



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Vinícius Cavalcante Morais

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM MATERIAIS
ORTODÔNTICOS

JOÃO PESSOA

2020

Vinícius Cavalcante Morais

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME
EM MATERIAIS ORTODÔNTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado à Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso Superior em Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, como requisito para obtenção do Título de Biotecnologista.

Orientadores:

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes

Bianca Teixeira Morais de Oliveira

JOÃO PESSOA

2020



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

ATA Nº 1 / 2020 - CBIOTEC - DB (18.62)

Nº do Protocolo: 23074.016568/2020-98

João Pessoa-PB, 22 de Março de 2020

Aos vinte dias do mês de março de 2020, às 10:00h, virtualmente, seguindo orientações das normas publicadas pela Portaria nº 090/GR/REITORIA/UFPB. A Banca Examinadora foi composta pelos Professor Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (DB/CBIOTEC/UFPB), orientador e presidente e pelas avaliadoras: 1. Prof(a). Dr(a). Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente (DBCM/CBIOTEC/UFPB) e 2. Gisely Maria Freire Abílio de Castro (DFP/CCS/UFPB). O presidente, por se encontrar doente e isolado em seu domicílio, enviou por mensagem eletrônica cópia do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: “**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM MATERIAIS ORTODÔNTICOS**” do discente Vinícius Cavalcante Morais, matrícula 2016015008, para a banca, solicitando que fizessem o parecer escrito, contemplando sugestões, modificações e alterações, assim como atribuição de uma nota de zero a dez, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reuniões virtuais individuais com ambas professoras, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela **APROVAÇÃO** do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a(ao) discente e demais presentes e eu, Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, peloas demais avaliadoras.

(Assinado digitalmente em 23/03/2020 16:58)

GISELY MARIA FREIRE ABILIO DE CASTRO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
Matrícula: 1723484

(Assinado digitalmente em 22/03/2020 23:26)

TATJANA KEESEN DE SOUZA LIMA CLEMENTE
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
Matrícula: 1889422

(Assinado digitalmente em 22/03/2020 12:49)

ULRICH VASCONCELOS DA ROCHA GOMES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
Matrícula: 2009494

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/documentos/> informando seu número: **1**, ano: **2020**, documento(espécie): **ATA**, data de emissão: **22/03/2020** e o código de verificação: **911712f364**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M827a Morais, Vinicius Cavalcante.

Avaliação da formação de biofilme em materiais ortodônticos / Vinicius Cavalcante Morais. - João Pessoa, 2020.

25 f. : il.

Orientação: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes.

Coorientação: Bianca Teixeira de Morais Oliveira.

TCC (Especialização) - UFPB/CBIOTEC.

1. Microbiota oral. 2. Biofilme. 3. Prótese dentária.
I. Gomes, Ulrich Vasconcelos da Rocha. II. Oliveira, Bianca Teixeira de Morais. III. Título.

UFPB/BC

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos aqueles que resistem apesar das dificuldades e aqueles que fazem o bem sem esperar retribuição

“Ainda é cedo ainda há muito o que errar”

MORAIS, Vinícius Cavalcante. Avaliação da formação de biofilme em materiais ortodônticos, 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 2020

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo verificar a atividade de quatro adoçantes comerciais sobre a formação de biofilme de *Streptococcus mutans* UA159 sobre a superfície de dentes artificiais compostos de resina acrílica. Inicialmente foram determinadas as concentrações inibitória e bactericida mínimas do aspartame, stevia, sucralose e xilitol em concentrações equivalentes a quatro sachês dos produtos (3,2 g/160 mL ou 0,02 g/mL). O ensaio *in vitro* de adesão da bactéria foi realizado em placas de microdiluição. Os dentes foram imersos em saliva artificial por 48h à 37°C. Após, o biofilme formado foi quantificado, em triplicata, pela técnica do cristal violeta. O controle do teste utilizou sacarose 10% e lactose, principal adjuvante da composição dos adoçantes. A absorvância determinada à $\lambda = 590$ nm foi utilizada para calcular e classificar o percentual de adesão de *S. mutans* UA159. Não foi observada concentrações bactericidas e bacteriostáticas, entretanto a presença do adoçante promoveu a redução da adesão bacteriana quando comparada ao controle. As densidades ópticas variaram entre 0,498 e 0,681. O maior e menor percentuais de adesão foi observado, respectivamente, na presença do aspartame e do xilitol. No entanto, em todas as condições avaliadas havia células metabolicamente ativas com capacidade de adesão, sugestivo de maior potencial de desenvolvimento do biofilme e risco de infecções.

Palavras-chave: Microbiota oral. Biofilme. Prótese dentária.

MORAIS, Vinícius Cavalcante. Assessment of biofilm formation in orthodontic materials, 2020. Course Completion Work (Biotechnology) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 2020.

ABSTRACT

This work aimed to verify the activity of four commercial sweeteners in the adhesion of *Streptococcus mutans* UA159 on a surface of artificial teeth composed of acrylic resin. Initially, it was determined the minimal inhibition concentration and minimal bactericide concentration of aspartame, stevia, sucralose and xylitol. Concentrations used were equivalent to four sachets (3.2 g/160 mL or 0.02 g/mL). The *in vitro* adherence test was carried out in microdilution plates. The teeth were immersed in artificial saliva for 48 hours at 37°C. Afterwards, the biofilm formed was quantified, in triplicate, using the violet crystal test. Sucrose 10% and lactose were used as control. Lactose was the main additive in all sweetener's composition. Absorbance at $\lambda=590$ nm was used to calculate and classify the percentage of adhesion of *S. mutans* UA159. No bactericidal and bacteriostatic activity were observed among the sweeteners, however, the presence of them promoted a reduction of the bacterial adhesion when it was compared to the control. Optical densities varied between 0.498 and 0.681. The highest and lowest percentage of adherence was observed, respectively, in the presence of aspartame and xylitol. However, in all conditions evaluated, there were adherent cells, suggesting greater potential for biofilm development and risk of infections.

Key-words: Oral microbiota oral. Biofilm. Dental prosthesis.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Adoçantes empregados neste estudo: composição e recomendação de uso.	14
----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Aspectos de *S. mutans* UA159 desenvolvida em tubos contendo caldo nutriente suplementado com 5 e 10% de sacarose (esquerda) e resultado do teste de atividade antimicrobiana dos conservantes (direita). 17
- Figura 2 Aspecto dos dentes durante o ensaio do cristal violeta. 18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	pH das soluções dos adoçantes.	17
Tabela 2	Formação de biofilme de <i>S. mutans</i> UA159 após incubação de 48h.	18

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 LOCAL DE PESQUISA.....	14
3.2 LINHAGEM TESTE	14
3.3 ADOÇANTES	14
3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....	15
3.5 ENSAIO <i>IN VITRO</i> DA FORMAÇÃO DE BIOFILME	15
3.6 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE ADESÃO E CRITÉRIO DE INTERPRETAÇÃO.....	16
3.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	16
4 RESULTADOS	17
5 DISCUSSÃO	19
6 CONCLUSÃO.....	21
REFERÊNCIAS	22

1 INTRODUÇÃO

A mais recente definição para cárie é um consenso entre os principais pesquisadores da área da odontologia os quais caracterizam e especificam melhor a doença como uma condição dental “mediada por biofilme, modulada pela dieta, multifatorial, não comunicável [...], dinâmica que resulta na perda de minerais de tecidos dentais sólidos. É determinada por fatores biológicos, comportamentais, psicossociais e ambientais. Como consequência desse processo, a lesão da cárie se desenvolve” (MACHIULSKIENE et al., 2020). Este conceito é mais abrangente do que o cunhado no anos 1940, num dos primeiros congressos mundiais sobre o tema, quando se acreditava que a cárie era uma doença dental primariamente de origem bacteriana, caracterizada principalmente pelo potencial de destruição dos dentes (ORLAND et al., 1954). Atualmente sabe-se que o desenvolvimento da cárie ocorre devido a formação de biofilme na superfície dental (placa dentária), mantido nutricionalmente pelos restos da alimentação que permanecem na boca, pelo fluxo salivar e pelo fluido do sulco gengival (AXELSSON; NYSTRÖM; LINDHE, 2004).

A maturação do biofilme dentário inicia o processo cariogênico em que o metabolismo fermentador das bactérias presentes favorece a redução do pH, por conseguinte, elimina muitas das bactérias da microbiota oral estimulando o crescimento de bactérias cariogênicas e promovendo a desmineralização dentária, que quando não tratada evolui para cavitação do dente (KARPIŃSKI; SZKARADKIEWICZ, 2013).

Os principais fatores de desenvolvimento da cárie são a microbiota oral, a presença de carboidratos fermentáveis na dieta e a predisposição genética. Nas duas últimas décadas do século XX os países desenvolvidos registraram quedas nos índices de cárie ainda que açúcares fermentáveis estejam muito presentes na dieta. Isto pode ter ocorrido principalmente em razão da disciplina na higiene bucal, aliada às regulares ao dentista, bem como também ao fato do flúor ter sido introduzido na água e em produtos dentais como um fator de prevenção (KANDELMAN, 1997).

A substituição de adoçantes fermentáveis por não fermentáveis na dieta, nos cremes dentais e gomas de mascar também podem estar associados à redução dos índices de cárie. Estes compostos têm como principais benefícios a segurança para portadores de diabetes, bem como para a saúde dental (IMFELD, 1993).

As diversas espécies bacterianas que ocorrem na placa dentária apresentam algumas características em comum, por exemplo, serem acidófilas e rapidamente

transformarem açúcares em ácidos orgânicos, tais como ácido láctico. As espécies mais prevalentes nas placas são membros dos gêneros *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Este último, mais presente em estágios mais avançados da cárie a partir da dentina. Já *Streptococcus* sp. em especial a *Streptococcus mutans* é reconhecido como um dos principais fatores de iniciação da cárie devido a produção elevada de ácidos orgânicos de cadeia curta, bem como a produção de polissacarídeos extracelulares insolúveis que fortalecem a aderência e a metabolismo de certos açúcares, tais como glicose, frutose, sacarose, lactose entre outros (KARPIŃSKI; SZKARADKIEWICZ, 2013).

S. mutans foi descrita por Clarke em 1924 como é uma bactéria Gram-positiva, facultativa, com temperatura de crescimento ótimo de 37°C, não crescendo em temperaturas inferiores à 22°C. O pH ideal de crescimento ocorre na faixa próxima de 7, não apresentando crescimento em valores de pH inferiores a 5,6 (CLARKE, 1924).

Estudos *in vitro* demonstram que a *S. mutans* pode se fixar em superfícies de dentes artificiais, no entanto a superfície de dentes naturais ainda apresenta uma maior facilidade de fixação da espécie (HAHNEL et al., 2008). Entretanto, cabe ressaltar que a presença de biofilmes em próteses totais, superior ou inferior, representam risco para a saúde, uma vez que infecções sistêmicas importantes podem ter origem na boca (CURTIS; ZENOBIA; DARVEAU, 2011).

No Brasil a necessidade de qualquer tipo de prótese dentária varia de acordo com as faixas etárias de modo que: 15-19 anos 86,3% não necessita, 35-44 anos 31,2% não necessita e 65-74 anos 7,3% não necessita (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012) Dentre os que precisam de prótese dentária removível nem todos conhecem as devidas instruções de higiene, cerca de 60% destes possuem o hábito de dormir com a prótese (LUCENA et al., 2016).

A redução de açúcares na dieta de pessoas que fazem uso de próteses dentárias também pode contribuir para a saúde bucal, não no contexto da redução da cárie, mas sim da prevenção da placa, a qual pode ser envolver em condições que possam evoluir para infecções importantes. Os adoçantes parecem servir como uma boa estratégia de profilaxia. Embora boa parcela da população apresentar certa resistência ao uso de alguns adoçantes sintéticos em razão de algumas informações contraditórias ao respeito destes, é possível embasar o uso em função da segurança (CHATTOPADHYAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2014).

Assim, este trabalho visou avaliar a formação de placa bacteriana na superfície de dentes de PPMA na presença dos adoçantes mais comuns em domicílios brasileiros.

2 OBJETIVOS

Avaliar a ação de quatro adoçantes comerciais sobre a formação de biofilmes de *S. mutans* UA159 na superfície de dentes empregados em próteses dentárias.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Listar a composição dos adoçantes comerciais;
- ❖ Determinar a Concentração Inibitória Mínima dos adoçantes comerciais;
- ❖ Identificar a Concentração Bactericida Mínima dos adoçantes comerciais.
- ❖ Calcular o percentual de adesão da linhagem teste sobre a superfície do dente artificial.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE PESQUISA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA) e no Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos, do Centro de Biotecnologia da UFPB.

3.2 LINHAGEM TESTE

Foi utilizada a linhagem *Streptococcus mutans* UA159, gentilmente cedida pelo Prof. Ricardo Dias de Castro (Departamento de Clínica e Odontologia Social/CCS/UFPB). A linhagem era mantida em ágar nutriente suplementado com 10% de sacarose à 4°C com repiques a cada ensaio realizado.

3.3 ADOÇANTES

Foram avaliados quatro tipos de adoçantes dietéticos na forma comercialmente vendida, adquiridas em um supermercado de grande circulação de clientes na cidade de João Pessoa. As informações técnicas mais importantes, disponíveis nos rótulos estão apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Adoçantes empregados neste estudo: composição e recomendação de uso

Adoçante	Marca (fabricante)	Composição	Modo de preparo (por 160 mL)*
Aspartame	Zero cal® (Cosmed)	Lactose, aspartame e dióxido de silício	1 envelope (0,8 g)
Stevia	Finn® (Cosmed)	Lactose, esteviol e dióxido de silício	1 envelope (0,8 g)
Sucralose	Finn® (Cosmed)	Lactose, sucralose e dióxido de silício	1 envelope (0,8 g)
Xilitol	Linea® (EIC)	Xilitol	6,6 g

* volume equivalente a um copo de suco

3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Inicialmente foram preparadas soluções concentradas dos adoçantes. De forma breve, o conteúdo dos envelopes foi diluído em 160 mL de água destilada de modo a preparar uma solução quatro vezes mais concentrada (20mg/ml para aspartame, stevia e sucralose e 165mg/ml para xilitol) à indicada para consumo (5mg/ml para aspartame, stevia e sucralose e 41,25mg/ml para xilitol). O pH das soluções foi determinado empregando potenciômetro portátil (Quimis, Q400AS).

A CIM dos adoçantes para a *S. mutans* UA 159 foi determinada pela técnica de microdiluição (HADACEK; GREGER, 2000). Em placas de microdiluição de 96 poços com fundo em “U”, os poços foram preenchidos com 100 µL de caldo Müller-Hinton (MH) adicionado com sacarose 10%. Em seguida, 100 µL da solução concentrada de cada adoçante foi transferida aos poços na razão 1:2 e por fim, 10µL da suspensão bacteriana de *S. mutans* UA 159. Esta suspensão foi preparada em solução de NaCl 0,9%, padronizando-se a turbidez equivalente ao tubo n° 1 da escala de MacFarland ($\approx 3 \times 10^8$ UFC/mL). As placas foram incubadas por 24h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ em jarra de anaerobiose (marca, modelo) em atmosfera pobre em oxigênio. Após o período incubação, foram conhecidas as: CIM, definida como a menor concentração em que não foi observada turbidez por inspeção visual (PFALLER; MESSER; COFFMANN, 1995) e a CBM, concentração cujo volume do poço modificou a coloração da solução de resazurina 1% de azul para rosa ou incolor em até 2h à temperatura ambiente (ELSHIKH et al., 2016).

O ensaio foi realizado em triplicata. O controle considerou a esterilidade do caldo MH modificado, das soluções dos adoçantes e da viabilidade da linhagem teste.

3.5 ENSAIO *IN VITRO* DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

O ensaio seguiu, com adaptações, a metodologia do cristal violeta descrita e avaliada por Peeters; Nelis; Coenye (2008). Em placas para cultura de células com 24 poços, cada poço foi preenchido com 1200 µL de uma mistura de 300 µL da solução do adoçante 20mg/ml para aspartame, stevia e sucralose e 165mg/ml para xilitol na CIM/CBM determinada e 900 µL da saliva artificial, com a seguinte composição (em mg/L): NaCl - 0,125; KCl - 0,964; KH_2PO_4 - 0,655; Ureia - 0,2; Na_2SO_4 - 0,763; NH_4Cl - 0,178; NaHCO_3 - 0,631, pH = 6,9 (PIETRZYŃSKA; VOELKEL, 2017). Um dente incisivo à base de resina acrílica de PPMA, cor 66, modelo TXL (VIPI Ltda, Pirassunga-SP, Brasil), medindo 10 mm de largura, foi imerso por poço em condições assépticas. Em

seguida foram transferidos 10 µL de uma solução de extrato de levedura 0,1% e 10 µL da suspensão de *S. mutans* UA 159. O sistema foi incubado por 48h a 37±1°C em jarra de anaerobiose sob atmosfera pobre em oxigênio.

Ao final de 48h de incubação, o dente foi assepticamente retirado do poço, em seguida tratado vigorosamente com água corrente, no intuito de remover resquícios de formas planctônicas e colocado em um tubo de microdiluição esterilizado com capacidade para 2,0 mL, preenchido com 1,5ml de cristal violeta 1% (newprov, pinhais PR). Após um repouso de 20 min à temperatura ambiente, o conteúdo foi removido e o excesso de corante no dente, rinsado vigorosamente com água corrente. Em seguida o dente foi colocado para secar à temperatura ambiente e após seco, transferiu-se o dente para um novo tubo esterilizado, adicionando-se 1,5ml de etanol absoluto (Control Lab Ltda, São José dos Pinhais). Após 15 min a solução cristal violeta-etanol foi lida à 590 nm (NewProv, Pinhais). O controle do teste foi realizado em solução de sacarose 10% e em lactose nas mesmas concentrações dos demais adoçantes. A lactose foi empregada por ser o principal adjuvante na composição dos adoçantes comerciais. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.6 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE ADESÃO E CRITÉRIO DE INTERPRETAÇÃO

O percentual de adesão foi calculado pela diferença entre as médias da medida (triplicata) das densidades ópticas do teste com o adoçante e do controle em solução de sacarose 10%, dividido pela média da densidade óptica (OD₅₉₀) obtida no controle e multiplicando por 100. O valor encontrado classificou a adesão da linhagem *S. mutans* UA 159 como fraca ($\leq 40\%$), moderada (40-80%) ou forte ($> 80\%$) (RODRIGUES et al., 2010).

O valor considerado para denotar a presença de células aderentes foi da leitura da média da OD₅₉₀ do meio sem inóculo $> 0,147$. Assumiu-se que três vezes acima indica a presença de células metabolicamente viáveis e com capacidade aderente (PAGANO et al., 2004). Neste estudo a média da densidade do meio não inoculado foi de 0,049.

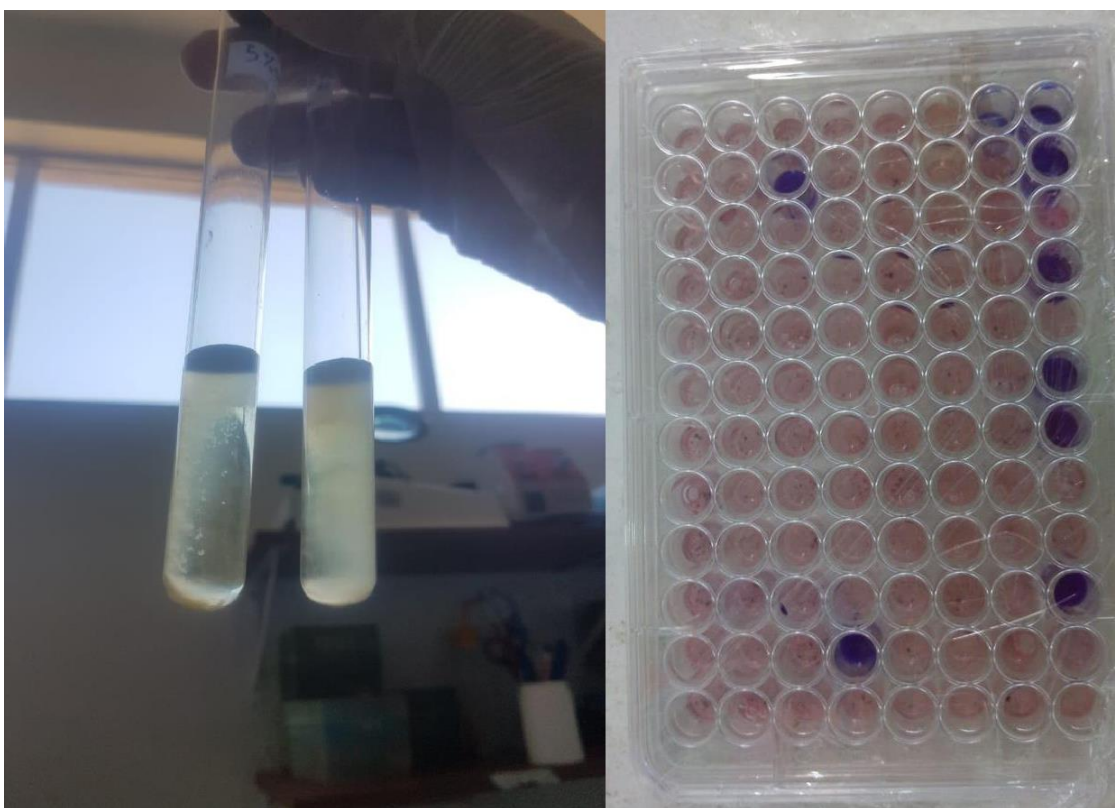
3.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados foram expressos como a média, mais o menos o desvio padrão, das réplicas de cada ensaio.

4 RESULTADOS

Não foi observada atividade antimicrobiana, bactericida ou bacteriostática das quatro marcas de adoçantes testadas sobre a linhagem *S. mutans* UA159. Isto permitiu que o ensaio *in vitro* da formação do biofilme pudesse ser realizado com a concentração equivalente a 4 sachês do produto.

Figura 1 – Aspectos de *S. mutans* UA159 desenvolvida em tubos contendo caldo nutriente suplementado com 5 e 10% de sacarose (esquerda) e resultado do teste de atividade antimicrobiana dos conservantes (direita)



Crédito da imagem: autor

O pH das soluções estava ácido, variando de aproximadamente 4 a 6,5 (Tabela 1).

Tabela 1 – pH das soluções dos adoçantes

Soluções	Aspartame	Stevia	Sucralose	Xilitol	Lactose*	Sacarose**
pH	4,43	6,38	6,44	6,47	5,15	6,28

* adjuvante das formulações de adoçante

** controle do teste

Houve formação de biofilme de *S. mutans* UA159, especialmente na presença de aspartame e stevia. Em todos os casos, a densidade óptica ultrapassou o limite para considerar a presença de células com capacidade aderente, no entanto, em todas as condições testadas a adesão foi considerada fraca. Em complemento, comparados ao controle, houve menos formação de biofilme na superfície do dente. A Figura 2 ilustra os dentes deixados para secagem e a Tabela 2 sumariza o ensaio da formação de biofilme.

Figura 2 – Aspecto dos dentes durante o ensaio do cristal violeta



Crédito da imagem: autor

Tabela 2 – Formação de biofilme de *S. mutans* UA159 após incubação de 48h*

Adoçantes	Densidade óptica (590 nm)	Adesão cellular**
Aspartame	0,681±0,241	- 8,2
Stevia	0,662±0,132	- 10,8
Sucralose	0,581±0,081	- 21,7
Xilitol	0,498±0,004	- 32,9
Lactato (adjuvante da formulação)	0,390±0,251	---
Sacarose (controle)	0,742±0,185	---

*OD_{590nm} > 0,147 indica a presença de células com capacidade aderente

** Os sinais (+) e (-) indicam aumento e redução da adesão, em relação ao controle com sacarose

5 DISCUSSÃO

Os biofilmes são comunidades sésseis microbianas organizadas em uma complexa associação envolvida por uma matriz polimérica adesiva ou EPS. Acredita-se que a maioria das bactérias exibam preferência pela vida em biofilme, no lugar da vida livre, especialmente pela vantagem da resistência aos estresses físicos, químicos e biológicos, aos quais estão expostas (COSTERTON et al., 1999; SANTOS et al. 2018). Neste contexto, a resistência microbiana estabelecida em biofilmes, aos agentes antissépticos, detergentes e antibióticos se mostra um importante risco à saúde (DE SOUZA et al., 2014).

O pH ácido é favorecido pelo metabolismo de *S. mutans* UA159, bem como garante estabilidade aos adoçantes (CHATTOPADHYAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2014; CLARKE, 1924). Em complemento, o estabelecimento do biofilme é governado pela presença de nutrientes, foi verificada a correlação entre a fonte de carbono e a quantidade de células presente no biofilme, bem como da sua arquitetura, seja em forma de pilar, seja na forma de cogumelo (WATNICK; KOLTER, 2000).

Isto parece ter relação com o fato do maior crescimento celular ter sido observado com a sacarose, enquanto que nos poços contendo os adoçantes os resultados levam a supor que todos eles serviram de fonte de carbono e energia, porém comparados ao açúcar, a preferência foi na ordem decrescente de aspartame, stevia, sucralose e xilitol. Isto também indicou que mesmo não sendo fontes preferenciais de carbono, os adoçantes podem ser tolerados e metabolizados por *S. mutans* UA159. Ressalta-se ainda que não houve atividade antimicrobiana dos adoçantes sobre a linhagem teste.

A formação de biofilmes de *S. mutans* na presença de aspartame, stevia e sucralose foi também observado por Giacaman et al. (2013). Os autores utilizaram parâmetros como biomassa, pela quantificação de células viáveis e dos polissacarídeos intracelulares (IPS), além do EPS e verificaram reduções mais significativas na formação de biofilme, atribuindo isto ao fato da menor quantidade de substrato assimilável estar disponível no meio. O aspartame não apresentou grande impacto na formação do biofilme *S. mutans*, assim como houve reduções da formação do biofilme na presença de sucralose e stevia. Adicionalmente, o estudo verificou a ausência de um efeito bactericida com o uso destes adoçantes, justificando isto ao fato de a biomassa final ser superior a inicial.

Embora não possua atividade antimicrobiana, o xilitol também foi descrito como potencial redutor da formação de biofilme oral num estudo que avaliou a ação deste adoçante juntamente com stevia (RAZAK et al., 2017). Apesar da redução da biomassa

no biofilme, os autores observaram paredes mais delgadas e porosas mesmo após 24h de exposição aos dois edulcorantes. Estudos *in vivo* revisados por Yazdani et al. (2019) mostram que o xilitol apresenta um efeito anticariogênico mas por um mecanismo diferente de ação antimicrobiana, mas sim por garantir a secreção de saliva, mantendo o pH bucal estável.

Um estudo realizado no Chile com ossos bovinos simulando dentes humanos, verificou a formação de cárie na presença de adoçantes como stevia, aspartame e sucralose (GIACAMAN et al., 2013). Tais achados podem provocar uma discussão sobre o fato do desgaste provocado nas próteses, por meio da produção de ácidos orgânicos a partir do metabolismo, num processo semelhante ao que ocorre em materiais tais como concreto (GODINHO et al., 2019) e rochas (DOURADO; RIZZO; RIBEIRO, 2015) denominado biodeterioração ou corrosão microbiologicamente induzida.

Além da biodeterioração da prótese, a formação da placa implica risco à saúde. Este trabalho alerta para o fato de que os adoçantes podem favorecer o surgimento de biofilmes de *S. mutans*. Baseado nesta observação, é de se supor que outros tantos patógenos orais importantes possam fazer o mesmo, abrindo novas propostas de investigações. Além disso, a limpeza cuidadosa das próteses deve ser rigorosamente cumprida, assim como estimulada pelos profissionais da área.

6 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais avaliadas, os adoçantes não apresentaram atividade bactericida sob *S. mutans* UA159 e podem ter servido de fonte de carbono para crescimento e formação de biofilme que comparado à sacarose, demonstrou redução da comunidade séssil, mas não por conta de um efeito antimicrobiano. Ao considerar que os experimentos foram realizados *in vitro* pode-se inferir que o efeito na inibição do desenvolvimento de cáries seja mais eficiente *in vivo* em razão da existência de um fluxo constante de saliva, favorecendo a regulação do pH, o que reduz a desmineralização do tecido dentário.

REFERÊNCIAS

AXELSSON, P.; NYSTRÖM, B.; LINDHE, J. The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults: Results after 30 years of maintenance. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, n. 9, p. 749–757, 2004.

CHATTOPADHYAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. Artificial sweeteners - A review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 4, p. 611–621, 2014.

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

CORRÊA, G. O. Resinas acrílicas de uso odontológico à base de polimetilmetacrilato. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**. v. 6, n. 3, p. 63–72, 2014.

COSTERTON, J.W., STEWARD, P.S., GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

CURTIS, M. A.; ZENOBIA, C.; DARVEAU, R. P. The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease. **Cell Host and Microbe**, v. 10, n. 4, p. 302–306, 2011.

DOURADO, M. D. L.; RIZZO, A. C. DE L.; RIBEIRO, R. C. DA C. Avaliação da degradação de rochas ornamentais devido à possível ação microbiana. **Jornada de Iniciação Científica**, p. 5, 2015.

ELSHIKH, M.; AHMED, S.; FUNSTON, S.; DUNLOP, P.; MCGAW, M.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 6, p. 1015–1019, 2016.

- GIACAMAN, R. A.; CAMPOS, P.; MUÑOZ-SANDOVAL, C.; CASTRO, R. J. Cariogenic potential of commercial sweeteners in an experimental biofilm caries model on enamel. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 9, p. 1116–1122, 2013.
- GODINHO, J. P.; FARIAS, M. H. Biodeterioração do concreto armado exposto à agressividade ambiental do reator uasb de uma estação de tratamento de esgoto sanitário. **Revista Técnico-Científica do CREA-PR**. Ed Esp., p. 1–15, 2019.
- HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 3, p. 137–147, 2000.
- HAHNEL, S.; ROSENTRITT, M.; BÜRGERS, R.; HANDEL, G. Adhesion of *Streptococcus mutans* NCTC 10449 to artificial teeth: An *in vitro* study. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 100, n. 4, p. 309–315, 2008.
- IMFELD, T. Efficacy of sweeteners and sugar substitutes in caries prevention. **Caries Research**, v. 27, n. supl. 1, p. 50–55, 1993.
- KANDELMAN, D. Sugar, alternative sweeteners and meal frequency in relation to caries prevention: new perspectives. **British Journal of Nutrition**, v. 77, n. S1, p. S121–S128, 1997.
- KARPIŃSKI, T. M.; SZKARADKIEWICZ, A. K. Microbiology of dental caries: M21-M24. **Journal of Biology and Earth Sciences**, v. 3, n. 3, p. 21–24, 2013.
- MACHIULSKIENE, V.; CAMPUS, G.; CARVALHO, J. C.; DIGE, I.; EKSTRAND, K. R.; JABLONSKI-MOMENI, A.; MALTZ, M.; MANTON, D. J.; MARTIGNON, S.; MARTINEZ-MIER, E. A.; PITTS, N. B.; SCHULTE, A. G.; SPLIETH, C. H.; TENUTA, L. M. A.; ZANDONA, A. F.; NYVAD, B. Terminology of dental caries and dental caries management: Consensus report of a workshop organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. **Caries Research**, v. 54, n. 1, p. 7–14, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal**. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 116p.

NÓBREGA, D. R. M.; LUCENA, A. G.; MEDEIROS, L. A. D. M.; FARIAS, T. S. S.; MEIRA, K. R. S.; MAHON, S. M. O. D. Avaliação da utilização e hábitos de higiene em usuários de prótese dentária removível. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 73, n. 3, p. 193–197, 2016.

ORLAND, F. J.; BLAYNEY, J. R.; HARRISON, R. W.; REYNIERS, J. A.; TREXLER, P. C.; WAGNER, M.; GORDON, H.A.; LUCKEY, T.D. Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries. **Journal of Dental Research**, v. 33, n. 2, p. 147–174, 1954.

PAGANO, P. J.; BUCHANAN, L. V.; DAILEY, C. F.; HAAS, J. V.; VAN ENK, R. A.; GIBSON, J. K. Effects of linezolid on staphylococcal adherence versus time of treatment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 3, p. 226–234, 2004.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, n. 2, p. 157–165, 2008.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; COFFMANN, S. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1094–1097, 1995.

PIETRZYŃSKA, M.; VOELKEL, A. Stability of simulated body fluids such as blood plasma, artificial urine and artificial saliva. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 197–201, 2017.

RAZAK, F. A.; BAHARUDDIN, B. A.; AKBAR, E. F. M.; NORIZAN, A. H.; IBRAHIM, N. F.; MUSA, M. Y. Alternative sweeteners influence the biomass of oral biofilm. **Archives of Oral Biology**, v. 80, n. July 2016, p. 180–184, 2017.

RODRIGUES, L. B.; DOS SANTOS, L. R.; TAGLIARI, V. Z.; RIZZO, N. N.; TRENHAGO, G.; DE OLIVEIRA, A. P.; GOETZ, F.; DO NASCIMENTO, V. PINHEIRO. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1082–1085, 2010.

SANTOS, A. L. S., GALDINO, A. C. M., MELLO, T. P., RAMOS, L. S., BRANQUINHA, M. H., BOLOGNESE, A. M., COLUMBANO NETO, J., ROUDBARY, M. What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective! **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 113, p. 1-7. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760180212>, 2018.

SOUZA, E.L., MEIRA, Q.G.S., BARBOSA, I.M., ATHAYDE, A.J.A.A., CONCEIÇÃO, M.L., SIQUEIRA-JUNIOR, J.P. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 45, n. 1, p. 67-75, 2014.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2675–2679, 2000.

YAZDANI, R.; ALBUJEER, A. N. H.; RAHNAMA, E.; KHARAZIFARD, M. J. Effect of xylitol on salivary *Streptococcus mutans*: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Contemporary Medical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 64–70, 2019.