <sup>a</sup>	17,64	25,53
<b>ARG 8</b>	49,39 $\pm$ 20,14 <sup>ac</sup>	36,74	58,20	14,10 $\pm$ 5,56 <sup>b</sup>	12,45	18,38
<b>NaF</b>	59,60 $\pm$ 19,90 <sup>a</sup>	56,17	77,37	15,61 $\pm$ 5,19 <sup>a</sup>	15,30	20,83
<b>NaF+ARG 2,5</b>	18,50 $\pm$ 38,31 <sup>c</sup>	16,80	57,62	12,08 $\pm$ 3,96 <sup>bc</sup>	11,61	15,83
<b>NaF+ARG 8</b>	23,19 $\pm$ 23,54 <sup>b</sup>	20,99	46,08	10,07 $\pm$ 3,14 <sup>c</sup>	9,28	12,62

### Desmineralização do esmalte

Os resultados da perda mineral integrada, profundidade de lesão e concentração de cálcio liberado no meio de cultura são apresentados na Tabela 3. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de perda mineral integrada e profundidade de lesão entre os grupos (Figura 5). No entanto, houve uma redução significativa da perda de cálcio do esmalte na presença de arginina a 8% e em ambas as combinações com NaF.



**Figura 5.** Imagens de microradiografias transversais (amplificação 10T) e curvas representando perfis de conteúdo mineral após 5 dias de crescimento dos biofilmes sobre blocos de esmalte bovino. As curvas vermelhas representam o perfil do conteúdo mineral do esmalte (área controle) e as curvas azuis representam o perfil do conteúdo mineral do esmalte desmineralizado (área teste).

**Tabela 3.** Medidas de tendência central dos valores de perda mineral integrada (%vol.mm), profundidade de lesão ( $\mu\text{m}$ ) e concentração de cálcio liberado ( $\mu\text{g/mL}$ ) após 5 dias de crescimento de biofilmes de acordo com os diferentes grupos

Grupos	Perda mineral integrada (%vol. $\mu\text{m}$ )	Profundidade de lesão ( $\mu\text{m}$ )	Cálcio liberado ( $\mu\text{g/mL}$ )
	Mediana (II)	Mediana (II)	Mediana (II)
<b>Controle</b>	2540,00(689,17) <sup>a</sup>	66,26(28,40) <sup>a</sup>	101,74(21,73) <sup>a</sup>
<b>ARG2,5</b>	2435,41(697,5) <sup>a</sup>	67,89(70,39) <sup>a</sup>	91,08(14,05) <sup>ac</sup>
<b>ARG 8</b>	1834,16(2390,00) <sup>a</sup>	79,61(60,39) <sup>a</sup>	75,02(15,70) <sup>bd</sup>
<b>NaF</b>	2035,00(373,33) <sup>a</sup>	64,40(37,32) <sup>a</sup>	78,45(5,01) <sup>bc</sup>
<b>NaF+ARG 2,5</b>	1775,00(908,33) <sup>a</sup>	97,78(47,10) <sup>a</sup>	60,87(26,21) <sup>bd</sup>
<b>NaF+ARG 8</b>	1943,33(1066,67) <sup>a</sup>	73,65(73,85) <sup>a</sup>	45,01(7,52) <sup>d</sup>

#### 4. DISCUSSÃO

O microbioma de biofilmes orais é complexo e variado [Valm, 2019; Chen et al., 2021]. O processo de cárie dentária está relacionado à disbiose, caracterizada pelo aumento das proporções de micro-organismos acidúricos e acidogênicos advindo da modificação ambiental pela redução de pH local [Beighton, 2005; Selwitz et al., 2007; Neves et al., 2017]. Neste contexto, o uso da arginina poderia significar uma alternativa para o controle da doença, pois poderia favorecer a manutenção das relações ecológicas relacionadas à homeostase e remineralização de tecidos dentários pelo aumento da proporção de micro-organismos que vivem em ambientes alcalinos [Huang et al., 2017].

A adição de arginina a 8% foi capaz de reduzir significativamente a contagem de todos os grupos microbianos estudados (37,48%, 29,97%, 34,50% e 35,18% de redução de lactobacilos totais, estreptococos do grupo mutans, estreptococos totais e micro-organismos totais, respectivamente). A combinação da arginina ao NaF alcançou níveis de redução similares com a concentração mais baixa do aminoácido (47,85%, 29,62%, 20,15% e 20,69% de redução para lactobacilos totais, estreptococos do grupo mutans, estreptococos totais e micro-organismos totais, respectivamente). A arginina a 2,5% reduziu apenas a contagem de lactobacilos totais (41,74%). Os mesmos padrões de redução foram observados para o biovolume de células vivas, como previamente demonstrado [Zheng et al., 2017; Miranda et al., 2020]. As reduções da contagem de estreptococos do grupo mutans que foram demonstradas estão de acordo com resultados de estudos anteriores, embora a

maioria tenha sido desenvolvida sobre biofilmes mono-espécie de *S. mutans* [Zheng et al., 2017; Bijle et al., 2019].

Nossos resultados mostraram a capacidade da arginina em promover o aumento do pH até valores próximos a 8,0, sendo provavelmente o motivo capaz de explicar a diminuição da proporção de micro-organismos acidogênicos e acidúricos, pois tal proporção parece ser negativamente correlacionada com a atividade produtora de álcalis pelo sistema ADS, mesmo com a aplicação da arginina em concentrações menores [Zheng et al., 2015].

A presença de bactérias cariogênicas no biofilme influencia na formação de polissacarídeos extracelulares [Takahashi and Nyvad, 2011]. As adições de arginina a 8% e ambas as combinações de arginina e NaF reduziram a formação de  $\alpha$ -PECs e  $\beta$ -PECs, tendo relação com a menor espessura do biofilme. Tais resultados estão de acordo com o relato da inibição da produção de glucanos insolúveis pela combinação de arginina a 2% e NaF, responsáveis pela ruptura do biofilme [Bijle et al., 2019]. A diminuição dos PECs resulta em uma matriz extracelular defeituosa, com arquitetura 3D modificada, o que reduz o número e a co-agregação de micro-organismos, contribuindo para a diminuição da virulência do biofilme [He et al., 2016; Miranda et al., 2020].

A similaridade das concentrações de ácido láctico entre os grupos testados, independentemente da diminuição da contagem de micro-organismos acidogênicos viáveis após adição de arginina combinada ou não ao NaF, sugere a presença de células microbianas tiveram a capacidade de desenvolver microambientes ácidos, denominados de nichos ácidos que fornecem o ambiente ideal para sobrevivência de bactérias remanescentes, que garante a produção de ácido de maneira localizada [Falsetta et al., 2014]. Nossos resultados estão de acordo com Exterkate et al. (2010), que demonstraram uma produção substancial de ácido láctico mesmo após a redução da contagem de estreptococos do grupo mutans em 2 log<sub>10</sub>, o que provavelmente indicou a metabolização de ácidos por micro-organismos não- acidúricos. A produção de ácido láctico observada no presente estudo foi coerente com os resultados de perda mineral integrada e de profundidade de lesão, similares estatisticamente entre todos os grupos. Por fim, a menor perda de cálcio observada nos grupos com adição de arginina combinada ao NaF pode ser explicada pelo efeito do flúor na redução da

---

desmineralização do esmalte [Thurnheer et al., 2006; Cury and Tenuta, 2009], que pode ser maximizado em maiores valores de pH [Zheng et al., 2017].

## **5. CONCLUSÕES**

Os resultados do presente estudo demonstraram um efeito sinérgico da combinação da arginina e do NaF na redução da viabilidade de grupos específicos de microrganismos e vitalidade dos biofilmes de microcosmos de saliva, desacelerando o processo de perda mineral mesmo em condições de alta disponibilidade de sacarose. Entretanto, tais mudanças não foram suficientes para prevenir a desmineralização e a formação de lesão em esmalte. Novos estudos devem testar os efeitos das mesmas combinações de arginina e fluoreto em modelos de biofilme com disponibilidade intermitente de sacarose.

## **Conflito de interesses**

Os autores declaram não possuir conflitos de interesses.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem as Profas. Dras. Ana Carolina Magalhães e Ana Flávia Sanches Borges pelo acesso ao Centro Integrado de Pesquisas da FOB-USP. Também agradecem os técnicos Marcelo Milanda, Márcia Graef e Rafaela Alves pela assistência durante os ensaios laboratoriais. Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de auxílio regular de pesquisa (Processo n° 2018/03866-2) e bolsa Doutorado (Processo n° 2018/01654-8).

## **REFERÊNCIAS**

- Albaugh VL, Pinzon-Guzman C, Barbul A. Arginine-Dual roles as an onconutrient and immunonutrient. *J Surg Oncol*. 2017 Mar;115(3):273-80.
- Beighton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2005 Aug;33(4):248-55.
- 
-



- Bel'skaya LV, Sarf EA, Kosenok VK. Indicators of L-arginine metabolism in saliva: A focus on breast cancer. *J Oral Biosci.* 2021 03;63(1):52-57.
- Bijle MNA, Ekambaram M, Lo ECM, Yiu CKY. The combined antimicrobial effect of arginine and fluoride toothpaste. *Sci Rep.* 2019 06 10;9(1):8405.
- Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends Microbiol.* 2018 03;26(3):229-42.
- Burne RA, Marquis RE. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol Lett.* 2000 Dec;193(1):1-6.
- Chen X, Daliri EB, Tyagi A, Oh DH. Cariogenic Biofilm: Pathology-Related Phenotypes and Targeted Therapy. *Microorganisms.* 2021 Jun 16;9(6).
- Chevalier M, Ranque S, Prêcheur I. Oral fungal-bacterial biofilm models in vitro: a review. *Med Mycol.* 2018 Aug 01;56(6):653-67.
- Cury JA, Tenuta LM. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res.* 2009;23 Suppl 1:23-30.
- Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun.* 2014 May;82(5):1968-81.
- He J, Hwang G, Liu Y, Gao L, Kilpatrick-Liverman L, Santarpia P, et al. L-Arginine Modifies the Exopolysaccharide Matrix and Thwarts *Streptococcus mutans* Outgrowth within Mixed-Species Oral Biofilms. *J Bacteriol.* 2016 10 01;198(19):2651-61.
- Hirsiger C, Schmidlin PR, Michaelis M, Hirsch C, Attin T, Heumann C, et al. Efficacy of 8% arginine on dentin hypersensitivity: A multicenter clinical trial in 273 patients over 24 weeks. *J Dent.* 2019 04;83:1-6.
- Huang X, Schulte RM, Burne RA, Nascimento MM. Characterization of the arginolytic microflora provides insights into pH homeostasis in human oral biofilms. *Caries Res.* 2015;49(2):165-76.
- Huang X, Zhang K, Deng M, Exterkate RAM, Liu C, Zhou X, et al. Effect of arginine on the growth and biofilm formation of oral bacteria. *Arch Oral Biol.* 2017 Oct;82:256-62.
- Kumar A, Alam A, Rani M, Ehtesham NZ, Hasnain SE. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2017 Dec;307(8):481-89.
- McBain AJ, Sissons C, Ledder RG, Sreenivasan PK, De Vizio W, Gilbert P. Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. *J Appl Microbiol.* 2005;98(3):624-34.
-

- Midha V, Kochhar AS, Kochhar GK, Bhasin R, Dadlani H. Evaluating the efficacy of desensitizing dentifrices on dentinal hypersensitivity management: A scanning electron microscopic analysis. *J Indian Soc Periodontol*. 2021 Jul-Aug;25(4):283-87.
- Miranda ML, Silva BNS, Salomão KB, de Oliveira AB, Gabbai-Armelin PR, Brighenti FL. Effect of arginine on microorganisms involved in dental caries: a systematic literature review of. *Biofouling*. 2020 07;36(6):696-709.
- Méndez DAC, Gutierrez E, Dionísio EJ, Oliveira TM, Buzalaf MAR, Rios D, et al. Effect of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic therapy on dentin caries microcosms. *Lasers Med Sci*. 2018 Apr;33(3):479-87.
- Nascimento MM, Gordan VV, Garvan CW, Browngardt CM, Burne RA. Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. *Oral Microbiol Immunol*. 2009 Apr;24(2):89-95.
- Neves BG, Stipp RN, da Silva Bezerra D, de Figueiredo Guedes SF, Rodrigues LKA. Molecular detection of bacteria associated to caries activity in dentinal lesions. *Clin Oral Investig*. 2017 Jul;21(6):2053-61.
- Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet*. 2007 Jan;369(9555):51-9.
- Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011 Mar;90(3):294-303.
- Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Bortolin MC, Vogel GL, Cury JA. Ca, Pi, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. *J Dent Res*. 2006 Sep;85(9):834-8.
- Thurnheer T, van der Ploeg JR, Giertsen E, Guggenheim B. Effects of *Streptococcus mutans* gtfC deficiency on mixed oral biofilms in vitro. *Caries Res*. 2006;40(2):163-71.
- Valm AM. The Structure of Dental Plaque Microbial Communities in the Transition from Health to Dental Caries and Periodontal Disease. *J Mol Biol*. 2019 07 26;431(16):2957-69.
- Vogel GL, Chow LC, Brown WE. A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Res*. 1983;17(1):23-31.
- Zheng X, Cheng X, Wang L, Qiu W, Wang S, Zhou Y, et al. Combinatorial effects of arginine and fluoride on oral bacteria. *J Dent Res*. 2015 Feb;94(2):344-53.
- Zheng X, He J, Wang L, Zhou S, Peng X, Huang S, et al. Ecological Effect of Arginine on Oral Microbiota. *Sci Rep*. 2017 08;7(1):7206.
-



### **2.3 ARTIGO 3 - Efeito antimicrobiano e antibiofilme da arginina combinada ou não ao fluoreto de sódio para o controle da desmineralização do esmalte**

Daniela Alejandra Cusicanqui Méndez<sup>a</sup>, Maricel Rosário Cardenas Cuellar<sup>b</sup>, Linda Wang<sup>b</sup> Marília Afonso Rabelo Buzalaf<sup>c</sup>, Thiago Cruvinel da Silva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo

<sup>b</sup>Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo

<sup>c</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo

#### **Autor correspondente:**

Thiago Cruvinel da Silva

Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Alameda Dr. Ótávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Vila Universitária, 17012-901, Bauru-SP, Brasil

Fone: +55 14 3235 8318 Telefax: +55 14 3223 4679

Email: thiagocruvinel@fob.usp.br

---

## **Efeito antimicrobiano e antibiofilme da arginina combinada ou não ao fluoreto de sódio para o controle da desmineralização do esmalte**

### **RESUMO**

O presente estudo objetivou avaliar o efeito antimicrobiano e antibiofilme da arginina a 2,5% e 8%, associada ou não ao fluoreto de sódio a 1.450 ppm, sobre a viabilidade, metabolismo e vitalidade de biofilmes de microcosmos de saliva e seu efeito sobre a desmineralização do esmalte. Amostras de saliva de três voluntários foram usadas para obter um pool microbiológico para crescimento dos biofilmes. Os biofilmes cresceram sobre blocos de esmalte adaptados a um modelo de crescimento ativo em placas de 24 poços. O meio utilizado foi McBain modificado com sacarose a 0,2% trocado a cada 24 h durante os primeiros 3 dias. Posteriormente, os espécimes foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos: a) McBain modificado com sacarose a 0,2% (sem tratamento, controle), b) arginina a 2,5%, c) arginina a 8%, d) fluoreto de sódio (NaF), e) NaF+arginina a 2,5% e f) NaF+arginina a 8%. Os meios contendo os tratamentos foram trocados a cada 24 h por 4 dias adicionais, até se completarem 7 dias. A viabilidade dos biofilmes foi determinada pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de microrganismos totais, estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e lactobacilos totais. A vitalidade dos biofilmes intactos e a produção de polissacarídeos extracelulares (PECs) foram determinadas por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). O metabolismo dos biofilmes foi determinado pelo ensaio de resazurina, pela quantificação de polissacarídeos extracelulares insolúveis e matriz extracelular e pela quantificação da concentração de L-lactato em meio de cultura. O processo de desmineralização foi mensurado pela concentração de cálcio liberado em meio de cultura pelo método Arsenazo III e a perda mineral integrada e a profundidade de lesão determinadas por microrradiografia transversal. A análise estatística foi realizada pelos testes de Kruskal Wallis e post-hoc de Dunn ( $P < 0,05$ ). A adição de arginina a 2,5% reduziu a contagem de lactobacilos, enquanto concentração de arginina a 8% e a combinação de NaF e arginina 8% reduziram significativamente a contagem de todos os grupos de microrganismos. A arginina a 8% e as combinações com NaF reduziram a vitalidade de biofilme, a produção de  $\alpha$ -PECs foi reduzida em todos os grupos, porém os  $\beta$ -PECs apenas no grupo ARG 8, assim como o cálcio liberado nos grupos ARG 8 combinado ou não com NaF. Entretanto, nenhuma condição de crescimento foi capaz de reduzir

---

significativamente a perda mineral integrada e na análise profundidade de lesão apenas o grupo NaF+ARG 2,5 apresentou a maior lesão. Por tanto, as combinações de arginina 8 % e NaF apresentaram melhores atividades antimicrobiana e antibiofilme sobre microcosmos salivares, contribuindo para a desaceleração da desmineralização, contudo sem prevenir a perda mineral integrada mas sim o desenvolvimento de lesões em esmalte.

**Palavras chave:** Cárie dentária, biofilme, microrganismos, arginina, prevenção e controle

## INTRODUÇÃO

A cavidade bucal apresenta uma diversa comunidade microbiana composta por mais de 700 espécies de micro-organismos ([www.homd.org/](http://www.homd.org/)) (Dewhirst et al., 2010). O desequilíbrio das relações harmônicas do microbioma (disbiose) pode favorecer o desenvolvimento de doenças, tais como a cárie dentária, a gengivite e a periodontite (Marsh 2006, Chimenos-Küstner, Giovannoni et al. 2017). A cárie dentária é uma doença resultante do metabolismo de açúcares da dieta humana por micro-organismos acidogênicos e acidúricos, com predomínio em biofilmes crescidos em microambientes com baixos pH decorrentes da glicólise (Liu, Ren, Hwang, & Koo, 2018), que causa a desmineralização dos tecidos dentários por períodos de tempo prolongados e consequente formação de lesões em esmalte, dentina e cimento (Kidd & Fejerskov, 2004; Liu et al., 2018).

A estratégia mais comum para a prevenção e controle da cárie dentária é a remoção mecânica do biofilme pela escovação e uso do fio dental (Schwendicke et al., 2016; Figuero et al., 2017). Entretanto, comportamentos individuais e características anatômicas dos dentes contribuem para a estagnação de biofilme sobre as superfícies dentárias e o aumento da sua virulência (Schwendicke et al., 2016). O uso de agentes quimioprolifáticos pode favorecer a modificação da comunidade microbiana, pela redução da formação da matriz extracelular e manutenção de valores de pH neutros (Miranda et al., 2020). Dessa maneira, os biofilmes podem ser mais facilmente removidos mecanicamente pela higiene bucal ou pela saliva (Cai et al., 2015), ou se ainda permanecerem aderidos em áreas de difícil acesso, como fóssulas e fissuras, não causar a desmineralização (Watson et al., 2005).

Neste contexto, o fluoreto foi amplamente estudado para a prevenção da doença, por meio da inibição da desmineralização das estruturas dentárias e promoção da remineralização de lesões já estabelecidas (Cury & Tenuta, 2009; Peng et al., 2019). Entretanto, apesar dele ser amplamente disponibilizado por meio de dentifrícios e outros produtos de higiene bucal, a cárie dentária continua sendo um problema de saúde pública mundial (Kassebaum et al., 2017). Portanto, sugere-se a adição de agentes que modulem o crescimento, a virulência de micro-organismos e a formação de matriz extracelular de biofilmes orais para melhorar a atividade biológica do flúor (Thurnheer, van der Ploeg, Giertsen, & Guggenheim, 2006). Uma das possibilidades poderia ser a arginina, um aminoácido semi-essencial encontrado naturalmente na

---

saliva com capacidade de alcalinização da cavidade bucal. Ela é utilizada para a produção de energia por alguns tipos de micro-organismos não sacarolíticos, mediante o uso do sistema arginina-deaminase (ADS). Neste sistema são produzidos a citrulina, ornitina, dióxido de carbono, ATP e amônia (Burne & Marquis, 2000), sendo portanto, considerada como um agente prebiótico para a prevenção da cárie dentária.

A produção de amônia via ADS resulta em um aumento do pH citoplasmático e ambiental, beneficiando o crescimento e sobrevivência de micro-organismos relacionados à homeostase bucal pela proteção contra a morte por ácidos (Burne & Marquis, 2000), por prover vantagens bioenergéticas com aumento do pH e síntese de ATP (Burne & Marquis, 2000; Poolman, Driessen, & Konings, 1987) e pela manutenção de um meio com pH relativamente neutro, menos favorável ao crescimento de micro-organismos cariogênicos (Burne & Marquis, 2000; Marquis, Bender, Murray, & Wong, 1987). Além disso, a arginina também pode reduzir a co-agregação de células microbianas e a viabilidade de biofilmes (Bernier, Ha, Khan, Merritt, & O'Toole, 2011; Borriello, Richards, Ehrlich, & Stewart, 2006; Sato & Nakazawa, 2014; Zhu et al., 2007). Em estudos anteriores foi demonstrado o aumento da atividade ADS nos biofilmes de pessoas livres de cárie (Burne & Marquis, 2000) e nos biofilmes localizados sobre superfícies dentárias livres de cárie em pacientes com experiência da doença (Nascimento et al., 2019; Nascimento et al., 2013).

Estudos tem demonstrado o possível controle da virulência de biofilmes crescidos em meios contendo arginina combinada ao fluoreto de sódio (Bijle, Ekambaram, Lo, & Yiu, 2019; Zheng et al., 2015; Zheng et al., 2017). Entretanto, para o nosso conhecimento, ainda não existem estudos demonstrando o mesmo potencial sobre biofilmes previamente formados. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da arginina a 2,5 e 8 % combinada ou não ao fluoreto de sódio a 1.450 ppm sobre a viabilidade, metabolismo e vitalidade de biofilmes de microcosmos de saliva, bem como sobre o controle da desmineralização do esmalte, considerando alta disponibilidade de sacarose.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Delineamento experimental*

Os biofilmes cresceram sobre blocos de esmalte em meio McBain modificado com sacarose a 0,2%, trocado a cada 24 h durante 3 dias. Posteriormente, os espécimes

---

foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos: a) McBain modificado com sacarose a 0,2% (sem tratamento, controle), b) arginina a 2,5%, c) arginina a 8%, d) fluoreto de sódio (NaF), e) NaF+arginina a 2,5% e f) NaF+arginina a 8%. Os meios contendo os tratamentos foram trocados a cada 24 h por 4 dias adicionais, até se completarem 7 dias. A viabilidade dos biofilmes foi determinada pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de microrganismos totais, estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e lactobacilos totais. A vitalidade dos biofilmes intactos e a produção de polissacarídeos extracelulares (PECs) foram determinadas por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). O metabolismo dos biofilmes foi determinado pelo ensaio de resazurina, pela quantificação de polissacarídeos extracelulares insolúveis e matriz extracelular e pela quantificação da concentração de L-lactato em meio de cultura. O processo de desmineralização foi mensurado pela concentração de cálcio liberado em meio de cultura pelo método Arsenazo III e a perda mineral integrada e a profundidade de lesão determinadas por microrradiografia transversal.

#### *Coleta de saliva*

Este estudo foi inicialmente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo (CEEA: 90551018.8.0000.5417). Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, saliva total estimulada pela mastigação de parafilm foi coletada de três adultos que preencheram os seguintes critérios de inclusão: (1) idade entre 20 e 35 anos, (2) sem lesão de cárie ativa, (3) estado de saúde geral satisfatório, sem o diagnóstico de doenças infecciosas, síndromes e/ou doenças congênitas ou adquiridas e (4) sem uso de antibióticos por três meses antes da coleta. Os participantes foram orientados a não escovar os dentes por 24 h e não ingerir alimentos por 2 h antes da coleta de saliva. Após a coleta, as amostras foram filtradas e diluídas em glicerol a 60% e armazenadas a -80°C até o momento do uso.

#### *Preparação e seleção de amostras dentárias*

Cem blocos de esmalte (4 x 4 x 3 mm) foram confeccionados em máquina de corte de semi-precisão (Buehler, Enfield, CT, EUA). As amostras foram fixadas em discos de acrílico com cera e as superfícies de esmalte foram lixadas e polidas em politriz metalográfica (Arotec, Cotia, Brasil) utilizando discos de carboneto de silício (lixas de

---

polimento 600, 800 e 1.200 graus de papéis Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Buehler Ltd., Lake Bluff, EUA) resfriados com água. Para padronização inicial, a dureza superficial dos blocos foi determinada em microdurômetro (Micromet 5114 hardness tester, Buehler LTD, Lake Bluff, IL, USA). Blocos com  $\pm 10\%$  da média da dureza superficial de todos os blocos foram descartados. Dois terços da superfície de cada bloco foram protegidas com esmalte de unhas para obter áreas de controle para análise de microrradiografia transversal (TMR). Posteriormente os blocos foram fixados no Active Attachment Biofilm Model from Amsterdam e autoclavados a 121°C por 15 min, como descrito por Méndez et al. (Méndez et al., 2018).

#### *Ativação do inóculo*

Um volume de 400  $\mu$ L do inóculo salivar foi adicionado a 10 mL de meio McBain modificado [2.5 g L<sup>-1</sup> mucina, 2.0 g L<sup>-1</sup> peptona, peptona caseína 2.0 g L<sup>-1</sup>, 1.0g L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 0.35 g L<sup>-1</sup> NaCl, 0.2g L<sup>-1</sup> KCl, 0.2g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 0.001 g L<sup>-1</sup> hemina, 0.0002 g L<sup>-1</sup> vitamina K1, 25 mmol L<sup>-1</sup> PIPES, água deionizada, pH 7.0] (McBain et al., 2005), com adição de sacarose a 0,2% e, em seguida, incubado anaerobicamente a 37°C overnight. Posteriormente, o inóculo salivar ativado foi adicionado ao meio McBain modificado na proporção 1:1. Então, alíquotas de 1,5 mL foram distribuídas uniformemente em cada poço de uma placa de 24 poços, nos quais foram inseridos os blocos de esmalte adaptados aos modelos de biofilme, incubados por mais 24 h a 37°C em anaerobiose.

#### *Divisão dos grupos experimentais e crescimento dos biofilmes*

No primeiro dia, a suspensão do inóculo foi adicionada ao meio McBain modificado na proporção 1:1. Alíquotas de 1,5 mL foram distribuídas uniformemente em cada poço de uma placa de 24 poços e, em seguida, o modelo de biofilme contendo blocos de esmalte foi adaptado e incubado por 24 h a 37°C em anaerobiose. Os meios foram renovados a cada 24 h até se completarem 3 dias de crescimento (1ª fase). Posteriormente, as amostras foram incubadas em diferentes condições de tratamento, de acordo com os seguintes grupos: 1) McBain modificado (controle), 2) arginina a 2,5% (ARG 2,5), 3) arginina a 8% (ARG 8), 4) fluoreto de sódio a 1.450 ppm (NaF), 5) NaF + arginina a 2,5% (NaF + ARG 2,5) e 6) NaF + arginina a 8% (NaF + ARG 8). Os meios de cultura com os tratamentos foram renovados por 4 dias adicionais (2ª fase),

---

até se completarem 7 dias de experimento. Cada grupo foi composto por um total de 9 amostras de biofilmes, crescidos em triplicata com 2 repetições.

A cada dia, o meio de crescimento foi coletado para a determinação do pH com uso de eletrodo (Benchtop phmeter, Kasvi, China) e para estocagem a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise de cálcio liberado. Ao final do 7<sup>o</sup> dia, os blocos de esmalte foram cuidadosamente removidos com pinças e transferidos para 2 mL de meio tamponado de água peptonada (BPW) [20 g de água peptonada tamponada, água deionizada/L, pH 7,2], suplementado com sacarose a 0,2% e incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  em anaerobiose por 3 h. Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de meio BPW foram coletadas de cada amostra e transferidas para microtubos, os quais foram mantidos a  $85^{\circ}\text{C}$  por 5 min para interromper a produção de ácido láctico. Em seguida, os microtubos foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise.

#### *Análise da produção de ácido láctico*

As concentrações de L-lactato foram determinadas pelo método espectrofotométrico enzimático, baseado na conversão de L-lactato em piruvato e na concomitante conversão de NAD em NADH. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (Synergy H1, BioTek Instruments Inc., EUA) no comprimento de onda de 340 nm. Os valores de absorbância foram convertidos para concentrações de ácido láctico de acordo com os parâmetros estabelecidos por uma curva padrão, com valores variando entre 0 e 3 mM de L-lactato.

#### *Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)*

Os biofilmes foram dispersos conforme descrito por Méndez et al. (Cusicanqui Méndez, Gutierrez et al. 2018). Alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  de cada diluição foram inoculadas em placas de Petri contendo Ágar Sangue de Soja Triptona, Ágar Mitis Salivarius, Ágar Mitis Salivarius contendo bacitracina a 0,2% e sacarose a 20%, Ágar Rogosa com ácido acético glacial a 0,13% e Ágar Sabouraud, para determinação de microrganismos totais, estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans, lactobacilos totais e candida, respectivamente. Em seguida, as placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48–72 h, sendo as contagens de UFC/mL determinadas em contador de colônias manual (CP608, Phoenix luferco, Araraquara/SP, Brasil).

---



### *Determinação da quantidade de cálcio liberado no meio de cultura*

A análise de cálcio no meio de cultura foi realizada por espectrofotometria. Alíquotas de 5 µL de cada amostra foram utilizados, permitindo volumes padronizados de padrões de cálcio (variando de 40 a 200 mM de cálcio). Um volume de 50 µL do reagente Arsenazo III foi usado como agente colorimétrico (Tenuta, Del Bel Cury, Bortolin, Vogel, & Cury, 2006; Vogel, Chow, & Brown, 1983), e as leituras da amostra foram realizadas em um leitor de microplacas (Synergy H1, BioTek Instruments Inc., EUA). Cinquenta microlitros de água deionizada e 5 µL das amostras ou das soluções padrão foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços. Posteriormente, o reagente colorimétrico foi adicionado uniformemente em cada poço da placa. Então as placas foram agitadas durante 60 s no leitor de microplaca, permitindo a reação entre a amostra e o Arsenazo III antes de obtenção da absorbância resultante em 610 nm.

### *Ensaio metabólico de resazurina*

Para o ensaio de resazurina, uma solução estoque de resazurina (1,25 mg/mL) foi diluída em PBS para atingir a concentração final de 0,0016%. Seguindo a divisão dos grupos testados, biofilmes foram cultivados no fundo de placas de 24 poços por um período de 7 dias (3 dias correspondentes a 1ª fase e 4 dias correspondentes a 2ª fase) para análise metabólica. Os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS para remoção de células pobremente aderidas. Alíquotas de 500 µL/poço foram uniformemente dispensadas e os biofilmes incubados por 2 h. A intensidade da fluorescência (FI) de cada poço foi registrada à temperatura ambiente no aparelho de leitor de microplacas (Synergy H1, BioTek Instruments Inc., EUA), com excitação em 485 nm e emissão em 580 nm. A intensidade de fluorescência (IF) de resazurina diluída a 0,0016% em PBS foram detectados em triplicata para cada placa de 24 poços. O efeito dos reagentes sobre o metabolismo dos biofilmes foi determinado com base na porcentagem de redução de IF em relação ao grupo controle, calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{IF}(\% \text{redução}) = \frac{[(\text{IF}_{\text{teste}} - \text{IF}_{\text{blank}}) / (\text{IF}_{\text{grupo controle}} - \text{IF}_{\text{blank}})] \times 100}{100}, \text{ onde}$$

**blank representa a média dos poços contendo apenas resazurina diluída em PBS, sem contato com biofilmes**

---

*Vitalidade de biofilmes intactos, biovolume, polissacarídeos extracelulares e espessura de biofilmes intactos*

Para evitar a autofluorescência dos tecidos dentários, biofilmes microcosmos salivares foram cultivados em blocos de vidro especiais (4 × 4 × 1 mm), com uma rugosidade superficial de 1.200 grit (Menzel, Braunschweig, Alemanha). Os blocos de vidro foram divididos de acordo com os grupos experimentais citados anteriormente. Nas últimas 24 h do crescimento dos biofilmes, 20 µL do corante Alexafluor O 488 (Molecular Probes Inc., EUA) a 2 µmol/L foram adicionados ao meio renovado e novamente incubado. Após o 7º dia de crescimento, as amostras foram lavadas três vezes em 1,5 mL de CPW e coradas com 15 µL do kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD® BacLight (Invitrogen Molecular Probes, EUA) e mantidas no escuro por 15 min. Posteriormente, os biofilmes foram lavados em água destilada e corados novamente com Calcofluor (White Calcofluor, Sigma Chemicals Co., EUA) à temperatura ambiente no escuro por 1 min. Por fim, as amostras foram novamente enxaguadas em água deionizada. Quatro locais representativos de cada amostra foram visualizados em um microscópio confocal Leica TCS-SPE invertido (Micro Systems Engineering GmbH, Alemanha), e as imagens foram corrigidas e sintetizadas no software Leica LAS AF Lite (Leica, Alemanha) e analisados para determinar o biovolume de bactérias vivas, polissacarídeos extracelulares e vitalidade de biofilmes intactos pela razão entre os sinais verdes e a soma dos sinais verdes e vermelhos, bem como para a mensuração da espessura do biofilme em µm, considerando o ponto mais externo da superfície mais espessa de cada biofilme e o ponto mais profundo em contato com o bloco de vidro.

*Microrradiografia transversal (TMR)*

Os blocos de esmalte foram seccionados em sentido perpendicular para a evidenciação das áreas desmineralizadas. Posteriormente, os fragmentos foram polidos manualmente com lixas de papel de 600-800 grãos até atingir uma espessura de 80-90 µm e fixados em um dispositivo contendo uma escala de calibração de alumínio com 14 níveis. As microrradiografias foram produzidas em lâminas de vidro especiais contendo filme radiográfico (SD-Q/SD-S, Konica Minolta), por meio de um equipamento gerador de raios-X (Softex; Tokio, Hhonsu, Japão) a 20 kV e 20 mA (a uma distância de 42 cm) por aproximadamente 13 min. As imagens produzidas nas lâminas de vidro foram analisadas em um microscópio óptico com objetiva 20x (Zeiss;

---

Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha), com uma câmera CCD (EOS 550D Canon, Tokio, Japão) e um microcomputador acoplados. O conteúdo mineral foi calculado com base na fórmula descrita por Angmar, et al. (1963). Os valores de perda mineral integrada ( $\Delta Z$ , % vol. $\mu\text{m}$ ) e a profundidade de lesão (LD,  $\mu\text{m}$ ) foram determinados.

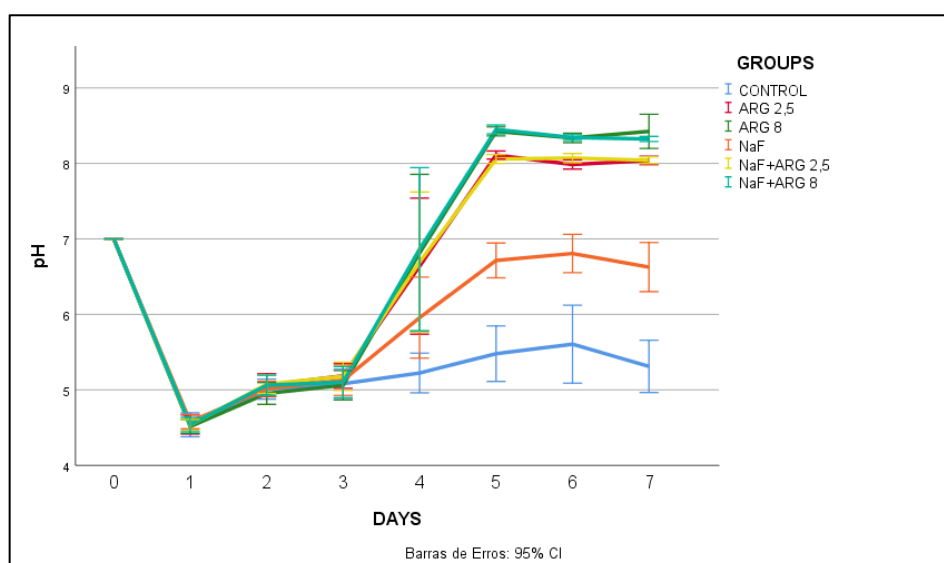
### Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 21.0 (IBM® SPSS® Statistics, Nova York, EUA). A hipótese de distribuição normal dos dados foi rejeitada pelo teste de Shapiro-Wilk. Portanto, as diferenças entre os grupos foram detectadas pelos testes não paramétricos para amostras independentes, Kruskal Wallis e testes post-hoc de Dunn. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## RESULTADOS

### PH

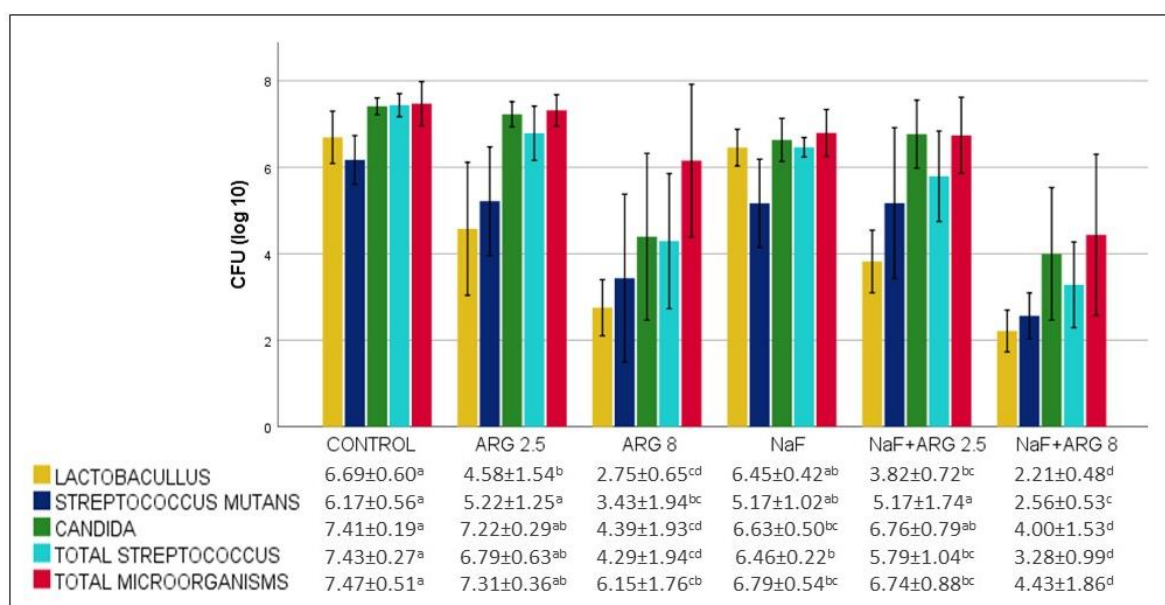
As flutuações dos valores de pH são apresentadas na Figura 1. No grupo controle (sem tratamento), observam-se valores de pH menores que 6,0 durante todo o período experimental. Todos os demais tipos de tratamento propiciaram aumento dos valores de pH desde o 4º dia (primeiro dia de tratamento). Os maiores valores de pH foram observados nos grupos tratados com arginina combinada ao NaF (pH > 8,0 a partir do 5º dia).



**Figura 1.** Variação dos valores de pH ao longo do tempo, de acordo com as diferentes condições de tratamento dos biofilmes.

#### *Viabilidade dos biofilmes*

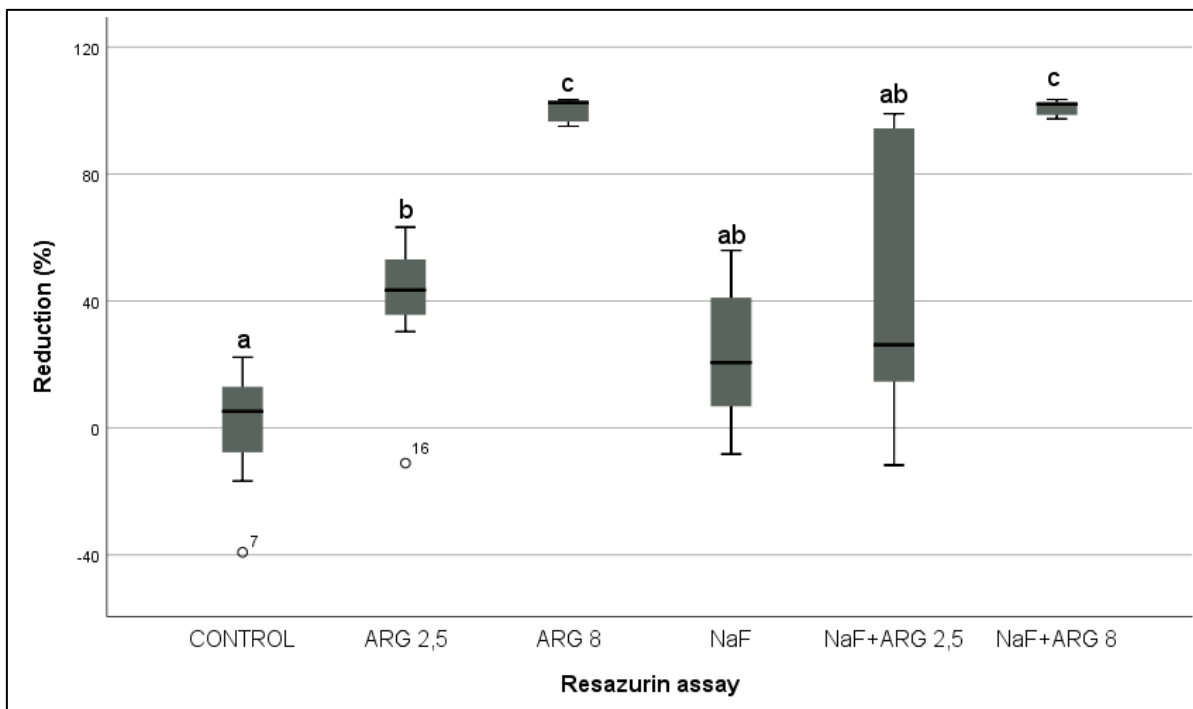
A Figura 2 apresenta as contagens de UFCs de biofilmes de microcosmos salivares de acordo com cada tipo de tratamento. A contagem de lactobacilos totais foi reduzida significativamente em todos os grupos teste quando comparados ao grupo controle, sendo dose-dependente em relação à arginina combinada ou não ao NaF. As contagens de estreptococos do grupo mutans foram reduzidas apenas nos grupos ARG 8 e NaF+ARG 8 (2,73 e 3,60 log<sub>10</sub>, respectivamente). De maneira similar, a contagem de candida foi reduzida nos grupos ARG 8 e NaF+ARG 8, além do grupo NaF (3,01, 3,41 e 0,78 log<sub>10</sub>, respectivamente). Já as contagens de estreptococos totais e micro-organismos totais foram reduzidas por todos os tratamentos, exceto pela arginina a 2,5%.



**Figura 2.** Contagem de lactobacilos totais (amarelo), estreptococos do grupo mutans (azul escuro), candida (verde), estreptococos totais (azul claro) e microrganismos totais (vermelho) de acordo com as diferentes condições de tratamento. Os valores demonstrados correspondem às médias e desvios-padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

### Ensaio metabólico de resazurina

A Figura 3 mostra as porcentagens de redução do metabolismo da resazurina nos diferentes grupos do estudo. Observa-se o efeito dose-dependente da arginina não combinada ao NaF. Os resultados do grupo NaF+ARG 2,5 foram similares ao grupo controle. A combinação NaF e arginina a 8% reduziu significativamente o metabolismo de resazurina, similarmente à arginina a 8% sozinha.



**Figura 3.** Porcentagem da redução do metabolismo de resazurina de acordo com as diferentes condições de tratamento. Diagramas de caixa representam os valores das medianas, percentis 25 e 75 e limite inferior e superior do intervalo de confiança de 95% das marcações dos corantes em microscopia confocal de varredura a laser. Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas.

### Concentração de ácido láctico

A concentração de ácido láctico em meio BPW está representada na Tabela 1. Observa-se que a arginina a 2,5% sozinha não foi capaz de reduzir a produção de ácido láctico. Entretanto, arginina a 8% e ambas as combinações de NaF e arginina reduziram significativamente a produção de ácido láctico por biofilmes de microcosmos de saliva.

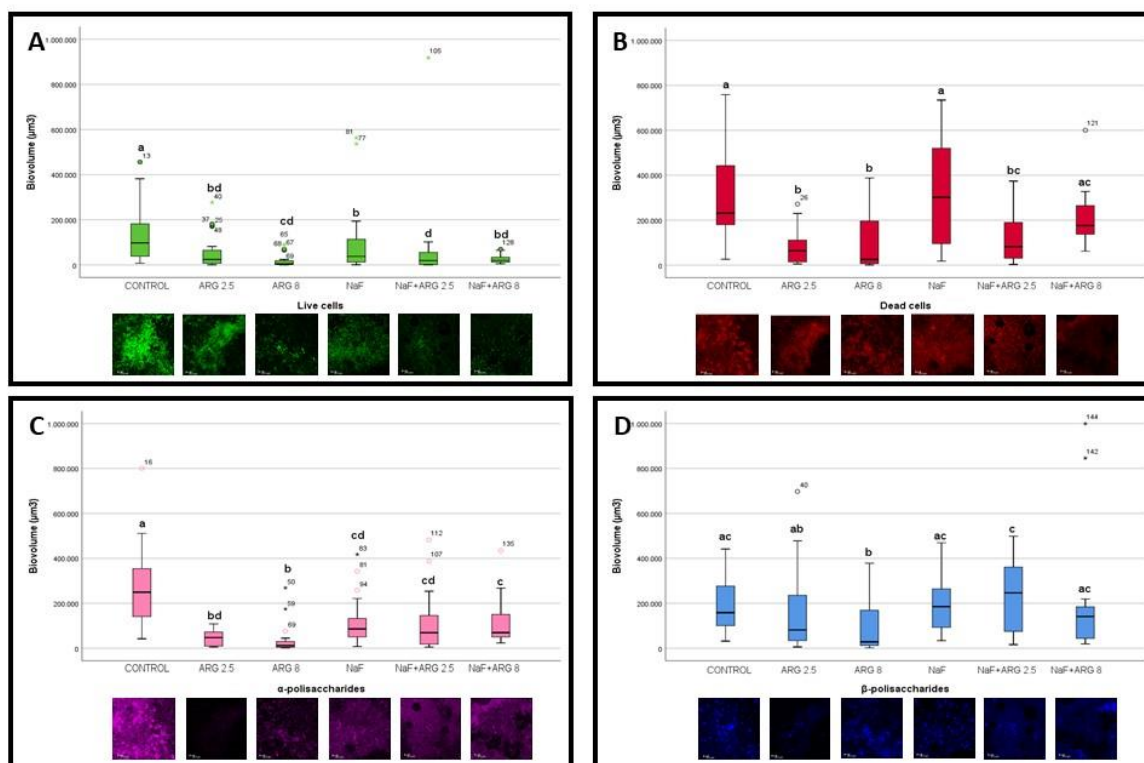
**Tabela 1.** Concentração de ácido láctico (mmol/L) após as diferentes condições de tratamento. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos

Grupos	Média ( $\pm DP$ )	Mediana (II)	IC (95%)	
			Inferior	Superior
Controle <sup>a</sup>	1,76 $\pm$ 0,99	1,60(1,74)	1,14	2,40
ARG 2,5 <sup>ab</sup>	1,57 $\pm$ 1,10	1,41(1,02)	0,87	2,27
ARG 8 <sup>b</sup>	0,96 $\pm$ 0,40	0,93(0,79)	0,70	1,21
NaF <sup>b</sup>	1,00 $\pm$ 0,54	0,99(0,96)	0,66	1,34
NaF+ARG 2,5 <sup>b</sup>	0,98 $\pm$ 0,34	0,99(0,68)	0,76	1,20
NaF+ARG 8 <sup>b</sup>	0,94 $\pm$ 0,39	0,98(0,78)	0,70	1,19

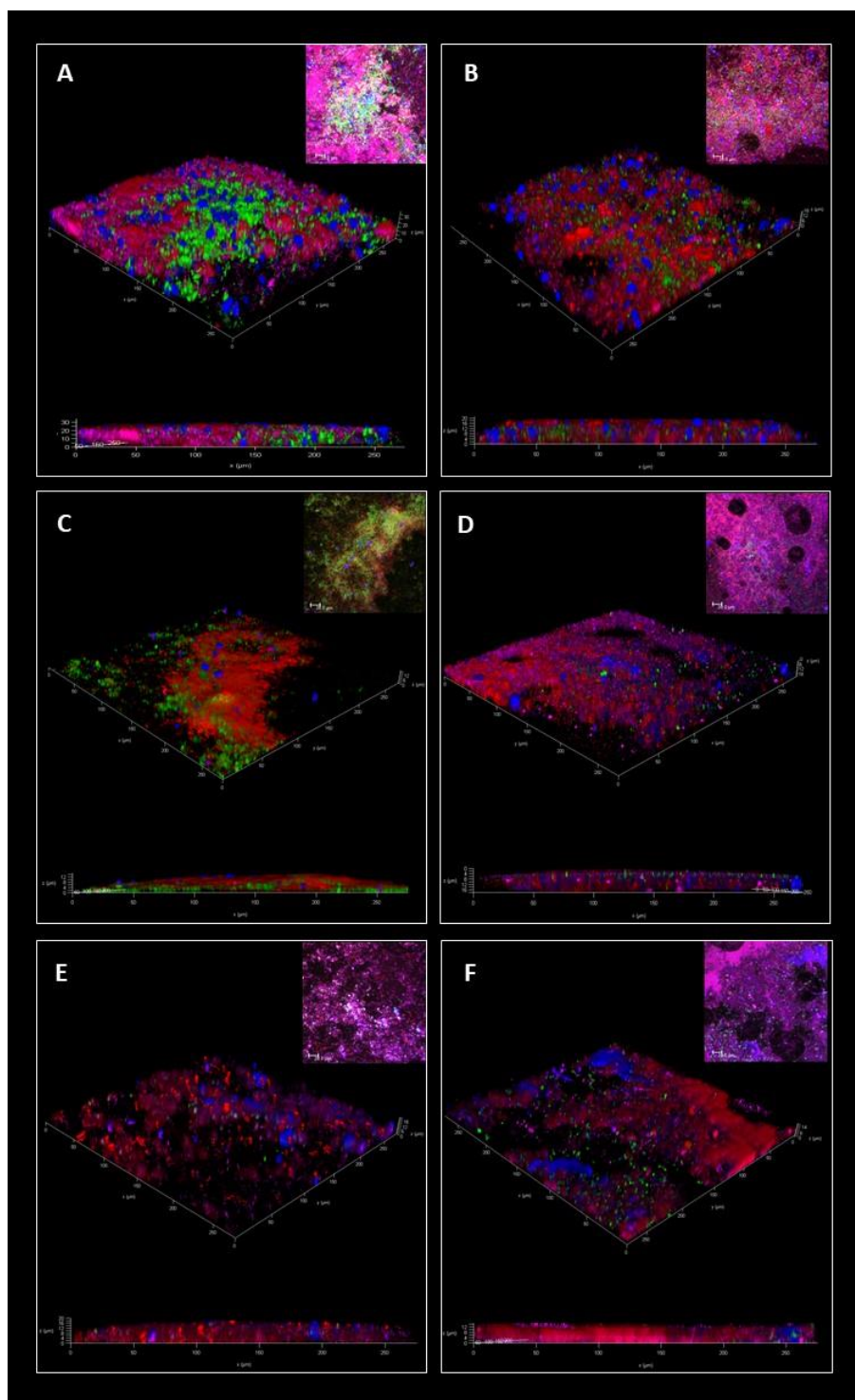
*Vitalidade de biofilmes intactos, biovolume, polissacarídeos extracelulares e espessura dos biofilmes intactos*

Os biovolumes de células vivas, mortas e polissacarídeos extracelulares alfa e beta são mostrados nas Figuras 4 e 5. Em todos os grupos teste ocorreu a diminuição significativa dos biovolumes de células vivas e  $\alpha$ -PECs. Contrariamente, o biovolume dos  $\beta$ -PECs foi reduzido apenas no grupo ARG 8.

Os resultados da vitalidade e a espessura dos biofilmes intactos são demonstrados na Tabela 2. A vitalidade dos biofilmes só não foi reduzida significativamente pelo tratamento com arginina a 2,5% sozinha. Já a espessura dos biofilmes foi significativamente reduzida apenas nos grupos ARG 8 e NaF+ARG 8.



**Figura 4.** Biovolumes de células vivas (A), células mortas (B), polissacarídeos extracelulares alfa ( $\alpha$ -PECs) (C) e polissacarídeos extracelulares beta ( $\beta$ -PECs) (D), de acordo com as diferentes condições de tratamento. Diagramas de caixa representam os valores das medianas, percentis 25 e 75 e limite inferior e superior do intervalo de confiança de 95% das marcações dos corantes em microscopia confocal de varredura a laser. Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas.



**Figura 5.** Imagens de biofilmes intactos de microcosmos salivares tratados com as seguintes condições: meio de crescimento McBain modificado com sacarose a 0,2% (A), NaF a 1.450 ppm (B), arginina a 2,5% (C), arginina a 2,5% + NaF a 1.450 ppm (D), arginina a 8% (E) e (F) arginina a 8% + NaF a 1.450 ppm. Diferentes cores de emissões de fluorescência indicam células viáveis (verde), células mortas (vermelha),  $\alpha$ -PECs (violeta) e  $\beta$ -PECs (azul).

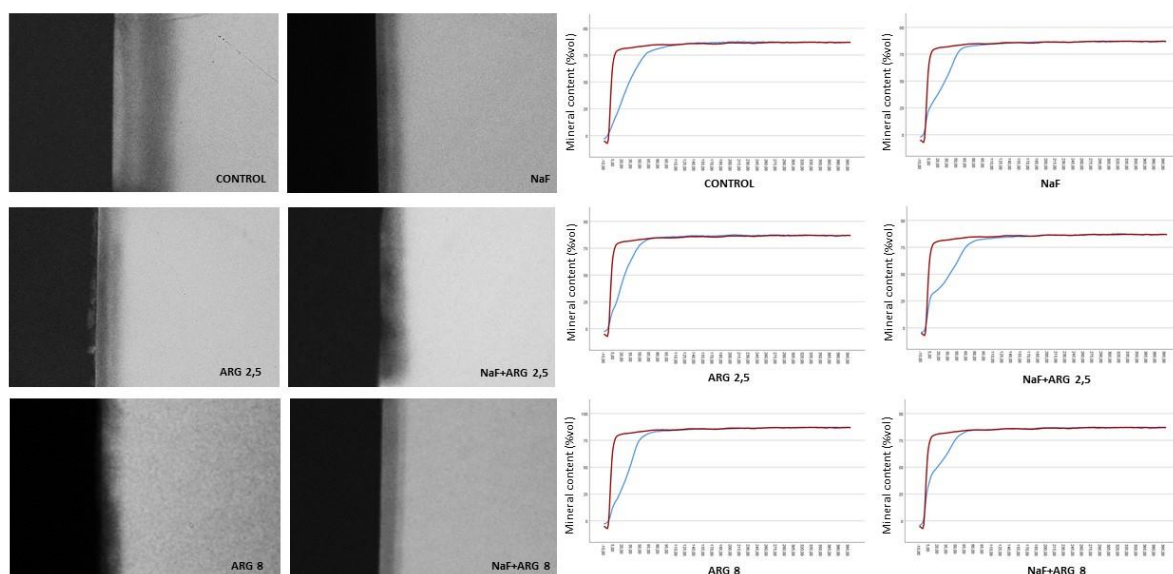


**Tabela 2.** Vitalidade e espessura dos biofilmes intactos de microcosmos de saliva de acordo com as diferentes condições de tratamento. A porcentagem é representada pela razão do biovolume de células vivas pelo biovolume total de células vivas e mortas. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes

	Grupos	Média ( $\pm$ DP)	Mediana	IC (95%)	
				Inferior	Superior
Vitalidade (%)	Controle <sup>ab</sup>	28,52 $\pm$ 16,40	30,18	21,59	35,45
	ARG 2,5 <sup>a</sup>	34,62 $\pm$ 22,31	31,28	25,20	44,04
	ARG 8 <sup>bc</sup>	22,39 $\pm$ 20,66	13,94	13,66	31,11
	NaF <sup>c</sup>	21,06 $\pm$ 22,22	10,32	11,68	30,45
	NaF+ARG 2,5 <sup>c</sup>	24,12 $\pm$ 28,42	9,84	12,12	36,12
	NaF+ARG 8 <sup>c</sup>	11,58 $\pm$ 7,7	8,43	8,33	14,83
Espessura ( $\mu$ m)	Controle <sup>ac</sup>	21,90 $\pm$ 10,24	19,13	17,58	26,23
	ARG 2,5 <sup>a</sup>	17,37 $\pm$ 4,98	16,61	15,27	19,47
	ARG 8 <sup>b</sup>	12,71 $\pm$ 3,15	11,08	11,38	14,47
	NaF <sup>c</sup>	20,69 $\pm$ 5,07	20,14	18,55	22,83
	NaF+ARG 2,5 <sup>ab</sup>	14,60 $\pm$ 2,57	15,10	13,51	15,69
	NaF+ARG 8 <sup>a</sup>	17,66 $\pm$ 5,10	17,12	15,51	19,82

### *Desmineralização do esmalte*

Os resultados da perda mineral integrada, profundidade de lesão e concentração de cálcio liberado em meio de cultura estão apresentados na Figura 6 e Tabela 3. Embora todos os grupos apresentem valores de perda mineral integrada e profundidade de lesão estatisticamente semelhantes, a perda de cálcio foi reduzida pelos tratamentos com arginina a 8% e NaF combinado com arginina a 2,5% e 8%.



**Figura 6.** Imagens de microradiografias transversais (amplificação 10T) e curvas representando perfis de conteúdo mineral após 7 dias de crescimento dos biofilmes sobre blocos de esmalte bovino. As curvas vermelhas representam o perfil do conteúdo mineral do esmalte (área controle) e as curvas azuis representam o perfil do conteúdo mineral do esmalte desmineralizado (área teste).

**Tabela 3.** Medidas de tendência central dos valores de perda mineral integrada (%vol.mm), profundidade de lesão ( $\mu\text{m}$ ) e concentração de cálcio liberado ( $\mu\text{g/mL}$ ) após 7 dias de crescimento de biofilmes de acordo com os diferentes grupos de tratamento

Grupos	Perda mineral integrada (%vol $\mu\text{m}$ ) Mediana (II)	Profundidade de lesão ( $\mu\text{m}$ ) Mediana (II)	Cálcio liberado ( $\mu\text{g/mL}$ ) Mediana (II)
<b>CONTROL</b>	3018,33(1077,92) <sup>a</sup>	79,61(40,83) <sup>ab</sup>	168,27(39,93) <sup>a</sup>
<b>ARG2,5</b>	2116,67(842,50) <sup>a</sup>	55,60(26,16) <sup>a</sup>	143,11(36,06) <sup>ab</sup>
<b>ARG 8</b>	2733,33(744,79) <sup>a</sup>	71,12(29,05) <sup>ab</sup>	111,91(30,76) <sup>bc</sup>
<b>NaF</b>	2330,00(1407,50) <sup>a</sup>	70,00(44,42) <sup>ab</sup>	120,17(54,40) <sup>ab</sup>
<b>NaF+ARG 2,5</b>	2928,33(1452,29) <sup>a</sup>	98,92(22,96) <sup>b</sup>	117,36(45,01) <sup>bc</sup>
<b>NaF+ARG 8</b>	2209,17(848,75) <sup>a</sup>	61,02(22,86) <sup>a</sup>	75,13(37,43) <sup>c</sup>

## DISCUSSÃO

Este estudo simulou o tratamento de biofilmes estagnados sobre superfícies dentárias com arginina combinada ou não ao NaF. Na cavidade bucal tal situação é bastante comum, pela presença de locais de difícil acesso para a remoção mecânica do biofilme, tais como faces proximais ou fossas e fissuras de molares e presença de aparelhos ortodônticos fixos.

A capacidade da arginina combinada ou não ao NaF em modular a composição de biofilmes foi demonstrada pela redução de todos os grupos microbianos específicos estudados, com variações observadas de acordo com os tratamentos. Por exemplo, a arginina a 8% foi capaz de reduzir a contagem de candida, como demonstrado previamente (Koopman et al., 2015). Este fungo é altamente acidogênico e tolerante a meios ácidos, mostrando sinergismo com estreptococos do grupo mutans e lactobacilos (Falsetta et al., 2014; Kraneveld et al., 2012). A participação da *Candida albicans* no processo de cárie já foi demonstrada (Liu et al., 2018), pois ela absorve enzimas produzidas pelos *S. mutans* como glicosiltransferases que favorecem a produção de PECs como glucanos (Falsetta et al., 2014). Isso pode explicar a similaridade de redução de UFCs entre os dois grupos de micro-organismos pela aplicação da arginina a 8% com e sem adição de flúor.

O biofilme é uma estrutura complexa, composta de comunidades microbianas imersa em uma matriz autoproduzida de substâncias poliméricas, como exopolissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Flemming et al., 2016). A matriz extracelular é fundamental para a adesão celular que fornece estabilidade mecânica ao biofilme, além de modular a composição microbiana mediante a manutenção de baixos valores de pH mesmo na presença de tamponadores salivares (Liu et al., 2018). A arginina tem a capacidade de aumentar a produção de álcalis por micro-organismos arginolíticos, como estreptococos sanguinis e estreptococos gordonii, aumentando o pH por meio do sistema arginina deiminase (ADS), tornando o microambiente do biofilme hostil para micro-organismos acidogênicos e acidúricos (Nascimento et al. 2014; Zheng et al. 2017) e controlando a virulência dos biofilmes (Featherstone, 2004). O efeito dos tratamentos com arginina e NaF sobre o aumento dos valores de pH foi marcante. Pelas análises dos tratamentos com arginina e NaF sozinhos, os aumentos parecem ser mais relacionados à aplicação da arginina.

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que utilizou 4 diferentes corantes para análises em microscopia confocal de varredura a laser simultaneamente, sendo o SYTO 9 e o iodeto de propídio (PI) do kit LIVE/DEAD, o Alexa Flúor® 647 e o Calcofluor Branco. O kit LIVE/DEAD já havia sido utilizado por nossa equipe para marcação de células vivas e mortas em biofilmes intactos de *Enterococcus faecalis* (Cusicanqui Méndez et al., 2021). Já para marcação dos PECs, aplicamos o Alexa Flúor® 647 para a marcação dos  $\alpha$ -PECs (glicosiltransferases e glucanos) (Jin et al.,

---

2005; Klein et al., 2009; Xiao & Koo, 2010) e o calcofluor para marcação dos  $\beta$ -PECs (celulose) (Adav et al., 2010; González-Machado, Capita, Riesco-Peláez, & Alonso-Calleja, 2018). Apesar do último corante já ter sido utilizado em biofilmes orais para marcação de PECs (Thurnheer et al., 2006), nenhum autor o aplicou simultaneamente com o Alexa Flúor. Nosso estudo mostrou que a aplicação da arginina a 8% diminuiu significativamente os biovolumes de  $\alpha$ -PECs e  $\beta$ -PECs, o mesmo não ocorrendo com outros tratamentos que foram capazes de reduzir apenas os  $\alpha$ -PECs. Nossos resultados demonstraram a possível relação entre os biovolumes de  $\beta$ -PECs e a espessura dos biofilmes, pela observação de reduções significativas apenas no grupo ARG 8. Podemos hipotetizar que a porção da matriz extracelular responsável pelo aumento do volume e estabilidade dos biofilmes está relacionada aos  $\beta$ -PECs. Isso poderia ser relevante para diminuir a virulência dos biofilmes, tornando-os mais acessíveis e menos resistentes aos tratamentos químicos (Bijle et al., 2019; Thurnheer et al., 2006).

Também observamos a existência de uma relação entre a viabilidade de estreptococos totais, a vitalidade dos biofilmes e a produção de ácido láctico, parâmetros que foram significativamente reduzidos por todos os tratamentos exceto pela arginina a 2,5%. A diminuição na produção de ácido láctico, entretanto, não foi capaz de reduzir a perda mineral integrada e a profundidade de lesão nos grupos estudados, embora a perda de cálcio tenha sido sensivelmente reduzida. A arginina tem a capacidade de gerar amônia pelo sistema ADS e neutralizar os ácidos do biofilme (Nascimento 2014). Porém, camadas mais profundas dos biofilmes estagnados podem não ter sido afetadas pelo efeito tampão da arginina (He et al., 2016), sendo possível que a desmineralização tenha continuado ao longo do tempo, independente do tratamento com a arginina e/ou o flúor.

Os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento com NaF combinado à arginina produziu os melhores efeitos antimicrobiano e antibiofilme sobre biofilmes de microcosmos salivares crescidos por 3 dias. Além disso, os tratamentos foram capazes de reduzir significativamente a perda de cálcio do esmalte, desacelerando o processo de desmineralização mesmo em condições com alta disponibilidade de sacarose. Entretanto, os resultados de perda mineral integrada e profundidade de lesão não foram modificados pelos tratamentos. A capacidade da arginina combinada ao flúor para controlar a desmineralização do esmalte deve ser testada em novos

---

estudos, adotando ciclos intermitentes de disponibilidade de sacarose e remineralização do esmalte.

### **Conflito de interesses**

Os autores declaram não possuir conflitos de interesses.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem as Profas. Dras. Ana Carolina Magalhães e Ana Flávia Sanches Borges pelo acesso ao Centro Integrado de Pesquisas da FOB-USP. Também agradecem os técnicos Marcelo Milanda, Márcia Graef e Rafaela Alves pela assistência durante os ensaios laboratoriais. Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de auxílio regular de pesquisa (Processo nº 2018/03866-2) e bolsa Doutorado (Processo nº 2018/01654-8).

### **REFERÊNCIAS**

- Adav, S. S., Lin, J. C., Yang, Z., Whiteley, C. G., Lee, D. J., Peng, X. F., & Zhang, Z. P. (2010). Stereological assessment of extracellular polymeric substances, exoenzymes, and specific bacterial strains in bioaggregates using fluorescence experiments. *Biotechnol Adv*, 28(2), 255-280.
- Bijle, M. N. A., Ekambaram, M., Lo, E. C. M., & Yiu, C. K. Y. (2019). The combined antimicrobial effect of arginine and fluoride toothpaste. *Sci Rep*, 9(1), 8405.
- Burne, R. A., & Marquis, R. E. (2000). Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol Lett*, 193(1), 1-6.
- Cai, J. N., Kim, M. A., Jung, J. E., Pandit, S., Song, K. Y., & Jeon, J. G. (2015). Effects of combined oleic acid and fluoride at sub-MIC levels on EPS formation and viability of *Streptococcus mutans* UA159 biofilms. *Biofouling*, 31(7), 555-563.
-

- Cury, J. A., & Tenuta, L. M. (2009). Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res*, 23 Suppl 1, 23-30.
- Cusicanqui Méndez, D. A., Cardenas Cuéllar, M. R., Feliz Pedrinha, V., Velásquez Espedilla, E. G., Bombarda de Andrade, F., Rodrigues, P. A., & Cruvinel, T. (2021). Effects of curcumin-mediated antimicrobial photodynamic therapy associated to different chelators against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 35, 102464.
- Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C., Yu, W. H., . . . Wade, W. G. (2010). The human oral microbiome. *J Bacteriol*, 192(19), 5002-5017.
- Falsetta, M. L., Klein, M. I., Colonne, P. M., Scott-Anne, K., Gregoire, S., Pai, C. H., . . . Koo, H. (2014). Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun*, 82(5), 1968-1981.
- Featherstone, J. D. (2004). The continuum of dental caries--evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res*, 83 Spec No C, C39-42.
- Figuro, E., Nóbrega, D. F., García-Gargallo, M., Tenuta, L. M., Herrera, D., & Carvalho, J. C. (2017). Mechanical and chemical plaque control in the simultaneous management of gingivitis and caries: a systematic review. *J Clin Periodontol*, 44 Suppl 18, S116-S134.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*, 14(9), 563-575.
- González-Machado, C., Capita, R., Riesco-Peláez, F., & Alonso-Calleja, C. (2018). Visualization and quantification of the cellular and extracellular components of *Salmonella Agona* biofilms at different stages of development. *PLoS One*, 13(7), e0200011.
-

- He, J., Hwang, G., Liu, Y., Gao, L., Kilpatrick-Liverman, L., Santarpia, P., . . . Koo, H. (2016). L-Arginine Modifies the Exopolysaccharide Matrix and Thwarts *Streptococcus mutans* Outgrowth within Mixed-Species Oral Biofilms. *J Bacteriol*, 198(19), 2651-2661.
- Jin, Y., Zhang, T., Samaranayake, Y. H., Fang, H. H., Yip, H. K., & Samaranayake, L. P. (2005). The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*, 159(3), 353-360.
- Kassebaum, N. J., Smith, A. G. C., Bernabé, E., Fleming, T. D., Reynolds, A. E., Vos, T., . . . Collaborators, G. O. H. (2017). Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res*, 96(4), 380-387.
- Kidd, E. A., & Fejerskov, O. (2004). What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res*, 83 Spec No C, C35-38.
- Klein, M. I., Duarte, S., Xiao, J., Mitra, S., Foster, T. H., & Koo, H. (2009). Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in *Streptococcus mutans* biofilm development. *Appl Environ Microbiol*, 75(3), 837-841.
- Koopman, J. E., Röling, W. F., Buijs, M. J., Sissons, C. H., ten Cate, J. M., Keijser, B. J., . . . Zaura, E. (2015). Stability and resilience of oral microcosms toward acidification and *Candida* outgrowth by arginine supplementation. *Microb Ecol*, 69(2), 422-433.
- Kraneveld, E. A., Buijs, M. J., Bonder, M. J., Visser, M., Keijser, B. J., Crielaard, W., & Zaura, E. (2012). The relation between oral *Candida* load and bacterial microbiome profiles in Dutch older adults. *PLoS One*, 7(8), e42770.
-

- Liu, Y., Ren, Z., Hwang, G., & Koo, H. (2018). Therapeutic Strategies Targeting Cariogenic Biofilm Microenvironment. *Adv Dent Res*, 29(1), 86-92.
- Marquis, R. E., Bender, G. R., Murray, D. R., & Wong, A. (1987). Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acid environments. *Appl Environ Microbiol*, 53(1), 198-200.
- McBain, A. J., Sissons, C., Ledger, R. G., Sreenivasan, P. K., De Vizio, W., & Gilbert, P. (2005). Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. *J Appl Microbiol*, 98(3), 624-634.
- Miranda, M. L., Silva, B. N. S., Salomão, K. B., de Oliveira, A. B., Gabbai-Armelin, P. R., & Brighenti, F. L. (2020). Effect of arginine on microorganisms involved in dental caries: a systematic literature review of. *Biofouling*, 36(6), 696-709.
- Méndez, D. A. C., Gutierrez, E., Dionísio, E. J., Oliveira, T. M., Buzalaf, M. A. R., Rios, D., . . . Cruvinel, T. (2018). Effect of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic therapy on dentin caries microcosms. *Lasers Med Sci*, 33(3), 479-487.
- Nascimento, M. M.; Burne, Robert A. (2014) Caries prevention by arginine metabolism in oral biofilms: translating science into clinical success. *Curr Oral Health Rep*, 1(1), 79-85.
- Nascimento, M. M., Alvarez, A. J., Huang, X., Hanway, S., Perry, S., Luce, A., . . . Burne, R. A. (2019). Arginine Metabolism in Supragingival Oral Biofilms as a Potential Predictor of Caries Risk. *JDR Clin Trans Res*, 4(3), 262-270.
- Nascimento, M. M., Liu, Y., Kalra, R., Perry, S., Adewumi, A., Xu, X., . . . Burne, R. A. (2013). Oral arginine metabolism may decrease the risk for dental caries in children. *J Dent Res*, 92(7), 604-608.
- Peng, C., de Sousa, F. B., Gan, H. Y., Kwon, H. J., Park, S., Kilpatrick-Liverman, L. Han, J. (2019). Enhanced Delivery of F. *J Dent Res*, 98(4), 430-436.
-



- Poolman, B., Driessen, A. J., & Konings, W. N. (1987). Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*. *J Bacteriol*, 169(12), 5597-5604.
- Schwendicke, F., Frencken, J. E., Bjørndal, L., Maltz, M., Manton, D. J., Ricketts, D., Innes, N. P. (2016). Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Carious Tissue Removal. *Adv Dent Res*, 28(2), 58-67.
- Tenuta, L. M., Del Bel Cury, A. A., Bortolin, M. C., Vogel, G. L., & Cury, J. A. (2006). Ca, Pi, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. *J Dent Res*, 85(9), 834-838.
- Thurnheer, T., van der Ploeg, J. R., Giertsen, E., & Guggenheim, B. (2006). Effects of *Streptococcus mutans* gtfC deficiency on mixed oral biofilms in vitro. *Caries Res*, 40(2), 163-171.
- Vogel, G. L., Chow, L. C., & Brown, W. E. (1983). A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Res*, 17(1), 23-31.
- Watson, P. S., Pontefract, H. A., Devine, D. A., Shore, R. C., Nattress, B. R., Kirkham, J., & Robinson, C. (2005). Penetration of fluoride into natural plaque biofilms. *J Dent Res*, 84(5), 451-455.
- Xiao, J., & Koo, H. (2010). Structural organization and dynamics of exopolysaccharide matrix and microcolonies formation by *Streptococcus mutans* in biofilms. *J Appl Microbiol*, 108(6), 2103-2113.
- Zheng, X., Cheng, X., Wang, L., Qiu, W., Wang, S., Zhou, Y., . . . Xu, X. (2015). Combinatorial effects of arginine and fluoride on oral bacteria. *J Dent Res*, 94(2), 344-353.
-

Zheng, X., He, J., Wang, L., Zhou, S., Peng, X., Huang, S., Zhou, X. (2017). Ecological Effect of Arginine on Oral Microbiota. *Sci Rep*, 7(1), 7206.

## *3 Discussão*

### 3 DISCUSSÃO

O presente estudo *in vitro* avaliou inicialmente vários protocolos de crescimento de biofilme de microcosmos de saliva para poder testar o efeito antimicrobiano de substâncias para a prevenção e controle da cárie dentária. As variáveis testadas nos biofilmes foram a concentração de solução tampão, atmosfera de incubação e tempo de crescimento dos biofilmes. Biofilmes de microcosmos são modelos de maior complexidade coletados *in natura* e crescidos em condições laboratoriais controladas (SISSONS, 1997). Observamos pelos resultados do nosso estudo que a viabilidade de grupos microbianos acidogênicos e acidúricos podem ser afetados pela variação das condições de crescimento (CUMMINS, 2013; KIDD; FEJERSKOV, 2004). Lactobacilos totais cresceram consideravelmente mais no grupo com menor concentração de PIPES e em condições anaeróbicas. Já o crescimento dos estreptococos do grupo mutans foi similar entre os grupos testados, porém com menor variância nos grupos que cresceram sob condições anaeróbicas. Outro ponto interessante a ser destacado é que em biofilmes mais antigos, uma quantidade de PIPES maior influenciou positivamente na viabilidade de estreptococos totais também associados a micro-organismos comensais, demonstrando que o uso do tampão é benéfico para a manutenção da homeostase ecológica microbiana (MARSH, 2006).

Em relação à vitalidade de biofilmes intactos, observa-se maior estabilidade longo do tempo de crescimento no grupo 25 ANA, apesar de inicialmente não ser o que apresentou maior porcentagem de vitalidade. Além disso, os biofilmes do mesmo grupo apresentaram os maiores biovolumes de células vivas após 3 e 7 dias de crescimento.

Aos 3 dias, a formação de matriz extracelular nos grupos com crescimento em microareofilia foi menor que nos grupos com crescimento em anaerobiose. A formação de matriz extracelular é um fator importante para a resistência e virulência dos biofilmes, pois funciona como barreira física de proteção contra a difusão de agentes antimicrobianos, reduzindo a concentração dos agentes desde a superfície externa até a superfície mais interna do biofilme (KUMAR; ALAM; RANI; EHTESHAM *et al.*, 2017). Neste sentido, seria mais recomendado que biofilmes com tempos de crescimento de até 7 dias, comumente utilizados para identificar potencial antibiofilme de novos reagentes, fossem incubados em anaerobiose, o que permitiria um melhor

---

controle da superestimação de efeitos em modelos *in vitro*. Caso contrário, poderá haver uma interpretação equivocada da capacidade antimicrobiana de estratégias específicas. Vale ressaltar que todas as interpretações aqui contidas consideram meios de crescimento com disponibilidade irrestrita de sacarose, com o intuito de promover ensaios de efetividade de agentes antimicrobianos nos cenários mais favoráveis à desmineralização do esmalte, com aumento da proporção de grupos acidogênicos e acidúricos.

A arginina é um aminoácido presente na saliva, que tem a capacidade de alcalinização da cavidade bucal através do sistema deaminase (ADS). Neste sistema ocorre a hidrólise da uréia e arginina em amônia, o que eleva o pH a um estado alcalino (BURNE; MARQUIS, 2000). Este sistema se torna importante para algumas bactérias comensais, pois as protege da morte por estresse ácido (CASIANO-COLÓN; MARQUIS, 1988). Evidentemente, em nosso estudo a arginina, combinada ou não ao fluoreto de sódio, foi capaz de aumentar o pH dos biofilmes. É importante destacar que os valores de pH subiram logo após a introdução da arginina durante o crescimento ou para tratamento dos biofilmes (pH > 8,0).

A viabilidade de lactobacilos totais foi sensível à aplicação de arginina, notando-se a diminuição das contagens deste grupo, como relatado anteriormente (ZHENG; CHENG; WANG; QIU *et al.*, 2015). Entretanto, as contagens de estreptococos do grupo mutans, outro grupo acidogênico, só foram reduzidas pelo uso de arginina a 8% ou pela combinação com o flúor, similarmente a estudos anteriores (BIJLE; EKAMBARAM; LO; YIU, 2019; ZHENG; CHENG; WANG; QIU *et al.*, 2015). Os mesmos efeitos antibiofilme não foram observados quando biofilmes de 3 dias foram tratados com arginina combinada ou não ao NaF. Isso pode ser explicado pelas características dos estreptococos do grupo mutans, capazes de metabolizar carboidratos em ácidos mesmo em condições de estresse ambiental, o que possibilita a alteração do ambiente local favoravelmente para sua própria sobrevivência (LEMOS; PALMER; ZENG; WEN *et al.*, 2019).

Os tratamentos que mostraram maior porcentagem de redução de metabolismo de resazurina foram arginina a 8% com ou sem fluoreto de sódio. O fluoreto de sódio sozinho também foi capaz de reduzir o metabolismo. Este resultado foi compatível com a redução da produção de ácido láctico, quando a arginina foi aplicada para tratar biofilmes, exceto a arginina a 2,5%. As concentrações de ácido láctico revelam a

---

capacidade metabólica do biofilme, evidenciando a fermentação de carboidratos pelos micro-organismos (EXTERKATE; CRIELAARD; TEN CATE, 2010).

A busca pelo re-equilíbrio homeostático do biofilme para o biofilme produzir mais compostos alcalinos para reduzir a probabilidade de desmineralização e prevenir a cárie dentária (KLEINBERG, 2002; TAKAHASHI; NYVAD, 2011). A arginina tem a capacidade de gerar amônia pelo sistema ADS e neutralizar os ácidos do biofilme (Nascimento 2014). Porém, camadas mais profundas dos biofilmes estagnados podem não ter sido afetadas pelo efeito tampão da arginina (He, Hwang et al. 2016), sendo possível que a desmineralização tenha continuado ao longo do tempo, independente do tratamento com a arginina e/ou o flúor.

A arginina afeta a co-agregação entre os micro-organismos durante o processo de formação do biofilme (BERNIER; HA; KHAN; MERRITT *et al.*, 2011; BORRIELLO; RICHARDS; EHRLICH; STEWART, 2006; SATO; NAKAZAWA, 2014; ZHU; WEISS; OTTO; FEY *et al.*, 2007). Isso pode ocorrer por uma menor formação de glucanos, como é mostrado neste estudo pela diminuição de  $\alpha$  e  $\beta$  PECs, gerando uma matriz extracelular defeituosa (BOWEN; BURNE; WU; KOO, 2018; ZHENG; CHENG; WANG; QIU *et al.*, 2015). Esta alteração na matriz extracelular, que representa uma verdadeira rede de proteção e abrigo (BOWEN; BURNE; WU; KOO, 2018; KARYGIANNI; REN; KOO; THURNHEER, 2020), pode afetar diretamente na sua estrutura e biomassa, mostrando que todos os grupos tratados com arginina tiveram sua espessura diminuída em comparação com o grupo controle, exceto nos grupos de ARG 2,5.

Em relação à desmineralização do esmalte, observa-se uma tendência de aumento ao longo do tempo, considerando os dados de 3 dias (25 ANA, experimento 1), 5 e 7 dias (controles experimentos 2 e 3). Em nenhum dos períodos de crescimento de biofilme os grupos mostraram diferenças estatísticas, porém houve uma tendência de diminuição da desmineralização dos grupos de NaF+ARG 8%, o que concordaria com a análise de cálcio em meio de cultura principalmente após 7 dias de crescimento.

---

---

*4 Conclusões*

## 4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados demonstrados neste estudo, pode-se concluir que:

- As condições de solução tampão, atmosfera e tempo de crescimento do biofilme são determinantes para a viabilidade, vitalidade e a formação de matriz extracelular de biofilmes de microcosmos de saliva.
  - A arginina e o fluoreto de sódio apresentaram efeito sinérgico sobre a redução da viabilidade, vitalidade, biovolumes de células vivas e PECs, espessura do biofilme e concentração de cálcio liberado no meio de cultura, quando aplicados durante o crescimento dos biofilmes de microcosmos de saliva. Embora tais mudanças pareçam ter desacelerado o processo de perda de cálcio, elas não foram suficientes para alterar a produção de ácido láctico e prevenir o desenvolvimento de lesões em esmalte.
  - O tratamento de biofilmes de microcosmos de saliva pela combinação de arginina e fluoreto de sódio foi capaz de reduzir a viabilidade de microorganismos acidogênicos, afetando a vitalidade, a produção de PECs, o metabolismo de ácido láctico e a concentração de cálcio liberado no meio de cultura. Embora tais mudanças pareçam ter desacelerado o processo de perda de cálcio, elas não foram suficientes para controlar o desenvolvimento de lesões em esmalte.
- 
-



*Referências*

## REFERENCIAS

BEIGHTON, D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. **Community Dent Oral Epidemiol**, 33, n. 4, p. 248-255, Aug 2005.

BERNIER, S. P.; HA, D. G.; KHAN, W.; MERRITT, J. H. *et al.* Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated group behaviors by individual amino acids through c-di-GMP signaling. **Res Microbiol**, 162, n. 7, p. 680-688, Sep 2011.

BIJLE, M. N. A.; EKAMBARAM, M.; LO, E. C. M.; YIU, C. K. Y. The combined antimicrobial effect of arginine and fluoride toothpaste. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 8405, 06 10 2019.

BORRIELLO, G.; RICHARDS, L.; EHRLICH, G. D.; STEWART, P. S. Arginine or nitrate enhances antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. **Antimicrob Agents Chemother**, 50, n. 1, p. 382-384, Jan 2006.

BOWEN, W. H.; BURNE, R. A.; WU, H.; KOO, H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. **Trends Microbiol**, 26, n. 3, p. 229-242, 03 2018.

BURNE, R. A.; MARQUIS, R. E. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. **FEMS Microbiol Lett**, 193, n. 1, p. 1-6, Dec 2000.

CASIANO-COLÓN, A.; MARQUIS, R. E. Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. **Appl Environ Microbiol**, 54, n. 6, p. 1318-1324, Jun 1988.

CUMMINS, D. Dental caries: a disease which remains a public health concern in the 21st century--the exploration of a breakthrough technology for caries prevention. **J Clin Dent**, 24 Spec no A, p. A1-14, 2013.

DAWES, C.; DIBDIN, G. H. Salivary concentrations of urea released from a chewing gum containing urea and how these affect the urea content of gel-stabilized plaques and their pH after exposure to sucrose. **Caries Res**, 35, n. 5, p. 344-353, 2001 Sep-Oct 2001.

---

DIBDIN, G. H.; DAWES, C. A mathematical model of the influence of salivary urea on the pH of fasted dental plaque and on the changes occurring during a cariogenic challenge. **Caries Res**, 32, n. 1, p. 70-74, 1998.

EXTERKATE, R. A.; CRIELAARD, W.; TEN CATE, J. M. Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. **Caries Res**, 44, n. 4, p. 372-379, 2010.

HAMILTON, I. R.; ELLWOOD, D. C. Carbohydrate metabolism by *Actinomyces viscosus* growing in continuous culture. **Infect Immun**, 42, n. 1, p. 19-26, Oct 1983.

HUANG, X.; EXTERKATE, R. A.; TEN CATE, J. M. Factors associated with alkali production from arginine in dental biofilms. **J Dent Res**, 91, n. 12, p. 1130-1134, Dec 2012.

KARYGIANNI, L.; REN, Z.; KOO, H.; THURNHEER, T. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. **Trends Microbiol**, 28, n. 8, p. 668-681, 08 2020.

KIDD, E. A.; FEJERSKOV, O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. **J Dent Res**, 83 Spec No C, p. C35-38, 2004.

KLEINBERG, I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. **Crit Rev Oral Biol Med**, 13, n. 2, p. 108-125, 2002.

KUMAR, A.; ALAM, A.; RANI, M.; EHTESHAM, N. Z. *et al.* Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. **Int J Med Microbiol**, 307, n. 8, p. 481-489, Dec 2017.

LEMOS, J. A.; PALMER, S. R.; ZENG, L.; WEN, Z. T. *et al.* The Biology of. **Microbiol Spectr**, 7, n. 1, 01 2019.

LIMA, K. C.; COELHO, L. T.; PINHEIRO, I. V.; RÔÇAS, I. N. *et al.* Microbiota of dentinal caries as assessed by reverse-capture checkerboard analysis. **Caries Res**, 45, n. 1, p. 21-30, 2011.

---

---

LIU, Y. L.; NASCIMENTO, M.; BURNE, R. A. Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. **Int J Oral Sci**, 4, n. 3, p. 135-140, Sep 2012.

LO, E. C.; SCHWARZ, E.; WONG, M. C. Arresting dentine caries in Chinese preschool children. **Int J Paediatr Dent**, 8, n. 4, p. 253-260, Dec 1998.

MARQUIS, R. E.; BENDER, G. R.; MURRAY, D. R.; WONG, A. Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acid environments. **Appl Environ Microbiol**, 53, n. 1, p. 198-200, Jan 1987.

MARSH, P. D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. **BMC Oral Health**, 6 Suppl 1, p. S14, Jun 2006.

NASCIMENTO, M. M.; BROWNGARDT, C.; XIAOHUI, X.; KLEPAC-CERAJ, V. *et al.* The effect of arginine on oral biofilm communities. **Mol Oral Microbiol**, 29, n. 1, p. 45-54, Feb 2014.

NASCIMENTO, M. M.; GORDAN, V. V.; GARVAN, C. W.; BROWNGARDT, C. M. *et al.* Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. **Oral Microbiol Immunol**, 24, n. 2, p. 89-95, Apr 2009.

PAES LEME, A. F.; KOO, H.; BELLATO, C. M.; BEDI, G. *et al.* The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. **J Dent Res**, 85, n. 10, p. 878-887, Oct 2006.

POOLMAN, B.; DRIESSEN, A. J.; KONINGS, W. N. Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*. **J Bacteriol**, 169, n. 12, p. 5597-5604, Dec 1987.

SATO, T.; NAKAZAWA, F. Coaggregation between *Prevotella oris* and *Porphyromonas gingivalis*. **J Microbiol Immunol Infect**, 47, n. 3, p. 182-186, Jun 2014.

SELWITZ, R. H.; ISMAIL, A. I.; PITTS, N. B. Dental caries. **Lancet**, 369, n. 9555, p. 51-59, Jan 2007.

SISSONS, C. H. Artificial dental plaque biofilm model systems. **Adv Dent Res**, 11, n. 1, p. 110-126, Apr 1997.

---

---

SISSONS, C. H.; CUTRESS, T. W.; PEARCE, E. I. Kinetics and product stoichiometry of ureolysis by human salivary bacteria and artificial mouth plaques. **Arch Oral Biol**, 30, n. 11-12, p. 781-790, 1985.

SISSONS, C. H.; HANCOCK, E. M.; CUTRESS, T. W. The source of variation in ureolysis in artificial plaques cultured from human salivary bacteria. **Arch Oral Biol**, 33, n. 10, p. 721-726, 1988.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. **J Dent Res**, 90, n. 3, p. 294-303, Mar 2011.

VAN HOUTE, J.; DE MOOR, C. E.; JANSEN, H. M. Synthesis of iodophilic polysaccharide by human oral streptococci. **Arch Oral Biol**, 15, n. 3, p. 263-266, Mar 1970.

VAN WUYCKHUYSE, B. C.; PERINPANAYAGAM, H. E.; BEVACQUA, D.; RAUBERTAS, R. F. *et al.* Association of free arginine and lysine concentrations in human parotid saliva with caries experience. **J Dent Res**, 74, n. 2, p. 686-690, Feb 1995.

WIJEYEWEERA, R. L.; KLEINBERG, I. Arginolytic and ureolytic activities of pure cultures of human oral bacteria and their effects on the pH response of salivary sediment and dental plaque in vitro. **Arch Oral Biol**, 34, n. 1, p. 43-53, 1989.

ZHENG, X.; CHENG, X.; WANG, L.; QIU, W. *et al.* Combinatorial effects of arginine and fluoride on oral bacteria. **J Dent Res**, 94, n. 2, p. 344-353, Feb 2015.

ZHENG, X.; HE, J.; WANG, L.; ZHOU, S. *et al.* Ecological Effect of Arginine on Oral Microbiota. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 7206, 08 2017.

ZHU, Y.; WEISS, E. C.; OTTO, M.; FEY, P. D. *et al.* Staphylococcus aureus biofilm metabolism and the influence of arginine on polysaccharide intercellular adhesin synthesis, biofilm formation, and pathogenesis. **Infect Immun**, 75, n. 9, p. 4219-4226, Sep 2007.

---