



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Estudo *in vitro* da cinética de ligação de cálcio em
Streptococcus mutans cultivados
na presença ou ausência de sacarose

Aluno: Guilherme Ishi

Guilherme Ishi

Estudo *in vitro* da cinética de ligação de cálcio em
Streptococcus mutans cultivados
na presença ou ausência de sacarose

Monografia apresentada ao Curso de Odontologia Da
Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP,
para obtenção do diploma
de Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Livia Maria Andaló Tenuta

PIRACICABA

-2010-

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª. / 8099

Is3e	<p>Ishi, Guilherme. Estudo in vitro da cinética de ligação de cálcio em Streptococcus mutans cultivados na presença ou ausência de sacarose / Guilherme Ishi. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010. 26f. : il.</p> <p>Orientadores: Lívia Maria Andaló Tenuta, Jaime Aparecido Cury. Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Bioquímica. 2. Carboidratos. 3. Microbiologia. I. Tenuta, Lívia Maria Andaló. II. Cury, Jaime Aparecido. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">(eras/fop)</p>
------	---

Dedico integralmente este trabalho aos meus familiares.
Meu pai, Armando, minha mãe Joana
e meus irmãos, Thales e Arquimedes
pelo apoio e amor incondicionais,
que tornaram a conclusão deste curso possível.

Agradecimentos

Agradeço à Profª Drª Livia Maria Andaló Tenuta por acreditar que este trabalho seria possível, compartilhando, com muita paciência, um pouco de seu enorme conhecimento, servindo de inspiração como pesquisadora e pessoa.

Agradeço ao Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury pelo apoio e inspiração.

Agradeço aos técnicos de laboratório da Alfredo e Waldomiro e aos alunos de pós-graduação pela colaboração e apoio.

SUMÁRIO

p.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....7

RESUMO.....8

INTRODUÇÃO.....9

OBJETIVOS.....10

DESENVOLVIMENTO.....10

CONCLUSÕES.....24

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....26

LISTAS DE TABELAS E FIGURAS

p.

Figura 1: Viabilidade bacteriana em função do tempo.....	11
Tabela 1: Quantidade de cálcio extraída da placa cultivada em glicose+frutose e da cultivada em sacarose.....	12
Figura 2: Comparação da quantidade de Unidades Formadoras de Colônia em placa de glicose+frutose ou de sacarose.....	14
Tabela 2. Média e desvio padrão (n= 3) da quantidade de cálcio extraída da placa cultivada em glicose+frutose (GF) e da cultivada em sacarose (S). Controles e tratamentos com EDTA, agitação em vórtex ou sonicação.....	16
Figura 3. Percentagem de polissacarídeos extracelulares em função da fonte de carboidrato utilizado para cultivo bacteriano (Glicose+Frutose ou Sacarose).....	17
Figura 4. Ligação de cálcio em função de diferentes tempos de equilíbrio com soluções contendo 1 ou 10 mM de Ca e cultivo bacteriano em glicose+frutose ou sacarose.....	19
Figura 5. Concentração de proteínas em função dos diferentes tempos de coleta.....	20
Figura 6: Ligação de cálcio em função de diferentes tempos de equilíbrio com soluções contendo 1, 5, 10 ou 20 mM de Ca e cultivo bacteriano em glicose+frutose ou sacarose.....	22
Figura 7: Concentração de proteínas em função de diferentes tempos de coleta.....	23

RESUMO

A importância do cálcio (Ca) ligado à superfície bacteriana em biofilmes dentais, como fonte de íons para o fluido do biofilme durante um desafio cariogênico, não tem sido explorada na literatura. Nesse sentido, não se conhece o tempo necessário para a ligação de Ca às bactérias expostas a diferentes concentrações do cátion, bem como a quantidade de Ca liberada durante uma queda de pH. Além disso, o efeito deletério da matriz extracelular rica em polissacarídeos na diminuição dos sítios bacterianos de ligação para Ca em um biofilme é desconhecido. Neste estudo, “pellets” bacterianos de *Streptococcus mutans* cultivados na ausência de sacarose (sem produção de polissacarídeos extracelulares – PEC) ou na sua presença (com produção de PEC) foram equilibrados com tampões pH 7,0 contendo 1, 5, 10 ou 20 mM Ca, em tempos crescentes, sendo determinado o tempo necessário para a saturação das bactérias com Ca nas quatro concentrações. Segundo este estudo, o tempo de 5 minutos foi suficiente para ligar o máximo de cálcio possível nas concentrações verificadas. A ligação de Ca, segundo as concentrações, demonstrou linearidade, mas não proporcionalidade em termos de quantidade de Ca ligada. Finalmente, verificou-se que, dada uma mesma concentração, a ligação de cálcio à superfície bacteriana foi similar tanto no pellet crescido na presença de glicose+frutose, quanto nos crescidos na presença de sacarose apesar das diferentes densidades bacterianas.

Palavras-chave: cálcio, *streptococcus mutans*, polissacarídeos extracelulares, sacarose, fluido do biofilme, *in vitro*.

INTRODUÇÃO

A retenção de íons minerais (cálcio, fosfato e flúor) no biofilme dental tem um papel relevante na sua cariogenicidade, pois eles poderiam funcionar como reservatórios minerais que seriam liberados para o fluido do biofilme durante a queda de pH por exposição a carboidratos fermentáveis (Pearce, 1998). O grau de saturação do fluido do biofilme em relação a esses minerais, durante a queda de pH, determinará a dissolução ou precipitação de hidroxiapatita ou fluorapatita na superfície dental (Margolis & Moreno, 1985; Moreno, 1993), e conseqüentemente a perda mineral líquida. Nesse sentido, embora a importância da presença de flúor no biofilme dental para interferir com o desenvolvimento de cárie seja conhecida (ten Cate, 1999), pouco se sabe sobre a importância relativa dos diversos reservatórios de cálcio (Ca) na redução da desmineralização durante o desafio cariogênico. A retenção do Ca ligado à superfície bacteriana e proteínas da matriz do biofilme ocorre por meio de grupamentos aniônicos, nos quais também pode haver a ligação de íons hidrogênio (H⁺). Assim, a quantidade de íons Ca ligados a essas estruturas diminui quando o pH cai de 7 para 5 (Rose et al., 1993), pois o Ca é substituído nos sítios de ligação pelo íon hidrogênio. Isso sugere que durante um evento de queda de pH no biofilme, o Ca por si só, liberado dos seus sítios de ligação, seja importante para aumentar a disponibilidade de íons minerais no fluido do biofilme. No entanto, estudos sobre a retenção do Ca ligado à superfície bacteriana são incipientes e as condições necessárias para a saturação das bactérias com o cátion não são conhecidas.

Um outro fator envolvido com a cariogenicidade do biofilme dental, além de suas reservas minerais, é a estrutura da matriz, que pode ser alterada de acordo com a condição de formação do biofilme. Assim, o biofilme dental formado na presença de sacarose é repleto de polissacarídeos extracelulares. Estes, além de alterar as propriedades físicas do biofilme, aumentando sua cariogenicidade por facilitar a penetração de substratos para o interior da massa bacteriana (Dibdin and Shellis, 1988; van Houte et al., 1989), também diminuem a densidade de bactérias e conseqüentemente o número de sítios de ligação para Ca disponíveis no biofilme.

Dessa forma, este trabalho objetivou estudar as condições necessárias para atingir o máximo de capacidade de ligação de íons Ca na superfície bacteriana, comparando a capacidade de ligação em massas bacterianas contendo uma matriz pobre ou repleta de polissacarídeos.

OBJETIVOS

Considerando que a importância do Ca ligado à superfície bacteriana em biofilmes dentais não tem sido explorada na literatura, este projeto objetivou estudar condições para saturação de *S. mutans* com íons Ca bem como o efeito deletério da matriz extracelular produzida por essas bactérias na diminuição da quantidade de Ca ligado.

DESENVOLVIMENTO

Realização do estudo piloto sobre tempo de viabilidade bacteriana

Delineamento Experimental

Com o intuito de avaliar se o tempo máximo para estudo da ligação de Ca às bactérias, previsto no projeto, seria adequado para manter a viabilidade bacteriana, um estudo piloto foi realizado, como descrito abaixo.

Streptococcus mutans IB1600 foram cultivados em caldo Todd Hewitt contendo aproximadamente 0,5% de glicose + 0,5% de frutose, de acordo com o protocolo descrito no projeto inicial. O *pellet* bacteriano resultante foi ressuspenso em tampão bicarbonato de potássio e logo após sonificado e centrifugado. Secou-se o *pellet* em papel filtro e o peso total foi dividido em três tubos.

O *pellet* foi tratado com a mesma solução que será usada nos testes de ligação de Ca às bactérias. Assim, adicionou-se tampão PIPES a 0,05 M, pH 7,0 contendo 0,1 M de glicose à cada um dos tubos. Uma alíquota foi coletada no tempo 0 e o restante foi mantido em banho maria à 37°C. Outras alíquotas foram coletadas nos tempos 10, 30, 60 e 120 min. As alíquotas coletadas foram diluídas utilizando solução de NaCl 0,9% e as diluições 10⁻³ à 10⁻⁶ foram semeadas em BHI agar. As placas foram incubadas à 37°C, 10% CO₂ por 48 horas. O número de unidades formadoras de colônia foi determinado.

Resultados

Os dados sobre viabilidade bacteriana são apresentados na Figura 1, abaixo:

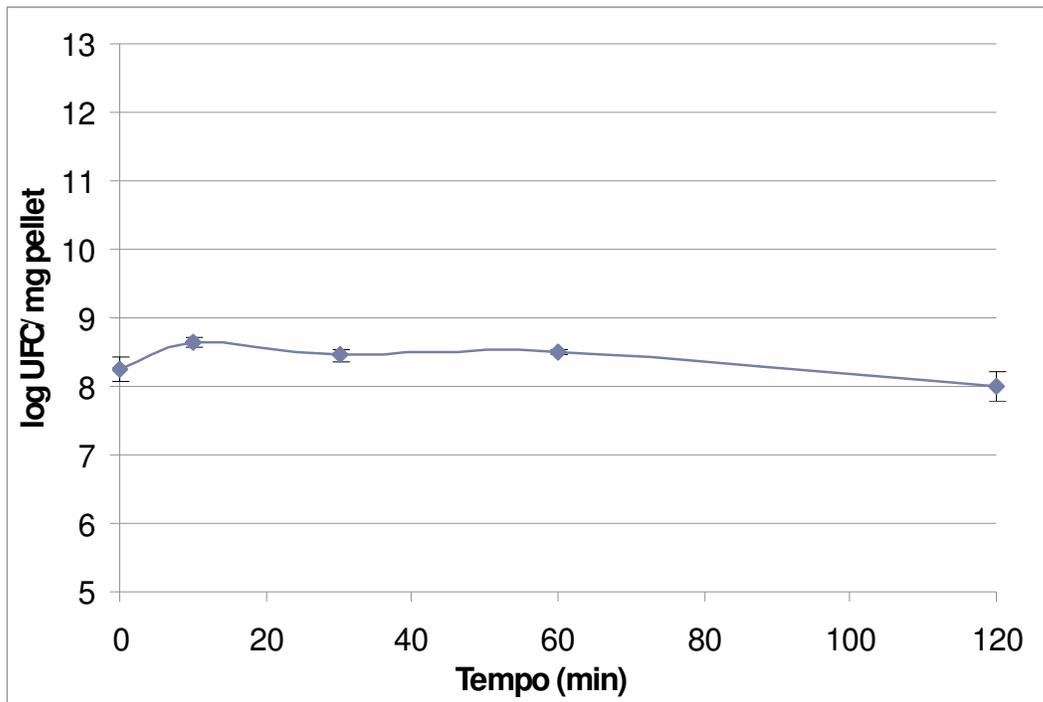


Figura 1: Viabilidade bacteriana (log UFC/mg pellet) em função do tempo (em minutos).

Como pode ser observado na Figura 1, não houve significativa morte bacteriana em função do tempo, já que as contagens bacterianas diferiram menos de uma unidade logarítmica em função do tempo. No entanto, o decréscimo na contagem no tempo de 120 minutos sugere que esse realmente seja mantido como o tempo máximo do experimento.

Realização de estudo para padronização da obtenção do *pellet* bacteriano livre de cálcio

Delineamento Experimental

Para determinação da necessidade de tratamento do *pellet* bacteriano para remoção de Ca residual, previamente aos testes de equilíbrio com as soluções contendo Ca a 1 ou 10 mM, um segundo estudo piloto foi realizado.

Streptococcus mutans IB1600 foram cultivados em caldo Todd Hewitt contendo aproximadamente 0,5% de glicose + 0,5% de frutose ou 1% de sacarose, de acordo com o protocolo descrito no projeto inicial. Os *pellets* foram ressuspensos em tampão bicarbonato de potássio,sonicados e centrifugados, sendo o *pellet* resultante seco em papel filtro.

Os *pellets* foram tratados com água destilada ou solução resfriada de EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético) a 0,01M durante 5 minutos, em triplicata. Os tubos foram agitados em vortex até a dispersão, e então centrifugados. O *pellet* foi congelado para posterior análise.

O cálcio resultante foi extraído com HCl 0,5M por 3 horas em temperatura ambiente sob agitação em agitador rotativo. Os tubos foram centrifugados e o sobrenadante ácido coletado para dosagem de Ca.

Resultados

Os dados de Ca remanescente nos *pellets* tratados com água ou EDTA são apresentados na tabela 1:

Tabela 1: Média e desvio-padrão (n=3) da quantidade de cálcio extraída da placa cultivada em glicose+frutose (GF) e da cultivada em sacarose (S). Controles e tratamentos com EDTA.

	Tratamento	µmol Ca/g pellet
Glicose+Frutose	Controle (água)	1.29 ± 0.16
	EDTA	0.51 ± 0.07
Sacarose	Controle (água)	0.50 ± 0.03
	EDTA	0.25 ± 0.08

Os dados mostram que a concentração de Ca remanescente foi cerca de 2 vezes maior nas bactérias cultivadas na presença de glicose+frutose quando comparadas àquelas cultivadas na presença de sacarose sugerindo que esta última apresenta um efeito deletério no biofilme formado, diminuindo a densidade bacteriana e conseqüentemente o número de sítios de ligação para Ca disponíveis.

Comparando os grupos controle e EDTA, nota-se uma diminuição de cerca de 60% da concentração Ca remanescente para o *pellet* de glicose+frutose e de 50% para o

pellet de sacarose, demonstrando a necessidade do tratamento prévio com EDTA. Cabe lembrar que a concentração de EDTA utilizada (0,01M) seria suficiente para remover todo o Ca possivelmente ligado às bactérias. Portanto, as diferenças entre os grupos parecem representar as características de cada tipo de *pellet* bacteriano.

Realização de estudo para comparar a viabilidade bacteriana e a obtenção de pellet livre de cálcio

Delineamento Experimental

De acordo com os resultados obtidos no piloto 2, um novo experimento foi idealizado para determinar a viabilidade bacteriana dos *pellets* formados na presença de glicose+frutose ou sacarose, além de estudar mais discriminadamente o melhor método para tratamento das bactérias com EDTA para remoção do Ca residual.

Streptococcus mutans IB1600 foram cultivados em caldo Todd Hewitt contendo aproximadamente 0,5% de glicose + 0,5% de frutose ou 1% de sacarose, de acordo com o protocolo descrito no projeto inicial. Os *pellets* foram ressuspensos em tampão bicarbonato de potássio, sonicados e centrifugados, sendo o pellet resultante seco em papel filtro. O experimento foi dividido em duas partes: viabilidade bacteriana e obtenção do pellet livre de cálcio.

Viabilidade Bacteriana

Solução de NaCl 0,9% foi adicionada aos pellets cultivados na presença de glicose+frutose ou sacarose, sendo os tubos agitados em vortex e homogeneizados em sonicador para obter o máximo de dispersão bacteriana. O experimento foi realizado em triplicata. Foram feitas diluições seriadas até 10⁻⁷ seguido de inoculação em agar sangue das amostras de 10⁻⁴ à 10⁻⁷, e incubação à 37°C, 10% CO₂ por 48 horas. O número de unidades formadoras de colônia foi determinado.

Obtenção do pellet livre de cálcio

Dois protocolos foram comparados para avaliar o mais adequado para remoção do Ca residual nos *pellets* bacterianos. Em um deles, as amostras foram ressuspensas em água destilada ou EDTA a 0,01 M, sendo agitadas em vortex e centrifugadas para descartar o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido mais 2 vezes, totalizando 3 lavagens com água ou EDTA. O outro protocolo consistiu na ressuspensão dos pellets em água ou EDTA, sendo os tubos homogeneizados em vortex e então centrifugados para descartar o sobrenadante. Os tratamentos foram realizados em triplicata. O Ca remanescente nos *pellets* tratados com água ou EDTA foi extraído com HCl 0,5 M por 3 horas em temperatura ambiente sob agitação em agitador rotativo. Os tubos foram centrifugados e o sobrenadante ácido coletado para dosagem de Ca e congelado.

Resultados

Os dados sobre a viabilidade bacteriana são apresentados na Figura 2, a seguir:

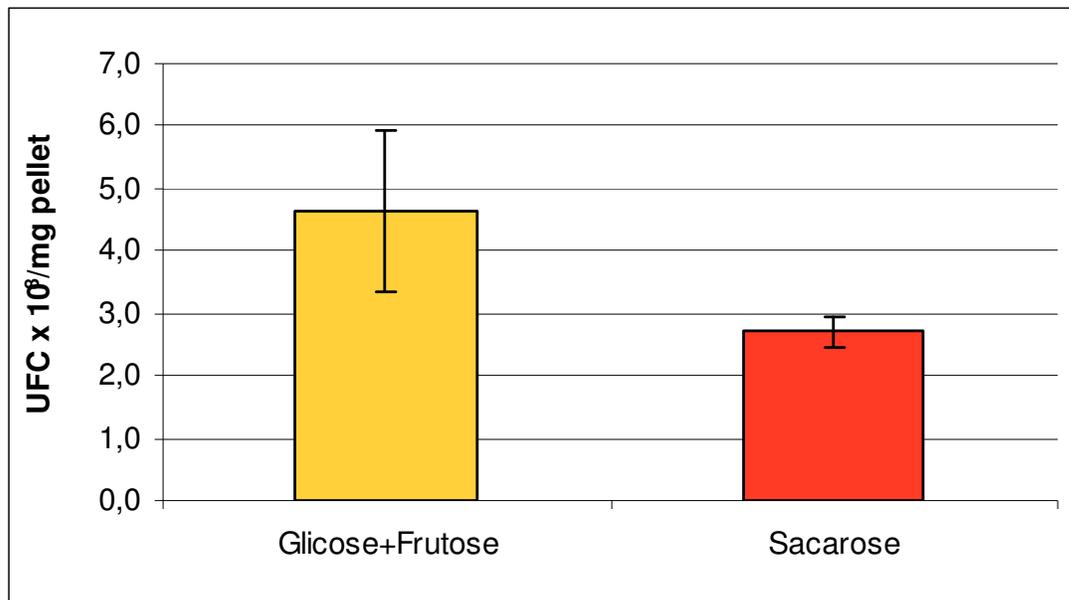


Figura 2: Comparação da quantidade de Unidades Formadoras de Colônia (UFC x 10⁸/mg pellet) em placa de glicose+frutose ou de sacarose.

O número de UFC/mg foi de $4,7 \pm 1,3 \times 10^8$ no biofilme teste cultivado na presença de glicose+frutose e de $2,7 \pm 0,3 \times 10^8$ no biofilme cultivado na presença de sacarose, sendo portanto 1,7 vezes maior para o grupo glicose+frutose. Este

resultado está de acordo com a menor quantidade de Ca ligado às bactérias cultivadas na presença de sacarose (tabela 1), sugerindo que esta diminui a densidade bacteriana.

Resumidamente, esses 3 estudos pilotos foram realizados com o intuito de padronizar a metodologia a ser utilizada no experimento. Segundo estes estudos, os resultados principais foram:

- a. A viabilidade bacteriana não se altera por até 120 min de equilíbrio com solução tampão (portanto o tempo de até 120 minutos poderia ser utilizado no experimento de equilíbrio das bactérias com Ca)
- b. Pré-tratamento das bactérias com EDTA reduz a quantidade de Ca residual ligado
- c. Há um maior número de bactérias em termos de peso úmido para o cultivo na presença de glicose+frutose em comparação com a sacarose. A quantidade de Ca residual após diferentes protocolos de tratamento com EDTA, realizado nesse piloto, não foi apresentada anteriormente, sendo descrita abaixo.

Estudo piloto para obtenção de obtenção do pellet livre de cálcio e determinação dos polissacarídeos extracelulares

Delineamento Experimental

Os resultados de viabilidade bacteriana em função do cultivo na presença de glicose+frutose ou sacarose foram apresentados anteriormente.

Paralelamente, dois protocolos foram comparados para avaliar o mais adequado para remoção do Ca residual nos *pellets* bacterianos cultivados na presença de glicose+frutose ou sacarose. Em um deles, as amostras foram ressuspensas em água destilada ou EDTA a 0,01 M, sendo agitadas em vortex e centrifugadas para descartar o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido mais 2 vezes, totalizando 3 lavagens com água ou EDTA. O outro protocolo consistiu na ressuspensão dos pellets em água ou EDTA, utilizando uma ponta sonicadora na potência de 7 W por 60 segundos para homogeneização. Os tubos foram então centrifugados para descartar o sobrenadante. Os tratamentos foram realizados em triplicata.

O Ca remanescente nos *pellets* tratados com água ou EDTA, utilizando vortex ou sonicação para homogeneização, foi extraído com HCl 0,5 M por 3 horas em temperatura ambiente sob agitação em agitador rotativo. Os tubos foram centrifugados e o sobrenadante ácido coletado para dosagem de Ca e congelado.

Em acréscimo, nesse piloto também foram realizadas análises da concentração de polissacarídeos extracelulares no pellet bacteriano cultivado na presença de glicose+frutose ou sacarose.

Os pellets cultivados na presença de glicose+frutose ou sacarose, utilizados no protocolo de obtenção do pellet livre de cálcio, foram, posteriormente, tratados com NaOH M, sendo agitados em vortex por 15 minutos para extração dos polissacarídeos extracelulares. A dosagem do extrato foi realizada pelo método fenol-sulfúrico.

Resultados

Os dados sobre obtenção de pellet livre de cálcio estão apresentados na Tabela 2. Os dados sobre dosagem de polissacarídeos extracelulares estão apresentados na Figura 3.

Tabela 2. Média e desvio padrão (n= 3) da quantidade de cálcio extraída da placa cultivada em glicose+frutose (GF) e da cultivada em sacarose (S). Controles e tratamentos com EDTA, agitação em vórtex ou sonicação.

		Tratamento	µmol Ca/g pellet
Glicose+Frutose	Controle (água)	Vortex	-*
		Sonicação	1,36 ± 0,27
	EDTA	Vortex	0,58 ± 0,03
		Sonicação	0,70 ± 0,07
Sacarose	Controle (água)	Vortex	0,64 ± 0,02
		Sonicação	0,46 ± 0,01
	EDTA	Vortex	0,40 ± 0,08
		Sonicação	0,44 ± 0,06

* as duplicatas de amostra foram perdidas durante a dosagem

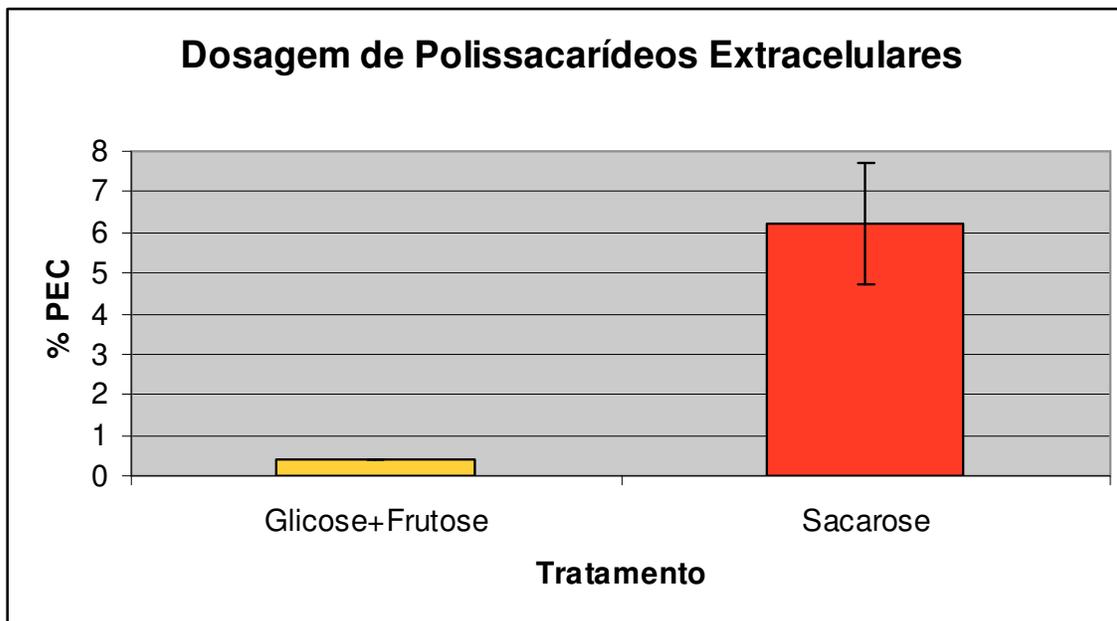


Figura 3. Percentagem de polissacarídeos extracelulares em função da fonte de carboidrato utilizado para cultivo bacteriano (Glicose+Frutose ou Sacarose).

Os dados apresentados na Tabela 2 mostram que o tratamento com EDTA removeu praticamente o dobro de cálcio residual dos pellets crescidos na presença de glicose+frutose em comparação ao tratamento controle ($1,36 \pm 0,27$ contra $0,70 \pm 0,07 \mu\text{mol Ca/g}$) e cerca de 1,5 vez mais de cálcio dos pellets crescidos na presença de sacarose ($0,64 \pm 0,02$ contra $0,40 \pm 0,08 \mu\text{mol Ca/g}$) sendo efetivo e, portanto, adotado como protocolo durante o preparo da placa teste antes dos testes de ligação com cálcio.

Em relação aos tratamentos físicos, a sonicação associada ao tratamento com EDTA não pareceu aumentar a remoção de cálcio residual em comparação ao tratamento com EDTA associado à agitação em vortex. Entretanto, as sonicações durante o preparo da placa teste foram importantes por permitir adequada homogeneização sendo adotadas como protocolo deste ponto em diante.

Como esperado, a dosagem dos polissacarídeos extracelulares apresentou cerca de 0,5% nos pellets cultivados na presença de glicose+frutose em comparação a 6% nos pellets cultivados com sacarose. Isso justifica a menor densidade bacteriana presente no pellet de sacarose em comparação ao pellet de glicose+frutose, já que quando pesamos o pellet de sacarose, estamos pesando

também uma massa de polissacarídeos extracelulares e, portanto, uma menor massa de bactérias.

Estudo do tempo de saturação das bactérias com as soluções contendo cálcio 1 e 10 mM

Delineamento Experimental

Visando estudar o tempo de saturação das bactérias, foi conduzido o seguinte estudo. *Streptococcus mutans* IB1600 foram cultivados em caldo Todd Hewitt contendo aproximadamente 0,5% de glicose + 0,5% de frutose ou 1% de sacarose, de acordo com o protocolo descrito no projeto inicial. Os *pellets* foram ressuspensos intercaladamente em tampão PIPES e EDTA 0,01 M sendo sonicados e centrifugados a cada ressuspensão, sendo o *pellet* resultante seco em papel filtro.

O estudo foi subdividido em 2 partes: ligação de cálcio e dosagem de proteínas:

a) Ligação de cálcio

Alíquotas de pellet bacteriano cultivados na presença de glicose+frutose ou sacarose foram pesadas e distribuídas em 20 tubos. Quatro tubos foram utilizados como tempo 0, sem tratamento com as soluções contendo Ca. Aos demais, em duplicata, foi adicionada solução tampão PIPES contendo 1 ou 10 mM de cálcio, previamente aquecida a 37 °C. Os tubos foram agitados em vórtex até a completa solubilização do pellet bacteriano e mantidos a 37 °C, sendo removidos e centrifugados nos tempos 10, 30, 60 ou 120 minutos a 4 °C, 21000 g por 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o pellet recentrifugado na mesma condição anterior seguido de descarte do sobrenadante. Os pellets foram tratados com HCl 0,5 M por 3 horas em temperatura ambiente sob agitação em agitador rotativo. Os tubos foram centrifugados e o sobrenadante ácido foi coletado para dosagem do cálcio, utilizando técnica colorimétrica em espectrofotômetro Beckman DU-800, com o reagente Arsenazo III.

b) Dosagem de proteínas

O pellet resultante da extração com HCl foi tratado com NaOH M e aquecido até atingir 100 °C, permanecendo nesta temperatura por 15 minutos, para extração de proteínas totais, como indicador de biomassa bacteriana. A dosagem foi realizada através do método de Lowry (BioRad), utilizando o espectrofotômetro Beckman DU-800.

Resultados

Os dados sobre ligação de cálcio em pellets crescidos na presença de glicose + frutose ou sacarose e tratados com soluções de cálcio 1 ou 10 mM estão apresentados na Figura 4, e a dosagem de proteínas consta da Figura 5.

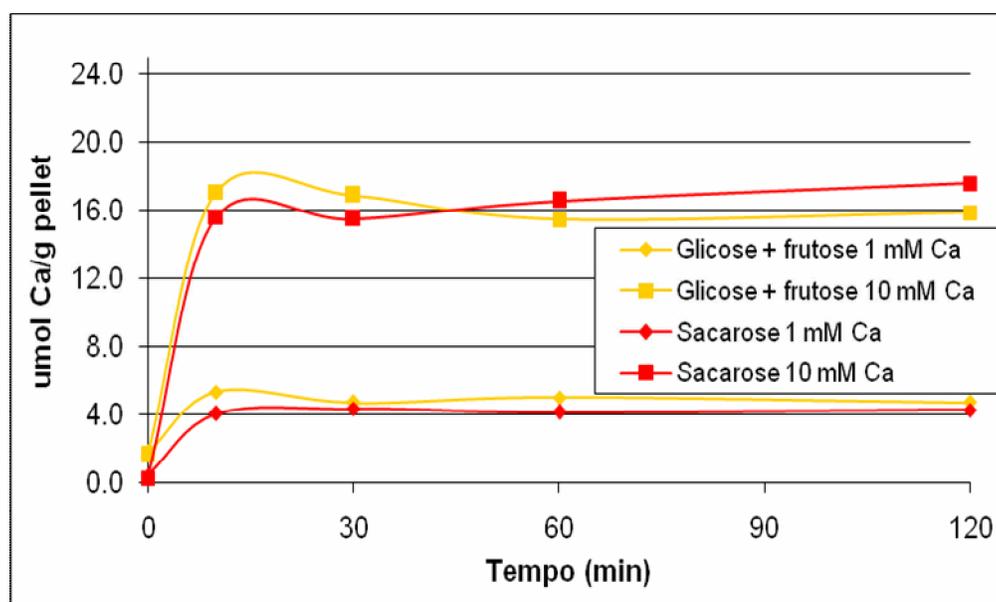


Figura 4. Ligação de cálcio ($\mu\text{mol Ca/g pellet}$) em função de diferentes tempos de equilíbrio com soluções contendo 1 ou 10 mM de Ca e cultivo bacteriano em glicose+frutose ou sacarose

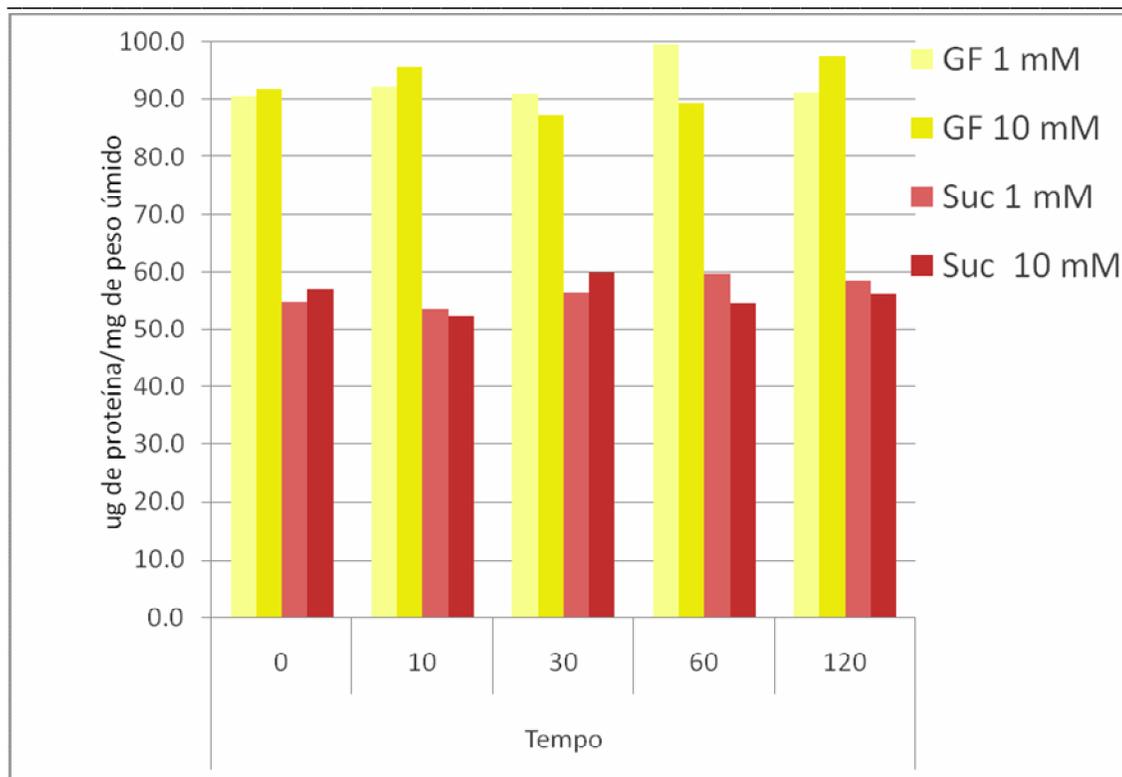


Figura 5. Concentração de proteínas (μg proteína/mg peso úmido pellet) em função dos diferentes tempos de coleta (min).

De acordo com o projeto inicial, os tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos foram testados quanto à ligação de cálcio. Observou-se então, de acordo com os resultados apresentados na Figura 4, que após o tempo de 30 minutos atingiu-se o equilíbrio de ligação de Ca, pois a quantidade de Ca ligado permaneceu praticamente inalterada. Portanto, este tempo foi definido como o máximo para a ligação de cálcio na parede bacteriana.

De acordo com os dados observados na Figura 4, a solução de cálcio 10 mM não aumentou em 10 vezes a ligação do cálcio às bactérias quando comparada à solução de cálcio 1 mM, sugerindo que todos os sítios disponíveis para ligação de átomos de cálcio estariam ocupados, atingindo-se um equilíbrio, não havendo significativamente mais ligação de átomos de cálcio. Outro fato observável foi que, para uma mesma concentração, não houve diferença significativa de ligação de cálcio entre os pellets crescidos na presença de glicose+frutose e os pellets crescidos na presença de sacarose. Este foi um fato inesperado já que, como a densidade bacteriana é maior no pellet crescido na presença de glicose+frutose (comprovado pelos dados apresentados na Figura 5, onde a quantidade de proteínas (outro indicador de biomassa traduzido como número de bactérias, ou seja, quanto

maior o número de bactérias, maior o número de proteínas) é cerca de 1,5 vez maior no pellet crescido na presença de glicose+frutose do que no crescido na presença de sacarose), esperava-se maior ligação de cálcio nesse pellet do que no pellet crescido na presença de sacarose.

A partir dessas observações, a idéia de fazer um novo estudo, utilizando uma concentração intermediária de cálcio ou uma muito mais elevada pareceu razoável e, foi optou-se pela sua realização ao invés de partir diretamente ao teste de liberação de cálcio em diferentes pHs. Além disso, pensou-se em testar tempos intermediários aos 30 minutos, quando se alcançou o máximo de ligação de cálcio. Dessa forma, os 30 minutos seriam o tempo máximo para ligação bacteriana, já que, talvez tempos menores surtiriam o mesmo efeito.

Estudo de saturação das bactérias com soluções contendo cálcio 1, 5, 10 ou 20 mM

Delineamento Experimental

Com o objetivo de testar se soluções com concentrações intermediárias ou mais elevadas surtiriam diferença na ligação de cálcio à parede bacteriana, foi realizado este estudo. *Streptococcus mutans* IB1600 foram cultivados em caldo Todd Hewitt contendo aproximadamente 0,5% de glicose + 0,5% de frutose ou 1% de sacarose, de acordo com o protocolo descrito no projeto inicial. Os *pellets* foram ressuspensos intercaladamente em tampão PIPES e EDTA 0,01 M sendo sonicados e centrifugados a cada ressuspensão, sendo o *pellet* resultante seco em papel filtro.

O estudo foi subdividido em 2 partes: ligação de cálcio e dosagem de proteínas:

a) Ligação de cálcio

Alíquotas de biofilme foram pesadas e distribuídas em 32 tubos. Oito tubos foram utilizados como tempo 0, sendo imediatamente congelados. Aos demais, em duplicata, foi adicionada solução tampão PIPES contendo 1, 5, 10 ou 20 mM de cálcio, previamente aquecida a 37 °C. Os tubos foram mantidos a 37 °C, sendo

removidos e centrifugados nos tempos 5, 10 ou 30 minutos a 4 °C, 21000 g por 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o pellet recentrifugado na mesma condição anterior seguido de descarte do sobrenadante. Os pellets foram tratados com HCl 0,5 M por 3 horas em temperatura ambiente sob agitação em agitador rotativo. Os tubos foram centrifugados e o sobrenadante ácido foi coletado para dosagem do cálcio, como já descrito.

b) Dosagem de proteínas

Os pellets resultantes da extração com HCl foram tratado com NaOH M e aquecidos até atingirem 100 °C, permanecendo nesta temperatura por 15 minutos. A dosagem foi realizada através do método de Lowry (BioRad).

Resultados

Os dados sobre ligação de cálcio em pellets crescidos na presença de glicose+frutose ou sacarose e tratados com soluções de cálcio 1, 5, 10 ou 20 mM estão apresentados na Figura 6. Os dados da dosagem de proteínas estão na Figura 7.

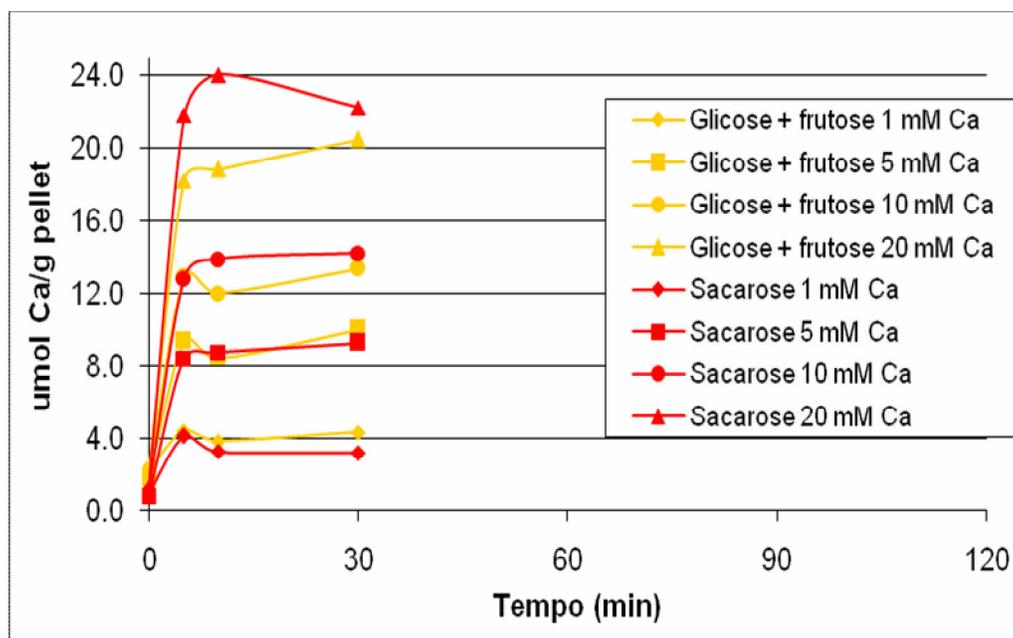


Figura 6. Ligação de cálcio ($\mu\text{mol Ca/g pellet}$) em função de diferentes tempos de equilíbrio com soluções contendo 1, 5, 10 ou 20 mM de Ca e cultivo bacteriano em glicose+frutose ou sacarose

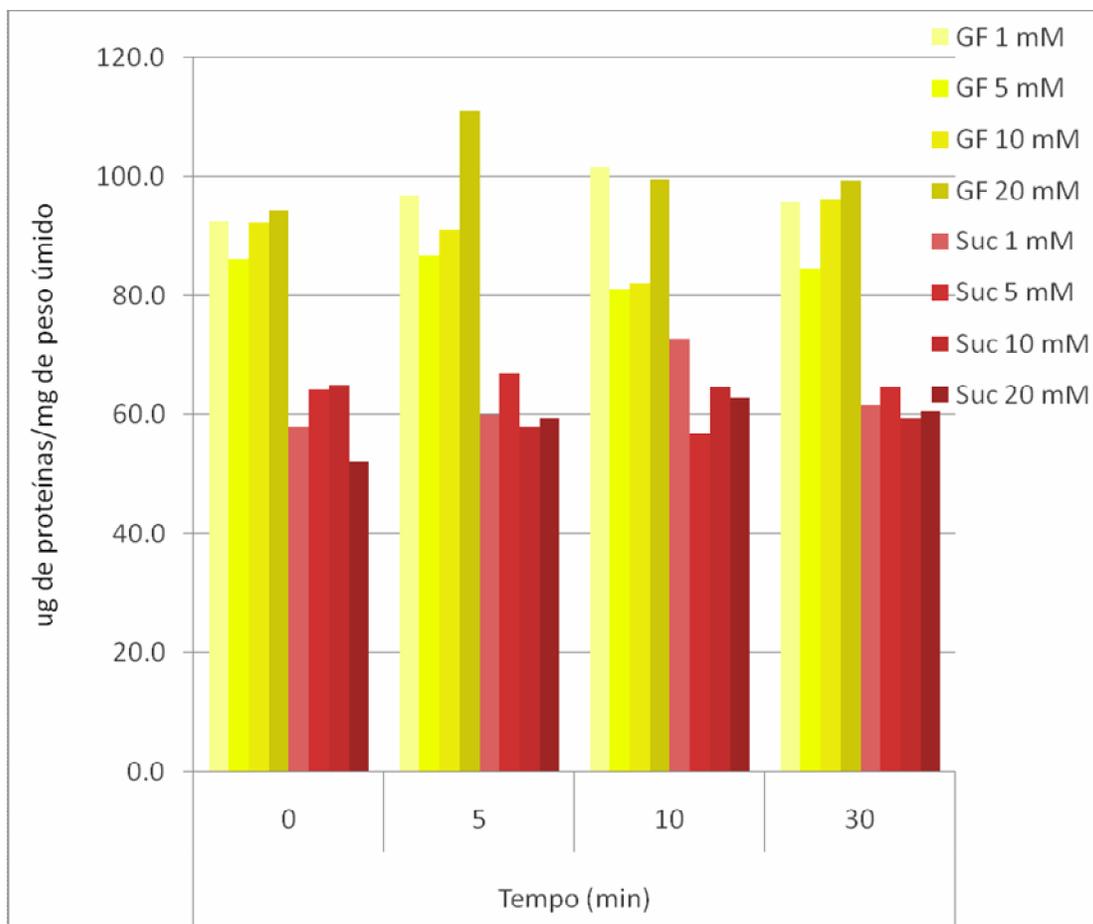


Figura 7. Concentração de proteínas (μg proteína/mg peso úmido pellet) em função de diferentes tempos de coleta (min).

Como podemos observar na Figura 6, a ligação de cálcio seguiu a mesma tendência do experimento anterior, ficando a concentração de 5 mM intermediária às concentrações de 1 e 10 mM e a de 20 mM um pouco maior em relação à concentração de 10 mM.

Ainda observando a mesma figura podemos notar que o tempo de 5 minutos foi suficiente para ligar o máximo de cálcio possível, não necessitando os 30 minutos previstos no experimento anterior.

De acordo com a Figura 6, continuou-se observando que para uma mesma concentração de cálcio, não houve diferença significativa de ligação de cálcio entre os pellets crescidos na presença de glicose+frutose e os pellets crescidos na presença de sacarose apesar de a densidade bacteriana no pellet crescido na

presença de glicose+frutose continuar sendo cerca de 1,5 vez maior do que a do pellet crescido na presença de sacarose (como apresentado na Figura 5).

Outra observação é que o tratamento com a solução contendo 10 mM de Ca não resultou na saturação total das bactérias, como sugerido, uma vez que a concentração de 20 mM resultou em uma maior ligação. Os resultados desse experimento foram extremamente importantes para mostrar que há linearidade na ligação de Ca entre as diferentes concentrações utilizadas (1, 5, 10 ou 20 mM), mas que esses resultados não necessariamente expressam a mesma proporcionalidade em termos da quantidade de Ca ligada (ex: 5 mM não liga 5 vezes mais do que 1 mM).

CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo demonstraram que a ligação de cálcio a superfície bacteriana é rápida, sendo que o tempo de 5 (cinco) minutos foi suficiente para ligar o máximo de cálcio possível. Adicionalmente, a presença de polissacarídeos extracelulares na placa teste cultivada na presença de sacarose não foi reduziu a concentração de cálcio ligado, apesar de a densidade bacteriana ser menor quando comparada com a da placa cultivadas na ausência de sacarose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CURY, J.A.; FRANCISCO, S.B.; SIMÕES, G.S. et al. Effect of a calcium carbonatebased dentifrice on enamel demineralization in situ. **Caries Res.**, v.37, n.3, p.194-9, May/Jun. 2003.
2. CURY, J.A. et al. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res.**, v.34, p.491-7, 2000.
3. DIBDIN, G.H.; SHELLIS R.P. Physical and biochemical studies of Streptococcus mutans sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. **J. Dent. Res.**, v.67, p.890-5, 1988.
4. MARGOLIS, H.C.; MORENO, E.C. Kinetic and thermodynamic aspects of enamel demineralization. **Caries Res.**, v.19, n.1, p.22-35, 1985.
5. MORENO, E.C. Role of Ca-P-F in caries prevention: chemical aspects. **Int. dent. J.**,v.43, p.71-80, Feb. 1993.
6. PEARCE, E. Plaque minerals and dental caries. **N. Zeal. dent. J.**, v.94, p.12-5, Mar. 1998.
7. STEPHAN, R.M. Intra-oral hydrogen-ion concentrations associated with dental caries activity. **J. Dent. Res.**, v.23, p.257-66, 1944.
8. TEN CATE, J.M. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. **Acta Odontol. Scand.**, v.57, p.325-9, 1999.
9. TENUTA, L.M.A.; DEL BEL CURY, A.A.; BORTOLIN, M.C.; VOGEL, G.L.; CURY, J.A. Ca, Pi and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. **J. dent. Res.**, v.85, p.834-8, 2006.
10. VAN HOUTE, J.; RUSSO, J.; PROSTAK, K.S. Increased pH-lowering ability of Streptococcus mutans cell masses associated with extracellular glucan-rich matrix material and the mechanisms involved. **J. Dent. Res.**, v.68, p.451-9, 1989.
11. VOGEL, G.L.; CHOW, L.C.; BROWN, W.E. A microanalytical procedure for the determination of calcium phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. **Caries Res.**, v.17, p.23-31, 1983.