



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**FORMAÇÃO *IN VITRO* DE BIOFILMES DE *STREPTOCOCCUS  
MUTANS*, *CANDIDA ALBICANS* E DERIVADOS DA SALIVA  
HUMANA EM RESINA COMPOSTA E RESINA NANOHÍBRIDA:  
ANÁLISE DOS BIOFILMES FORMADOS E COMPARAÇÃO**

Trabalho submetido por

**Pedro Fraga Pauli**

para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**Novembro de 2022**





**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**FORMAÇÃO *IN VITRO* DE BIOFILMES DE *STREPTOCOCCUS*  
*MUTANS*, *CANDIDA ALBICANS* E DERIVADOS DA SALIVA HUMANA  
EM RESINA COMPOSTA E RESINA NANOHÍBRIDA: ANÁLISE DOS  
BIOFILMES FORMADOS E COMPARAÇÃO**

Trabalho submetido por

**Pedro Fraga Pauli**

para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por

**Prof. Doutora Lucinda Bessa**

**Novembro de 2022**



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a toda a equipa docente que me acompanhou e que contribuiu tanto para a minha evolução enquanto estudante, pessoa e futuro profissional. Gostaria de agradecer em especial à Professora Lucinda Bessa, que me acompanhou ao longo da elaboração da minha tese de mestrado e que se mostrou sempre disponível para as minhas dúvidas e questões, guiando-me e acompanhando-me de forma tão adequada e benéfica para mim, representando um elemento fundamental nesta última etapa tão importante do meu percurso.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer às instituições que tornaram a elaboração desta tese de mestrado possível, nomeadamente o Instituto Universitário Egas Moniz, que me acolheu ao longo de todos estes anos e que me instruiu e guiou para um futuro profissional de excelência, assim como à STEC, matadouro da margem sul onde recolhi as amostras de esmalte dentário, que tornou possível a elaboração e desenvolvimento da minha pesquisa, através do fornecimento dos materiais necessários. A equipa mostrou-se sempre bastante receptiva e disponível às minhas visitas, proporcionando-me uma experiência diferente e interessante e enriquecendo o meu percurso académico, assim como a minha pesquisa.

Gostaria também de agradecer aos meus pais e ao meu irmão, que me apoiaram incondicionalmente ao longo de toda a minha vida, assim como ao longo do meu percurso enquanto estudante, estendendo-me a mão quando precisei de apoio e de ajuda a ultrapassar os momentos mais difíceis, e que fizeram sempre questão de acompanhar as minhas alegrias, conquistas e o meu sucesso. Devo-lhes a eles o meu maior agradecimento, sendo que sem eles nada disto teria sido possível.

E por último queria agradecer à Carolina, que me ajudou nas fases finais da elaboração desta tese, o teu apoio foi sempre incondicional e nunca me vou esquecer do quão fácil parecia fazer qualquer coisa quando estavas ao meu lado.



## RESUMO

**Introdução:** Na superfície dentária, as comunidades microbianas formam um biofilme complexo, a placadentária. A placa dentária também se forma em materiais restauradores, usados na restauração dentária. Pretendeu-se analisar quantitativa e qualitativamente a capacidade de *S. mutans*, *C. albicans*, mistura de ambas, e da microbiota da saliva em aderir e formar biofilme em duas resinas compostas utilizadas na restauração dentária, em comparação com o esmalte dentário.

**Materiais e métodos:** Biofilmes de *S. mutans*, *C. albicans* e mistos (*S. mutans* + *C. albicans*) foram formados *in vitro* (em meio BHI) durante 48 h em três superfícies diferentes: esmalte dentário – ED, resina composta microhíbrida – Z250 (3M Filtek™ Z250), e resina composta nanohíbrida – TEC (Tetric EvoCeram®). Cada biofilme formado foi analisado quantitativamente pela determinação de unidades formadoras de colónias (UFCs) e qualitativamente por microscopia de fluorescência após coloração Live/Dead.

**Resultados:** No biofilme mono-espécie de *C. albicans*, o número de UFCs contado a partir da TEC foi mais baixo e estatisticamente diferente ( $p < 0.05$ ) do contado a partir do ED e da Z250. O biofilme de *S. mutans* e misto (*C. albicans* + *S. mutans*) formados em cada uma das superfícies foram semelhantes. Os biofilmes formados a partir da saliva de três indivíduos com baixo risco de cárie e de três indivíduos com alto/moderado risco não apresentaram diferenças significativas. Contudo, devido ao baixo número de indivíduos e ausência de ensaios replicados não foi possível chegar a um resultado com relevância clínica.

**Conclusão:** De um modo geral, as superfícies Z250 e TEC proporcionaram a formação de um biofilme semelhante àquele formado no ED. Apenas o biofilme de *C. albicans* na TEC se apresentou menos viável. Os resultados obtidos a partir da saliva de indivíduos com baixo e com moderado/alto risco de cárie foram preliminares não sendo suficientes para chegar a conclusões definitivas.

**Palavras-chave:** Biofilmes Orais, *Candida albicans*, Resinas Compostas, *Streptococcus mutans*.



## ABSTRACT

**Introduction:** On the tooth surface, the microbial communities form a complex biofilm, the dental plaque. The dental plaque is also formed in restorative materials used in dental restoration. We wanted to analyze quantitatively and qualitatively the capability of *S. mutans*, *C. albicans*, a mixture of both and saliva derived microbiota of adhering and forming biofilms on two resin composites, in comparison to tooth enamel.

**Materials and methods:** *C. albicans*, *S. mutans* and mixed biofilms (*S. mutans* + *C. albicans*) were formed *in vitro* (in BHI broth) for 48 h on three distinct surfaces: tooth enamel – ED, microhybrid composite resin – Z250 (3M Filtek™ Z250), and nanohybrid composite resin – TEC (Tetric EvoCeram®). Each biofilm formed was analyzed quantitatively through the determination of colony forming units (CFUs) and qualitatively through fluorescence microscopy after Live/Dead staining.

**Results:** On the mono-species *C. albicans* biofilm, the number of CFUs counted on TEC was lower and statistically different ( $p < 0.05$ ) than the ones counted on ED and Z250. The *S. mutans* biofilm and the mixed biofilm (*C. albicans* + *S. mutans*) formed on the three surfaces were considerably similar. The biofilms formed from the saliva of three individuals with low risk and three with high risk of dental caries did not present significant differences. However, due to the low number of patients in each risk group, and the fact that only one experiment was done with the saliva samples, it was not possible to reach a conclusion with clinical meaning.

**Conclusion:** Generally, the surfaces TEC and Z250 allowed the formation of single- and dual-species biofilms that were similar to that formed on ED. Only *C. albicans* biofilm formed on TEC was less viable. The results obtained from the saliva of individuals with low and high caries risk were preliminary, and not enough to reach definite conclusions.

**Keywords:** Oral biofilms, *Candida albicans*, Composite resins, *Streptococcus mutans*.



# ÍNDICE

|                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>                                                    | <b>7</b>  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>                                                | <b>11</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                        | <b>13</b> |
| 1.1. Microbioma Humano.....                                                      | 13        |
| 1.2. Microbioma Oral.....                                                        | 15        |
| 1.3. Biofilme Oral.....                                                          | 16        |
| 1.4. <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Candida albicans</i> na cavidade oral..... | 18        |
| 1.5. Cárie dentária e seu tratamento.....                                        | 19        |
| 1.6. Principais materiais utilizados na restauração dentária.....                | 20        |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>                                                         | <b>23</b> |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                               | <b>25</b> |
| 3.1. Superfícies utilizadas e sua preparação.....                                | 25        |
| 3.2. Microrganismos e condições de cultura.....                                  | 28        |
| 3.3. Recolha da saliva.....                                                      | 28        |
| 3.4. Formação dos biofilmes.....                                                 | 29        |
| 3.4.1. Formação de biofilme de <i>C. albicans</i> .....                          | 31        |
| 3.4.2. Formação de biofilme de <i>S. mutans</i> .....                            | 31        |

|                                                                                                                                                |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.4.3. Formação de biofilme misto ( <i>C. albicans</i> + <i>S. mutans</i> ).....                                                               | 32        |
| 3.4.4. Formação de biofilme a partir da saliva.....                                                                                            | 32        |
| 3.5. Avaliação dos biofilmes formados.....                                                                                                     | 33        |
| 3.5.1. Avaliação quantitativa.....                                                                                                             | 33        |
| 3.5.2. Avaliação qualitativa.....                                                                                                              | 34        |
| 3.6. Análise estatística.....                                                                                                                  | 35        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                          | <b>36</b> |
| 4.1. Análise qualitativa microscópica da viabilidade dos biofilmes de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i> formados nas três superfícies..... | 36        |
| 4.2. Quantificação de UFCs dos biofilmes de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i> formados nas três superfícies.....                           | 39        |
| 4.3. Quantificação de UFCs dos biofilmes derivados da saliva formados nas três superfícies.....                                                | 43        |
| 4.4. Análise qualitativa microscópica da viabilidade dos biofilmes derivados da saliva formados nas três superfícies.....                      | 49        |
| <b>5. CONCLUSÕES.....</b>                                                                                                                      | <b>51</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>                                                                                                                       | <b>53</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Fig. 1</b> – Esquema que exemplifica a composição do microbioma.....                                                                                                                                                                | <b>14</b> |
| <b>Fig. 2</b> – A disbiose do microbioma está associada à passagem de um estado de saúde para um estado de doença.....                                                                                                                 | <b>15</b> |
| <b>Fig. 3</b> – Sequência da formação do biofilme, que acontece em 4 etapas: adesão de microrganismos à superfície; colonização e organização individualizada das células; secreção de EPS e disseminação das células do biofilme..... | <b>17</b> |
| <b>Fig. 4</b> – Filtek™ Z250 Universal Restorative.....                                                                                                                                                                                | <b>21</b> |
| <b>Fig. 5</b> – Tetric EvoCeram® Bulk Fill.....                                                                                                                                                                                        | <b>21</b> |
| <b>Fig. 6</b> – Superfícies de resina, TEC e Z250.....                                                                                                                                                                                 | <b>26</b> |
| <b>Fig. 7</b> – Dentes anteriores de bovino.....                                                                                                                                                                                       | <b>27</b> |
| <b>Fig. 8</b> – Superfícies de esmalte dentário de dente anterior bovino.....                                                                                                                                                          | <b>27</b> |
| <b>Fig. 9</b> – Esquema da placa de 24 poços com superfícies de Z250, TEC e ED colocadas para posterior inoculação e ensaios.....                                                                                                      | <b>30</b> |
| <b>Fig. 10</b> – Avaliação das UFC/cm <sup>2</sup> de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i> a partir dos biofilmes de uma só espécie ou do biofilme misto (MIX) formados em cada superfície (Z250, TEC e ED).....                      | <b>39</b> |
| <b>Fig. 11</b> – Imagens do biofilme de <i>C. albicans</i> formado nas superfícies de Z250, TEC e ED, obtidas após coloração Live/Dead e observação ao microscópio de fluorescência nas objetivas de 20 e 100×.....                    | <b>41</b> |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Fig. 12</b> – Imagens do biofilme de <i>S. mutans</i> formado nas superfícies de Z250, TEC e ED, obtidas após coloração Live/Dead e observação ao microscópio de fluorescência nas objetivas de 20 e 100×.....                                                                                                                                                                                                   | <b>42</b> |
| <b>Fig. 13</b> – Imagens do biofilme misto, <i>C. albicans</i> + <i>S. mutans</i> , formado nas superfícies de Z250, TEC e ED, obtidas após coloração Live/Dead e observação ao microscópio de fluorescência nas objetivas de 20 e 100×.....                                                                                                                                                                        | <b>43</b> |
| <b>Fig. 14</b> – Enumeração dos UFCs /cm <sup>2</sup> de microrganismos totais (A e B), de leveduras (C e D) e de anaeróbios (E e F) obtidos dos biofilmes formados a partir da saliva de indivíduos ( <b>a</b> , <b>b</b> e <b>c</b> ) com baixo risco de cárie (A, C e E) e de indivíduos ( <b>x</b> , <b>y</b> e <b>z</b> ) com moderado/alto risco de cárie (B, D e F), em cada superfície, Z250, TEC e ED..... | <b>45</b> |
| <b>Fig. 15</b> – Imagem aleatória obtida a partir de uma placa de TSA para contagem de UFCs de microrganismos totais a partir da saliva de um dos indivíduos. São visíveis diferentes tipos de morfologias de colônias.....                                                                                                                                                                                         | <b>46</b> |
| <b>Fig. 16</b> – Imagem aleatória obtida a partir de uma placa de SAB para contagem de UFCs de leveduras a partir da saliva de um dos indivíduos. São visíveis colônias grandes que foram contadas como leveduras. Também são visíveis pequenas colônias, mas que não foram contadas como sendo típicas de leveduras.....                                                                                           | <b>47</b> |
| <b>Fig. 17</b> – Imagem aleatória obtida a partir de uma placa de MH5% para contagem de UFCs de anaeróbios a partir da saliva de um dos indivíduos. São visíveis colônias de morfologias distintas e causadores de diferentes tipos de hemólise.....                                                                                                                                                                | <b>48</b> |
| <b>Fig. 18</b> - Imagens dos biofilmes derivados da saliva de três indivíduos com baixo risco de cárie. Os biofilmes foram formados nas superfícies de Z250, TEC e ED, e observados no microscópio de fluorescência após coloração Live/Dead, na ampliação de 1000×.....                                                                                                                                            | <b>50</b> |
| <b>Fig. 19</b> – Imagens dos biofilmes derivados de saliva de três indivíduos com moderado/alto risco de cárie. Os biofilmes foram formados nas superfícies de Z250,                                                                                                                                                                                                                                                |           |

|                                                                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| TEC e ED, e observados ao microscópio de fluorescência após coloração Live/Dead,<br>na ampliação de 1000×..... | <b>51</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ANOVA** – Análise de variância (Analysis of variance)

**ATCC** - American Type Culture Collection

**BHI** – Brain heart infusion

**CAMBRA** – Caries Management by Risk Assessment

**UFC** – Unidades formadoras de colônias

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**ED** - Esmalte dentário

**EPS** – Substâncias poliméricas extracelulares (extracellular polymeric substances)

**MH5%** - Mueller Hinton + 5% Sangue

**OD** – Densidade ótica

**PBS** – Tampão Fosfato Salino

(Phosphate-buffered saline)

**SAB** – Sabouraud Dextrose agar

**SiO<sub>2</sub>** – Dióxido de silício

**TEC** - Tetric EvoCeram®

**TSA** – Tryptone Soya Agar

**UV** – Ultravioleta

**Z250** - 3M Filtek™ Z250

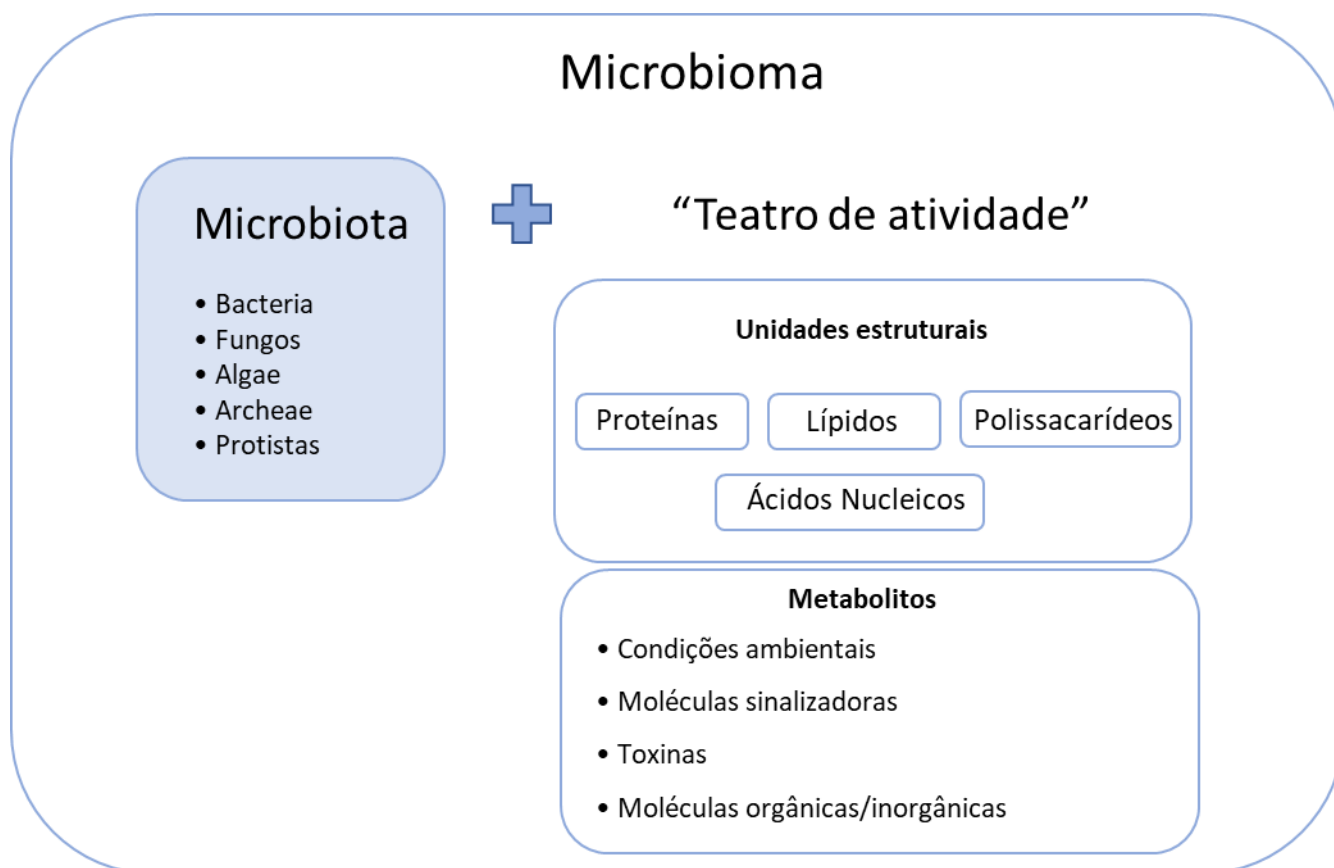


## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Microbioma humano

Estima-se que o número total de bactérias num “homem adulto referência com 70 kg” é cerca de  $3.8 \times 10^{13}$ , número na mesma ordem de grandeza que o número de células humanas, que são aproximadamente  $3.0 \times 10^{13}$  (Sender et al., 2016). Contudo há que notar que a microbiota humana não é apenas constituída por bactérias, mas inclui também fungos, protistas, archaea e algae.

Muito se tem ouvido falar, particularmente na última década, de vários estudos sobre o microbioma humano e da sua importância em múltiplos estados de doença. No entanto, nem todos os investigadores definem microbioma da mesma maneira, nem todos se guiam pelo mesmo conceito embora todos lhe chamem microbioma. Nota-se que há uma grande diversidade de definições do conceito microbioma. No sentido de colmatar essa lacuna Berg et al. (Berg et al., 2020) veio recentemente propor uma definição uniformizada e refinada do conceito de microbioma no sentido de vir a ser tida em conta de forma homogênea nos estudos futuros. Assim, definem microbioma como a comunidade de microrganismos (microbiota), mas também todo o espectro molecular produzido por microrganismos, como as suas unidades estruturais (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos e polissacarídeos), metabolitos (toxinas, moléculas sinalizadoras, orgânicas e inorgânicas), como também as moléculas produzidas por hospedeiros coexistentes, que são estruturadas pelas condições existentes (Berg et al., 2020) (Fig. 1).

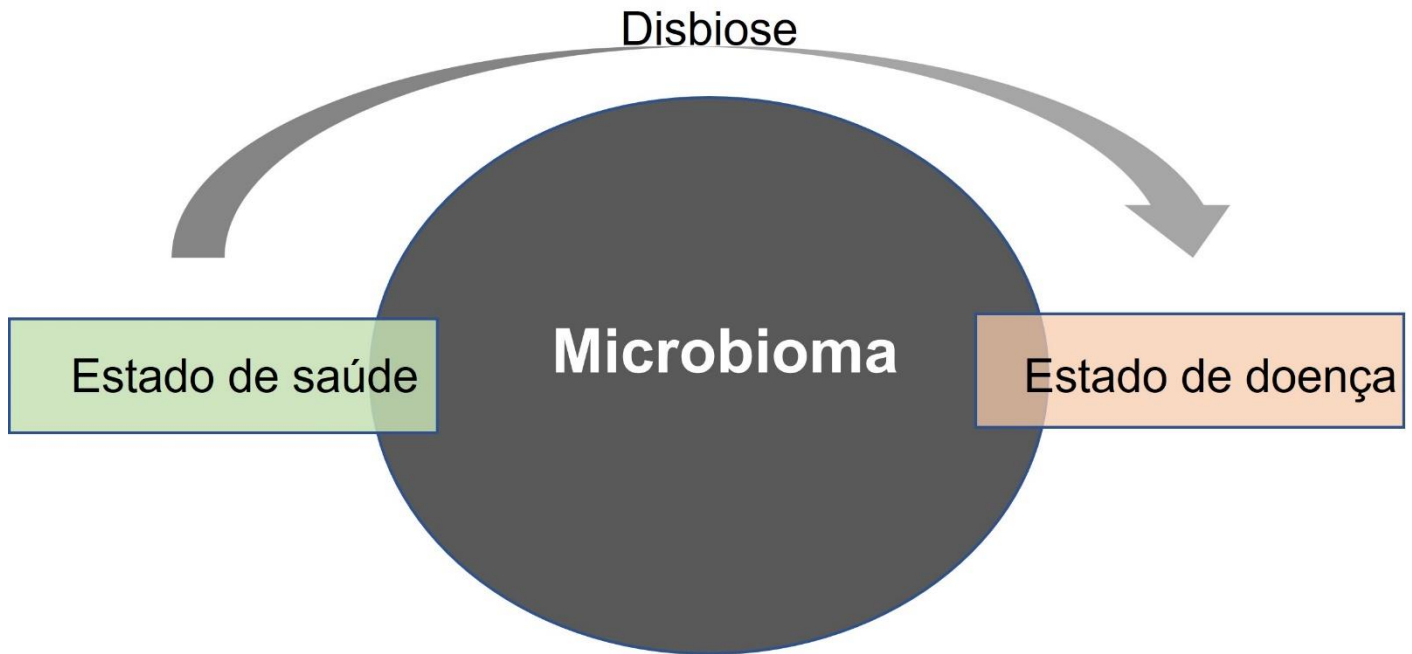


**Fig. 1** – Esquema que exemplifica a composição do microbioma. Imagem adaptada de (Berg et al., 2020).

A comunidade microbiana interage simbioticamente entre si e com o hospedeiro, e vai sofrendo alterações temporais e estruturais (Banerjee et al., 2018). É consensual que o hospedeiro e a sua microbiota associada co-evoluem um com o outro, e em conjunto formam o que é designado de holobionte, e, portanto, nesta perspetiva holística, o estado de doença do holobionte está ligado à disbiose, ao baixo nível de diversidade da microbiota do hospedeiro e à sua variabilidade (Berg et al., 2020).

É fundamental ter em consideração que a composição da microbiota humana é influenciada pelo genótipo do hospedeiro, condições ambientais e dieta. A disbiose é caracterizada pela perda da biodiversidade, que induz uma alteração funcional da composição do microbioma num determinado ecossistema, tornando-o suscetível a microrganismos patogénicos (Berg et al., 2020; Iebba et al., 2016; Tiffany & Bäumler, 2019).

Assim, a disbiose pode implicar uma perda de microrganismos benéficos, propagação de microrganismos patogénicos e até mesmo a perda de diversidade geral (Tiffany & Bäumler, 2019), e está associada à passagem de um estado de saúde a um estado de doença (Fig. 2).



**Fig. 2** – A disbiose do microbioma está associada à passagem de um estado de saúde para um estado de doença.

Dentro do microbioma humano podemos particularizar vários microbiomas, como o microbioma intestinal e o microbioma oral entre outros.

## 1.2. Microbioma oral

O microbioma oral é um ecossistema composto por microrganismos como vírus, fungos, bactérias e protozoários, sendo um dos mais complexos e diversificados do corpo humano, a seguir ao microbioma intestinal (Deo et al., 2019). O microbioma oral está organizado e estruturado, geralmente, na forma de biofilme, desempenhando um papel fundamental na manutenção da homeostase oral, proteção e prevenção de doenças (Deo & Deshmukh, 2019).

As características do microbioma oral são influenciadas por uma dualidade de fatores genéticos e ambientais, nos quais se incluem idade, dieta, pobre higiene oral, tabagismo e até mesmo presença de materiais de restauração dentária, implantes, próteses dentárias, doenças sistêmicas e medicação (Bacali et al., 2022) (Cintoni et al., 2019). Estes podem influenciar a composição do microbioma oral de forma negativa, induzindo um estado disbiótico e alterando o equilíbrio entre o microbioma do hospedeiro e potenciais microrganismos patogênicos (Bacali et al., 2022) (Cintoni et al., 2019).

Apesar da cavidade oral estar coberta na sua totalidade por epitélio escamoso, é possível distinguir vários nichos, sendo estes microambientes habitados por diferentes comunidades microbianas, como a placa sub- e supragengival, sulco gengival, palato duro, dorso da língua, zona sublingual e mucosa jugal, tendo cada um uma microbiota diferente (Bacali et al., 2022) (Lu et al., 2019).

O “Human Microbiome Project” (<https://www.hmpdacc.org/>) definiu 9 nichos na cavidade oral humana no estado de saúde: dorso da língua, palato duro, amígdalas, placa sub e supragengival na superfície dentária, gengiva queratinizada, mucosa jugal, garganta e saliva. Cada nicho tem o seu microbioma associado.

### **1.3. Biofilme oral**

Os microrganismos da cavidade oral podem formar biofilmes complexos, em que essa comunidade microbiana se encontra envolvida numa matriz polimérica (EPS – *extracellular polymeric substances*) derivada ou dos seus produtos metabólicos, podendo também incluir fatores do hospedeiro como glicoproteínas salivares (Thurnheer & Belibasakis, 2014) (Hwang et al., 2017).

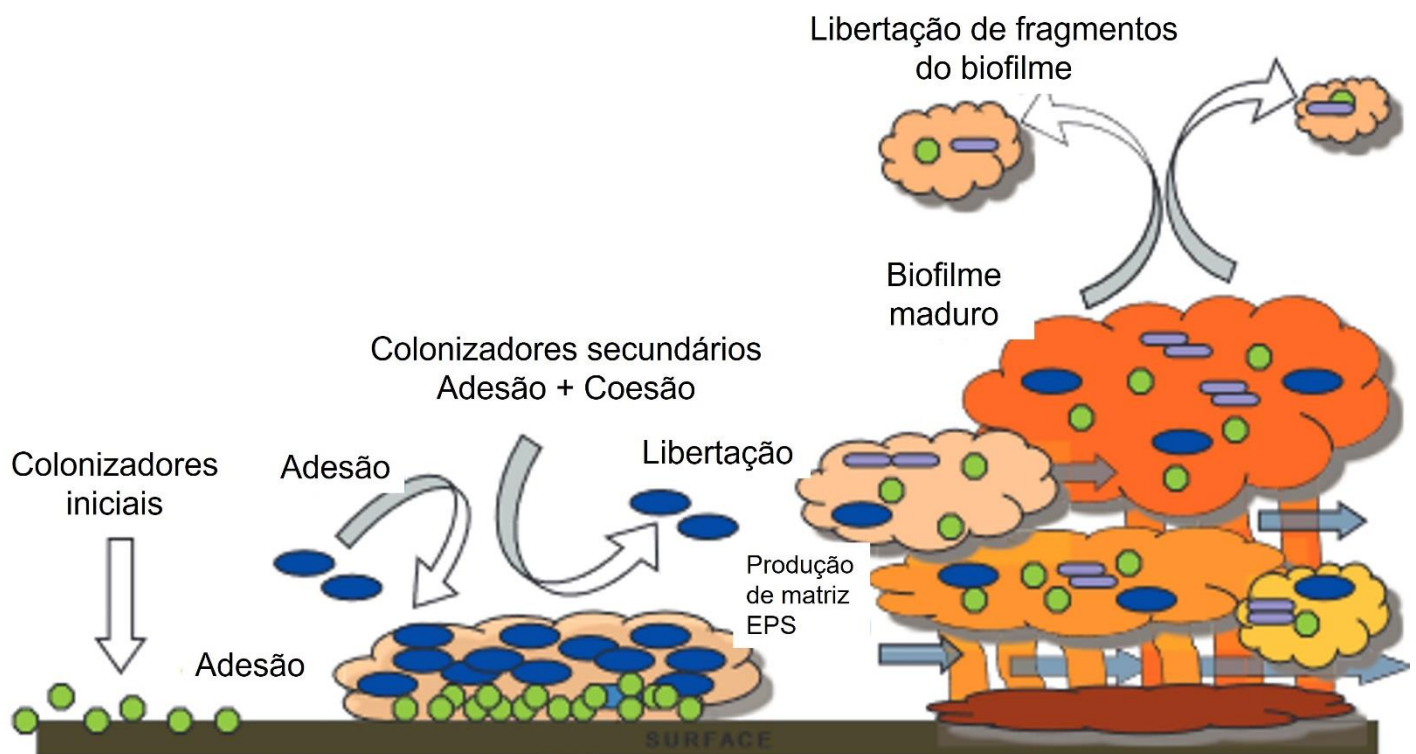
Este biofilme é altamente especializado e organizado, envolvendo várias espécies de microrganismos, localizado, principalmente, na superfície dentária em forma de matriz (Struzycka, 2014)

Para haver formação de biofilme, os microrganismos têm de se aderir primeiro à superfície, e fazem-no através de pilus, proteínas e adesinas polissacarídeas (Berger et al., 2018).

Sendo a adesão de microrganismos a uma superfície oral o primeiro passo para a formação do biofilme, não é suficiente, devendo ocorrer uma sequência organizada de eventos:

- 1º: as bactérias colonizadoras aderem à superfície;
- 2º: essas bactérias multiplicam-se, formando microcolônias individualizadas secretoras de matriz EPS;
- 3º: essas microcolônias, embebidas na matriz, proliferam, levando à formação de uma comunidade densa organizada e estruturada tridimensionalmente, que é o biofilme maduro;
- 4º algumas células microbianas destacam-se do biofilme, levando à propagação do mesmo em novos ambientes (Seneviratne, Zhang & Samaranayake, 2011);

Na Fig. 3, podemos ver as etapas de formação do biofilme oral.



**Fig. 3** – Sequência da formação do biofilme, que acontece em 4 etapas: adesão de microrganismos à superfície; colonização e organização individualizada das células; secreção de EPS e disseminação das células do biofilme. Imagem retirada de (Seneviratne, Zhang & Samaranayake, 2011).

Inseridas no biofilme estão microcolônias densas de bactérias em crescimento ativo, que aderem à estrutura dentária produzindo microbiota acidogénica, levando à desmineralização do esmalte e ao aparecimento de cáries (Kim et al., 2017).

A higiene oral diária através da escovagem e a utilização de fio dentário cria um ciclo de remoção do biofilme (placa dentária) e subsequente recolonização, portanto, é importante conhecer os mecanismos de formação do biofilme oral na fase inicial, os quais são influenciados por fatores do hospedeiro, pela composição do microbioma oral e por fatores ambientais (tais como o tipo de material de adesão, o pH e a temperatura, etc.), por forma a melhor desenvolver estratégias eficientes de remoção do mesmo (Menezes et al., 2020).

#### **1.4. *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na cavidade oral**

*Streptococcus mutans* é uma bactéria anaeróbia facultativa que se encontra na cavidade oral, integra o biofilme encontrado na superfície dentária e é o principal agente para o aparecimento de cárie (Metwalli et al., 2013). Esta espécie sobrevive e cresce em ambientes anaeróbios, como é o caso do interior dos biofilmes (Fernandes et al., 2016).

A grande maioria das lesões cariosas ocorrem nas fissuras dos dentes definitivos posteriores, zonas mais isoladas da cavidade oral, onde a higienização, o contato com a língua e a lubrificação pela saliva são mais difíceis. O reconhecimento do ácido como principal agente etiológico para cárie dentária foi um elemento fundamental. *Streptococcus mutans*, pela sua capacidade de produzir elevadas quantidades de glucanos e ácido excedendo a capacidade tampão da saliva, tornou-se no principal agente cariogénico (Metwalli et al., 2013).

*Candida albicans* é uma levedura que faz parte da microbiota humana e coloniza várias partes do corpo, e é também das únicas espécies de leveduras patogénicas, afetando principalmente indivíduos imunocomprometidos (Gulati et al., 2018). Uma das características patogénicas de *C. albicans* é a sua capacidade de formar biofilmes resistentes a perturbações mecânicas ou químicas (Gulati et al., 2018).

*Candida albicans* e *S. mutans* têm uma relação simbiótica quando presentes no biofilme dentário. Biofilmes causadores de cárie formam-se quando bactérias na superfície dos dentes

interagem com açúcares da dieta, metabolizando-os e produzindo exopolissacarídeos que fazem parte da matriz EPS, e que aumentam o potencial de adesão do biofilme, enquanto acidificam o local. As associações entre bactérias e fungos podem ser cooperativas ou antagonistas. *C. albicans* e *S. mutans* costumam interagir cooperativamente. Por exemplo, *C. albicans* não consegue metabolizar a sacarose e pode beneficiar da glucose e frutose provenientes da metabolização da sacarose por *S. mutans*. Por outro lado, *S. mutans* também beneficia da presença de *C. albicans* pois esta afeta fisicamente o biofilme aumentando a produção da matriz EPS, fundamental para acúmulo e proteção das microcolônias bacterianas (Kim et al., 2017).

### **1.5. Cárie dentária e seu tratamento**

Cárie dentária é a segunda doença mais prevalente mundialmente, sendo caracterizada pela destruição progressiva, irreversível e localizada do dente e resultam de uma interação complexa entre os microrganismos aderidos, dieta, saliva e genótipo do hospedeiro (Pitts et al., 2017). É de máxima importância compreender os mecanismos de homeostasia da microflora residente, de forma a prevenir a formação de biofilme causador de cárie. Indivíduos com uma condição sócioeconomia baixa são mais propensas ao desenvolvimento de cáries, sobretudo devido à falta de higienização dos dentes (Metwalli et al., 2013).

Apesar da incorporação de flúor em diferentes produtos (pastas dentífricas, água, etc..) e da remoção mecânica de biofilme pela escovagem serem os principais métodos de prevenção de cárie, estes podem não oferecer proteção suficiente para evitar o aparecimento da mesma (Metwalli et al., 2013).

## **1.6. Principais materiais usados na restauração dentária**

Os materiais restauradores mais utilizados em medicina dentária atualmente são resinas compostas e cerâmicas, que vêm cada vez mais substituindo a amálgama quer pelo seu fator estético melhorado e pela sua maior biocompatibilidade.

As resinas compostas universais, ou compósitos universais, são um material restaurador universal fotopolimerizável, constituídas, basicamente, por três materiais quimicamente diferentes: a matriz orgânica; a matriz inorgânica; e um organossilano, que adere a matriz orgânica à inorgânica. O organossilano é uma molécula com um grupo silano numa extremidade ( $\text{SiO}_2$ ) e um grupo metacrilato na outra. A matriz orgânica normalmente é composta por um sistema de monómeros, dímeros e trímeros funcionais, um sistema de iniciação de polimerização de radicais livres, um sistema de estabilização, com o propósito de aumentar o tempo de vida da resina quando armazenada; e, por fim, elementos que absorvem a luz UV de comprimentos de onda menores que 350 nm, providenciando estabilidade de cor (Farias Pontes et al., 2014; Hervás García et al., 2006)

As resinas compostas universais, tendo a sua estética limitada, são indicadas em restaurações de dentes posteriores ou anteriores, normalmente em zonas onde só se usaria um tom.

Derivadas das resinas compostas, as resinas microhíbridas são compostas por uma junção de micropartículas com macropartículas, permitindo que a estética e a funcionalidade se fundam. A resina Filtek™ Z250 (3M, EUA) é um exemplo de uma resina composta microhíbrida e que será usada neste trabalho (Fig. 4). É composta por TEGDMA (Dimetacrilato de trietilenoglicol) (1-5%); Bis-GMA (Bisfenol-A glicidilmetacrilato) (1-5%); Bis-EMA (Bisfenol-A etoxilado dimetacrilato) (5-10%) e UDMA (Uretano dimetacrilato) (5-10%), sendo o seu enchimento de zircónia e sílica, com superfície modificada (60% do volume). A dimensão das partículas está compreendida entre 0.01-3.5µm (<https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.04.022>) (Kopperud et al., 2013).

A resina Tetric EvoCeram® Bulk Fill, fabricada pela Ivoclar Vivadent (Fig. 5), é uma resina nanohíbrida, de fotopolimerização rápida, distinguindo-se da Filtek™ Z250 por ter partículas de menor dimensão. É composta por uma matriz monomérica contendo dimetacrilatos (17-18%

do volume); Bis-GMA (5-10% do volume) e UDMA (5-10% do volume). O enchimento inorgânico contém vidro de bário, trifluoreto de itérbio, óxido misto e pré-polímero (78-81% do volume). Adicionalmente contém aditivos, estabilizadores e pigmentos (<1% do volume). As dimensões das partículas estão compreendidas entre 40-3000 nm, com uma dimensão média de 550 nm (Kopperud et al., 2013).

As resinas nanohíbridas surgiram face à crescente necessidade de um material de restauração que tivesse propriedades universais, com potencialidade para ser utilizada tanto em dentes anteriores como em posteriores (Júnior, et al., 2011). Como o tamanho das partículas nas resinas nanohíbridas é menor, estas oferecem um melhor acabamento, fazendo por uma restauração menos rugosa, mais uniforme e resistente a perturbações mecânicas e químicas (Hervás García et al., 2006).



**Fig. 4** – Filtek™ Z250 Universal Restorative (3M, EUA).



**Fig. 5** – Tetric EvoCeram® Bulk Fill (Ivoclar Vivadent, Espanha)

*Formação in vitro de biofilmes de Streptococcus mutans, Candida albicans e derivados da saliva humana em resina composta e resina nanohíbrida: análise dos biofilmes formados e comparação*

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho experimental teve como objetivo principal fazer um estudo comparativo da influência do tipo de superfície na adesão e formação de biofilmes monomicrobianos e polimicrobianos de *C. albicans* e *S. mutans*. e, adicionalmente, inferir eventuais diferenças nos biofilmes formados no mesmo tipo de superfícies a partir de saliva humana de indivíduos sem risco de desenvolver cárie ou com risco moderado/elevado de cárie.

Assim, para esse propósito três superfícies distintas foram utilizadas: esmalte dentário, resina microhíbrida (Filtek™ Z250) e resina nanohíbrida (Tetric EvoCeram®). Biofilmes monomicrobianos e mistos de *C. albicans* e *S. mutans* foram formados nas várias superfícies e comparados através de uma análise 1) quantitativa pelo método de determinação de unidades formadoras de colônias (UFCs), e 2) qualitativa por microscopia de fluorescência após coloração Live/Dead dos biofilmes. Uma segunda parte do trabalho consistiu em colher saliva de voluntários com baixo risco de cárie (n=3) e voluntários com com risco moderado/alto de cárie (n=3), segundo o protocolo CAMBRA (Featherstone et al., 2019); a saliva de cada indivíduo foi usada como inóculo para formar biofilmes nos três tipos de superfícies acima mencionados que foram analisados também pelos mesmos métodos.

*Formação in vitro de biofilmes de Streptococcus mutans, Candida albicans e derivados da saliva humana em resina composta e resina nanohíbrida: análise dos biofilmes formados e comparação*

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Superfícies usadas e sua preparação**

Neste trabalho foram usadas duas resinas comerciais, a Filtek™ Z250 Universal Restorative (3M™, EUA), daqui em diante designada de Z250 e a Tetric Evoceram® Bulk Fill (Ivoclar Vivadent, Espanha), a seguir designada de TEC para preparação de superfícies de dimensões semelhantes entre si.

Para preparação de superfícies de esmalte dentário, optou-se pela sua elaboração a partir de dentes anteriores, superiores e inferiores, de bovino, como demonstrado na Fig. 6.

Dentes de bovino, em termos de rugosidade, microdureza, elementos químicos e composição mineral não apresentam diferenças significativas quando comparados a dentes humanos (Nogueira, et al., 2014).

As superfícies feitas a partir das resinas foram preparadas tendo como referência um modelo de acrílico de forma quadrada com 1 cm de lado, que assim proporcionou a formação de superfícies com a área de 1 cm<sup>2</sup> e 1 mm de altura, como demonstradas na Fig. 7. Estas superfícies foram fotopolimerizadas sempre por 30 s, esperaram-se dois dias para se dar a contração de polimerização antes de as esterilizar por autoclavagem, passo essencial antes de serem utilizadas nos ensaios.



**Fig. 6** – Superfícies de resina, TEC (à esquerda) e Z250 (à direita), respetivamente.

Para preparar as superfícies de esmalte dentário (ED) (Fig. 8) a partir de dentes anteriores bovinos, estes foram mantidos em solução de cloramina 1% durante 3 dias e de seguida em solução tampão fosfato-salino (PBS 1×) por mais 3 dias. Posteriormente, foram seccionados com auxílio de um micrótomo (Struers Accutom- 50, Dinamarca), o que nos permitiu elaborar superfícies finas, lisas e com dimensões semelhantes entre si, embora com áreas diferentes (a área específica de cada uma foi sempre determinada e registada). Estas também foram autoclavadas antes de serem utilizadas nos ensaios.



**Fig. 7** – Dentes anteriores de bovino.



**Fig. 8** – Superfícies de esmalte dentário de dente anterior bovino.

### **3.2. Microrganismos e condições de cultura**

Os microrganismos usados neste trabalho foram: *S. mutans* ATCC 25176 e *Candida albicans* ATCC 10231.

As estirpes de *C. albicans* e *S. mutans*, armazenadas a - 80°C, foram inoculadas em meio de Sabouraud Dextrose agar (SAB - Scharlab, Espanha) e Mueller Hinton agar +5% sangue (MH5% - Biogerm, SA., Portugal), respetivamente. As placas de SAB foram incubadas a 37°C, em aerobiose durante 48 h e as placas de MH5% foram também incubadas a 37°C durante 48 h mas em condições de anaerobiose (Merck, Alemanha). Após esse tempo, colónias de cada placa foram usadas para preparar os inóculos para a formação dos biofilmes respetivos como abaixo descrito.

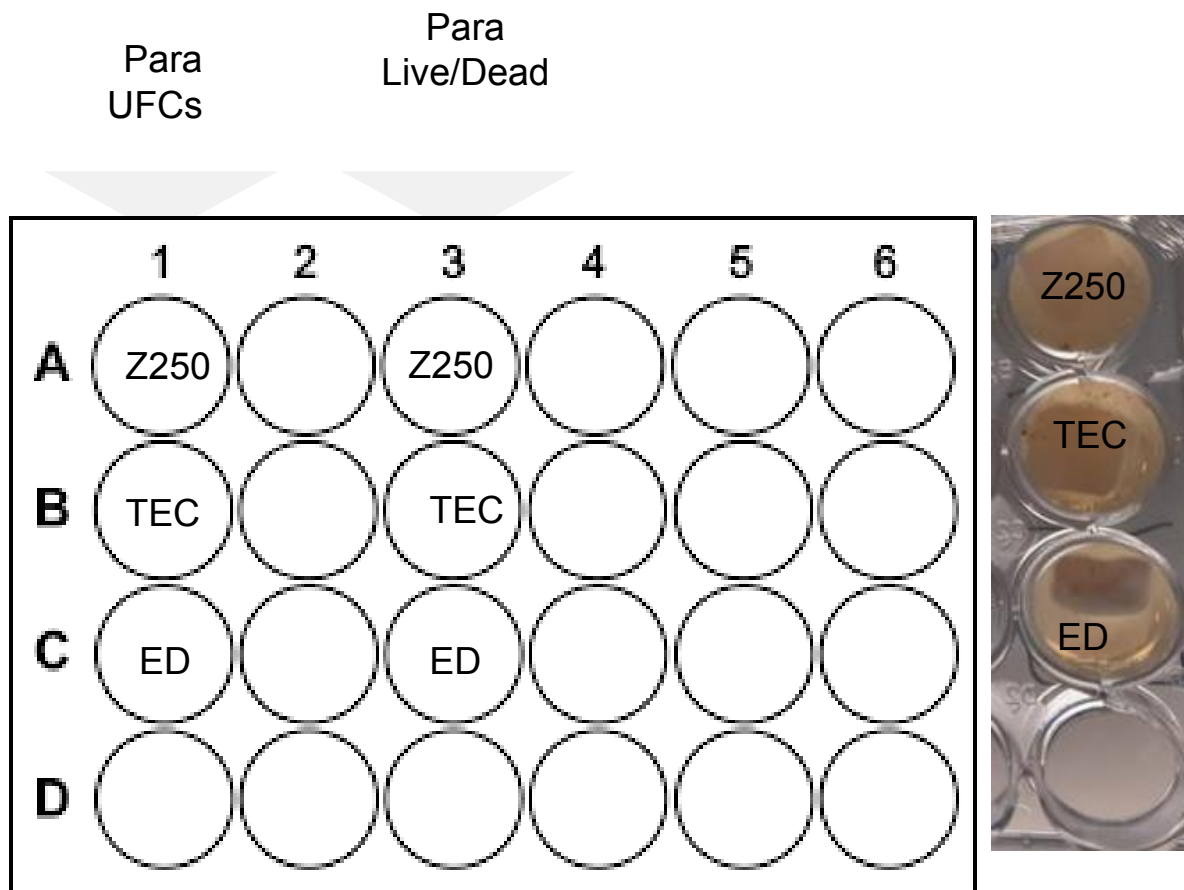
### **3.3. Recolha da saliva**

O protocolo CAMBRA foi aplicado a 6 indivíduos voluntários, e obtivemos dois grupos n=3: um grupo com baixo risco de cárie (**a, b, c**); e um grupo com risco moderado/alto de cárie (**x, y, z**). Após a obtenção do consentimento informado assinado por cada voluntário, foi recolhida saliva dos 6 indivíduos. Os voluntários cumpriram os seguintes critérios de inclusão: serem

indivíduos saudáveis sem complicações sistêmicas, não terem periodontite, terem idade superior a 16 anos e não terem sido submetidos a antibioterapia nos últimos 3 meses. Nas 24 h precedentes à recolha de saliva, os voluntários foram instruídos a não escovar os dentes ou a usar qualquer solução/colutório bucal, e nas 2 h antes da recolha, a não ingerir alimentos ou líquidos. A saliva foi recolhida sem qualquer estímulo. Foram recolhidos cerca de 3 mL de saliva de cada voluntário e, logo após a recolha, essa saliva foi diluída em glicerol (60% saliva + 40% glicerol) e dispensada em criotubos (1 mL/criotubo) e seguidamente conservada a - 80°C até ao momento de ser usada na formação do biofilme.

### **3.4. Formação dos biofilmes**

Para a formação dos biofilmes, placas de 24-poços de fundo plano foram usadas (Biofil, China). Previamente à inoculação, as superfícies esterilizadas de Z250, TEC e ED foram colocadas nos respetivos poços conforme mostrado no esquema da Fig. 9.



**Fig. 9** – Esquema da placa de 24 poços com superfícies de Z250, TEC e ED colocadas para posterior inoculação e ensaios. À direita pode-se ver exemplo de poços já inoculados.

#### **3.4.1. Formação de biofilme de *C. albicans***

O inóculo de *C. albicans* foi preparado da seguinte maneira:

- colónias recolhidas do SAB foram suspensas em meio BHI (VWR, Bélgica);
- uma alíquota foi retirada para leitura da densidade ótica a 600 nm ( $OD_{600}$ ) (Zuzi, Spectrophotometer model 4101);
- o objetivo era obter uma suspensão com aproximadamente  $OD_{600} = 0.1$  (0.095-0.110), sendo por vezes necessário adicionar mais colónias ou diluir com meio no sentido de alcançar essa leitura.

Ensaio preliminares foram feitos para determinar o número de UFCs a que correspondia a suspensão de  $OD_{600\text{ nm}} = 0.1$ , tendo-se verificado que correspondia a aproximadamente  $10^6$  UFC/mL.

O inóculo assim preparado foi usado para inocular os poços contendo as superfícies (1 mL de inóculo/poço).

As placas de 24-poços inoculadas foram incubadas a 37°C, em aerobiose durante 48 h, sendo que ao fim de 24 h, 500 µL de meio foram adicionados a cada poço.

#### **3.4.2. Formação de biofilme de *S. mutans***

O inóculo de *S. mutans* foi preparado da seguinte maneira:

- colónias recolhidas do MH5% foram suspensas em meio BHI + 0.2% sacarose;

- seguidamente, como acima descrito, foi lida a OD<sub>600</sub> e ajustada a 0.1;

- Dessa suspensão fez-se uma diluição posterior de 1:100 no mesmo meio; tendo sido esta suspensão usada para inocular os poços contendo as superfícies (1 mL de inóculo/poço).

Ensaio preliminares mostraram que o número de UFCs a que correspondia a suspensão de *S. mutans* com OD<sub>600</sub>= 0.1 era de aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL. Por esse motivo fez-se a diluição 1:100, para obter um inóculo inicial com aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC/mL.

As placas de 24-poços assim inoculadas foram incubadas a 37°C, em anaerobiose durante 48 h, sendo que ao fim de 24 h, 500 µL de meio foram adicionados a cada poço.

#### **3.4.3. Formação de biofilme misto (*C. albicans* + *S. mutans*)**

Inóculos de cada espécie foram preparados separadamente como acima descrito. De seguida, igual volume do inóculo de *C. albicans* e de *S. mutans* foram misturados (10<sup>6</sup> UFC/mL de cada, sendo que assim cada espécie sofreu uma diluição de 1:2). Esta suspensão das duas espécies serviu para inocular cada poço da placa (1 mL/poço). As placas de 24 poços inoculadas foram incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> (Oxoid, Reino Unido), durante 48h, sendo que ao fim de 24h, 500µL de meio foram adicionados a cada poço.

#### **3.4.4. Formação de biofilme a partir da saliva**

Para formação de biofilme a partir da saliva, juntou-se 1 mL da saliva previamente armazenada em glicerol a - 80°C e descongelada a 40ml de meio BHI + 0.2% sacarose. Agitou-se bem, e esta suspensão foi usada para inocular cada poço contendo uma superfície (1 mL/poço). Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C durante 48 h, num ambiente com 5% de CO<sub>2</sub> ao fim de 24 h, foram adicionados 500 µL de BHI + 0.2% sacarose a cada poço.

### **3.5. Avaliação dos biofilmes formados**

Cada biofilme formado foi posteriormente analisado, tendo-se 1) quantificado o número de UFCs de cada espécie presente no biofilme formado sobre cada superfície - análise quantitativa do biofilme, e 2) visualizado cada biofilme formado ao microscópio de fluorescência após coloração com o “Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit” (Molecular probes) – análise qualitativa da viabilidade e estrutura do biofilme.

#### **3.5.1. Avaliação quantitativa**

- Foi removido o sobrenadante de cada poço;
- Lavou-se com 500  $\mu$ L de PBS 1 $\times$ , adicionando-o com cuidado para não destacar bactérias da superfície de resina/esmalte dentário;
- Transferiram-se as superfícies cuidadosamente para poço imediatamente ao lado;
- Adicionou-se 1 mL de PBS a cada poço contendo a superfície;
- A placa de 24 poço foi isolada com parafilme, podendo assim ir ao banho de ultrassons (TPC Advance dentsonic ultrasonic cleaner, modelo UC-400, Independent Dental, EUA) durante 10 minutos, com o propósito de destacar o biofilme aderido ao fundo do poço;
  - De cada poço, foram retirados 100  $\mu$ L para 900  $\mu$ L de PBS (diluição 1:10) e sucessivamente do mesmo modo foram feitas várias diluições seriadas 1:10 de modo a atingir a diluição desejada.

Após a realização de ensaios preliminares, verificámos que as diluições apropriadas para plaquear seriam:

- Para os biofilmes de uma única espécie:

- $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  no caso de *S. mutans*, com a particularidade que foram plaqueados 10  $\mu$ L em 5 réplicas em MH5%;
- $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  para *C. albicans*, tendo sido plaqueados 100  $\mu$ L por cada placa de SAB.

As placas de SAB e MH5% foram incubadas a 37°C em aerobiose e anaerobiose, respetivamente, durante 48 horas.

- Para o biofilme misto foram plaqueadas as diluições:
  - $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  em SAB, para contagem de *C. albicans* ;
- $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  em MH5%, para contagem de *S. mutans*.
- No caso da saliva, foram plaqueadas as diluições:
  - $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  em meio TSA, para contagem dos microrganismos totais;
  - $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  em SAB para contagem das leveduras;
  - $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  em MH5%, para contagem dos anaeróbios.

### **3.5.2. Avaliação qualitativa**

Para a avaliação microscópica do biofilme formado em cada superfície:

- Foi removido o sobrenadante de cada poço;
- Lavou-se com 500  $\mu$ L de PBS, adicionando-o com cuidado para não destacar bactérias da superfície de resina/esmalte dentário;
- Transferiram-se as superfícies cuidadosamente para outra placa
- Adicionou-se 1 ml de solução corante, que consiste em SYTO 9 e iodeto de propídeo (LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit)

(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L7012>) e deixou-se no escuro durante 30 min a 1 h;

A solução corante foi removida e as superfícies foram colocadas sobre uma lâmina; sobre a superfície colocou-se uma gota de óleo de montagem e cobriu-se com uma lamela e de seguida procedeu-se à visualização no microscópio de fluorescência, a uma ampliação de 200, 400 e 1000×. Ambos os corantes se ligam ao DNA; o SYTO 9 consegue penetrar nos microrganismos com a membrana intacta, e estes fluorescem de verde, significando que os microrganismos estão viáveis; por outro lado, o iodeto de propídio apenas se consegue ligar aos microrganismos com a membrana danificada, sobrepondo-se ao SYTO 9 quando isto acontece, corando assim de vermelho as células mortas (<https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2Fmp07007.pdf>).

### **3.6. Análise estatística**

A significância estatística das diferenças entre os grupos experimentais foi avaliada por one-way ANOVA com o teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram considerados estatisticamente significantes níveis de probabilidade de  $p < 0,05$ . Foi utilizado o programa Vassarstats.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Quantificação de UFCs dos biofilmes de *C. albicans* e *S. mutans* formados nas três superfícies**

O biofilme de uma só espécie, *C. albicans* ou *S. mutans*, ou biofilme misto (*C. albicans* + *S. mutans*) formado em cada uma das superfícies em estudo (Z250, TEC e ED) foi quantificado pela enumeração dos UFCs (UFC/cm<sup>2</sup>) de cada espécie. Os resultados obtidos podem ser visualizados no gráfico da Fig. 10.

As diferenças entre o número de log UFC/cm<sup>2</sup> de *C. albicans* obtido do biofilme de *C. albicans* formado na Z250 e na TEC e entre a TEC e o ED foram estatisticamente significativas. É possível constar que foi da resina nanohíbrida, TEC, que se obteve menor número de UFC/cm<sup>2</sup> de *C. albicans*. Isto pode dever-se ao facto de menos leveduras terem aderido a esta superfície e consequente formação de menos biofilme ou pelo facto de ao fim de 48 h maior número de leveduras do biofilme formado já não estarem viáveis, de terem morrido mais rapidamente nesta superfície do que nas outras superfícies. Os números de log UFC/cm<sup>2</sup> de *S. mutans* no biofilme da mesma espécie formado nas diferentes superfícies não foram significativamente diferentes. Este resultado indica que aparentemente *S. mutans* adere e/ou forma um biofilme idêntico em todas essas superfícies. No caso do biofilme misto, também não houve diferenças estatisticamente significativas nas várias superfícies. No entanto, podemos verificar que ambas as espécies proliferam mais quando em conjunto do que quando sozinhas, isto é, no biofilme misto, o número de UFC/cm<sup>2</sup> recuperado foi semelhante ao de cada espécie no biofilme mono-espécie, contudo, no inóculo inicial para formação do biofilme misto cada uma das espécies estava presente em metade do número relativamente ao inóculo usado para formação do biofilme mono-espécie. Este resultado indica que há uma interação sinérgica, de cooperação, entre *S. mutans* e *C. albicans*, quando presentes em simultâneo no mesmo biofilme. A existência desta relação sinérgica e de coagregação entre estas duas espécies é conhecida (Kim et al., 2017) (Sampaio-Maia et al., 2016) (Barbieri, 2007).

*C. albicans* tem a capacidade de aderir a bactérias orais (co-agregar), inclusive *S. mutans* mas também de aderir à mucosa oral (David et al, 2013) (Sampaio-Maia et al., 2016). Sabe-se que *C. albicans* forma uma ponte entre a mucosa e as bactérias que normalmente não aderem à superfície mucosa como é o caso de *S. mutans* (Sampaio-Maia et al., 2016). Neste nosso trabalho, a adesão à mucosa não foi avaliada, mas sim a adesão a duas resinas e ao esmalte dentário, sendo que, no entanto, essa co-agregação também foi notada neste caso.

Diversos estudos in vitro desenvolvidos demonstraram que *C. albicans* potencia, de facto, a aderência de *S. mutans*, na medida em que este apresenta elevada afinidade para as hifas de *C. albicans*, aderindo à mesma (Metwalli et al., 2013) (Barbieri et al., 2013) (Falsetta et al., 2014).

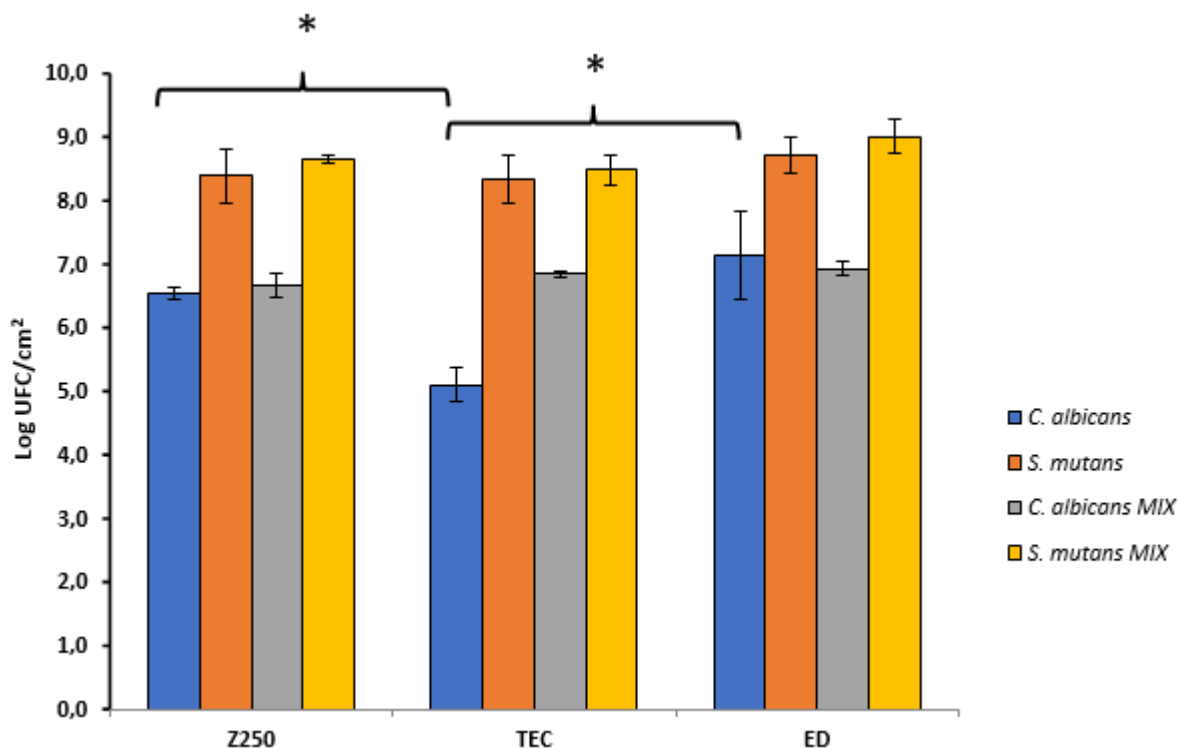
A sua sinergia também se estende quando se fala em cárie dentária. A capacidade que a *C. albicans* tem de produzir e tolerar ácido combina muito bem com *S. mutans*, que sobrevive em ambientes ácidos (Klinke et al., 2011).

De um modo geral, analisando o gráfico e respectivos resultados, podemos dizer que o número de UFCs/cm<sup>2</sup> obtido dos biofilmes mono-espécie no esmalte dentário é tendencialmente superior face às resinas, embora sem significado estatístico

Os microrganismos aderem mais ou menos a uma superfície dependendo do material. Quando analisámos os resultados dos números de UFCs de *C. albicans* pôs-se como uma das hipóteses ela ter aderiu de forma diferente em superfícies distintas. Está estabelecido que as propriedades eletro e físicoquímicas de um material de restauração afetam a adesão de microrganismos a este, assim como a sua topografia e molhabilidade (Song, 2015) (Kozmos et al., 2021).

Tendo em conta que cada superfície apresenta características individuais, é possível que os microrganismos colonizadores iniciais que aderem sejam diferentes. Superfícies com propriedades químicas distintas vão representar taxas de adesão maiores ou menores, o que se traduz num biofilme biologicamente diferente em cada material (Song, 2015).

Num estudo que teve como objetivo estudar a adesão bacteriana em resinas utilizadas em restaurações diretas e indiretas verificou-se uma correlação parcial entre a rugosidade da superfície e a adesão bacteriana (Giacomo et al, 2017), o que pode explicar o nível de adesão superior em Z250, sendo esta uma resina composta por partículas de maior dimensão que se traduzem numa superfície mais rugosa, quando em comparação com TEC, que apresenta partículas de menor dimensão, tornando a superfície mais lisa.



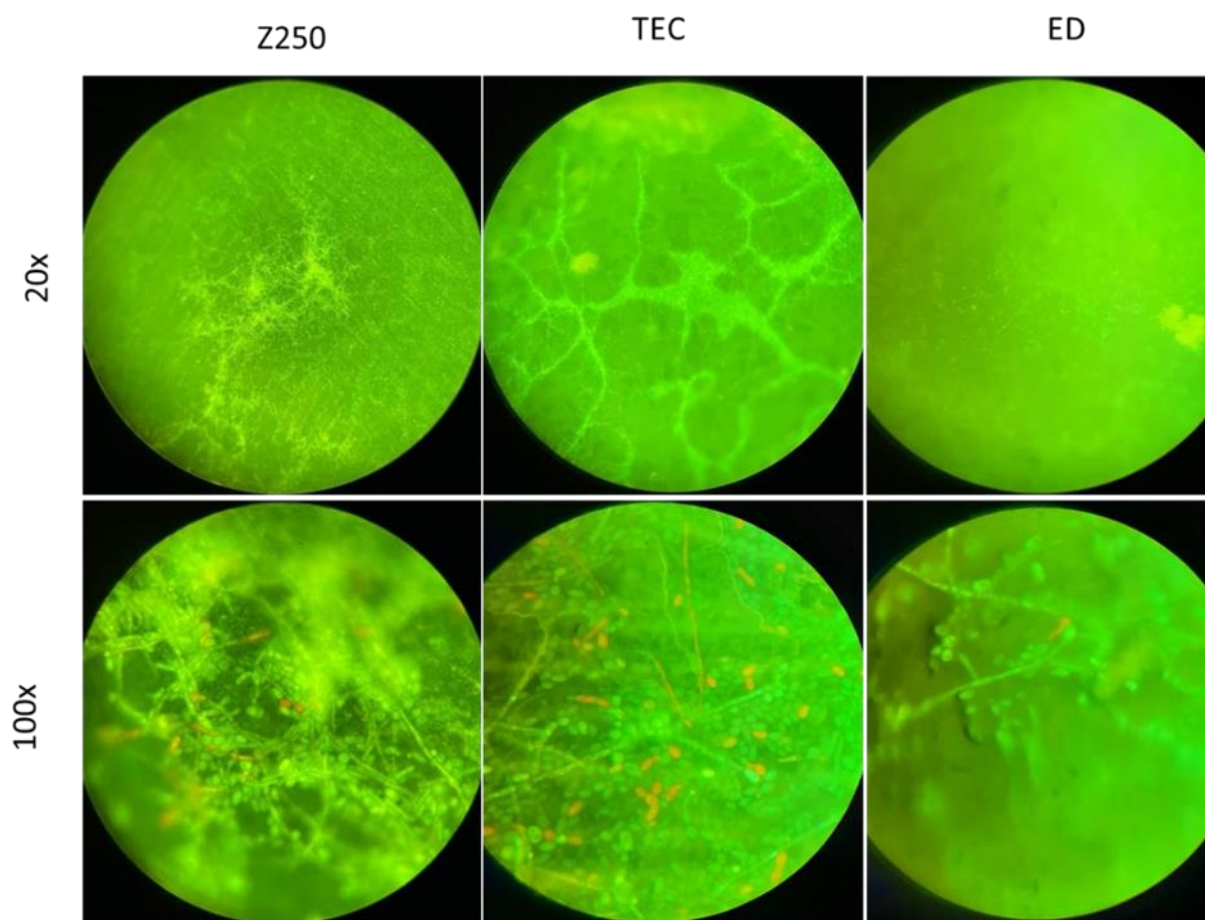
**Fig. 10** – Avaliação das UFC/cm<sup>2</sup> de *C. albicans* e *S. mutans* a partir dos biofilmes de uma sóespécie ou do biofilme misto (MIX) formados em cada superfície (Z250, TEC e ED). As barras representam a média obtida em três ensaios independentes e as barras de erro o respectivo desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas (para  $p < 0.05$ ) estão assinaladas com \*.

#### 4.2. Análise qualitativa microscópica da viabilidade dos biofilmes de *C. albicans* e *S. mutans* formados nas três superfícies

A análise microscópica dos biofilmes de *C. albicans*, *S. mutans* e misto (*C. albicans* + *S. mutans*) nas três superfícies permitiu obter imagens que são mostradas nas Fig. 11, Fig. 12, Fig. 13, respetivamente.

Ao analisar as imagens da Fig. 11, podemos verificar que *C. albicans* está presente numa grande quantidade nas três superfícies, significando isso, que a levedura aderiu a todas essas superfícies e formou biofilme. Para todas as três superfícies e numa ampliação de 200×, podemos ver que o biofilme formado não é uniforme em toda a superfície, há sempre zonas com mais biofilme do que outras. Na superfície de ED não foi possível individualizar de forma perfeita a forma de *C. albicans*, como se vê nas imagens, pelo facto de a superfície não ser completamente plana, foi difícil obter imagem que apresente foco total. Contudo, nesse caso também podemos constatar que havia igualmente bastante biofilme e maioritariamente viável.

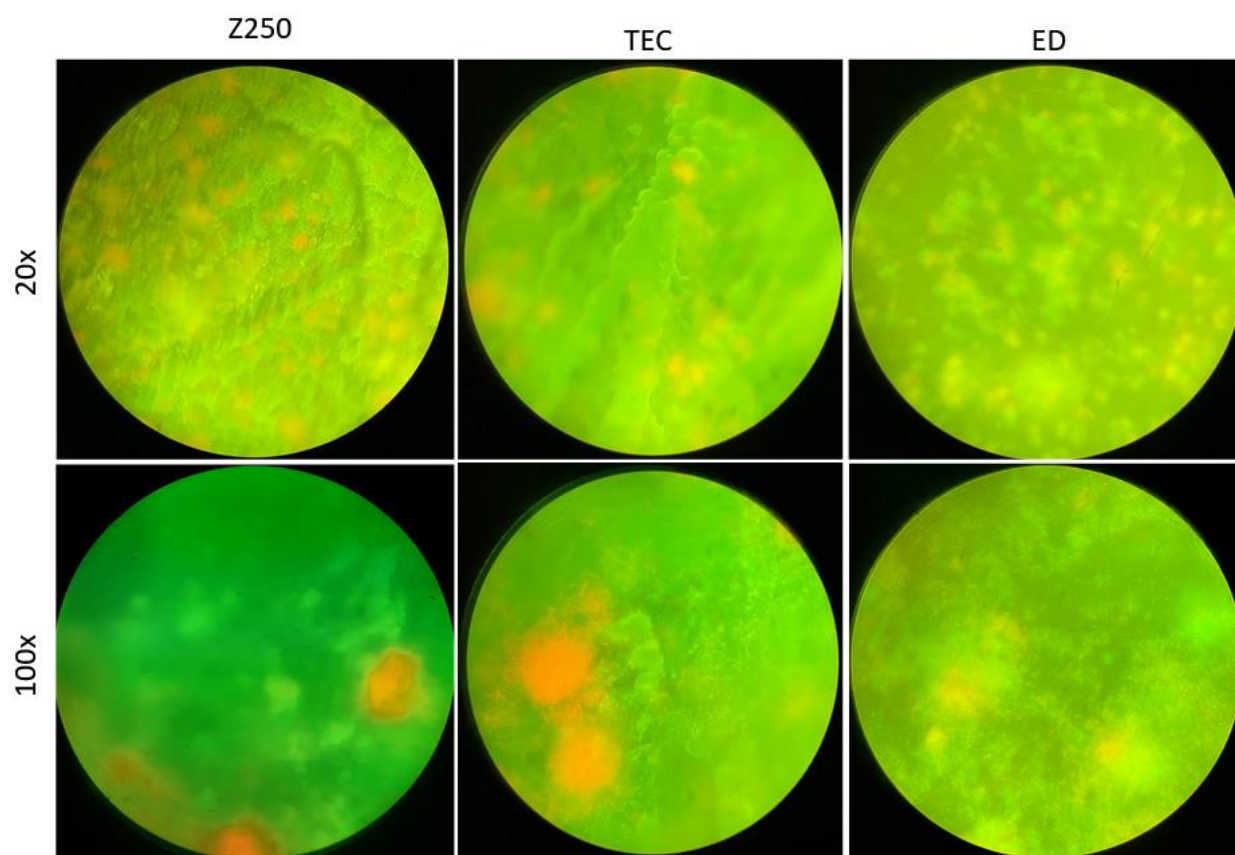
Pela coloração Live/Dead é possível observar a viabilidade do biofilme formado em cada superfície e que nos pode ajudar a esclarecer os resultados obtidos na determinação dos UFCs do biofilme. Por exemplo, conseguimos agora dizer que *C. albicans* aderiu e formou biofilme similar nas três superfícies, contudo, conseguimos detetar mais leveduras mortas (vermelhas) na superfície TEC, e talvez isso seja a explicação que vai de encontro ao facto de menos UFCs terem sido obtidos do biofilme formado nesta superfície. É possível notar também que nas três superfícies, existe *C. albicans* com crescimento filamentosos. A capacidade de *C. albicans* filamentar, formando hifas e pseudohifas é conhecida e considerada um fator de virulência de *C. albicans* (Jacobsen et al, 2014). E geralmente o crescimento filamentosos e a capacidade de formar biofilmes densos estão correlacionadas (Krasowska et al., 2009), o que vai de encontro aos nossos resultados.



**Fig. 11** – Imagens do biofilme de *C. albicans* formado nas superfícies de Z250, TEC e ED, obtidas após coloração Live/Dead e observação ao microscópio de fluorescência nas objetivas de 20 e 100× (ampliação respectiva de 200 e 1000×)

Ao analisar a Fig. 12, podemos ver que *S. mutans* aderiu em todas as superfícies, formando um biofilme abundante, o que vai de encontro à contagem de UFCs. Ao comparar as diferentes superfícies, *S. mutans* parece ter aderido de forma semelhante em Z250 e TEC, com muitos agregados, mas no ED parecia haver mais zonas com menos agregados.

Quanto à viabilidade, é possível ver que as células mortas tendem a estar agrupadas, havendo zonas com apenas células mortas, e outras com apenas células vivas, sendo que no geral a grande maioria das células estava viva. Apesar do biofilme aparentar ser pouco denso quando comparado ao de *C. albicans*, temos de ter em conta que as leveduras são células cerca de 10× maiores do que as células de *S. mutans* e, portanto, na verdade o biofilme de *S. mutans* é muito denso com alta carga bacteriana.



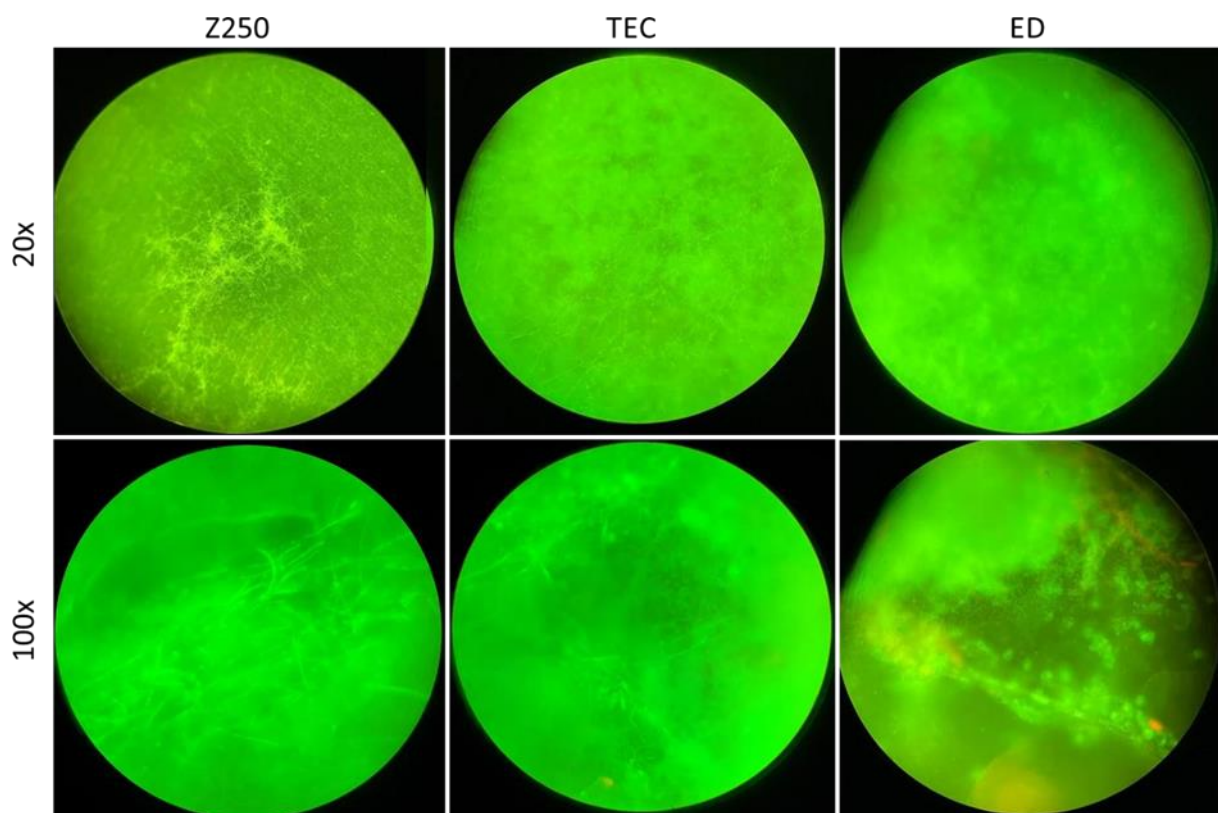
**Fig. 12** – Imagens do biofilme de *S. mutans* formado nas superfícies de Z250, TEC e ED, obtidas após coloração Live/Dead e observação ao microscópio de fluorescência nas objetivas de 20 e 100× (ampliação respectiva de 200 e 1000×).

Na Fig. 13, temos imagens do biofilme misto de *C. albicans* + *S. mutans*. e comparando-as às de cada biofilme mono-espécie, é possível observar que aqui o biofilme é muito mais denso e espesso, com menos espaços vazios, o que vai de encontro aos UFCs apresentados no gráfico da Fig. 10.

Quanto à viabilidade, no biofilme misto, quase não é possível visualizar células mortas, o que é expectável quando *C. albicans* e *S. mutans* se encontram no mesmo biofilme, pelo facto como acima já ter sido mencionado, em conjunto estabelecem uma sinergia no sentido de proliferarem e sobreviverem.

Quanto à morfologia, apenas é possível a visualização de leveduras, a maioria filamentadas, o que faz sentido, pois por apresentarem uma dimensão maior, sobrepõem-se a *S. mutans*, ficando este mais difícil de ser visualizado.

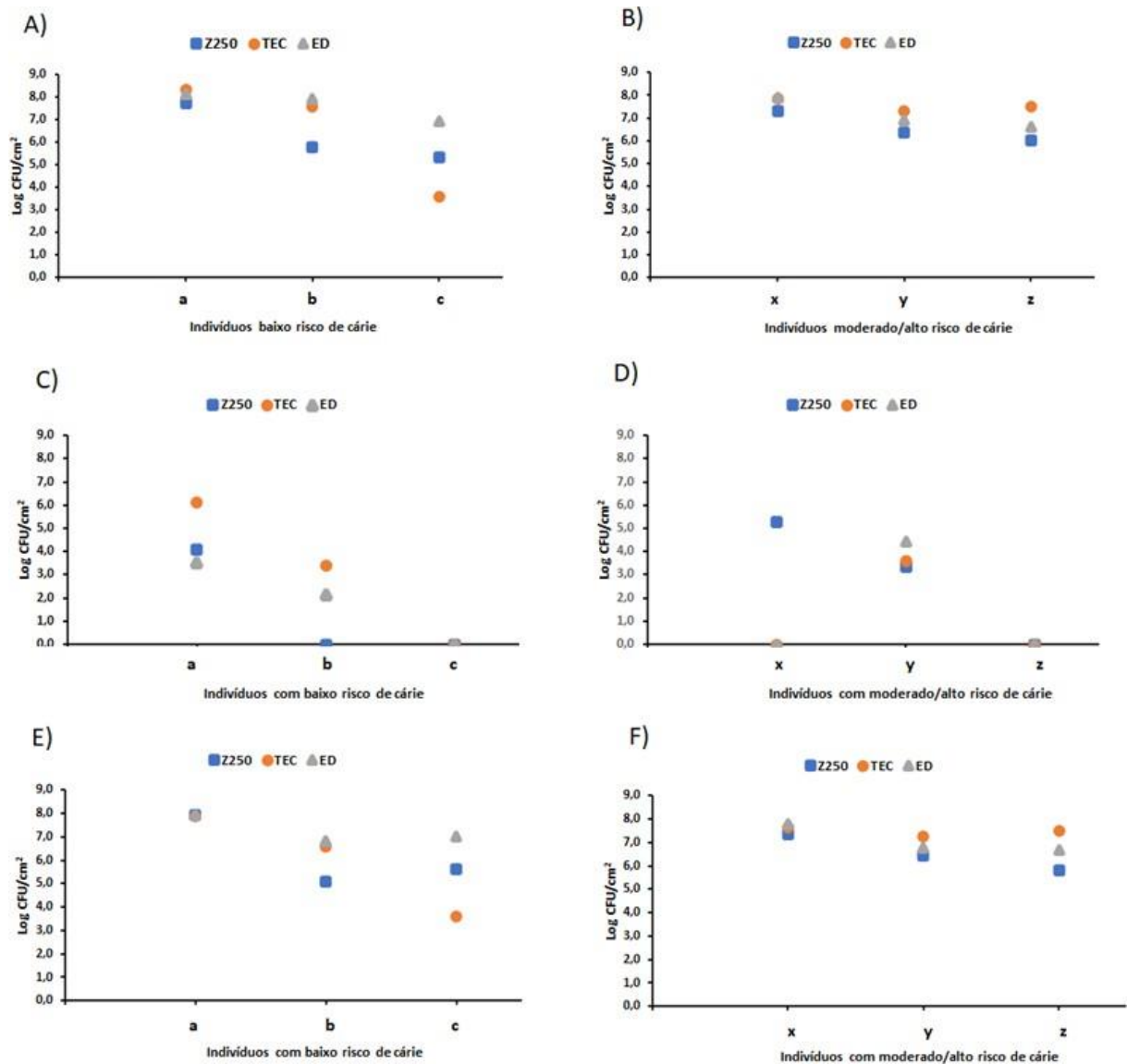
No biofilme formado no ED, *C. albicans* apresentava menos filamentação do que nas outras duas superfícies.



**Fig. 13** – Imagens do biofilme misto, *C. albicans* + *S. mutans*, formado nas superfícies de Z250, TEC e ED, obtidas após coloração Live/Dead e observação ao microscópio de fluorescência nas objetivas de 20 e 100× (ampliação respetiva de 200 e 1000×).

#### 4.3. Quantificação de UFCs dos biofilmes derivados da saliva formados nas três superfícies

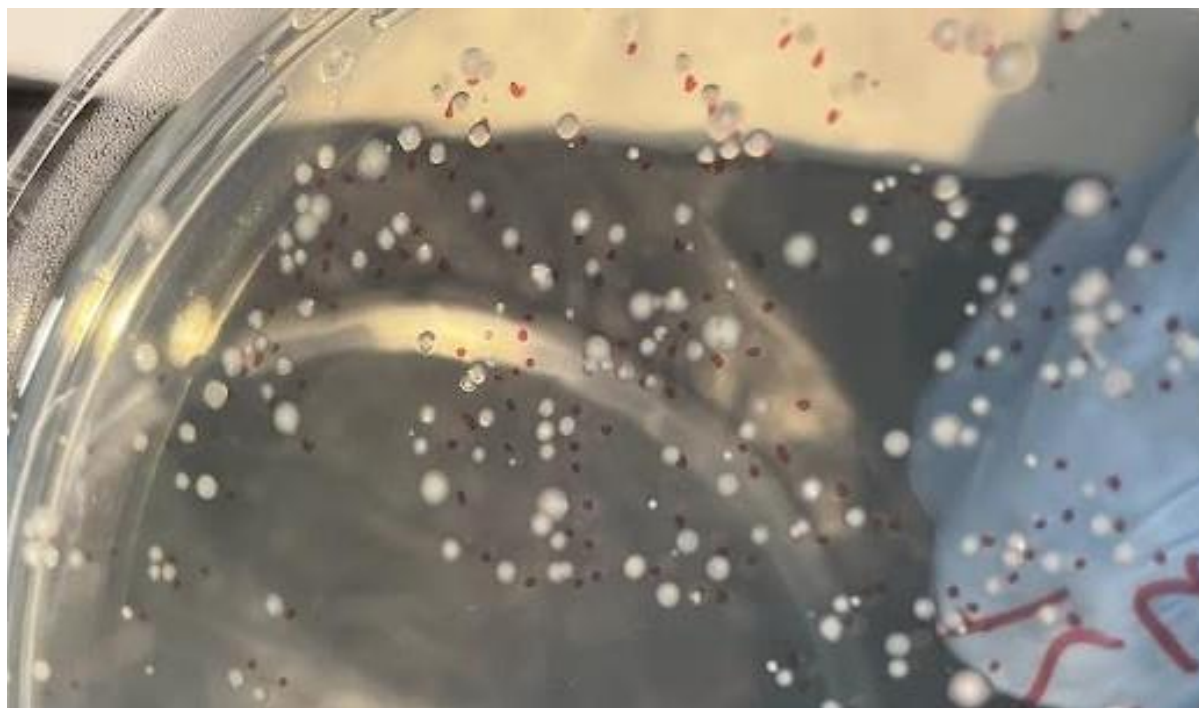
Na Fig. 14, estão apresentados os valores de UFC/cm<sup>2</sup> relativos aos microrganismos totais, (Fig. 14 A e Fig. 14 B), a leveduras (Fig. 14 C e Fig. 14 D) e aos anaeróbios (Fig. 14 E e Fig. 14 F) obtidos a partir dos biofilmes derivados da saliva dos indivíduos com baixo risco de cárie (**a**, **b** e **c**) e de indivíduos com moderado/alto risco de cárie (**x**, **y** e **z**).



**Fig. 14** – Enumeração dos UFC/cm<sup>2</sup> de microrganismos totais (A e B), de leveduras (C e D) e de anaeróbios (E e F) obtidos dos biofilmes formados a partir da saliva de indivíduos (**a**, **b** e **c**) com baixo risco de cárie (A, C e E) e de indivíduos (**x**, **y** e **z**) com moderado/alto risco de cárie (B, D e F), em cada superfície, Z250, TEC e ED.

Relativamente aos microrganismos totais (Fig. 14 A e Fig. 14 B), podemos ver que o número de UFCs é mais variável entre os indivíduos com baixo de risco de cárie do que nos indivíduos com moderado/alto risco. E para os indivíduos **a**, **x**, **y** e **z** o número de UFCs de microrganismos total obtido foi muito semelhante nas três superfícies testadas. Apenas para o indivíduo **c** se observou maior variabilidade nas contagens nas diferentes superfícies, na TEC (3.6 log

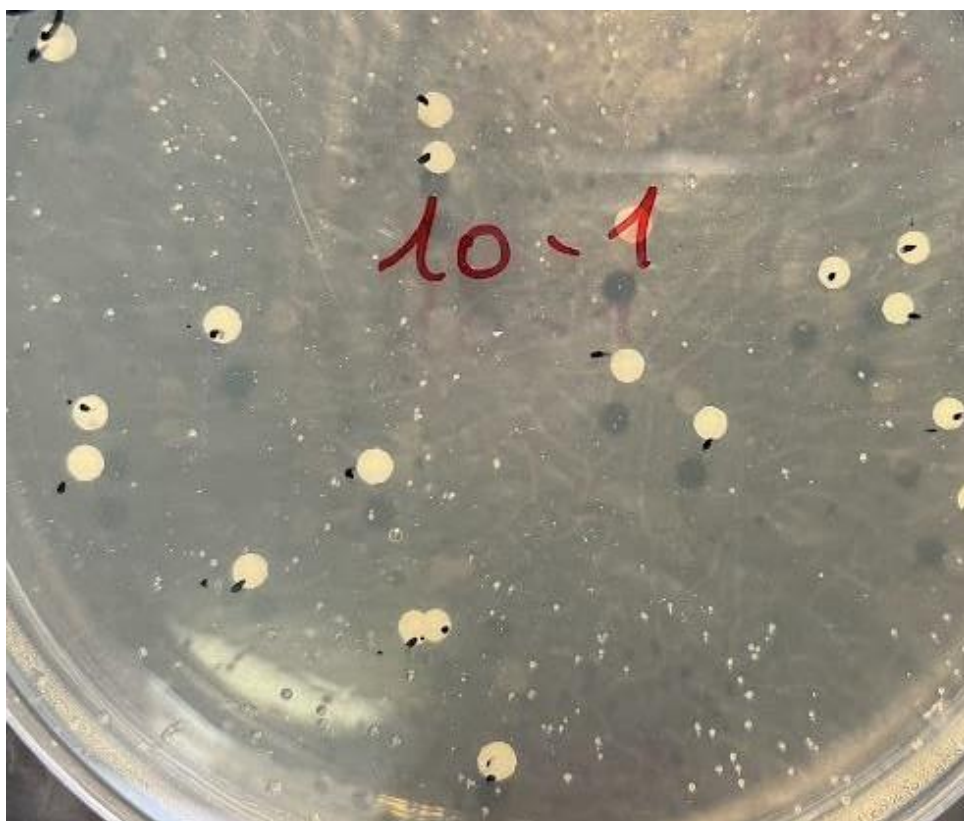
UFC/cm<sup>2</sup>), seguida da Z250 (5.3 log UFC/cm<sup>2</sup> e no ED (6.9 log UFC/cm<sup>2</sup>). Em todos os casos, aquando das contagens foi possível observar colónias com morfologias muito variadas a partir da saliva de todos os pacientes (Fig. 15), o que era de esperar uma vez que a saliva é constituída por uma microbiota variada. No entanto, foi perceptível, que essa microbiota era variável entre os indivíduos estudados, uma vez que certas morfologias de colónias estavam presentes num e não nos outros, independentemente do grau de risco de cárie. Este resultado indica que a microbiota da saliva de cada paciente é diversa e será influenciada por vários fatores intrínsecos a cada indivíduo. Como o número de indivíduos é pouco representativo, não podemos saber se o diferente risco de cárie é um fator que significativamente influencia o tipo de microbiota, ou pelo menos a presença de determinadas estirpes microbianas.



**Fig. 15** – Imagem aleatória obtida a partir de uma placa de TSA para contagem de UFCs de microrganismos totais a partir da saliva de um dos indivíduos. São visíveis diferentes tipos de morfologias de colónias.

No que respeita à contagem de leveduras (Fig. 14 C e Fig. 14 D), os valores das contagens totais foram genericamente sempre mais baixas em comparação com os microrganismos totais, variaram entre 0 e 6 log UFC/cm<sup>2</sup>. Nos indivíduos com baixo risco de cárie houve variabilidade

entre os três indivíduos, sendo que do indivíduo **c** não foram recuperadas quaisquer colônias de leveduras em nenhuma superfície, e do indivíduo **b**, na superfície Z250, também não. Estas contagens também variaram entre os indivíduos com moderado/alto risco de cárie, sendo que no indivíduo **z** não foram detetadas leveduras em nenhuma superfície, e no caso do indivíduo **x** em só foi detetada na Z250. Deste modo, também no caso da contagem de leveduras houve uma variabilidade entre indivíduos e entre superfícies, mas sem relação ao risco de cárie, pelo que não é possível retirar qualquer tendência ou resultado definitivo. Não foram detetadas colônias típicas de *C. albicans*, com exceção do caso do indivíduo **x**. De notar, que foram contadas leveduras no meio de Sabouraud (Fig. 16) de forma presuntiva, não tendo sido levada a cabo uma identificação precisa em meios cromogénicos, ou por testes bioquímicos ou moleculares (como *polymerase chain reaction* -PCR).



**Fig. 16** – Imagem aleatória obtida a partir de uma placa de SAB para contagem de UFCs de leveduras a partir da saliva de um dos indivíduos. São visíveis colônias grandes que foram contadas como leveduras. Também são visíveis pequenas colônias, mas que não foram contadas como sendo típicas de leveduras.

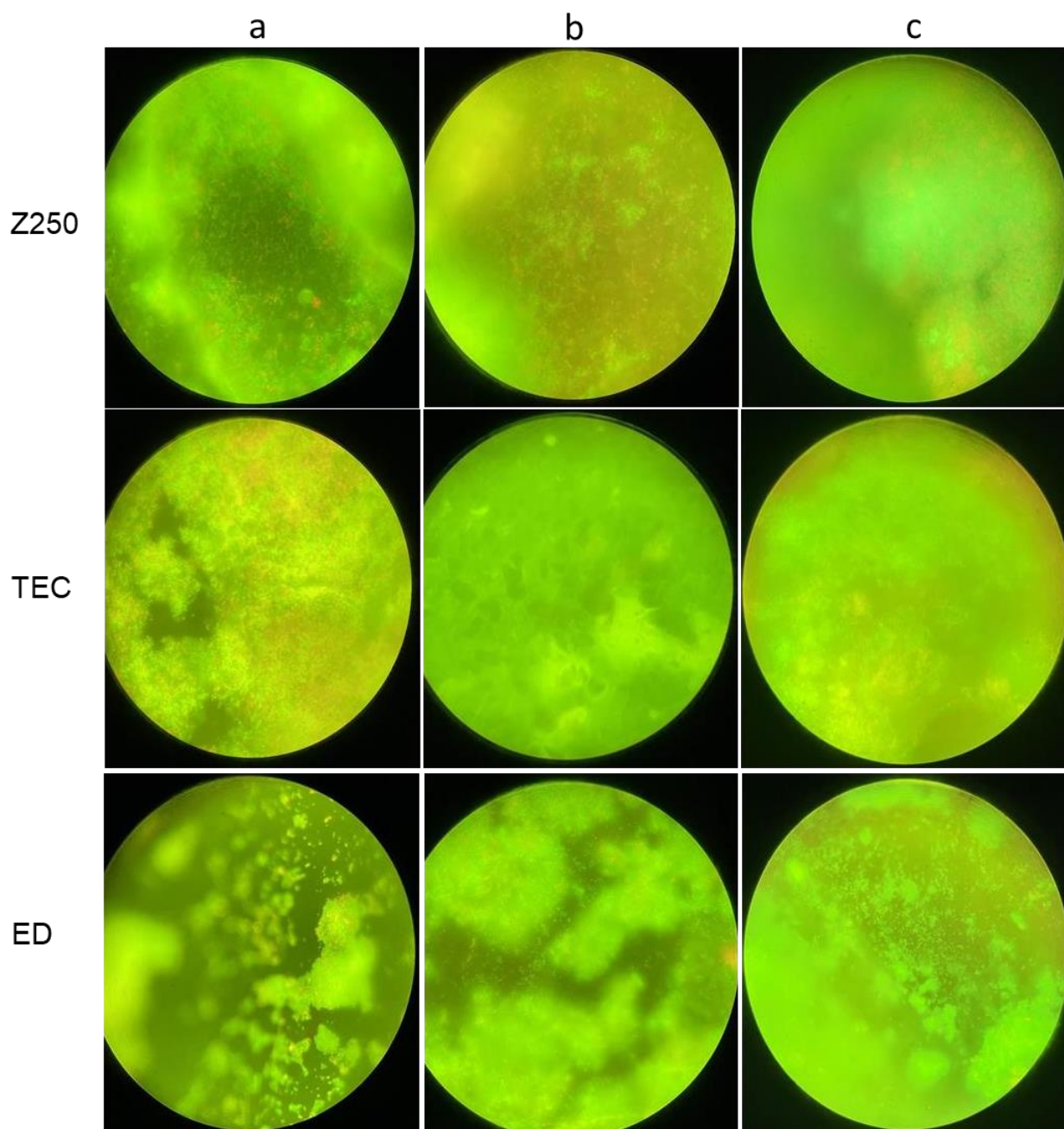
No que respeita à contagem de microrganismos anaeróbios, este também variou entre indivíduos e entre superfícies. Os indivíduos **a** e **x** tiveram contagens semelhantes (cerca de 8 log UFC/cm<sup>2</sup>) para todas as superfícies. Apenas no indivíduo **c** houve maior variabilidade entre superfícies, tendo havido menores contagens na TEC (5.8 log UFC/cm<sup>2</sup>). No que diz respeito a morfologias das colónias contadas em MH5% após incubação em anaerobiose, para determinação dos anaeróbios totais, verificou-se uma grande diversidade, com morfologias bastante distintas e variadas (Fig. 17). A superfície onde houve mais diversidade de morfologias foi no ED, onde em alguns casos foram observadas 6 morfologias diferentes, seguido pela Z250, e menos diversidade no ED. O que indica, que por vezes apesar do número total ser equivalente, o tipo de microrganismos em cada superfície, aqueles que aderiram e formaram biofilme em cada superfície, são distintos. Também aqui, não foi levada a cabo uma identificação definitiva dos vários tipos de colónias.



**Fig. 17** – Imagem aleatória obtida a partir de uma placa de MH5% para contagem de UFCs de anaeróbios a partir da saliva de um dos indivíduos. São visíveis colónias de morfologias distintas e causadores de diferentes tipos de hemólise.

#### **4.4. Análise qualitativa microscópica da viabilidade dos biofilmes derivados da saliva formados nas três superfícies**

Nas Fig. 18 e Fig. 19 são mostradas imagens representativas obtidas da observação microscópica dos biofilmes formados nas três superfícies, Z250, TEC e ED, a partir da saliva total de vários indivíduos; na Fig. 18, três indivíduos (**a**, **b** e **c**) com risco baixo de cárie e na Fig. 19, três indivíduos com risco moderado/alto de cárie (**x**, **y** e **z**). Por este método de observação microscópica, não é possível individualizar microrganismos específicos, pois todos são corados. Conseguimos apenas avaliar a viabilidade total do biofilme (vivas e mortas) e também podemos ver se há mais ou menos biofilme formado. Além disso, também foi possível notar uma variedade de morfologias bacterianas, tendo-se observado: cocos, cocos em cadeia, bacilos curtos e bacilos longos. Foram ainda detectadas morfologias típicas de levedura (célula cerca de 10× superiores às bacterianas) na maioria das superfícies, mas em muito pequeno número. Contudo, não foram identificadas leveduras filamentadas.

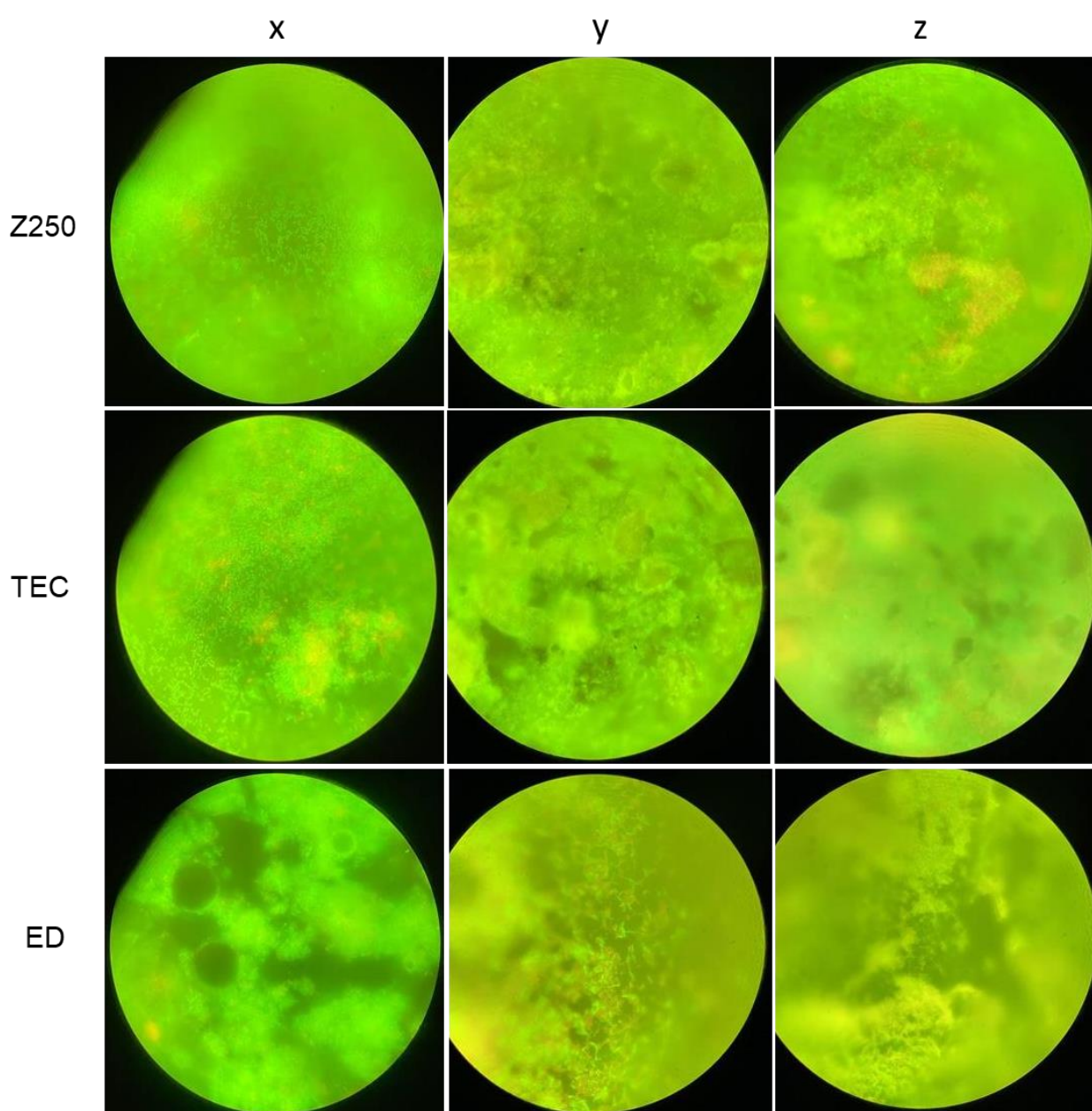


**Fig. 18** - Imagens dos biofilmes derivados da saliva de três indivíduos com baixo risco de cárie (indivíduos **a**, **b** e **c**). Os biofilmes foram formados nas superfícies de Z250, TEC e ED, e observados no microscópio de fluorescência após coloração Live/Dead, na ampliação de 1000×.

Ao analisar as imagens da Fig. 18 conseguimos ver que a saliva proporcionou a formação de um biofilme abundante, mas com características diferentes nas três superfícies. Na TEC, de

uma forma geral e nos três indivíduos, a distribuição parece ser mais uniforme, não havendo espaços completamente vazios nem espaços com densidade bacteriana muito elevada. Além disso, em termos de viabilidade, pode notar-se que no caso do paciente **b**, conseguem-sever muito mais células mortas no biofilme formado na Z250 do que na TEC.

No ED, o biofilme a partir da saliva de cada um dos três indivíduos parece ser menos denso e menos agregado com espaços totalmente ausentes de microrganismos.



**Fig. 19** – Imagens dos biofilmes derivados de saliva de três indivíduos com moderado/alto risco de cárie (indivíduos **x**, **y** e **z**). Os biofilmes foram formados nas superfícies de Z250, TEC

e ED, e observados ao microscópio de fluorescência após coloração Live/Dead, na ampliação de 1000x.

Ao analisar a Fig. 19, podemos notar que os biofilmes formados a partir da saliva dos indivíduos com risco moderado/alto de cária são relativamente idênticos em termos de estrutura e densidade microbiana e viabilidade nas resinas Z250 e TEC. Sendo que no ED, o biofilme formado, e a partir da saliva de cada um dos três indivíduos, foi menos denso, havendo também mais espaços na superfície sem biofilme.

Quanto à viabilidade, não é possível notar grandes diferenças, nem entre indivíduos nem entre superfícies.





## 5. CONCLUSÕES

De um modo geral, as superfícies Z250 e TEC proporcionaram a formação de um biofilme, mono-espécie ou misto, semelhante àquele formado no ED, revelando que estas resinas compostas usadas na restauração dentária proporcionam uma adesão microbiana bastante semelhante àquela que ocorre no esmalte dentário. Apenas o biofilme de *C. albicans* na TEC se apresentou menos viável. Os resultados obtidos da saliva dos indivíduos com risco baixo e dos indivíduos com moderado/alto risco não representam relevância clínica, face a uma quantidade reduzida de indivíduos em cada grupo e, conseqüentemente, reduzida quantidade de amostras (apenas uma única amostra e respetiva análise foram feitas), no entanto, servem de base para estudos posteriores mais aprofundados e robustos.

*Formação in vitro de biofilmes de Streptococcus mutans, Candida albicans e derivados da saliva humana em resina composta e resina nanohíbrida: análise dos biofilmes formados e comparação*

## BIBLIOGRAFIA

Bacali, C., Vulturar, R., Buduru, S., Cozma, A., Fodor, A., Chiș, A., Lucaciu, O., Damian, L., & Moldovan, M. L. (2022). Oral Microbiome: Getting to Know and Befriend Neighbors, a Biological Approach. *Biomedicine* 10 (3). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030671>.

Banerjee, S., Schlaeppi, K., & van der Heijden, M. G. A. (2018). Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 16, Issue 9, pp. 567–576). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0024-1>.

Barbieri, D., Vicente, V., Fraiz, F., Lavoranti, O., Svidzinski, T., & Pinheiro, R. (2007). Analysis of the In Vitro Adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://www.scielo.br/j/bjm/a/8m5vYGy9JZjgzXjwGMYt6vn/?lang=en>

Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schlöter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* 8 (1). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>.

Berger, D., Rakhamimova, A., Pollack, A., & Loewy, Z. (2018). Oral Biofilms: Development, Control, and Analysis. *High-Throughput*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/ht7030024>.

Cintoni, M., Rinninella, E., Scaldaferrì, F., Ianìro, G., Franceschi, F., Mele, M. C., & Gasbarrini, A. (2019). The oral microbiota in oral and systemic diseases. *Microb Health Dis* 2019; 1: e209.

Deo, P. N., & Deshmukh, R. (2019). Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 23 (1), 122–128. Wolters Kluwer Medknow Publications. [https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP\\_304\\_18](https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_304_18).

Falsetta, M. L., Klein, M. I., Colonne, P. M., Scott-Anne, K., Gregoire, S., Pai, C. H., Gonzalez-Begne, M., Watson, G., Krysan, D. J., Bowen, W. H., & Koo, H. (2014). Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infection and Immunity*, 82(5), 1968–1981. <https://doi.org/10.1128/IAI.00087-14>.

Farias Pontes, L., Alves, E. B., Alves, B. P., & Yagüe Ballester, R. (2014). Mechanical properties of nanofilled and microhybrid composites cured by different light polymerization modes Non-carious cervical lesions-oral health View project Tutorial STROBE View project. <https://www.researchgate.net/publication/236643293>.

Featherstone, J., Gomes, F.R., & Crystal, Y.O. (2019). CAMBRA® Caries Management by Risk Assessment A Comprehensive Caries Management Guide for Dental Professionals. *Journal of the California Dental Association*.

Hervás García, A., Angel, M., Lozano, M., Cabanes Vila, J., Escribano, A. B., Galve, P. F., Adela, D., & García, H. (2006). E215 Composite resins. A review of the materials and clinical indications E216. *Medicina Oral, Patologia Oral, Cirugia Bucal* 2006 11(2):E215-20.

Hwang, G., Liu, Y., Kim, D., Li, Y., Krysan, D. J., & Koo, H. (2017). *Candida albicans* mannans mediate *Streptococcus mutans* exoenzyme GtfB binding to modulate cross-kingdom biofilm development in vivo. *PLoS Pathogens*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006407>.

Iebba, V., Totino, V., Gagliardi, A., Santangelo, F., Cacciotti, F., Trancassini, M., Mancini, C., Cicerone, C., Corazziari, E., Pantanella, F., & Schippa, S. (2016). Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *Microbiologica* 39.

Jacobsen, I., Wilson, D., Wächtler, B., Brunke, S., Naglik, J., & Hube, B. (2014). *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Reviews*, 85-93. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/eri.11.152>.

Kim, D., Sengupta, A., Niepa, T. H., Lee, B. H., Weljie, A., Freitas-Blanco, V. S., Murata, R. M., Stebe, K. J., Lee, D., & Koo, H. (2017). *Candida albicans* stimulates *Streptococcus mutans* microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites. *Scientific reports*, 7, 41332. <https://doi.org/10.1038/srep41332>.

Klinke, T., Guggenheim, B., Klimm, W., & Thurnheer, T. (2011). Dental caries in rats associated with *Candida albicans*. *Caries Research* 45(2), 100–106. <https://doi.org/10.1159/000324809>.

Kopperud, H. M., Johnsen, G. F., Lamolle, S., Kleven, I. S., Wellendorf, H., & Haugen, H. J. (2013). Effect of short LED lamp exposure on wear resistance, residual monomer and degree of conversion for Filtek™ Z250 and Tetric EvoCeram® composites. *Dental Materials* 29(8), 824–834. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.04.022>.

Kozmos, M., Virant, P., Rojko, F., Abram, A., Rudolf, R., Raspor, P., Zore, A., & Bohinc, K. (2021). Bacterial Adhesion of *Streptococcus mutans* to Dental Material Surfaces. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(4), 1152. <https://doi.org/10.3390/molecules26041152>.

Krasowska, A., Murzyn, A., Dyjankiewicz, A., Łukaszewicz, M., & Dziadkowiec, D. (2009). The antagonistic effect of *Saccharomyces boulardii* on *Candida albicans* filamentation, adhesion and biofilm formation. *FEMS Yeast Research*, 1312-1321. <https://academic.oup.com/femsyr/article/9/8/1312/520904?view=extract>

Lu, M., Xuan, S., & Wang, Z. (2019). Oral microbiota: A new view of body health. In *Food Science and Human Wellness* 8 (1) 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.12.001>.

Menezes, M. L. F. V. de, Macedo, Y. V. G. de, Ferraz, N. M. P., Matos, K. de F., Pereira, R. O., Fontes, N. M., Batista, M. I. H. de M., & Paulino, M. R. (2020). A importância do controle do biofilme dentário: uma revisão da literatura. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, 55, e3698. <https://doi.org/10.25248/reas.e3698.2020>.

Metwalli, K. H., Khan, S. A., Krom, B. P., & Jabra-Rizk, M. A. (2013). *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the Human Mouth: A Sticky Situation. *PLoS Pathogens*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003616>.

Nogueira, B., Fernandes, P., Paiva, A., Fagundes, N., Teixeira, F., & Lima, R. (2014). Avaliação comparativa da ultraestrutura e propriedades físicas do esmalte bovino, bubalino e humano. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 485-490. <https://www.scielo.br/j/pvb/a/YhZdrhHGTYWpcHTzzbBGdPt/?format=pdf&lang=pt>

Orłowski, M., Tarczydło, B., & Chałas, R. (2015). Evaluation of marginal integrity of four bulk-fill dental composite materials: In vitro study. *Scientific World Journal*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/701262>.

Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Tsakos, G., & Ismail, A. (2017). Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers*, 3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>.

Sampaio-Maia, B., Caldas, I. M., Pereira, M. L., Pérez-Mongiovi, D., & Araujo, R. (2016). The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases. *Advances in applied microbiology*, 97, 171–210. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.08.002>.

Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*, 14(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>.

Seneviratne, C., Zhang, C., & Samaranayak, L. (2011). The Chinese Journal of Dental Research. Dental plaque biofilm in oral health and disease, pp. 87-94. <https://www.quintessence-publishing.com/deu/en/article-download/851685/chinese-journal-of-dental-research/2011/02/dental-plaque-biofilm-in-oral-health-and-disease>

Song, F., Koo, H., & Ren, D. (2015). Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *Journal of dental research*, 94(8), 1027–1034. <https://doi.org/10.1177/0022034515587690>.

Struzycka I. (2014). The oral microbiome in dental caries. Polish journal of microbiology, 63(2), 127–135.

Thurnheer, T., & Belibasakis, G. N. (2014). Integration of non-oral bacteria into in vitro oral biofilms. Virulence, 6(3), 258–264. <https://doi.org/10.4161/21505594.2014.967608>.

Tiffany, C. R., & Bäumler, A. J. (2019). Dysbiosis: from fiction to function. American Journal of Physiology Gastrointestineology and Liver Physiology, 317, 602–608. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00230.2019>.