



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

HÉLLEN SÚZANY FREIRE SILVA

**AÇÃO DO PLASMA DE BAIXA TEMPERATURA EM BIOFILMES EM
FORMAÇÃO DE *Streptococcus mutans* IN VITRO**

FORTALEZA

2018

HÉLLEN SÚZANY FREIRE SILVA

AÇÃO DO PLASMA DE BAIXA TEMPERATURA EM BIOFILMES EM FORMAÇÃO DE
Streptococcus mutans IN VITRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

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

S58a Silva, Héllen Súzany Freire.

AÇÃO DO PLASMA DE BAIXA TEMPERATURA EM BIOFILMES EM FORMAÇÃO DE
Streptococcus mutans IN VITRO / Héllen Súzany Freire Silva. – 2018.

44 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia,
Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos.

1. Placa Dental. 2. Cárie Dentária. 3. Gases em Plasma. 4. Streptococcus mutans. I.
Título.

CDD 617.6

HÉLLEN SÚZANY FREIRE SILVA

AÇÃO DO PLASMA DE BAIXA TEMPERATURA EM BIOFILMES EM FORMAÇÃO DE
Streptococcus mutans IN VITRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr^a. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos. (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Maria Denise Rodrigues de Moraes Bezerra
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Profa. Dr^a. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, que é o Senhor da minha vida.

Aos meus pais, Marques e Edna, por todo cuidado e esforço que sempre tiveram por mim.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal do Ceará**, na pessoa do Reitor **Prof. Dr. Henry de Holanda Campos**; à **Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem**, na pessoa da diretora **Prof^a. Dr^a. Lidianny Karla Azevedo Rodrigues**; ao **Curso de Odontologia**, na pessoa do coordenador **Prof. Dr. Juliano Santori Mendonça**; ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia** na pessoa do coordenador **Prof. Dr. Vicente de Paulo Aragão Sabóia**, por fazerem desta instituição uma das melhores.

A CAPES, pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Aos **professores do curso de Pós-Graduação em Odontologia** da UFC por seus ensinamentos transmitidos em sala de aula.

Aos funcionários da pós-graduação, **David Queiroz, Joana Pinheiro, Lúcia Ribeiro e Janaíne Marques**, pela dedicação e disponibilidade em ajudar no que for preciso. Aos funcionários da limpeza e da recepção da Faculdade de Odontologia da UFC.

À **Central Analítica - UFC/CT - INFRA/MCTI - SISNANO/Pró-Equipamentos CAPES. (UFC)**, na pessoa do Prof. Dr. **Emílio de Castro Miguel**, por disponibilizar o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) e o Microscópio Confocal.

À banca, composta pelas **Professoras Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia e Maria Denise Rodrigues de Moraes Bezerra**, por terem aceitado o convite, pelo tempo dedicado e pelas considerações.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, o Criador de todas as coisas, que sempre caminha comigo, que está sempre me ajudando, dando-me forças e me protegendo de todo mal. Sou grata por me permitir vencer mais essa etapa em minha vida. Honras e Glórias ao Teu nome!

Aos meus pais, **Marques Rabelo da Silva** e **Edna Maria Freire da Silva**, por me ensinarem que nada se conquista com facilidade, por se dedicarem tanto e batalharem tanto para que minhas irmãs e eu tenhamos uma vida e um futuro melhor. Eu não teria chegado até aqui se não fosse o apoio de vocês. Às minhas irmãs, **Erika Suyane Freire Silva** e **Évila Vitória Freire Silva**, pela companhia.

Aos meus avós, **Eridan de Brito Freire**, **Manoel Freire da Silva**, **Maria Edna da Silva** e **Davi Cordeiro da Silva**, por cada oração pela nossa família.

À minha família, em especial minha tia **Laura Maria de Brito Freire** e seu esposo **Edson Araújo da Costa**, por serem como nossos pais aqui em Fortaleza, por todo apoio, cuidado e por estarem sempre dispostos a ajudar em qualquer situação. Ao meu tio **Helidy Freire da Silva** e sua esposa **Maria do Socorro de Lima Freire**, pela preocupação, pelas orações e pelos conselhos dados a nós.

Ao meu melhor amigo, meu namorado, **Wilton A. de Oliveira Junior**, pela paciência, dedicação, apoio e companheirismo de sempre.

À minha tão querida Orientadora **Prof^a. Dr^a. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos**, por todo apoio, conhecimento transmitido, hospitalidade, confiança, sinceridade e por me fazer ver a microbiologia com outros olhos. A senhora é um exemplo de fé, de garra, de superação e de pesquisadora. Tenho certeza que foi Deus quem lhe colocou no meu caminho. Também agradeço por cada conselho, por cada conversa e pelas palavras que me acalmavam quando o desânimo chegava.

À **Prof^a. Dr^a. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues**, uma pesquisadora nata, por toda paciência, tranquilidade, conhecimentos repassados e pelas diversas vezes que me recebeu em sua sala. Minha orientadora não poderia ser uma amiga melhor! Obrigada por contribuir com minha formação profissional e pessoal de forma tão gentil.

À **Profª. Drª. Simone Duarte**, agradeço pelo conhecimento transmitido, pelas sugestões a respeito do projeto, por ser tão acessível e por ter cedido o equipamento do plasma, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

À minha grande amiga, professora e incentivadora **Profª. Drª. Maria Denise Rodrigues de Moraes Bezerra**, obrigada por todo carinho e apoio. Você foi essencial para que eu me interessasse pela área acadêmica e conseguisse estudar para passar no Mestrado. Já lhe disse e repito que me espelho muito em você.

À minha companheira de pesquisa, de laboratório, de noites mal dormidas e de muitas comidas, **Adália Samara Gadelha de Holanda Lima**, pela amizade, por todo apoio, por ter chorado comigo nos momentos de desespero e se alegrado quando tudo corria bem e por se fazer presente em todas as etapas da pesquisa.

À minha amiga **Daniela Nunes Pinto**, pelo seu jeito tão extrovertido de ser, pelos conselhos, pela ajuda, pelas orientações, por ter compartilhado um pouco de sua experiência de vida e, principalmente, por ter o dom de me ajudar a solucionar alguns problemas que surgiram no caminho.

À querida **Paula Ventura da Silveira**, pela paciência, dedicação e grande ajuda para entender e realizar a metodologia dos polissacarídeos. Você foi essencial!

Aos amigos do grupo de pesquisa, **Roberto Haniery Pontes Alves, Karla Shangela da Silva Alves, Ramille de Araújo Lima, Cibele Sales Rabelo, Victor Monteiro** pela amizade, companhia e apoio, seja ajudando nos experimentos ou tirando quaisquer dúvidas a respeito da metodologia.

Aos colegas de turma, em especial a **Talita Arrais, Julianne Coelho, Madiana Magalhães, Samuel Carvalho, Luciana Arcanjo e Bernardo Aguiar**, pela amizade e por serem pessoas de coração tão bom.

Aos amigos do laboratório de microbiologia, **Ernanda Sales, Wesllanny Moraes, Catarina Reis, Wanessa Pinheiro, Salma Araújo, Jamila Ricarte e Rúlio Rocha**, por terem tornado o tudo mais tranquilo, pela amizade, pela ajuda com a metodologia e realização da coleta de biofilme. O processo ficou muito mais fácil quando vocês me ajudaram.

“Pois o Senhor é quem dá sabedoria; de sua boca procedem o conhecimento e o discernimento.”

Provérbios 2:6 – Bíblia Sagrada

RESUMO

O Plasma de Baixa Temperatura (PBT) é uma terapia inovadora que vem sendo estudada para desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e/ou tratamento de doenças infecciosas relacionadas à presença de biofilmes orais, incluindo a cárie dentária. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito do PBT em biofilmes formados *in vitro* sobre o esmalte humano. Para isso, biofilmes de *Streptococcus mutans* UA159 foram formados sobre os blocos de esmalte humano (4 x 4 x 2mm) expostos à episódios de sacarose simulando o que ocorre na cavidade oral. Os blocos foram divididos em: ST (Controle negativo); CHX 0,12% (Controle positivo); NaF 0,05% (Controle positivo); ARG1 (Argônio 1 minuto); ARG5 (Argônio 5 minutos), ARG10 (Argônio 10 minutos), PLA1 (Plasma 1 minuto); PLA5 (Plasma 5 minutos); PLA10 (Plasma 10 minutos). A viabilidade bacteriana através da contagem de UFC/mg de biofilme mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,0001$). Os tratamentos com gás argônio ou PBT nos três tempos testados reduziram significativamente a viabilidade das bactérias presentes nos biofilmes. Na Microscopia Confocal a Laser (MCL) os biofilmes dos grupos ST, NaF e ARG10 apresentaram mais áreas coradas em verde (vivas), já os biofilmes dos grupos CHX, PLA1 e PLA 10 apresentaram mais área coradas em vermelho (mortas). A quantificação dos Polissacarídeos Extracelulares (PEC) solúveis demonstrou não haver diferença estatística entre os grupos ST, NaF e ARG5. Todos os demais grupos promoveram redução significativa ($p < 0,05$) na quantidade de PEC solúveis. Não houve diferença estatística entre todos os grupos para os PEC insolúveis em água. A partir do teste de microdureza de superfície, foi para calcular a porcentagem da perda de dureza superficial (%PDS), sendo observada redução significativa na %PDS somente para o grupo CHX ($p < 0,05$). Adicionalmente, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os na Espectroscopia Raman. Além disso, a MEV demonstrou não haver diferença topográfica na superfície do esmalte tratado com o PBT. Em conclusão, temos que o tratamento diário com o PBT foi eficaz em reduzir a quantidade de bactérias viáveis e a concentração de PEC solúveis em água; sem alterar a superfície do esmalte sob o biofilme irradiado.

Palavras-chave: Placa dental. Cárie dentária. Gases em plasma. *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

Low Temperature Plasma (LTP) is an innovative therapy that has been studied to develop new strategies for the prevention and / or treatment of infectious diseases related to the presence of oral biofilms, including dental caries. The objective of this study was to verify the effect of LTP on biofilms formed *in vitro* on human enamel. For this, biofilms of UA159 *Streptococcus mutans* were formed on blocks of human enamel (4 x 4 x 2 mm) exposed to episodes of sucrose simulating what occurs in the oral cavity. The blocks were divided into: ST (negative control); CHX 0.12% (Positive control); 0.05% NaF (Positive control); ARG1 (Argon 1 minute); ARG5 (Argon 5 minutes), ARG10. (Argon 10 minutes), PLA1 (Plasma 1 minute); PLA5 (Plasma 5 minutes); PLA10 (Plasma 10 minutes). Bacterial viability through the CFU / mg biofilm count showed a statistically significant difference between the groups ($p < 0.0001$). The argon or LTP treatments at the three times tested significantly reduced the viability of bacteria present in biofilms. In the Confocal Laser Microscopy (CLM), the biofilms of the ST, NaF and ARG10 groups showed more areas stained in green (living), while the biofilms of the CHX, PLA1 and PLA 10 groups showed more red stained areas. Quantification of Soluble Extracellular Polysaccharides (EPS) showed no statistically significant difference between ST, NaF and ARG5 groups. All other groups promoted a significant reduction ($p < 0.05$) in the amount of soluble EPS. There was no statistical difference between all groups for water insoluble EPSs. From the surface microhardness test, the percentage of the superficial hardness loss (%SHL) was calculated, with a significant reduction in the %SHL only for the CHX group ($p < 0.05$). In addition, no statistically significant differences were found among Raman spectroscopy. In addition, the SEM showed no topographical difference in the enamel surface treated with LTP. In conclusion, we have found that the daily treatment with LTP was effective in reducing the amount of viable bacteria and the concentration of water soluble EPS; without altering the surface of the enamel under the irradiated biofilm.

Keywords: Dental plaque. Dental caries, Plasma gases. *Streptococcus mutans*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Descrição dos tratamentos em que os blocos de esmalte foram tratados..	19
Figura 1 – Delineamento do experimento.....	19
Figura 2 – Resultado microbiológico.	27
Figura 3 – Gráfico da extração de PEC insolúveis em água.	28
Figura 4 – Gráfico da extração de PEC insolúveis em água.	28
Figure 5 – Imagens da Microscopia Confocal do biofilme tratado diariamente.	29
Figura 6 – Microdureza de Superfície.....	30
Figura 7 –Espectroscopia Raman	31
Figura 8 – MEV do esmalte após os tratamentos.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise de Microdureza de Superfície dos blocos de esmalte de acordo com os tratamentos (média \pm DP).....	30
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 METODOLOGIA	17
3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4 RESULTADOS.....	27
5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS.....	39
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	44

1 INTRODUÇÃO

A cárie dental ainda é uma doença muito comum e os fatores responsáveis pelo seu desenvolvimento são: o acúmulo de bactérias sobre os dentes e a ingestão freqüente de açúcar. Assim, é fundamental interferir nesses fatores, ou seja, desorganizar regularmente a placa formada e reduzir o consumo de açúcar (CURY, 2001).

Um biofilme formado sobre a superfície dos dentes pela aderência de diferentes espécies de bactérias e de matriz extracelular com glucanos solúveis e insolúveis é também chamado de placa dentária. Ela é afetada por diversos fatores externos, como a dieta, a composição da saliva e o fluxo salivar (MARSH, 2014). A composição de espécies bacterianas varia entre os indivíduos, os locais na cavidade oral, a dieta e o comportamento cultural (BLANC *et al.*, 2014; KUTSCH, 2014). Mas, as espécies de *Streptococcus* compõem a maior parte da população (PRATTEN *et al.*, 2013) e, juntamente com os Bacilos Gram Positivos são as primeiras bactérias a colonizar a película adquirida sobre a superfície do dente (MASH, 2014).

O biofilme oral é composto por estruturas tridimensionais complexas, formado sobre os tecidos orais (HOJO *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2011), incorporados em uma matriz de polissacarídeos extracelulares (PEC) (REESE; GUGGENHEIM B., 2007). As bactérias em biofilmes mostram uma virulência mais elevada em comparação a seus homólogos planctônicos (HOJO *et al.*, 2009).

Uma dieta rica em açúcares alimenta a formação da matriz de PEC e aumenta o acúmulo de uma microbiota acidogênica-acidúrica (TAKAHASHI; NYVAD 2008; KOO *et al.*, 2013). Já está bem estabelecido que, após a ingestão de açúcares fermentáveis (glicose, sacarose ou frutose), o pH na placa cai de neutro para pH 5,0 ou inferior (SHEIHAM, JAMES, 2015).

Bactérias cariogênicas, como *Streptococcus mutans*, possuem a capacidade de degradar vários carboidratos, sintetizar PEC (PAES LEME *et al.*, 2006) e ácidos e residir nos biofilmes (TAKAHASHI; NYVAD 2008, KOO *et al.* 2013; MOYE *et al.*, 2014). A resistência do *S. mutans* no biofilme se dá pois, os PECs produzem exoenzimas, tais como glucosiltransferases (Gtfs) derivadas de *S. mutans* presentes

na película adquirida. Na presença de sacarose, as Gtfs ligadas a diferentes microrganismos produzem grandes quantidades de glucanos *in situ* (PAES LEME *et al.*, 2006, BOWEN e KOO 2011). Os glucanos com a maioria das ligações α 1-6 são denominados dextranos (com cadeias flexíveis) e os com predominância α 1-3 são chamados mutanos (cadeias altamente insolúveis e rígidas) (LEITES; PINTO; SOUSA, 2006), dificultando a desorganização do biofilme.

Em odontologia, tem-se buscado novos métodos para eliminar microrganismos patogênicos presentes nos biofilmes orais (KARYGIANNI *et al.*, 2016) que não resultem no surgimento de cepas resistentes. A análise da formação de matriz de PEC poderia avançar a compreensão atual do processo de desenvolvimento e organização estrutural de biofilmes orais, o que seria essencial para a concepção de novas terapias eficazes anti-biofilme. (XIAO e KUO, 2010). Nesse contexto, surgem os plasmas de baixa temperatura (PBT), apresentando ainda um custo bastante elevado, porém é uma tecnologia alternativa promissora em diversas aplicações biomédicas, principalmente no combate às infecções (MAI-PROCHNOWA *et al.*, 2014) e como um potente agente anti-biofilme (KOBAN *et al.*, 2011), por apresentar propriedades antissépticas contra muitos microrganismos (DELBEN *et al.*, 2014).

O plasma é o quarto estado da matéria, sendo produzido a partir da ionização dos gases como argônio, hélio, ozônio e oxigênio. Ao receber energia, ocorre uma aceleração no movimento das moléculas do gás, que passam a colidir umas com as outras, favorecendo a transferência de elétrons de modo que partículas carregadas positivamente e negativamente, fótons e radicais livres, tornam o gás ionizado (MOREAU, ORANGE, FEUILLOLEY, 2008). Todo o processo de produção dos plasmas de baixa temperatura ocorre sem gerar significativos aumentos de temperatura, podendo ser tocado livremente com as mãos, sem provocar nenhum dano térmico aos tecidos expostos (KUNHARDT, 2000; MOISAN *et al.*, 2001; KOGELSCHATZ, 2002; KIM *et al.*, 2014). O argônio apresenta baixo custo e é um gás nobre (pode ser mantido a uma temperatura mais baixa, de modo que o plasma produzido possa ser mantido a uma temperatura mais baixa (DUARTE, *et al.*, 2011).

Existem dois tipos de plasmas gasosos, o plasma térmico e o não térmico. No plasma térmico, os elétrons estão quase na mesma temperatura que as partículas pesadas (íons, moléculas neutras e átomos), o plasma está em um estado de

equilíbrio local e sua temperatura atinge os valores de vários milhares de Kelvins. Em contraste, o plasma não térmico ou de baixa temperatura (PBT) pode ser gerado se a maior parte da energia acoplada é transmitida para os elétrons e somente sua temperatura atinge os valores altos sem alterar as partículas pesadas. Nesse caso, as partículas neutras e os íons carregam somente uma energia desprezível e permanecem frios. A baixa temperatura macroscópica é a principal característica do plasma não térmico e pode ser gerada por descargas eletrizadas em gases sob pressão baixa ou atmosférica (SCHOLTZ *et al.*, 2015).

Os tratamentos com PBTs para várias aplicações biomédicas e médicas, incluindo cicatrização de feridas, não mostraram efeitos adversos e fornecem provas da segurança da tecnologia (FLUHR *et al.*, 2012). Além de a terapia ter demonstrado efeitos colaterais mínimos, a possibilidade de surgimento de resistência bacteriana mediada pela célula é mínima, uma vez que o tratamento com PBT é localizado. Além disso, pode inibir completamente a formação de um biofilme rico em matriz (DUARTE *et al.*, 2011).

A tecnologia do PBT tem recebido crescente atenção como uma possível terapia para o tratamento e/ou prevenção de biofilmes, com o possível benefício de destruir a matriz do biofilme oral, expondo as células bacterianas. O PBT poderia ser usado em várias situações de cuidados orais nos quais a remoção mecânica do biofilme é indicada.

Ainda não se têm estudos *in vitro* avaliando o efeito do PBT em biofilmes orais de *Streptococcus mutans* formados sobre o esmalte humano. Portanto, este trabalho foi desenvolvido visando testar condições de uso (seleção do tempo de aplicação) do PBT em biofilmes orais e seu efeito no esmalte humano sob o biofilme irradiado.

OBJETIVO GERAL

Testar o efeito do Plasma de Baixa Temperatura na viabilidade de *Streptococcus mutans* e na matriz de polissacarídeos de biofilmes *in vitro* em formação, bem como avaliar seu efeito no esmalte sob o biofilme irradiado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do PBT na viabilidade e nas características bioquímicas da matriz de biofilmes em formação de *Streptococcus mutans* em três diferentes tempos de exposição (1 / 5 / 10 minutos).
- Avaliar o efeito do PBT nas propriedades mecânicas e bioquímicas do esmalte dentário humano sob o biofilme irradiado.

2 METODOLOGIA

2.1 Aspectos éticos

Como a realização desta pesquisa incluiu experiências com a utilização de órgãos dentários humanos, o estudo foi conduzido após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sob o parecer CAAE 80206617.7.0000.5054, conforme ANEXO A. Todos os responsáveis pelas unidades doadoras de dentes assinaram um Termo de doação de dentes, o qual explicou a realização do estudo, os objetivos, os riscos e os benefícios aos quais estariam expostos, de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 196/96) e resoluções complementares (240/97, 251/97, 292/99, 303/2000, 304/2000, 340/2004, 346/2005 e 347/2005).

2.2 Preparo dos espécimes de esmalte

Foram coletados 220 dentes, porém, 58 foram excluídos, pois apresentavam lesões cáries, rachaduras visíveis ou não passaram no teste de microdureza de superfície inicial. Para a realização da pesquisa, foram utilizados 162 blocos de esmalte humano, obtidos da região central da coroa de terceiros molares hígidos, extraídos por razões que não as desta pesquisa, armazenados em solução de timol a 0,1%, a temperatura de 4°C por pelo menos 30 dias (WHITE, FEATHERSTONE, 1987, CURY *et al.*, 2000).

Os blocos dentais foram fixados em peças acrílicas e cortados com o auxílio de uma cortadeira elétrica (Isomet™® Low Speed Saw, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) e discos de diamante (EXTEC CORP, Enfield, CT, USA). Após o corte das raízes e da face oclusal, obtivemos um fragmento dental da porção central da coroa. A regularização do esmalte, a fim de obter blocos planos medindo 4x4x2mm de dimensões, foi feita com o auxílio da politriz (Arotec, Aropol 2V-PU, Cotia, SP, Brasil) em baixa velocidade e lixa de granulação 320 (Carbimet Paper Discs, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) sob refrigeração (TEIXEIRA *et al.*, 2012).

Os blocos foram fixados com godiva em bastão em discos perfurados de resina acrílica. Depois disso, foram lixados e polidos em politriz automática (AutoMet® 250, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) com lixas de granulação decrescente de 400 (15 segundos), 600 (40 segundos) e 1200 (2 minutos) e, entre cada lixa, foram sonicados em cuba ultrassônica (USC-1600, Unique, SP, Brasil) por 10 minutos. O polimento final foi realizado com discos de feltro (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) e suspensão de diamante de 1 µm de granulação (MetaDi® Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), sem refrigeração, por 3 minutos. Em seguida, foram armazenados em umidade até serem utilizados (MELO *et al.*, 2010).

2.3 Seleção das amostras

A seleção dos blocos foi determinada por meio da microdureza de superfície (MDS). (MELLBERG, PETROU, GROTE, 1992). Para determinação de dureza de Knoop, utilizamos um microdurômetro (Durômetro sistema automático, Future-Tech Corp®, Tóquio, Japão) acoplado ao software FM-ARS®, com uma carga de 25gF por 10 segundos, sendo realizadas 5 indentações em cada bloco, com um intervalo de 100µm entre elas. Os blocos de esmalte com dureza entre 274 e 335 Knoop (305 ± 10%) (MEREDITH *et al.*, 1996) foram selecionados para a pesquisa.

Após a realização do teste de microdureza superficial, os blocos foram colocados em microtubos contendo 1 ml de água destilada, foram identificados e autoclavados durante 15 minutos a uma temperatura de 121°C.

2.4 Aleatorização dos blocos e divisão dos grupos

Os blocos selecionados a partir do Teste de Microdureza Knoop foram aleatorizados utilizando uma planilha no Excel, do pacote Microsoft Office e distribuídos em 9 grupos, conforme o quadro a seguir.

Quadro 1 – Descrição dos tratamentos em que os blocos de esmalte foram tratados.

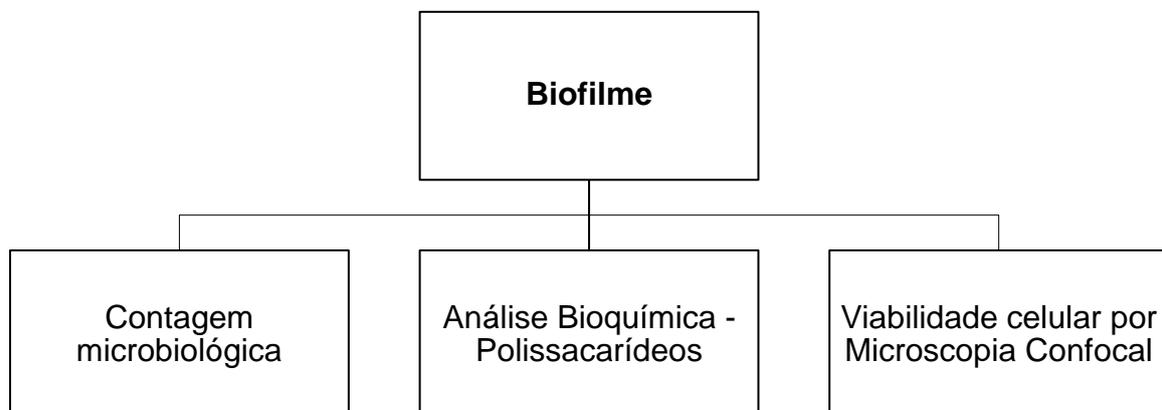
Código	Tratamento realizado
ST	Não tratado por 10 min (Controle negativo)
CHX	Clorexidina 0,12% por 10 minutos (Controle antiplaca)
NaF	Fluoreto de sódio 0,05% por 10 minutos (Controle anticárie)
ARG1	Argônio por 1 minuto
ARG5	Argônio por 5 minutos
ARG10	Argônio por 10 minutos
PLA1	Plasma por 1 minuto
PLA5	Plasma por 5 minutos
PLA10	Plasma por 10 minutos

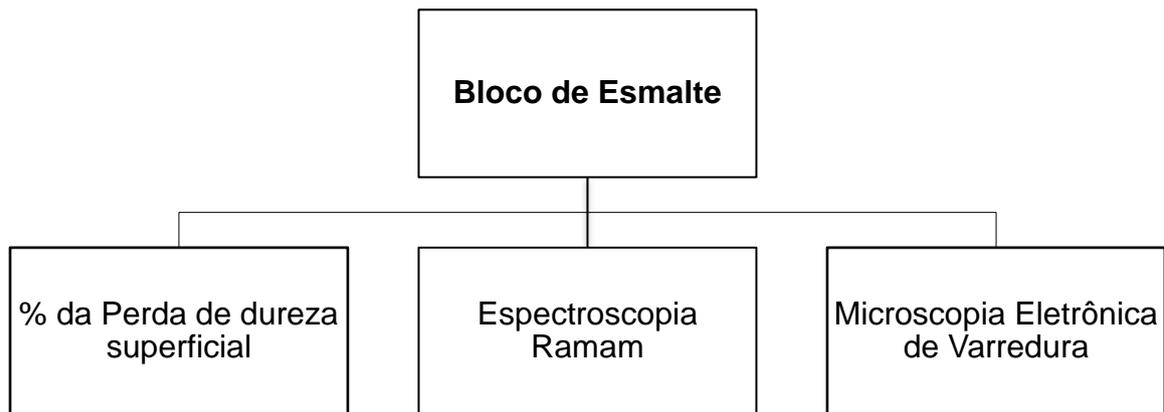
Descrição dos tratamentos

2.5 Delineamento experimental

Após a formação dos biofilmes e realização dos tratamentos, as amostras de biofilme e os blocos de esmalte humano foram analisados conforme descrito abaixo. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, sendo realizadas três repetições para cada experimento.

Figura 1 – Delineamento do experimento.





Descrição dos testes que serão realizados nos blocos de esmalte humano e no biofilme.

2.6 Formação da película adquirida

A película adquirida foi formada a partir de saliva humana clarificada diluída em tampão de adsorção. A saliva foi coletada de um doador saudável (em jejum e sem escovar os dentes) por estimulação com filme flexível (Parafilm M® Pechiney Plastic Packaging, Akron, Ohio, EUA). O tampão de adsorção (KCl 50 mM, KPO₄ 1,0 mM, CaCl 1,0 mM, MgCl₂ 0,1 mM, pH = 6,5) foi adicionado à saliva na proporção de 1:1 e o fluoreto de fenilmetilsulfônico - PMSF foi adicionado na proporção de 1:1000. Após leve agitação, a solução foi clarificada por centrifugação (Centrífuga refrigerada - NT 815, Novatecnica, Piracicaba, SP, Brasil) a 8.500 rpm durante 10 minutos a 4°C e filtrada a vácuo com um filtro de poro 0,22µm (Stericup Millipore, St. Louis, MO, EUA) (DUARTE *et al.*, 2006). Para formação da película adquirida, os blocos de esmalte humano estéreis foram colocados em placa de 24 poços contendo 1ml da saliva clarificada, incubados em estufa de CO₂, durante 1 hora, a 37°C, sobre uma mesa agitadora orbital (Te-145 Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) imediatamente antes da inoculação das amostras.

2.7 Crescimento do biofilme *in vitro*

Oito colônias de *Streptococcus mutans* UA159 (ATCC, Manassas, Virgínia, EUA), obtidas a partir do crescimento em BHI (Infusão de cérebro e coração) ágar suplementado com 5% de sangue de carneiro estéril, foram inoculadas em 9ml de caldo Tryptic Soy Broth (TSB) - (Difco, Detroit, Michigan, EUA) suplementado com

extrato de levedura e 1ml de glicose a 10%. Em seguida foram incubadas durante 18 horas, a 37°C, sob condições de microaerofilia (5% de CO₂). Após 18h, foi utilizado para o inóculo inicial dos blocos de esmalte na proporção de 100µL para cada 45mL de meio de cultivo (TSB + Extrato de levedura) para 5mL de Sacarose a 10%. Após a formação da película adquirida, os biofilmes de *S. mutans* UA159 foram formados sobre os blocos de esmalte humano em placa de 24 poços de poliestireno. Os biofilmes foram incubados em estufa de CO₂ (Forma™ 310 Direct-Heat, Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, EUA), a 37°C, a 5% de CO₂, durante 5 dias, em repouso. O meio de cultivo foi trocado após cada tratamento (duas vezes ao dia) sem adição da bactéria.

2.8 Tratamentos dos biofilmes/blocos

Após a formação inicial do biofilme sobre os blocos de esmalte (24 horas em repouso na estufa de CO₂), os tratamentos foram iniciados dentro da câmara de fluxo laminar (Filtracom, Valinhos, SP, Brasil), às 8 e às 16 horas de cada dia, e o processo se repetiu por mais 4 dias. Os biofilmes dos grupos ARG1, ARG5, ARG10, PLA1, PLA5 e PLA10 foram expostos aos seus respectivos tempos de tratamentos – a seleção destes foi baseada em um estudo prévio de Alves, Santos e Rodrigues (2016) – a uma distância fixa de 3mm da superfície do bloco à saída do gás. Os blocos dos grupos CHX e NaF ficaram imersos em 2ml da respectiva solução por 10 minutos e os blocos do grupo ST não passaram por nenhum tratamento, aguardando em temperatura ambiente por 10 minutos, sendo este o controle negativo. O PBT foi gerado através da ionização do gás argônio (Ar) à pressão atmosférica por meio de um dispositivo operatório portátil - Kinpen 09 (INP, Greifswald, Alemanha), desenvolvido pelo Instituto Leibniz de Ciências e Tecnologia de Plasma (INP). O dispositivo consiste de uma unidade de mão (170mm de comprimento, 20mm de diâmetro e 170g de peso) para a geração de um jato de plasma à pressão atmosférica, uma fonte de alimentação de corrente contínua (energia do sistema: 8 W a 220 V, 50/60 Hz) e uma unidade de fornecimento de gás (DELBEN, *et al.*, 2014). A temperatura média do PBT é de 37°C, podendo chegar até 40°C, de acordo com Rupf *et al.* (2011). O fluxo de gás argônio (Ar) foi ajustado

para 5l/min e a taxa de fluxo foi controlada pelo controlador de fluxo (MKS Instruments, Munique, Alemanha).

A seguir, os blocos de todos os grupos foram mergulhados 3 vezes em 1mL de solução salina (NaCl 0,89%), a fim de remover o biofilme fracamente aderido, e transferidos para um novo meio de cultura contendo TSB+YE + 1% de Sacarose (DUARTE *et al.*, 2006).

2.9 Análise microbiológica do biofilme formado *in vitro*

No último dia do experimento, os biofilmes foram coletados com espátulas plásticas estéreis (uma para cada bloco) e colocados em um tubo de 50ml, contendo 5ml de NaCl 0,89%. Esse conteúdo foi vortexado (Vórtex AP-56, Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil) e sonicado a 6 watts (Sonicador Digital Sonifer™ 450, 50/60Hz, 4A, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, EUA), com 3 pulsos de 15 segundos, com intervalo de 15 segundos em banho de gelo entre eles. A suspensão foi diluída em série decimal (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000, 1:10000000) e plaqueada em duplicata em placas de Ágar Sangue. Em seguida, foram incubadas em estufa a 5% de CO₂, 37°C, por 48 horas. Decorrido o tempo de incubação, a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada e o número de UFC/mg de peso seco de biofilme foi estabelecido após a determinação do peso seco de cada amostra (DUARTE *et al.*, 2006).

2.10 Determinação do peso seco do biofilme

Para a determinação do peso seco do biofilme de cada tratamento, foram adicionados, aproximadamente, 15ml de etanol a -20°C (3 vezes o volume restante da diluição 1:1) no tubo de 50ml e estes foram armazenados na geladeira -20°C por 18h. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados (3500rpm durante 10 minutos a 4°C), os sobrenadantes foram descartados, os “pellets” resultantes foram lavados com 1ml de etanol frio e transferidos para microtubos de 1,5mL pré-pesados (um para cada unidade experimental). Em seguida, o conteúdo foi novamente centrifugado, o excesso de álcool foi cuidadosamente removido e os microtubos

foram colocados em uma dessecadora a vácuo por 48h e, após esse período, foram pesados novamente (DUARTE *et al.*, 2006).

2.11 Análise da composição bioquímica da matriz dos biofilmes

Foram realizados outros três experimentos para esta análise. Após a realização dos tratamentos propostos, os biofilmes formados sobre os blocos de esmalte foram coletados, colocados em tubos de 50ml, contendo 5ml de NaCl 0,89%, lavados, centrifugados e sonicados a 6 watts (Digital Sonifer 450, Branson Ultrasonics Corporation, 50/60Hz, 4A), por 30 segundos, para permitir a separação das células bacterianas. O sobrenadante foi coletado e o precipitado foi novamente suspenso e lavado com 4ml de água Milli-Q (este procedimento se repetiu por mais 3 vezes). (LIMA; ZANIN, 2014)

O sobrenadante foi utilizado para o ensaio de polissacarídeo extracelular (PEC) solúvel em água e o “pellet” foi utilizado para os ensaios de PEC insolúvel em água/solúvel em álcali. Após a coleta, os polissacarídeos presentes no sobrenadante foram precipitados no álcool absoluto gelado por 18 horas (a quantidade de álcool foi aproximadamente três vezes o volume da amostra) (LIMA; ZANIN, 2014).

O conteúdo de polissacarídeo foi expresso por mg de peso seco do biofilme. A análise colorimétrica dos PEC solúveis em água foi realizada em triplicata, tendo uma curva de glicose como padrão, utilizando o método fenol – ácido sulfúrico, descrito por Dubois *et al.* (1956) onde em cada tubo de ensaio foi colocado 200µL da amostra, 200µL de fenol a 5% e 1000µL de Ácido Sulfúrico e o conteúdo foi agitado cuidadosamente no vórtex, depois ficou em repouso por 20 minutos até a leitura em Espectrofotômetro (DU 730 UV-VIS, Beckman Coulter, Brea, Califórnia, EUA). Antes de iniciar as leituras, o espectrofotômetro foi configurado com $\lambda=490\text{nm}$ e, para calibrar a absorbância foi realizado o branco (1,4ml de água Milli-Q). Os valores de absorbância foram tabelados para calcular a média entre as três leituras de cada grupo.

Os PEC solúveis em álcali foram extraídos usando NaOH 1N (0,3ml de NaOH 1N:1mg de peso seco de biofilme), sob agitação durante 1h e 10 min, a 37°C. Os

PEC solúveis em água e em álcali foram também determinados pelo método fenol – ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

2.12 Análise estrutural do biofilme irradiado

A presença de bactérias mortas e vivas foi analisada por microscopia confocal de varredura a laser (CONFOCAL ZEISS LM 710, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha) da Central Analítica da UFC e analisada pelo software ZEN 2.3 SP1 (black) versão 14.0.0.0 Carl Zeiss Microscopy GmbH. Para tanto, três amostras de biofilme de cada grupo foram coradas com kit de viabilidade bacteriana (LIVE/DEAD® BacLight™, for microscopy - Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram preparados na proporção de 1 ml de solução salina, 1,5µl de SYTO 9 dye (corante verde) e 1,5µl de iodeto de propídio (corante vermelho). Depois de preparado, 1ml do corante foi colocado no poço de cada amostra, evitando contato direto com o biofilme. Esse processo foi realizado em ambiente escuro, 30 minutos antes da análise das amostras no microscópio. Cinco leituras aleatórias de cada biofilme foram realizadas e as imagens em 2D foram confeccionadas para produzir projeções XY (a soma total de brilho de pixel no eixo z) e projeções sagitais parciais, conforme Zanin *et al.*, (2005), utilizando o mesmo software usado para as análises (ZEN 2.3 SP1 (black) versão 14.0.0.0).

2.13 Determinação das alterações estruturais na superfície do esmalte

2.13.1 Porcentagem da perda da dureza

Para a determinação de alterações na superfície do esmalte, após a utilização do PBT, os blocos submetidos ao estudo *in vitro* foram reembutidos em discos de resina acrílica e passaram novamente pelo teste de MDS (Microdurômetro Future-Tech®, acoplado a um software FM-ARS® e penetrador do tipo Knoop, carga de 25g e tempo de 5 segundos), sendo realizadas cinco novas indentações com 100 µm de distância entre elas. Além disso, a porcentagem da perda de microdureza superficial (% PMS) foi calculada: $(\% \text{ PMS}) = \frac{\text{MDS após os tratamentos} - \text{MDS inicial}}{\text{MDS inicial}} \times 100$ (Gonçalves *et al.*, 2014).

2.13.2 Espectroscopia Raman

A espectroscopia foi realizada no Espectrofotômetro Raman (Xplora HORIBA Scientific, Paris, França), com o objetivo de verificar as quantidades de material mineral presente no esmalte após os tratamentos propostos. O sistema Raman foi calibrado com um semicondutor de silício, utilizando o pico Raman a 600cm^{-1} . Para esta análise, foram realizadas 3 acumulações de 10 segundos, com o laser HeNe de $\lambda = 638\text{nm}$, a 1% da potência total e grade de 600, no programa LabSpec6. O feixe do laser foi focado na superfície do bloco usando a lente de 100x. Os espectros de Raman foram obtidos através de três verificações em pontos diferentes nas superfícies expostas aos tratamentos. O primeiro ponto foi na região central da superfície dental e os outros localizados a 1mm para a direita e 1mm para a esquerda deste primeiro ponto. A região explorada que permitiu a caracterização do conteúdo mineral variou de 800 a 2000cm^{-1} . As bandas identificadas foram 1070cm^{-1} que caracteriza o pico do carbonato e 958cm^{-1} que caracteriza o fosfato. No total, foram utilizados 27 blocos para esta análise, sendo ($n = 3$) para cada tratamento. A imagem dos picos foi identificada para cada banda usando um sistema de software OriginPro (versão 8.6, 32 bits, sistema operacional: 7, Copyright 2012, OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA) (ALVES, SANTOS e RODRIGUES, 2016).

2.13.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com o objetivo de avaliar as possíveis alterações dos tratamentos na superfície do esmalte, realizou-se a Microscopia Eletrônica de Varredura. Para isso, os blocos de esmalte humano foram sonicados em ultrassom com água destilada, secadas ao vácuo por 24h e, em seguida, montadas em um disco de alumínio (*stubs*), fixadas com fita adesiva de carbono dupla face (Acheson silver DAG Scientific, UK) e codificadas. Depois foram revestidos com uma camada de ouro de 15nm de espessura (metalização), utilizando uma unidade de revestimento MEV Polaron. Os espécimes foram examinados utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (Inspect S50 FEI, Hillsboro, Oregon, EUA). As imagens foram capturadas em quatro níveis de ampliação ($\times 500$, $\times 1000$, $\times 5000$, $\times 10000$) para avaliar as alterações na estrutura superficial do esmalte.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra foi calculado usando dados de um estudo piloto, assumindo um tamanho de efeito médio de 0,5%, nível de significância de 5% e poder estatístico de 95%, então, concluiu-se que eram necessários 162 blocos de esmalte para a realização da pesquisa. Trezentos blocos foram preparados para garantir que, ao final, 162 serviriam para o estudo. O software de programa BioEstat5.3 para Windows (versão 5.3, de 2007, Belém, Pará, Brasil) foi utilizado.

A distribuição de normalidade foi verificada no teste estatístico Kolmogorov-Smirnov. A média e o desvio padrão (DP) do número de microrganismos sobreviventes para cada tratamento foram calculados. As unidades formadoras de colônias (UFC) foram transformadas em UFC \log_{10} , com o objetivo de reduzir a heterogeneidade de variância. Para determinar a diferença entre os valores dos grupos testes com os controles, realizou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn (teste de múltiplas comparações). A estatística dos PECs solúveis e insolúveis também foi obtida a partir do testes Kruskal-Wallis seguido do método de Dunn. Os dados da microdureza de superfície final passaram pela transformação linear para que fosse realizada a análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste Tukey. Na espectroscopia de Raman, para padronizar as medidas e permitir a comparação entre os grupos, a área dos picos foi usada como parâmetro. As médias das áreas dos picos foram comparadas através da análise de variância ANOVA de uma via.

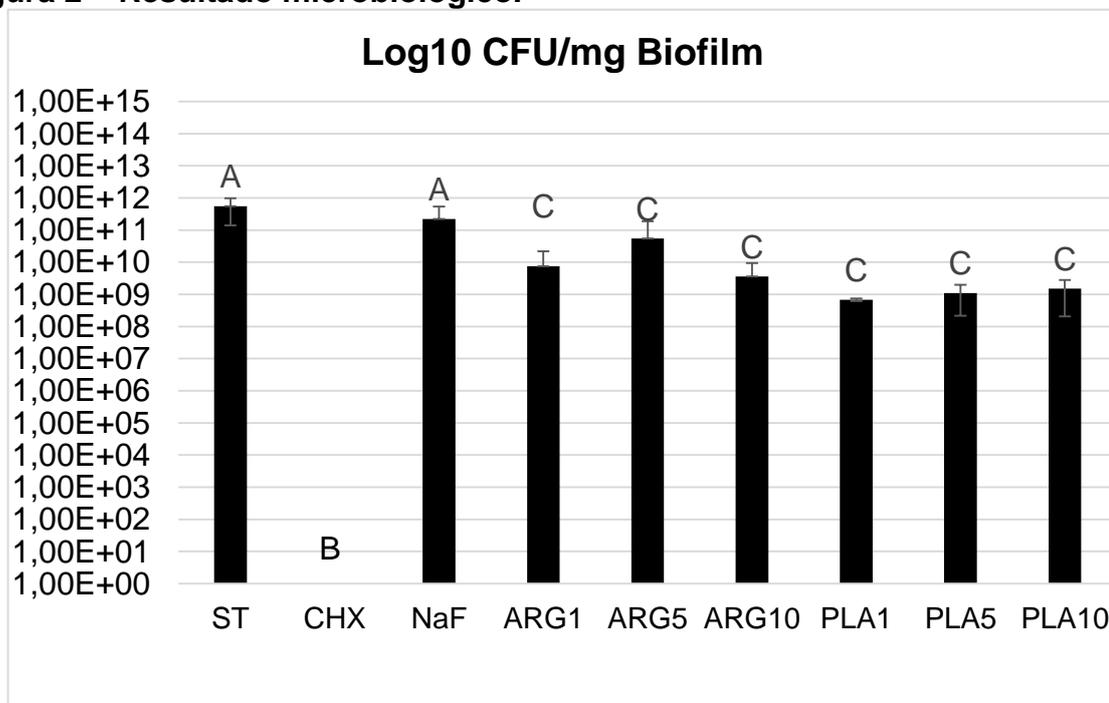
4 RESULTADOS

4.1 Análises realizadas a partir do biofilme

Contagem microbiológica

O efeito dos tratamentos na viabilidade de biofilmes *in vitro* em formação pode ser encontrado na Figura 2. Os resultados demonstraram não haver diferença significativa entre as contagens no grupo ST e no grupo tratado com fluoreto de sódio ($p < 0,0001$). Além disso, como esperado, o tratamento diário com clorexidina 0,12% inibiu completamente a formação de biofilme de *S. mutans* no modelo testado. Os tratamentos com gás argônio ou plasma de baixa temperatura nos tempos de 1, 5 e 10 minutos reduziram significativamente a viabilidade das bactérias presentes nos biofilmes, quando comparadas aos controles ST e NaF, não havendo, entretanto, diferença significativa entre eles.

Figura 2 – Resultado microbiológico.



Os dados representam valores médios e as barras de erro representam o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na redução da contagem de *Streptococcus mutans*.

Análise Bioquímica - Polissacarídeos Extracelulares (PEC)

Os resultados da análise dos PEC solúveis em água no biofilme em formação (Fig. 3) demonstraram que os grupos ST, NaF e ARG5 não reduziram a quantidade de PEC solúveis, diferindo estatisticamente dos demais grupos testados ($p < 0,05$). Entretanto, a análise dos PEC insolúveis em água/solúveis em álcali (Figura 4) demonstrou não haver diferença estatística entre todos os grupos ($p = 0,5132$).

Figura 3 – Gráfico da extração de PEC insolúveis em água.

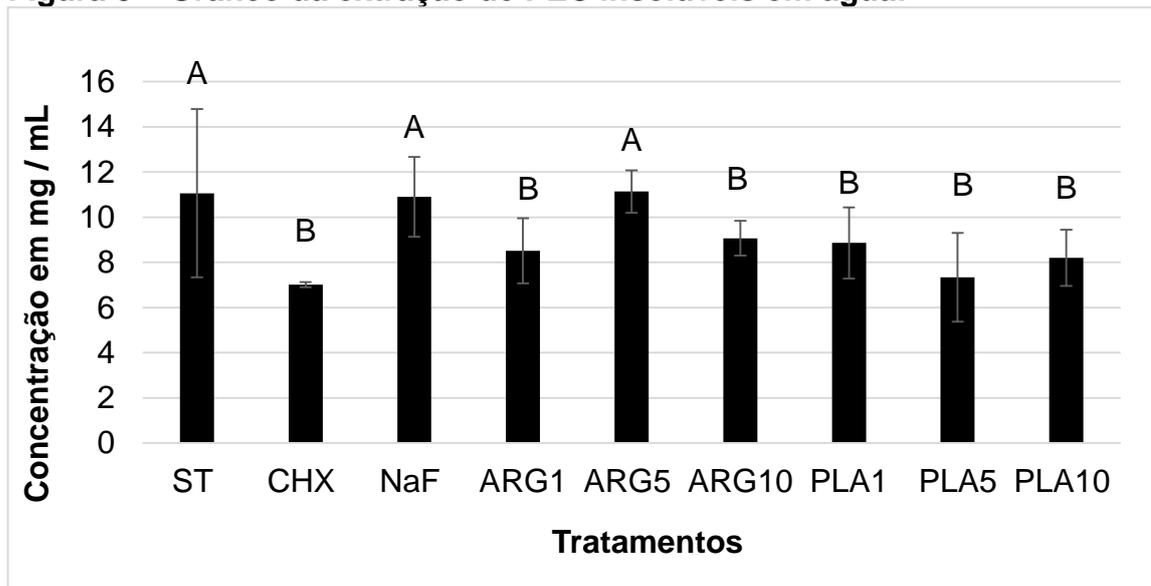
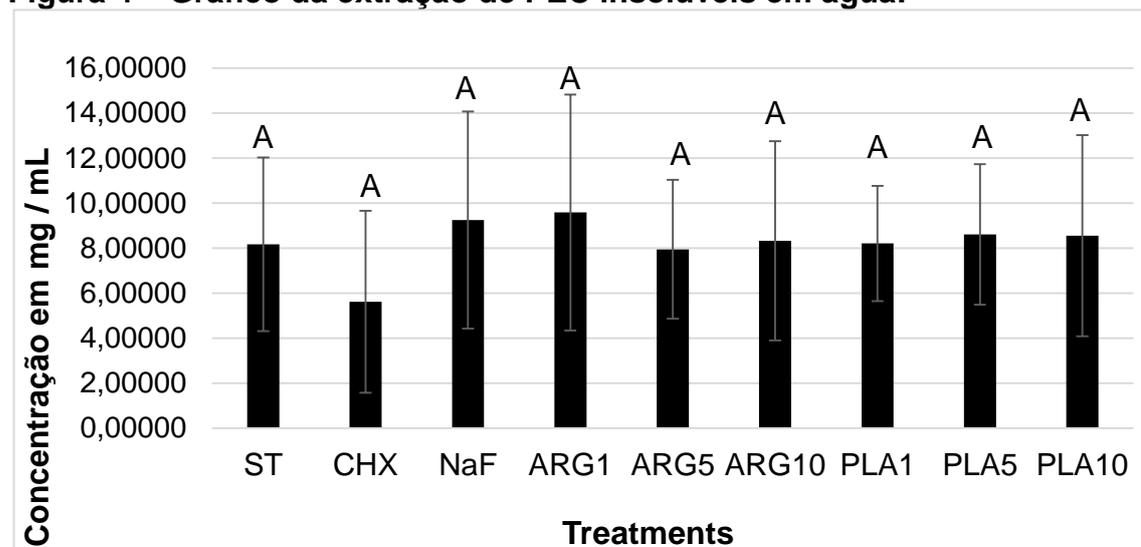


Figura 4 – Gráfico da extração de PEC insolúveis em água.

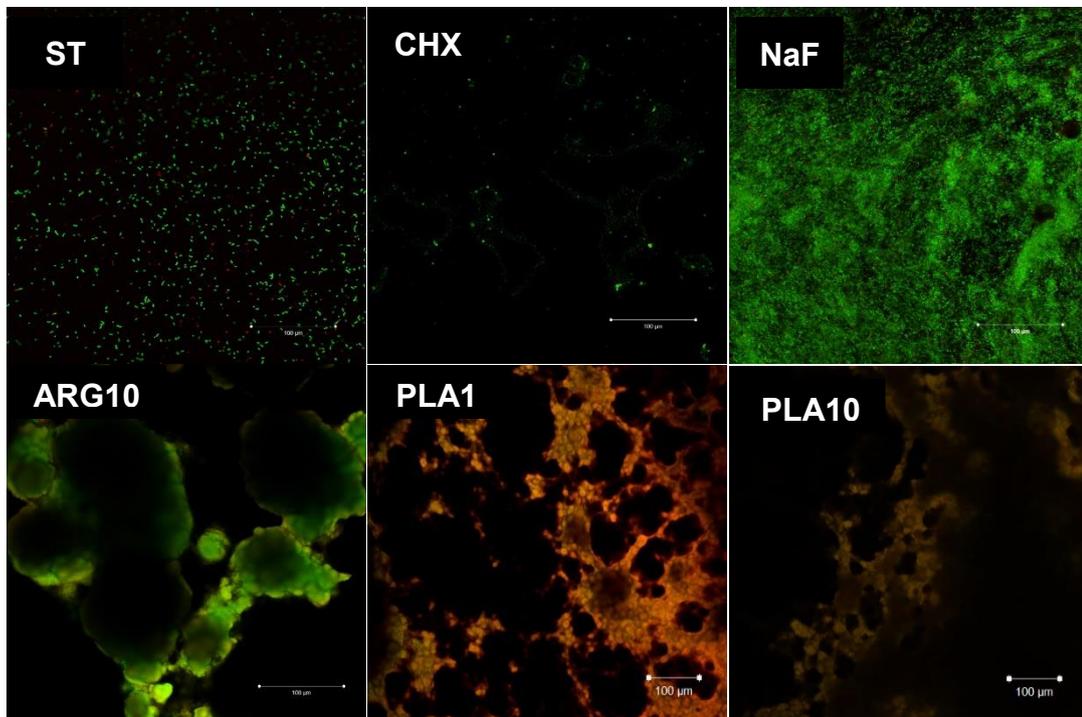


Os dados representam valores médios e as barras de erro representam o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Microscopia de Confocal a Laser - MCL

As imagens de MCL representativas dos biofilmes após os tratamentos estão na Figura 5. A área total das imagens foi de 415 x 415µm, utilizando a lente Plan-Apochromat 20x / 0.8 M27. Os biofilmes dos grupos ST, NaF e ARG10 apresentaram maior quantidade de áreas coradas em verde (vivas). Embora não se possa comparar quantitativamente a eficácia dos tratamentos por imagens de MCL, as áreas coradas em vermelho (mortas) podem ser observadas com mais clareza nos biofilmes dos grupos CHX, PLA1 e PLA10.

Figure 5 – Imagens da Microscopia Confocal do biofilme tratado diariamente



Tratamentos indicados nas imagens pelo código do grupo.

4.2 Análises realizadas a partir do bloco de esmalte humano

Microdureza de Superfície (MDS)

Os resultados para a perda de microdureza de superfície podem ser encontrados na Tabela 1. Com relação à microdureza, todos os blocos entraram no experimento na mesma condição, todos sofreram perda mineral pelo modelo de biofilme, confirmando que ele é cariogênico nas condições testadas. Apenas o grupo tratado com clorexidina (0,12%) conseguiu reduzir a porcentagem de perda de

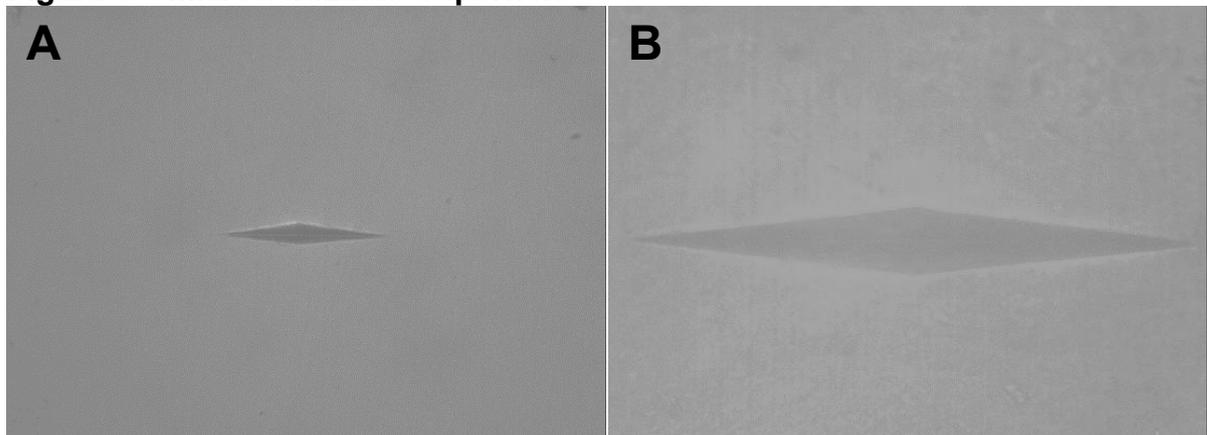
dureza superficial. A Figura 6 mostra as indentações do penetrador de Knoop antes e depois dos tratamentos realizados.

Tabela 1 – Análise de Microdureza de Superfície dos blocos de esmalte de acordo com os tratamentos (média ± DP)

Tratamento	Microdureza Superficial		%PDS
	Inicial	Final	
ST	328,66 ± 43,18 a	13,64 ± 5,14c	-95,92 ± 1,02 ^a
CHX	300,66 ± 17,89 a	123,18 ± 107,85b	-57,54 ± 39,56 ^B
NaF	296,66 ± 6,02 a	46,25 ± 15,52c	-84,47 ± 4,88 ^a
ARG 1	289,33 ± 9,07 a	29,76 ± 26,50c	-89,47 ± 8,85 ^a
ARG 5	309,00 ± 10,58 a	19,25 ± 9,17c	-93,69 ± 3,24 ^a
ARG 10	308,00 ± 12,48 a	16,77 ± 12,28c	-94,46 ± 4,21 ^a
PLA 1	306,66 ± 11,01 a	48,98 ± 9,26c	-83,94 ± 3,61 ^a
PLA 5	304,66 ± 18,71 a	55,29 ± 31,60c	-81,72 ± 10,85 ^a
PLA 10	319,00 ± 22,60 a	42,12 ± 24,96c	-86,86 ± 7,30 ^A

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam as leituras iniciais com os finais; letras minúsculas comparam os grupos no mesmo período. PDS = perda de dureza de superfície.

Figura 6 – Microdureza de Superfície

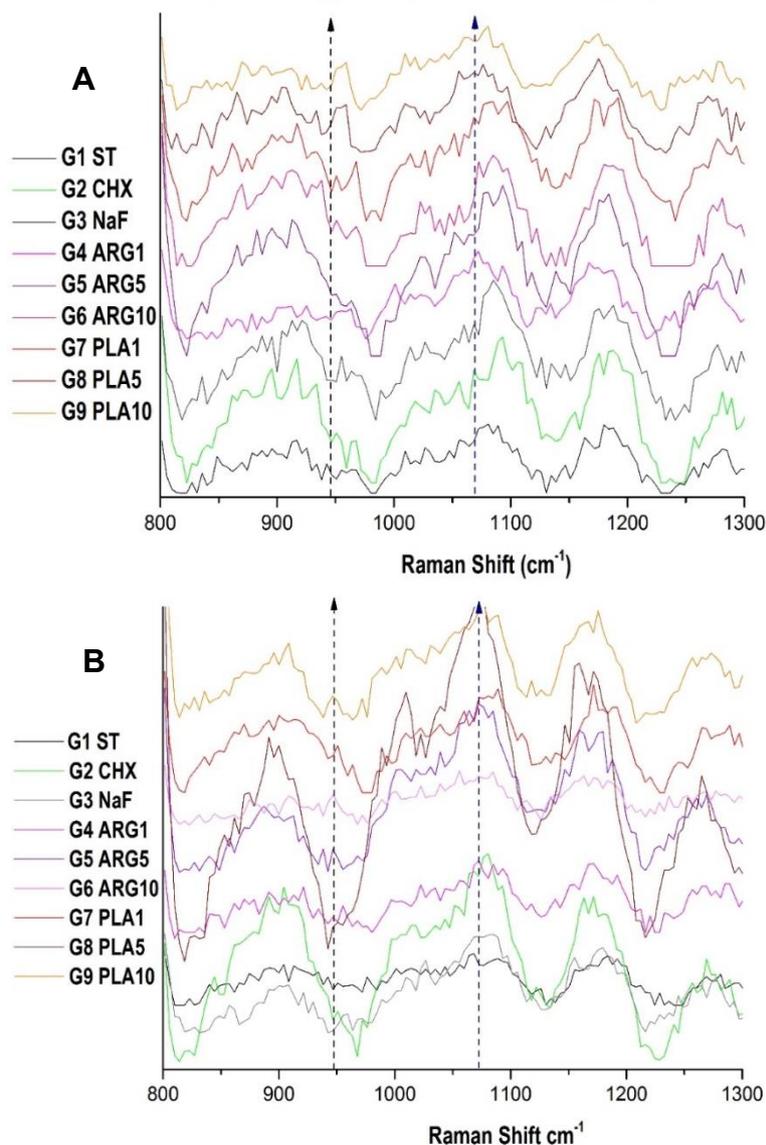


Imagens da Microdureza de Superfície do esmalte, onde A e B representam a indentação inicial e final do tratamento diário, respectivamente.

Espectroscopia Raman

Os espectros Raman iniciais para os nove grupos de tratamento na região de 800-2000 cm^{-1} estão na Figura 7(A). Já os espectros Raman finais estão na Figura 7(B). A estatística foi realizada com base na área dos picos do Fosfato (958 cm^{-1}) e do Carbonato (1070 cm^{-1}), que representam a fase mineral do esmalte. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos antes ($p = 0,6978$) ou depois dos tratamentos ($p = 0,8904$).

Figura 7 –Espectroscopia Raman

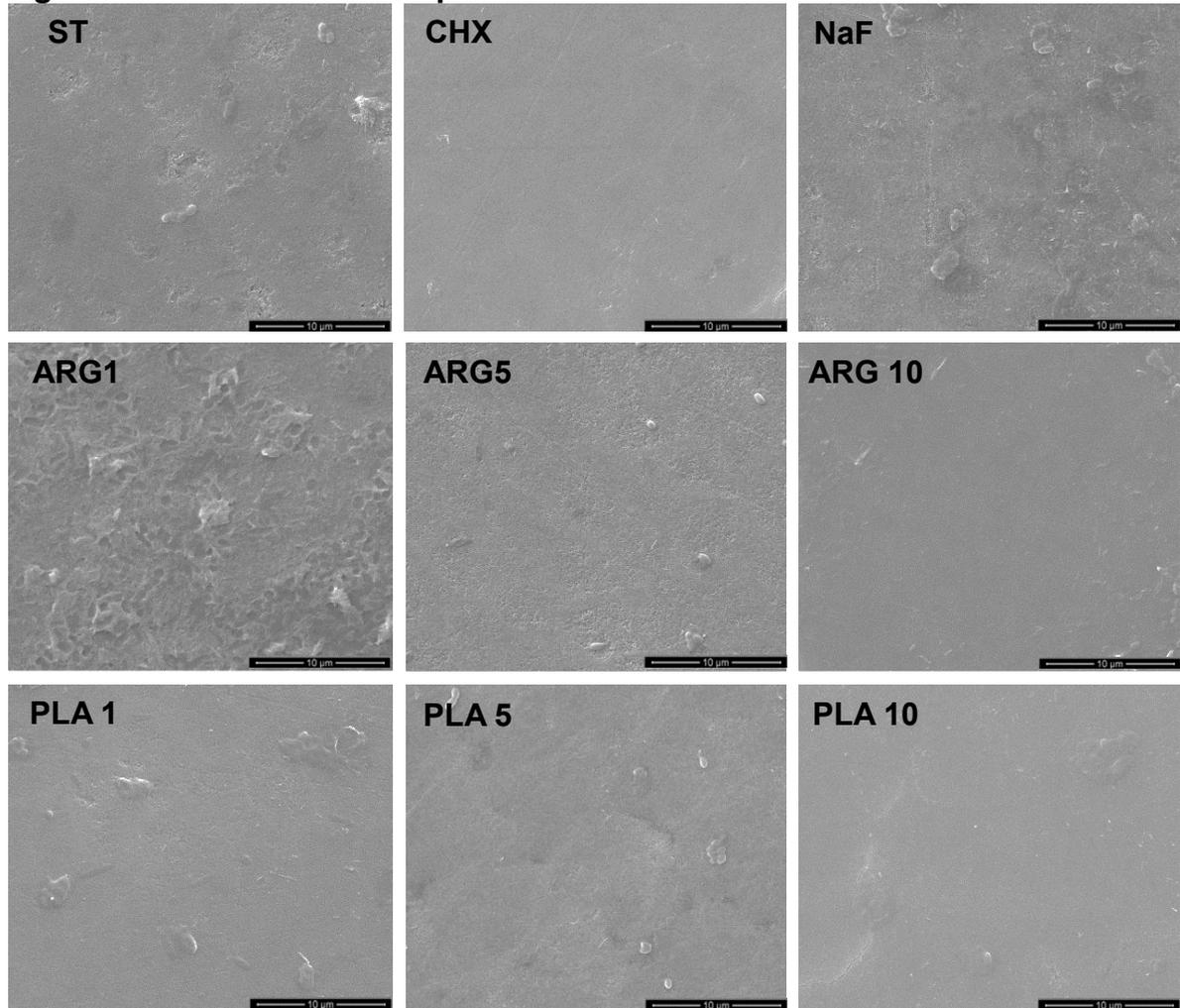


Espectroscopia Raman mostrando que não houve diferença entre os picos dos grupos tratados diariamente antes (A) e após (B) tratamentos. ST - linhas pretas, CHX - linhas verdes, NaF - linhas cinzas, ARG1 - linhas rosa pink, ARG5 - linhas roxas, ARG10 - linhas rosa claro, PLA1 - linhas vermelhas, PLA5 - linhas marrons e PLA10 - linhas laranjas; Seta azul = Pico de 958 cm^{-1} ; Seta preta = pico de 1070 cm^{-1} .

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise qualitativa da MEV mostrou que os tratamentos não alteram a superfície do esmalte dentário sob o biofilme tratado, sendo observado superfícies lisas e homogêneas no aumento x10000, conforme a Figura 8.

Figura 8 – MEV do esmalte após os tratamentos.



MEV dos blocos esmalte humanos tratados diariamente de acordo com os tratamentos ST, CHX, NaF, ARG1, ARG5 e ARG10, PLA1, PLA5 e PLA10 no aumento de x10000.

5 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo *in vitro* que avalia o efeito antimicrobiano do PBT na formação de biofilmes orais sobre o esmalte dentário humano, para investigar o potencial uso dessa terapia na prevenção dos biofilmes em formação. O modelo de biofilme utilizado neste estudo foi um modelo cariogênico, com troca periódica de nutrientes, visto que já está bem estabelecido que, após a ingestão de açúcares fermentáveis (glicose, sacarose ou frutose), o pH na placa cai do neutro para pH 5,0 ou inferior (STEPHAN, 1944; BOWEN; EASTOE; COCK, 1966).

Este estudo comparou o efeito antimicrobiano do PBT em biofilmes orais em formação com diversos tratamentos. Como esperado, o PBT mostrou-se uma terapia eficaz contra biofilmes orais, pois reduziu significativamente a viabilidade das bactérias presentes nos biofilmes, quando comparado ao controle negativo. Confirmando, assim, a hipótese de Goree *et al.* (2006) e Sladek *et al.* (2007). A CHX foi o melhor tratamento, esta é considerada o padrão ouro antiplaca, por seu efeito antimicrobiano e sua grande substantividade (Autio-Gold, 2008). Não houve diferença entre os tratamentos com gás argônio ou PBT, de modo que a ionização do gás não influenciou os resultados. Dessa forma, os tratamentos com PBT e gás argônio reduziram de forma semelhante o número de \log_{10} CFU/ml de *Streptococcus mutans* quando comparados ao grupo do controle negativo (ST). Estes resultados corroboram com os trabalhos de Yang *et al.* (2011), Ermolaeva *et al.* (2011) e Blumhagen *et al.* (2014) que utilizaram o PBT de argônio contra *Streptococcus mutans* e observaram que o PBT foi eficaz na redução dos microrganismos e que os resultados eram dependentes do meio de suporte bacteriano.

No presente estudo, quando os grupos ST, NaF e ARG5 foram comparados aos grupos dos três tempos de PBT, outros dois tempos de gás argônio e o grupo da clorexidina (0,12%), estes últimos reduziram significativamente a concentração de PEC solúveis em água, ($p < 0,05$), indicando que as interações destes tratamentos com os componentes da matriz podem afetar a coesão e a estabilidade dos PEC dos biofilmes. Essa redução de polissacarídeos da matriz de biofilmes de *S. mutans* é importante, uma vez que esses componentes estão relacionados à proteção de

biofilme cariogênicos (TAKAHASHI, NYVAD 2008, KOO *et al.* 2013; MOYE *et al.*, 2014). Porém, para PEC insolúveis em água/solúveis em álcali, não foi demonstrada diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos ($p = 0,5132$), indicando que o tratamento diário com o PBT teve uma capacidade maior de impedir a formação dos PEC com ligações mais flexíveis, do tipo α 1-6 (dextranos), diferindo dos resultados encontrados por Lima; Zanin, 2014.

As imagens bidimensionais produzindo projeções XY (a soma total de brilho de pixel no eixo z) e projeções sagitais parciais da microscopia confocal a laser dos biofilmes após a exposição aos tratamentos com gás argônio sugerem que a morte celular ocorreu predominantemente nas camadas exteriores dos biofilmes. As imagens do biofilme exposto ao tratamento com PBT por 1 e 10 minutos mostraram grande quantidade de áreas avermelhadas (morte celular). Yamazak *et al.*, (2011) encontrou que o Plasma aplicado por 1-2 minutos não reduziu a quantidade de *S. mutans*, já quando aplicado de 3-5 minutos reduziu a quantidade de *S. mutans*. Nas imagens deste trabalho, parecem haver diferenças na viabilidade em PLA1 e PLA10; Porém, esses resultados não refletem os resultados encontrados na análise quantitativa de contagem. Isso pode ter ocorrido devido a movimentação do biofilme causada pelo jato do gás e também por ser uma análise apenas qualitativa de áreas restritas do bloco, podendo não refletir a realidade do tratamento como um todo. Vale ressaltar que essa interferência não altera os dados quantitativos, pois foram regulados de acordo com o peso seco do biofilme. Além disso, a biomassa do biofilme será calculada.

No presente estudo, a desmineralização do esmalte humano foi observada após 5 dias de acúmulo de placa em alta frequência de exposição ao açúcar (Tabela 2). A redução na microdureza superficial (MDS) do esmalte foi observada devido ao desafio cariogênico ao qual os blocos de esmalte foram submetidos. Os blocos tratados com três tempos de PBT e gás argônio sofreram uma %PMS semelhante aos tratados com NaF (0,05%), sendo este considerado o padrão-ouro anticárie. Ambos os grupos citados anteriormente apresentaram %PMS tendendo a ser menor que os blocos do controle negativo, que apresentou $95,92 \pm 1,02$ de perda de dureza. O grupo tratado com clorexidina 0,12% obteve a menor % PMS, pois impediu completamente a formação de biofilme na superfície do esmalte. O

esperado era que a %PDS nos blocos tratados com clorexidina fosse ainda menor que $-57,54 \pm 39,56B$, mas esse resultado pode ser explicado por conta da troca do meio de cultura duas vezes ao dia, o que também explica o fato do NaF 0,05% não funcionar como anticárie, pois como aumentou a exposição do substrato à sacarose, o meio se tornou mais ácido e o NaF não conteve a desmineralização. A MDS é considerado um método muito sensível de avaliação da lesão precoce da cárie (ZERO, 1995). Tenuta *et al.* (2003) sugerem que leva cerca de 3 a 4 dias para que a placa dental mostre sua cariogenicidade no substrato dental. Assim, a porcentagem da perda de dureza (perda mineral) resultante no nosso estudo se assemelha aos resultados encontrados por Park *et al.* (2014). Como esperado, o tratamento com plasma não causou alterações na superfície do esmalte, pois as modificações encontradas foram decorrentes do desafio cariogênico.

A espectroscopia de Raman permite analisar a composição molecular do tecido dentário mineralizado. A análise é fornecida por picos que representam a intensidade do sinal de acordo com a frequência (presença de determinado mineral). As análises matemáticas podem ser realizadas para permitir a comparação entre os grupos (TRAMINI *et al.*, 2000). A leitura em três pontos diferentes da superfície do bloco nos permitiu comparar estatisticamente a média da área dos picos nos diferentes tratamentos, contudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativa entre os tratamentos propostos, corroborando com os resultados encontrados por Alves, Santos e Rodrigues (2016); Alves, Santos e Rodrigues (2015).

Considerando os resultados da MEV, o tratamento com PBT não alterou a topografia do esmalte sob o biofilme irradiado. Alves, Santos e Rodrigues (2016) e Chen *et al.* (2013) também não encontraram modificações na superfície dos substratos dentais submetidos ao tratamento com PBT. Afirmando que o PBT não provoca nenhum dano físico aos tecidos expostos (KUNHARDT, 2000; MOISAN *et al.*, 2001; KOGELSCHATZ, 2002; KIM *et al.*, 2014), o que incentiva a utilização *in vivo* (FLUHR *et al.*, 2012; PATTERCKE *et al.*, 2012). Um estudo prévio ainda não publicado mostrou que o PBT alterou a superfície de forma positiva, melhorando a molhabilidade do esmalte humano, o que permitiu um melhor escoamento do adesivo restaurador.

Dessa forma, temos que a aplicação do PBT como tratamento diário, duas vezes ao dia, em biofilmes orais de *Streptococcus mutans* formados *in vitro* sobre blocos de esmalte humano, foi eficaz para reduzir a quantidade de bactérias viáveis. Também reduziu significativamente a concentração de PEC solúveis em água e não modificou a concentração de PEC insolúveis em água. O PBT não alterou a superfície do esmalte sob o biofilme irradiado. Porém, a clorexidina ainda continua sendo o tratamento que apresenta melhor efeito antiplaca e melhor custo-benefício.

6 CONCLUSÃO

- O tratamento diário com o PBT na formação de biofilmes orais de *S. mutans in vitro* sobre blocos de esmalte humano, mostrou-se eficaz na viabilidade de *S. mutans* e na matriz de polissacarídeos extracelulares solúveis, sem alterar a quantidade de PEC insolúveis.
- O PBT foi eficaz em reduzir as bactérias viáveis presentes no biofilme e também em reduzir a quantidade de PEC solúveis.
- O PBT não alterou as propriedades bioquímicas do esmalte sob o biofilme irradiado e nem sua superfície topográfica, porém não reduziu a % de perda de dureza de superfície, não tendo efeito anticárie.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi financiada pelos recursos oriundos do Programa Ciência sem Fronteiras, e os termos da Chamada de Projetos nº 09/2014 – 1º Cronograma – Pesquisador Visitante Especial Número do Processo: 88881.062159/2014-01 Número da Proposta: 189422.

REFERÊNCIAS

- ALVES, Karla Shangela Silva; SANTOS, Iriana Carla Junqueira Zanin dos; RODRIGUES, Lidianny Karla Azevedo. **EFEITO DO PLASMA DE BAIXA TEMPERATURA E PRESSÃO NO BIOFILME ORAL FORMADO SOBRE ESMALTE EM UM MODELO IN SITU**. 2016. 58 f. Tese (Doutorado) - Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/20128>>. Acesso em: 04 out. 2017.
- ALVES, Roberto Haniery Ponte; SANTOS, Iriana Carla Junqueira Zanin dos; RODRIGUES, Lidianny Karla Azevedo. **EFEITOS DO PLASMA DE BAIXA TEMPERATURA SOBRE OS SUBSTRATOS DE ESMALTE E DENTINA**. 2015. 44 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Odontologia, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/16972>>. Acesso em: 10 jan. 2018.
- AUTIO-GOLD, J. The role of chlorhexidine in caries prevention. **Operative Dentistry**. v. 33, n. 6, p. 710-716, 2008.
- BLANC, V.; ISABAL, S.; SANCHEZ, M.C.; LLAMA-PALACIOS, A.; HERRERA, D.; SANZ, M. Characterization and application of a flow system for in vitro multispecies oral biofilm formation. **J Periodontal Res**. v. 49, p. 323-332, 2014.
- BLUMHAGEN, A.; SINGH, P.; MUSTAPHA, A.; CHEN, M.; WANG, Y.; YU, Q. Plasma Deactivation of Oral Bacteria Seeded on Hydroxyapatite Disks as Tooth Enamel Analogue. **Am J Dent**. April; v. 27, n. 2, p. 84–90, 2014.
- BOWEN, W. H.; EASTOE, J. E.; COCK, D. J. The effect of sugar solutions on the pH of plaque in caries-active monkeys (*Macaca irus*). **Archives Of Oral Biology**, v. 11, n. 8, p. 833-838, 1966.
- BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans* - Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. **Caries Res**, v. 45, p. 69-86, 2011.
- CURY, Jaime Aparecido *et al.* Biochemical Composition and Cariogenicity of Dental Plaque Formed in the Presence of Sucrose or Glucose and Fructose. **Caries Research**, Basel, v. 34, n. 6, p. 491-497, 2000.
- CURY, Jaime Aparecido. USO DO FLÚOR E CONTROLE DA CÁRIE COMO DOENÇA. In: BARATIERI, Luiz Narciso *et al.* **Odontologia restauradora: Fundamentos e possibilidades**. 2. ed. São Paulo: Santos, 2001. Cap. 2. p. 33-68.
- DELBEN, Juliana Aparecida *et al.* Low-Temperature Plasma: An Effective Approach Against *Candida albicans* Biofilm. **Plasma Medicine**, v. 4, n. 1-4, p. 231-244, 2014.

- DUARTE, Simone, *et al.* Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. **Fems Microbiology Letters**, v. 257, n. 1, p. 50-56, 2006.
- DUARTE, Simone, *et al.* Air plasma effect on dental disinfection. **Physics of Plasmas**, v. 18, n. 7, p. 0735031-0735037, 2011.
- DUBOIS, Michel, *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- ERMOLAEVA, S. A, *et al.* Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 75–83, 2011.
- FLUHR, Joachim W. *et al.* In vivo skin treatment with tissue-tolerable plasma influences skin physiology and antioxidant profile in human stratum corneum. **Experimental Dermatology**, v. 21, n. 2, p. 130-134, 2012.
- GONÇALVES, M. N.; PALMA-DIBB, R. G.; PAULA-SILVA, F. W. G.; OLIVEIRA, F.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, L. A. B.; QUEIROZ, A. M. Radiation therapy alters microhardness and microstructure of enamel and dentin of permanent human teeth. **Journal of Dentistry**, v. 42, p. 986-992, 2014.
- GOREE, John *et al.* Killing of *S. mutans* Bacteria Using a Plasma Needle at Atmospheric Pressure. **IEEE T Plasma Sci.** v. 34, n. 4, p. 1317-1324, 2006.
- HOJO, K.; NAGAOKA, S.; OHSHIMA, T.; MAEDA, N. Bacterial interactions in dental biofilm development. **J Dent Res.** v. 88, p. 982–990, 2009.
- KARYGIANNI, L, *et al.* Natural antimicrobial and Oral microorganisms: a systematic review on Herbal interventions of the eradication of multispecies oral biofilms. **Frontiers in Microbiology**. v. 1529, n. 14, p. 1-7, 2016.
- KIM, Jae-Hoon *et al.* Plasma in dentistry: a review of basic concepts and applications in dentistry. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 72, n. 1, p. 1-12, 2014.
- KOBAN, Ina *et al.* Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs in vitro: Proof of principle experiment. **Journal of Clinical Periodontology**. v. 38, n. 10, p. 956-965, 2011.
- KOGELSCHATZ, U. Filamentary, patterned, and diffuse barrier discharges. **IEEE Transactions on Plasma Science**. v. 30, n. 4, p. 1400-1408, 2002.
- KOO, H.; FALSETTA, M. L.; KLEIN, M. I. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. **J. Dent. Res.** v. 92, p. 1065–1073, 2013.
- KUNHARDT, E. E. Generation of large-volume, atmospheric-pressure, nonequilibrium plasmas. **IEEE T Plasma Sci.** v. 28, n. 1, p. 189-200, 2000.

KUTSCH, V.K. Dental caries: an updated medical model of risk assessment. **J Prosthet Dent**, v. 111, p. 280-285, 2014.

LEITES, Antonio Cesar Bortowski Rosa; PINTO, Márcia Bueno; SOUSA, Ezilmara Rolim de. Aspectos microbiológicos da cárie dental. **Salusvita**, Bauru, v. 25, n. 2, p.239-252, 2006.

LIMA, Ramille Araújo; ZANIN, Iriana Carla Junqueira. **Estudos da ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana em biofilmes de *Streptococcus mutans***: Efeito na célula e na matriz de polissacarídeos. 2014. 65 f. Tese (Doutorado) - Curso de Odontologia, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/9123>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

MAI-PROCHNOWA, A.; MURPHYA, A.B.; MCLEANB, K.M.; KONGC, M.G.; OSTRIKOVA, K. Atmospheric pressure plasmas: Infection control and bacterial responses. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.43, p.508–517, 2014.

MELLBERG, J. R; PETROU, I. D; GROTE, N. E. A Study of the Ability of an in situ Remineralization Model to Differentiate between the Effects of Two Fluoride Dentifrices that Produced Significantly Different Clinical Caries Results. **J Dent Res**, v. 71, n. 5, p.1169-1172, 1992.

MELO, M. A. S, *et al.* In vitro photodynamic antimicrobial chemotherapy in dentine contaminated by cariogenic bacteria. **Laser Phys**. v. 20, p. 1504–1513, 2010.

MARSH, P. D. Dental plaque: as a microbial biofilm. **Caries Res**; v. 38, p.204–211, 2014.

MEREDITH, N.; SHERIFF, M.; SETCHELL, D.J.; SWANSON, S.A. Measurement of the micro hardness and Young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. **Arch Oral Biol**, v. 41, n. 6, p. 539-545, 1996.

MOISAN, M. *et al.*, Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. **International journal of pharmaceutics**; v. 226, n. 1-2, p. 1-21, 2001.

MOREAU, M.; ORANGE, N.; FEUILLOLEY, M.G.J. Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination. **Biotechnology Advances**. v. 26, p. 610–617, 2008.

MOYE, Z. D.; ZENG, L.; BURNE, R. A. Fueling the caries process: carbohydrate metabolism and gene regulation by *Streptococcus mutans*. **Journal Of Oral Microbiology**. v. 6, n. 1, p. 24878. 2014.

PAES LEME, A. F; BELLATO, C. M; BEDI, G; CURY, J. A. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation— New insight. **J Dent Res**. v. 85, n. 10, p. 878-887, 2006.

- PARK, B.G; KIM, K. S; JUNG, K. H; JUNG, S. B. Effect of atmospheric-pressure plasma treatment on the adhesion characteristics of screen-printed Ag nanoparticles on polyimide. **J Nanosci Nanotechnol.** v. 14, n. 12, p. 9448-9453, 2004.
- PRATTEN, J; WILSON, M; SPRATT, D. A. Characterization of in vitro oral bacterial biofilms by traditional and molecular methods. **Oral Microbiol Immunol.** v. 18, p. 45–49, 2013.
- REESE, S; GUGGENHEIM, B. A Novel TEM Contrasting technique for extracellular polysaccharides in in vitro biofilms. **Microsc Res Tech.** v. 70, p. 816–822, 2007.
- SHEIHAM, A; JAMES, W. P. T. Diet and Dental Caries. **Journal Of Dental Research,** v. 94, n. 10, p. 1341-1347, 10 ago. 2015.
- SCHOLTZ, V; SOUŠKOVÁ, H; HUBKA, V; ŠVARCOVÁ, M; JULÁK, J. Inactivation of human pathogenic dermatophytes by non-thermal plasma. **J Microbiol Methods.** v. 119, p. 53-58, 2015.
- SLADEK, R.E.J. *et al.* Treatment of Streptococcus mutans biofilms with a nonthermal atmospheric plasma. **Letters In Applied Microbiology.** v. 45, n. 3, p.318-323, set. 2007.
- STEPHAN, R. M. Intra-oral hydrogen-ion concentrations associated with dental caries activity. **Journal of dental research,** v. 23, n. 4, p. 257-266, 1944.
- RUPF, Stefan *et al.* Removing Biofilms from Microstructured Titanium Ex Vivo: A Novel Approach Using Atmospheric Plasma Technology. *Plos One,* v. 6, n. 10, E25893 p.1-9, 10 out. 2011.
- TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. **Caries Research,** v. 42, n. 6, p. 409-418, 2008.
- TEIXEIRA, A. H, *et al.* Effect of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on in vitro and in situ Biofilms. **Caries Research,** v. 46, p. 549-554. 2012..
- TENUTA, L. M. A; LIMA, J. E. O; CARDOSO, C. L; TABCHOURY, C. P. M; CURY, J. A. Effect of plaque accumulation and salivary factors on enamel demineralization and plaque composition in situ. **Pesqui Odontol Bras.** v. 17, n. 4, p. 326-331, 2003.
- TRAMINI, P; PÉLISSIER, B; VALCARCEL, J; BONNET, B; MAURY, L. A Raman spectroscopic investigation of dentin and enamel structures modified by lactic acid. **Caries Res.** v. 34, n. 3, p. 233-240, 2000.
- WHITE, D. J; FEATHERSTONE, J. D. B. A Longitudinal Microhardness Analysis of Fluoride Dentifrice Effects on Lesion Progression in vitro. **Caries Res,** v. 21, n. 6, p. 502-512, 1987.

XIAO, J; KOO, H. Structural organization and dynamics of exopolysaccharide matrix and microcolonies formation by *Streptococcus mutans* in biofilms. **J Appl Microbiol.** v. 108, p. 2103– 2113, 2010.

YANG, L., *et al.* Current understanding of multi-species biofilms. **Int J Oral Sci.** v. 3, p. 74-81, 2011.

ZANIN, Iriana Carla Junqueira; GONÇALVES, Reginaldo Bruno; BRUGNERA JUNIOR, Aldo; HOPE, Christopher Keith; PRATTEN, Jonathan. **Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 56 n. 2, p. 324–330, 2005.

ZERO, D. T. In situ caries models. **Adv Dent Res**, v. 9, p. 214-30. 1995

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atividade do plasma de baixa temperatura nos biofilmes orais de *Streptococcus mutans* em formação e maduros - estudo in vitro **Pesquisador:** HELLEN SUZANY FREIRE SILVA **Área Temática:**

Versão: 2

CAAE: 80206617.7.0000.5054

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ **Patrocinador**

Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.435.890

Apresentação do Projeto:

Essa pesquisa busca investigar novos métodos para erradicar o biofilme dental uma vez que nenhum dos agentes antimicrobianos disponíveis atualmente no mercado é eficaz contra biofilmes maduros, necessitando de meios alternativos para o tratamento do biofilme dentário sem prejudicar os tecidos saudáveis. As técnicas desenvolvidas para erradicar bactérias indesejáveis incluem a utilização mais recentemente, de antimicrobianos nano particulados, de superfícies nano estruturadas, de peptídeos antibacterianos e de Plasma de Baixa Temperatura (PBT). O plasma é o quarto estado da matéria, sendo constituído de um gás ionizado neutro, gerado utilizando uma variedade de gases ou misturas de gases como: argônio, hélio, ozônio ou gás oxigênio. É constituído por partículas em interação permanente, essas partículas incluem fótons, elétrons, íons positivos e negativos, átomos, radicais livres e moléculas excitadas e não excitadas, os quais podem contribuir para suas propriedades antibacterianas. Para a realização da pesquisa serão necessários 324 blocos de esmalte humano, obtidos a partir de terceiros molares hígidos, extraídos por razões que não as desta pesquisa. Os dentes serão cortados em cortadeira elétrica com discos de diamante e ao final, obtivemos blocos de esmalte medindo 4 x 4 x 2 mm. Os blocos serão aleatorizados e divididos entre os grupos: G1. Sem Tratamento; G2. Clorexidina 0,12% - Padrão ouro anti-placa; G3. Fluoreto de sódio 0,05% (Padrão ouro anticárie); G4. Plasma de Baixa Temperatura (PBT) 1min; G5. PBT 5 min; G6. PBT 10 min; G7. Argônio (ARG) 1 min; G8. ARG 5 min; G9. ARG 10 min. Em uma placa de 24 poços, biofilmes de *S. mutans*

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275