

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS
PARA SAÚDE**

REUBER MENDES ROCHA

**Associação da quitosana e clorexidina contra formação de biofilmes por
estreptococos do grupo mutans e *Candida sp.* em escovas dentais**

**Anápolis - GO
2022**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS CAMPUS DE CIÊNCIAS EXATAS E
TECNOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE

REUBER MENDES ROCHA

**Associação da quitosana e clorexidina contra formação de biofilmes por
estreptococos do grupo mutans e *Candida sp.* em escovas dentais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*
em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (nível mestrado)
da Universidade Estadual de Goiás como exigência parcial
para obtenção do Título de Mestre em Ciências Aplicadas
a Produtos para Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves

Anápolis - GO

2022



Câmpus
Anápolis de Ciências
Exatas e Tecnológicas
Henrique Santillo



Universidade
Estadual de Goiás



ESTADO
DE GOIÁS

SERVIÇO PÚBLICO ESTADUAL
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS HENRIQUE SANTILLO
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 054

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO - No dia quatorze do mês de junho de 2022, às 08h30min, reuniram-se os componentes da banca Examinadora: Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves – Orientador, Profa. Dra. Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão e Profa. Dra. Mayara Barbosa Viandelli Mundim, sob a presidência do primeiro, e em sessão realizada por videoconferência. Procederam à avaliação da defesa de dissertação de Mestrado intitulada: “Associação da quitosana e clorexidina contra formação de biofilmes por estreptococos do grupo *mutans* e *Candida sp.* em escovas dentais” de autoria de **Reuber Mendes Rocha**, discente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca Examinadora: Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra a seguir foi concedida ao autor da dissertação **Reuber Mendes Rocha** que, em 40 minutos procedeu à apresentação do trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. A dissertação foi aprovada por unanimidade, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE, na área de concentração “Pesquisa e Obtenção de Produtos para Saúde”, na linha de pesquisa “Desenvolvimento de Produtos para a Saúde” pela Universidade Estadual de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGCAPS, da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções. Cumpridas as formalidades de pauta, às 10 horas e 20 minutos, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação de Mestrado e para constar eu, Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves, presidente da banca, lavrei a presente Ata, que após lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.

Profa. Dra. Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão
Membro externo – UEG

Profa. Dra. Mayara Barbosa Viandelli Mundim
Membro externo - UniEVANGÉLICA

Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves
Presidente da Banca

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MR442 MENDES ROCHA, REUBER
a Associação da quitosana e clorexidina contra
formação de biofilmes por estreptococos do grupo mutans
e Candida sp. em escovas dentais / REUBER MENDES
ROCHA; orientador PLÍNIO LÁZARO FALEIRO NAVES. --
Anápolis, 2022.
101 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
Mestrado Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos
para Saúde) -- Câmpus Central - Sede: Anápolis - CET,
Universidade Estadual de Goiás, 2022.

1. Estreptococos do grupo mutans. 2. Candida. 3.
Quitosana. 4. Clorexidina. 5. Cavidade bucal. I. LÁZARO
FALEIRO NAVES, PLÍNIO , orient. II. Título.

Dedicatória

Aos meus pais Eni e Delmo: o incentivo e paciência foram fundamentais.

À Rhaíssa, irmã querida que é para mim, exemplo de dedicação e entrega.

À Valéria por estar presente e, mais que ninguém, acompanhou e presenciou cada passo e deu forças até o fim.

Ao meu avô Josias a quem devo vários ensinamentos.

Ao meu primo Lucas Alexandre (*in memoriam*) pelo exemplo de simplicidade e leveza na vida.

Aos meus amigos de infância que torceram por mim.

Ao prof. Dr. Plínio Lázaro pela infinita paciência e instrução em cada passo planejado e executado. Agradeço profundamente por tudo que me ensinou enquanto ser humano, acadêmico e profissional.

Agradecimentos

Aos que se seguem, meu sincero agradecimento.

Aos meus pais que tiveram serenidade para lidar com a distância e saudade.

À Valéria que foi ombro amigo; esteve perto em todas as circunstâncias e mesmo na eminência de cansaço, jamais me deixou desanimar.

À minha irmã Rhaíssa que torce por mim e a quem admiro profundamente.

Ao meu amado avô. O respeito e admiração que tenho são imensuráveis. Suas orações foram fundamentais para que o final chegasse com sucesso.

Aos meus amigos de infância: Simão Pedro, Paulo Henrique Garcia, Micaías Ribeiro, Kayron Vargas, Douglas Henrique, Ruan Alves, Lucas Alves: não importando o tempo e a distância, nossa amizade se fortaleceu.

À então secretária CAPS Leila que desde o primeiro dia me indicou caminhos e pessoas que foram fundamentais.

À todos os colegas de laboratório: à sua maneira, contribuíram para cada passo. À Amanda Correia: colega de laboratório e amiga de vida.

Aos amigos que fiz: Isadora, Elizabeth, Osvaldo, Milena, Stephany: obrigado pela paciência e contribuições tanto pessoais quanto técnicas.

Agradeço a todos os professores do programa e aqueles que contribuíram no enriquecimento da pesquisa e escrita.

À Universidade Estadual de Goiás por ter aberto as portas e me recebido e possibilitado engrandecimento como aluno, pessoa e profissional.

Especialmente ao meu orientador Plínio Lázaro Faleiro Naves: dedicou incontável tempo, paciência e esclarecimentos à minha escrita, oratória, e amadurecimento.

Sumário

Introdução	13
Capítulo 1 - Isolamento e caracterização da formação de biofilme por <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Candida</i> sp. da cavidade bucal.....	16
Capítulo 2 - Uso de quitosana e clorexidina no controle de estreptococos do grupo mutans na cavidade bucal.....	35
Capítulo 3 - Biofilm formation on toothbrushes by mutans group streptococci and <i>Candida</i> spp. isolated from oral cavity of students of the State University of Goiás, Brazil	56
Capítulo 4 - Efeito da quitosana e do digluconato de clorexidina na formação de biofilme por estreptococos do grupo mutans e <i>Candida</i> sp. em escovas dentais	74
Anexos	88

Lista de quadros e tabelas

Capítulo 1

Quadro 1. Caracterização dos estreptococos do grupo mutans..... 20

Capítulo 2

Quadro 1. Caracterização dos estreptococos do grupo mutans 37

Quadro 2. Principais técnicas escovação dental 41

Quadro 3. Agentes de controle químico de biofilme bucal 42

Capítulo 3

Table 1. Presumptive identification based on colonial morphology of the isolated microorganisms. 61

Capítulo 4

Tabela 1. Resultados de formação de biofilme na ausência e presença dos compostos antimicrobianos 80

Lista de figuras

Capítulo 1

Figura 1. Coleta das amostras bucais de voluntários.....	24
Figura 2. Processamento microbiológico das amostras obtidas na coleta	25
Figura 3. Morfologia macroscópica de colônias crescidas em ágar mitis salivarius bacitracina sacarose (AMSBS) a 37 °C após 72 horas em microaerofilia. A, aspecto geral. B, Detalhe em aproximação. Colônias de cor azul escuro, centro levemente mais escurecido. Centro elevado, aspecto pegajoso	27
Figura 4. Morfologia macroscópica de colônias crescidas em ágar Sabouraud dextrose cloranfenicol (ASDC) a 37 °C após 72 horas em microaerofilia. A, aspecto geral. B, Detalhe em aproximação. Colônias esféricas esbranquiçadas, centro levemente mais elevado	28

Capítulo 2

Figura 1. Fórmula estrutural da quitosana	44
Figura 2. Implicações práticas da desacetilação da quitosana	46
Figura 3. Fórmula estrutural da clorexidina	47

Capítulo 3

Figure 1. Microbiological processing of samples	61
Figure 2. Biofilm formation assay on sterile toothbrushes.	62
Figure 3. Cell counts ($\text{Log}_{10} \text{cfu.ml}^{-1}$) recovered from the microbial biofilms adhered in toothbrushes.	67

Capítulo 4

Figura 1. Ensaio da formação de biofilme em escovas dentais.....	79
---	----

Símbolos, siglas e abreviaturas

°C – graus *Celsius*

AMSBS - ágar *mitis salivarius* bacitracina sacarose

ASDC - ágar *Sabouraud* dextrose cloranfenicol

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP - adenosina trifosfato

BHI - *brain heart infusion*

Ca - *Candida*

EGM - estreptococos do grupo mutans

MGS - mutans group streptococci

h - Horas

mg - miligramas

kHz - kilohertz

mL - mililitros

mm - milímetros

SFE - solução fisiológica estéril 0,9%

Resumo

A cavidade bucal é colonizada por diversos micro-organismos comensais e por outros com potencial patogênico. Nesse sítio anatômico, os estreptococos do grupo mutans (EGM) e *Candida* (Ca) têm destaque por serem agentes etiológicos que participam do desenvolvimento da cárie dentária e da candidíase, respectivamente. A formação de biofilme microbiano é um importante fator de virulência que contribui na patogenicidade desses micro-organismos. O objetivo desta pesquisa é avaliar o efeito da quitosana, clorexidina e da combinação das duas na formação de biofilme de EGM e Ca em escovas dentais. Para tanto, foram coletadas amostras da saliva de 12 discentes da Universidade Estadual de Goiás para o isolamento e identificação presuntiva dos micro-organismos com base no crescimento em meios seletivos e análise da morfologia macroscópica das colônias. EGM foram isolados em 10 amostras com predominância de colônias com aspecto mucóide e em 5 amostras foram isoladas colônias com aspecto sugestivo de Ca. Posteriormente, os micro-organismos foram cultivados em escovas dentárias embebidas em caldo de cultura para se avaliar a formação de biofilme dos isolados. Os resultados indicaram que todos os isolados microbianos foram capazes de formar biofilmes nas condições testadas, com contagens de células microbianas aderidas ao biofilme variando de 6,75 a 11,00 Log₁₀ ufc.ml⁻¹ para estreptococos do grupo mutans e 4,94 a 5,79 Log₁₀ ufc.ml⁻¹ para *Candida* sp. Posteriormente foi avaliado impacto da solução de quitosana a 1 mg.mL⁻¹, da clorexidina 0,60 mg.mL⁻¹ e da associação de ambas na formação de biofilme dos isolados em escovas dentais pré-tratadas. Os resultados indicaram que a quitosana reduziu a formação de biofilme dos isolados EGM4 e EGM5 nas escovas pré-tratadas. A clorexidina foi capaz de reduzir a formação de biofilme por todos os EGM e Ca8. A combinação dos compostos foi eficaz contra EGM4, EGM 5 e Ca2. Em resumo, neste trabalho avaliamos a formação de biofilme em escovas dentais por estreptococos do grupo mutans e *Candida* sp. isolados da boca de estudantes da Universidade Estadual de Goiás. A metodologia de coleta de amostras mostrou-se eficaz, pois os microrganismos não foram recuperados em apenas uma escova coletada. Na segunda parte do estudo, foi detectado que todos os isolados foram capazes de formar biofilmes nas escovas, o que reforça a importância dos cuidados com a descontaminação das escovas dentais na

promoção da saúde bucal. Sendo assim, conclui-se que a clorexidina foi o composto com maior efetividade na redução da formação de biofilme pelos isolados microbianos testados, seguido da associação de quitosana e clorexidina. A quitosana apresentou o pior desempenho e a associação dos compostos não foi capaz de intensificar a redução de biofilme da clorexidina.

Palavras-chave: quitosana, clorexidina, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, biofilme, cárie dentária, candidíase bucal, saliva.

Abstract

The oral cavity is colonized by several commensal microorganisms and by others with pathogenic potential. In this anatomical site, mutans group streptococci (MGS) and *Candida* (Ca) are highlighted as etiological agents that participate in the development of dental caries and candidiasis, respectively. The formation of microbial biofilm is an important virulence factor that contributes to the pathogenicity of these microorganisms. The objective of this research is to evaluate the effect of chitosan, chlorhexidine and the combination of the two on the formation of MGS and Ca biofilm on toothbrushes. For this purpose, saliva samples were collected from 12 students from the Universidade Estadual de Goiás for the isolation and presumptive identification of microorganisms based on growth in selective media and analysis of the macroscopic morphology of the colonies. MGS were isolated in 10 samples with a predominance of colonies with a mucoid aspect and in 5 samples colonies with a suggestive Ca aspect were isolated. Subsequently, the microorganisms were cultured on toothbrushes soaked in culture broth to evaluate the biofilm formation of the isolates. The results indicated that all microbial isolates were able to form biofilms under the conditions tested, with microbial cell counts adhered to the biofilm ranging from 6.75 to 11.00 Log₁₀ cfu.ml⁻¹ for mutans streptococci and 4.94 to 5.79 Log₁₀ cfu.ml⁻¹ for *Candida* sp. Subsequently, the impact of 1 mg.mL⁻¹ chitosan solution, 0.60 mg.mL⁻¹ chlorhexidine solution and the association of both on the biofilm formation of the isolates on pre-treated toothbrushes was evaluated. The results indicated that chitosan reduced the biofilm formation of the MGS4 and MGS5 isolates on the pre-treated brushes. Chlorhexidine was able to reduce biofilm formation by all

MGS and Ca8. The combination of compounds was effective against MGS4, MGS 5 and Ca2. In summary, in this work we evaluated the formation of biofilm on toothbrushes by mutans streptococci and *Candida* sp. isolated from the mouths of students at the State University of Goiás. The sample collection methodology proved to be effective, as the microorganisms were not recovered in just one brush collected. In the second part of the study, it was found that all isolates were able to form biofilms on toothbrushes, which reinforces the importance of taking care with decontamination of toothbrushes in promoting oral health. Therefore, it can be concluded that chlorhexidine was the compound with the highest biofilm-reducing activity of MGS and Ca, followed by the association of chitosan and chlorhexidine; only chitosan had the lowest inhibition results only on MGS and without Ca action. The combination of compounds was not able to intensify the biofilm reduction of chlorhexidine alone, but the association was more effective than chitosan.

Keywords: chitosan, chlorhexidine, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, biofilm, dental caries, oral candidiasis, saliva.

Introdução

A cavidade bucal humana é consideravelmente colonizada por micro-organismos logo após o nascimento que permanecem durante toda a vida. Inicialmente, este processo ocorre através da adesão de micro-organismos nos tecidos duros e moles da boca e depende diretamente de fatores como manutenção da higiene da boca, capacidade imunológica do indivíduo, uso de medicamentos, ocorrência de doenças sistêmicas como diabetes e SIDA/HIV e tratamentos médicos abrangendo radioterapia e quimioterapia (GERMANO et al., 2018).

Os *Streptococcus mutans* são bactérias associadas ao processo de instalação e desenvolvimento da cárie dentária que, por sua vez, relaciona-se à ingestão de açúcares pelo portador, higiene inadequada da cavidade bucal e por consequência, aumento da população bacteriana. Deste modo, o tempo de exposição a esse conjunto de fatores culmina na cárie dentária que é definida como uma doença bacteriana intimamente relacionada à presença de biofilme polimicrobiano com agregação, metabolismo e secreção de ácido na superfície dental (BIRAL et al., 2013).

Outro micro-organismo relevante na cavidade bucal é a *Candida albicans*. Esta levedura faz parte da microbiota normal, mas que pode se comportar como patogênica e causar candidíase na boca, no caso de quebra de equilíbrio com o hospedeiro (VILA et al., 2020).

O biofilme microbiano instala-se sobre a película adquirida que se forma em até 15 minutos após a higienização e polimento do esmalte dentário e é considerada como a primeira etapa para a formação de biofilme, uma vez que os micro-organismos colonizadores primários aderem à película e então promovem agregação de outros micro-organismos para induzir a formação da biomassa esbranquiçada de biofilme dentário como uma comunidade polimicrobiana (FARIA et al., 2020).

Na cavidade bucal, o biofilme microbiano, principalmente advindo da participação associativa entre *S. mutans* e *C. albicans*, contribui para a proteção,

disseminação e virulência dos micro-organismos e está condicionado à presença, quantidade e diversidade de micro-organismos presentes, de modo a fornecer interação física, química e metabólica em relações de sinergia e antagonismo entre os indivíduos da microbiota oral (DIAZ; VALM, 2020).

A investigação sobre o controle microbiano na cavidade bucal com compostos naturais ou sintéticos visa interferir na formação de biofilme e no seu impacto na preservação e recuperação da saúde na boca. Dentre estes produtos, encontra-se a quitosana que é um polímero biocompatível, biodegradável e mucoadesivo com efeito antibacteriano descrito contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de ser considerado um produto antitumoral, cicatrizante e anticoagulante (SEABRA, PELEGRINO e HADDAD, 2016).

A clorexidina é um produto sintético comumente empregado como agente antimicrobiano de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas anaeróbias e facultativas, fungos e vírus. Tem ampla utilização na prática clínica devido à seu poder antimicrobiano como medicamento de controle de biofilme bucal para tratamento periodontal, como adjuvante na higienização bucal de paciente com mobilidade reduzida, antes e após procedimentos cirúrgicos para manutenção de baixos níveis bacterianos e também pode ser usada em tratamentos endodônticos substituindo a solução de hipoclorito de sódio (FERRAZ et al., 2007).

Neste contexto, o presente trabalho investigou a capacidade de formação de biofilme por estreptococos do grupo mutans e *Candida sp.* isolados da cavidade bucal de estudantes da Universidade Estadual de Goiás. Posteriormente, foi avaliado o efeito da quitosana, clorexidina e da associação de ambos compostos na formação de biofilme pelos isolados microbianos em escovas dentais.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar a formação de biofilme microbiano por estreptococos do grupo mutans e *Candida* sp. em escovas dentais pré-tratadas com solução de clorexidina 0,60 mg.mL⁻¹ e quitosana 1 mg.mL⁻¹ e ambas associadas.

Objetivos específicos

Capítulo 1 - Descrever as metodologias empregadas para o isolamento e identificação de *S. mutans* e *C. albicans* da cavidade bucal e estabelecer o perfil de formação de biofilme dos isolados em condições laboratoriais.

Capítulo 2 - Realizar um levantamento bibliográfico sobre o emprego de quitosana e clorexidina no controle microbiano oral.

Capítulo 3 - Avaliar a formação de biofilme em escovas dentais por estreptococos do grupo mutans e *Candida* sp. isolados da cavidade oral de estudantes da Universidade Estadual de Goiás.

Capítulo 4 - Comparar a formação de biofilme por estreptococos do grupo mutans e *Candida* sp. em escovas dentais tratadas com quitosana 1 mg.ml⁻¹ e digluconato de clorexidina 0,60 mg.mL⁻¹ clorexidina isoladas e em combinação.

**Capítulo 1: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE
BIOFILME POR *Streptococcus mutans* E *Candida albicans* DA
CAVIDADE BUCAL**

Publicado no E-Book: "Métodos e técnicas aplicados na pesquisa interdisciplinar em saúde" Editora UEG, Anápolis, 2022 disponível em:
"https://cdn.ueg.edu.br/source/editora_ueg/conteudo_extensao/12224/ebook_2022_meto_dos_e_tecnicas_aplicados_na_pesquisa.pdf"

ISBN: 978-65-88502-14-3

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR
Streptococcus mutans E *Candida albicans* DA CAVIDADE BUCAL**

Reuber Mendes Rocha¹; Juliane Guimarães de Carvalho²; Plínio Lázaro Faleiro Naves³

¹ Discente - Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas em Produtos para Saúde, Campus Central, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, Goiás - GO, Brasil.

² Cirurgiã-dentista, especialista em dentística (HRAC-USP), mestre e doutora em Biologia Oral pela Faculdade de Odontologia de Bauru (USP). Docente do curso de Odontologia no Centro Universitário de Anápolis UniEVANGÉLICA. Docente colaboradora do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Odontologia da UniEVANGÉLICA

³ Orientador - Professor do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas em Produtos para Saúde, Campus Central, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, Goiás - GO, Brasil.

Capítulo 4

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Streptococcus mutans* E *Candida albicans* DA CAVIDADE BUCAL

REUBER MENDES ROCHA
JULIANE GUIMARÃES DE CARVALHO
PLÍNIO LÁZARO FALEIRO NAVES

1 INTRODUÇÃO

Além das funções mastigatória e de fala, a boca está ligada à aparência e à integração social, portanto, é crescente a preocupação com a saúde bucal, dada a significância do sistema estomatognático. A saúde bucal é frequentemente comprometida por doenças como cárie, lesões inflamatórias, infecciosas, cistos e tumores (JIN *et al.*, 2016). A disponibilidade de açúcares estimula a microbiota bucal acidogênica residente a proliferar e secretar ácido lático que, por sua vez, induz à dissolução dos tecidos dentários duros, o que é conhecido como cárie (ALMEIDA *et al.*, 2017).

A cárie dentária pode ser definida como um sinal clínico do processo de desmineralização da superfície dentária, causado pelo metabolismo de biofilme bacteriano na presença de açúcar, principalmente a sacarose. A dissolução da superfície dentária é um processo quase sempre lento e, se não houver alguma interferência, pode progredir até a destruição dentária (FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2017). O processo de desmineralização ocorre devido ao desequilíbrio nas flutuações do pH resultante de produção de ácido

lático proveniente do metabolismo microbiano, principalmente de *Streptococcus mutans* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

A complexidade da microbiota bucal humana não permite creditar unicamente a um tipo de micro-organismo o desenvolvimento da cárie dentária. Estudos *in vivo* demonstraram que, além dos *Streptococcus mutans*, outros micro-organismos acidogênicos participam da etiologia do processo cariioso, dentre eles, *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus salivarius* e *Streptococcus sanguis* (JORGE, 2012).

Inicialmente, os micro-organismos interagem para a formação do biofilme e expressam genes em resposta às condições bucais como pH, oxigenação, nutrientes e presença de superfície sólida (RODRIGUES, 2019). O estabelecimento de biofilme polimicrobiano é um importante fator na patogênese, pois propicia proteção aos micro-organismos associados, que, ao fermentarem os carboidratos disponíveis, reduzem o pH local e intensificam a perda mineral (MALTZ *et al.*, 2016).

Contudo, nem todas as espécies residentes na boca humana são eminentemente prejudiciais. *Candida albicans* é outro importante micro-organismo bucal que, em situações de normalidade do hospedeiro, é um componente comensal, mas que pode se comportar como patogênico quando fatores locais e sistêmicos são desencadeados (WILLIAMS *et al.*, 2013). A capacidade de transição de levedura para filamentosa está diretamente relacionada à sua patogênese (HAN; CANNON; VILLAS-BÓAS, 2011).

Essa levedura tem capacidade de colonizar a mucosa bucal e superfícies de próteses (MARTIN *et al.*, 2011) e é relatada como causa frequente de infecções orofaríngeas (HILLER *et al.*, 2011); também apresenta potencial cariogênico, sendo encontrada em 10% de dentes cariados sem *S. mutans* (AAS *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2018).

É crescente a demanda por compostos sintéticos e naturais que atuem de maneira complementar ao arsenal já disponível no controle de micro-organismos patogênicos na cavidade bucal (MELO *et al.*, 2015). A compreensão da dinâmica da formação de biofilme contribui diretamente para o estudo de estratégias que visam ao controle

Capítulo 4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

de doenças microbianas bucais relacionadas à presença e quantidade de biofilme microbiano nesse sítio anatômico. Nesse contexto, o objetivo deste capítulo é descrever as metodologias empregadas para o isolamento e identificação de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* da cavidade bucal e estabelecer o perfil de formação de biofilme dos isolados em condições laboratoriais.

2 *Streptococcus mutans*

S. mutans é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa e imóvel com crescimento ideal a 37 °C na presença de 5 a 10% de dióxido de carbono. Agrega-se e forma biofilme bacteriano, metaboliza açúcares, especialmente a sacarose, libera ácido lático que promove desmineralização dental, sendo, portanto, considerado como o principal agente etiológico da cárie humana (ARAÚJO, 2012; MEI *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2008).

Os estreptococos mutans estão classificados em quatro subgrupos: C, E, F, K, baseados na composição polissacarídeo ramnose-glicose celular externa: cerca de 75% são tipo C, 20% tipo E e o restante, tipos F ou K. Essa descrição permitiu aprimoramento de estudos sobre mecanismo de ação, infecção e progressão patológica da bactéria (LEMOS *et al.*, 2018).

S. mutans pertence à família *Streptococaceae*, que possui 6 grupos: *mutans*, *anginosus*, *mitis*, *salivarius* encontrados na boca. O grupo *mutans*, por sua vez, engloba as espécies *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. downei*, *S. macacae*, *S. ferus*. O Quadro 1 apresenta um compilado das principais características de cada um.

Além do papel central na etiologia da cárie, *S. mutans* também pode causar a endocardite bacteriana, condição que é desencadeada por micro-organismos presentes na microbiota bucal indígena, dentre os quais figuram *S. mutans* e *Candida*, enterococos e outros estreptococos. Geralmente acomete válvulas cardíacas danificadas, mas pode ocorrer em qualquer parte do endocárdio comprometido, resultando em embolia, infarto, febre baixa e suores e até morte (SCHMALZLE, 2020).

Quadro 1 – Caracterização dos estreptococos do grupo *mutans*

Espécies	Características	Identificação
<i>S. mutans</i>	São isolados aderidos à superfície dentária humana e são grandes metabolizadores de sacarose. Estão relacionados à cárie humana	Fermentação de manitol, sorbitol, rafinose, lactose, manose e produz ácido em presença de carboidratos. Não fermentam xilose, glicero. Possuem 3 antígenos polissacarídeos <i>c,ef</i> . Produzem H ₂ O ₂ . Produzem polissacarídeos extracelulares e intracelulares.
<i>S. sobrinus</i>	São isolados aderidos a superfície dentária humana e podem estar relacionados à cárie dentária em humanos	Fermentação de manitol, lactose, sorbitol, rafinose. Produção de H ₂ O ₂ através da enzima piruvato-oxidase (converte piruvato em acetil-fosfato em presença de O ₂ e libera H ₂ O ₂ e CO ₂)
<i>S. rattus</i>	Isolados da microbiota bucal de roedores. Ocasionalmente, são isolados da boca humana.	Produção de glucano como polissacarídeo extracelular. São acidogênicos a partir de carboidratos assim como <i>S. mutans</i> .
<i>S. ferus</i>	Isolados da microbiota bucal de roedores.	Não sintetizam glucano. São acidogênicos a partir de carboidratos assim como <i>S. mutans</i> e <i>S. rattus</i> .
<i>S. macacae</i>	Isolados da microbiota bucal de primatas	Produção de polissacarídeos extracelulares. São acidogênicos a partir de carboidratos assim como <i>S. mutans</i> , <i>S. rattus</i> e <i>S. ferus</i> .
<i>S. cricetus</i>	Presente na boca de roedores (ratos e hamsters). Ocasionalmente são isolados da boca humana.	Produção de polissacarídeos extracelulares como <i>S. mutans</i> e <i>S. macacae</i> . São acidogênicos a partir de carboidratos. <i>S. mutans</i> , <i>rattus</i> , <i>macacae</i> e <i>ferus</i>

Fonte: Zhou e Li (2015) e Moraes (2011).

3 *Candida albicans*

As leveduras *C. albicans* são células esféricas, aerofacultativas, com crescimento ideal em 30 a 37 °C por 24 a 48 horas em ágar *Sabouraud* Dextrose Cloranfenicol (ASDC), que é o meio mais utilizado para cultivo e isolamento (VASCONCELOS *et al.*, 2019).

O gênero *Candida* tem como principais espécies descritas a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, sendo a *C. albicans* a mais patogênica para humanos (NUCCI *et al.*, 2010). Os processos infecciosos são denominados como candidoses e podem ser do tipo cutâneo-mucosa ou sistêmica. No primeiro grupo, está a candidose oral e genital – tratáveis com antifúngicos menos complexos. Já no segundo grupo, temos o acometimento de órgãos internos ou disseminação sanguínea (ANAISSIE; MCGINNIS; PFALLER, 2009).

C. albicans é responsável por 95% dos casos de candidose; geralmente, é um fungo comensal que não apresenta patogenia em indivíduos imunocompetentes (HÖFS; MOGAVERO; HUBE, 2016). A capacidade de desencadear uma candidose depende basicamente de imunodepressão, entretanto essa infecção também está diretamente relacionada à virulência da levedura, uma vez que expressa fatores como aderência, polimorfismo, variabilidade fenotípica, produção de exoenzimas, toxinas, biofilme (SANTANA *et al.*, 2013).

C. albicans está presente em cerca de 35% das pessoas saudáveis, sendo mais frequente em recém-nascidos. Os sítios bucais preferidos para colonização são as mucosas, a saliva e o palato, e, neste último a candidose é relativamente comum, devido ao contato do acrílico da prótese apoiado no palato duro (céu da boca) do usuário uma vez que o material plástico é mais propício à retenção e à colonização (ZHOU; LI, 2015). O dorso da língua é o local onde as leveduras estão abundantemente e, a partir desse sítio anatômico, ocorre distribuição para mucosa, dentes, placa e saliva secundariamente (JORGE, 2012).

O micro-organismo possui mecanismos de fixação que lhe atribuem maior virulência. Geralmente, a adesão à boca se dá por

relações eletrostáticas e ligações às superfícies epiteliais da boca. A saliva atua como barreira física e química pela presença de antimicrobianos, como lisozima, lactoferrina e defensinas. O próprio ambiente bucal controla proliferação de *C. albicans* por meio do fluxo salivar ou pelo movimento dos alimentos na mastigação (PETERS *et al.*, 2012).

É fundamental compreender que *C. albicans*, no ambiente bucal humano, tem várias apresentações clínicas. A patogenia está diretamente relacionada à transição morfológica de levedura para hifa, que ocorre como resposta a alterações locais do organismo. As hifas iniciam a fixação, o espalhamento e a candidose por consequência (WALL *et al.*, 2019).

4 FORMAÇÃO DE BIOFILME MICROBIANO NA CAVIDADE BUCAL

O biofilme microbiano é formado na superfície dentária recoberta pela película adquirida composta por proteínas e glicoproteínas da saliva e fluidos gengivais. Essa película é formada em até 15 minutos após a higienização e polimento do esmalte dentário e é considerada como a primeira etapa para a fixação de *S. mutans* e na formação de biofilme dentário (FARIA *et al.*, 2020).

A instalação de biofilme bucal ocorre por etapas: inicialmente, organismos primários grudam na superfície que possui proteínas e substâncias orgânicas. Uma vez aderidas, as células geram microcolônias formadoras de matriz de exopolissacarídeos que funciona como matéria que adere colonizadores secundários e estes podem colar nos organismos primários ou se juntar com outros organismos e posteriormente se aderir aos primários. É importante ressaltar que o biofilme bucal é uma comunidade complexa e distinta que está propensa a alterações locais químicas, físicas ou imunológicas. Logo, a microbiota, quantidade e localização de biofilme bucal, pode mudar entre os indivíduos portadores ou até mesmo no próprio indivíduo (NUNEZ; GARCEZ; RIBEIRO, 2015).

O biofilme microbiano é considerado precursor na instalação e progressão de doenças bucais, como cárie, gengivite e periodontite (PEDRAZZI *et al.*, 2009; SVOBODA *et al.*, 2004). Entretanto, pode ser removido com a escovação dentária devido ao atrito mecânico das cerdas da escova com a superfície dentária e do fio dental nos espaços interdentais (OPPERMANN *et al.*, 2015).

Uma vez instalado e maturado, o biofilme torna-se um emaranhado multipopulacional de micro-organismos que aumentam a acidez e desmineralizam progressiva e irreversivelmente o dente (ZENG; BURNE, 2013). Assim como para *S. mutans* e para *C. albicans*, a formação de biofilme é essencial para patogenicidade no ambiente bucal (JEON *et al.*, 2011).

5 ESTUDO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR MICRO-ORGANISMOS DA CAVIDADE BUCAL

5.1 Obtenção dos micro-organismos

Os micro-organismos avaliados foram obtidos de voluntários estudantes em nossa universidade. As amostras foram coletadas pelos próprios participantes através de salivagem não estimulada por meio da escovação. Foram fornecidas escovas dentais descartáveis embaladas individualmente, de cabo reto, cabeça pequena com arestas arredondadas, tamanho 30 cerdas médias para maximizar a remoção dos micro-organismos aderidos às superfícies dentais dos voluntários (LINDHE; LANG; KARRING; 2010, adaptado) (Figura 1).

O método de Bass modificado foi adotado, uma vez que é descrito na literatura como padrão-ouro de higienização para adultos, já que promove remoção adequada de placa e não produz injúrias ao tecido gengival (LINDHE; LANG; KARRING, 2010). Um encarte ilustrado auxiliou a instrução dos participantes sobre os passos da técnica e o tempo da coleta foi cronometrado para ser eventualmente utilizado como variável influenciadora dos resultados.

Os participantes foram orientados a higienizar todas as faces dos dentes e a língua não foi escovada.

Figura 1 – Coleta das amostras bucais de voluntários



Legenda: Técnica de Bass modificada. 1. Movimentos de vibração leve, englobando de 1 a 2 dentes (vestibular); 2. Movimentos de vibração leve, englobando de 1 a 2 dentes (palatina/lingual); 3. Movimentos de varredura nos dentes anteriores, de cervical para incisal; 4. Movimentos de varredura nos dentes anteriores, de cervical para incisal (palatina); 5. Movimentos de varredura nos dentes anteriores, de cervical para incisal (lingual); 6. Movimento de vaivém nas faces oclusais de todos os dentes, começando pelos últimos; 7. Inserção imediata em solução fisiológica estéril 0,9%.

Fonte: Próprios autores (2021). Criado com BioRender.com e imagem (escova de dente) de pixabay.com

Como a dinâmica da formação do biofilme inicia-se com a agregação dos micro-organismos na película adquirida, a sua proliferação ocorre entre 0 a 4 horas após a limpeza da superfície dentária. Entre 4 e 24 horas, existe uma grande proliferação microbiana e formação de microcolônias; após esse prazo, haverá sucessão microbiana e coagregação entre 1 a 14 dias e, a partir de 2 semanas, já se tem biofilme maduro (CARRANZA *et al.*, 2011). Considerando a dinâmica do crescimento dos biofilmes microbianos, as coletas foram feitas dentro do prazo de 0 a 4 horas, contado a partir da última higienização relatada pelo participante, seguindo os protocolos de período utilizados por Oliveira (2004) e Saraiva (2010), que preconizam 2 e 3 horas, respectivamente.

Após a coleta, as escovas foram acondicionadas em tubos tipo Falcon, contendo 15 mL de solução fisiológica estéril (SFE 0,9%) suficiente para manter a cabeça das escovas imersas. (SOARES *et al.*,

Capítulo 4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

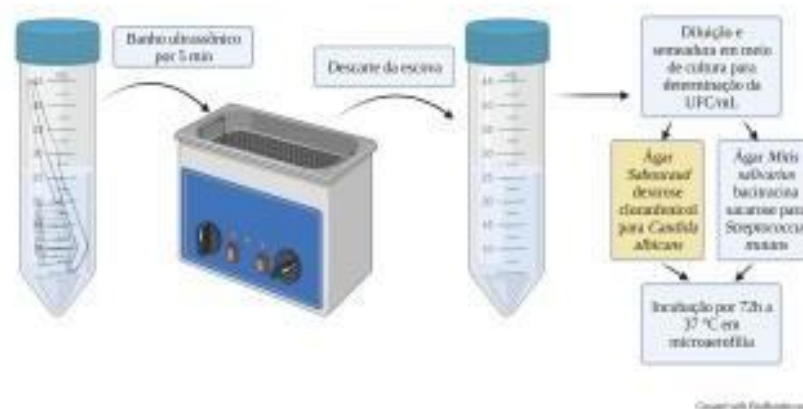
2007). Os tubos foram transportados até o Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Goiás para o processamento.

A execução dos ensaios microbiológicos depende dos cuidados com as coletas, que devem propiciar amostras livres de contaminação ambiental, ao mesmo tempo em que a rapidez do transporte das amostras para processamento no laboratório deve garantir a representatividade da microbiota bucal dos voluntários.

Após as coletas, as escovas encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia foram submetidas a banho ultrassônico por 5 minutos para o desprendimento dos micro-organismos aderidos. Após esse período, os tubos foram agitados e as escovas, removidas e descartadas.

Em seguida, as suspensões resultantes foram diluídas em SFE 0,9% até 10^{-7} e repicadas em placas de ágar *Mitis Salivarius* Bacitracina Sacarose (AMSBS) e ágar *Sabouraud* Dextrose Cloranfenicol (ASDC) para crescimento de *S. mutans* e *C. albicans*, respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C em microaerofilia durante 48 a 72 horas para o crescimento dos micro-organismos (Figura 2).

Figura 2 – Processamento microbiológico das amostras obtidas na coleta



Fonte: Próprios autores (2021). Criado com BioRender.com e imagem (escova de dente) de pixabay.com.

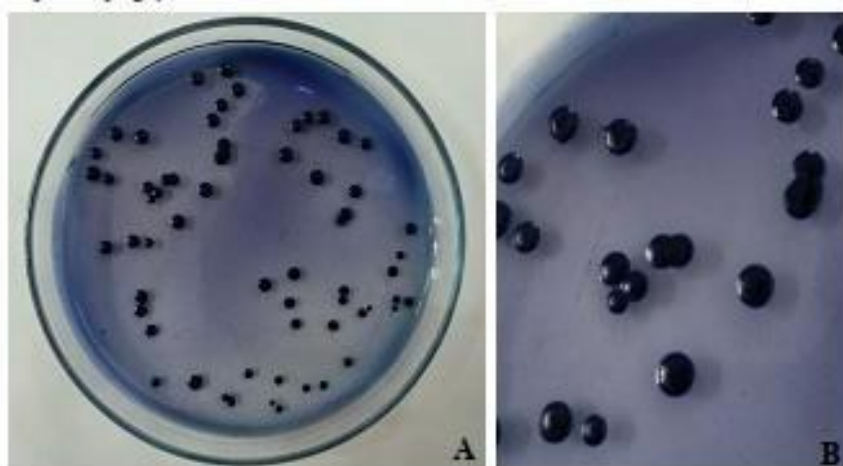
AMSBS é um dos meios seletivos mais utilizados para *S. mutans* devido à adição de 0,2 UI (unidades internacionais) de bacitracina e por conter 20% de sacarose como fonte primária de açúcar. A bacitracina inibe crescimento de *S. cricetus*, *S. downei*, *S. macacae*, *S. ferus*. Por outro lado, *S. mutans*, *S. sobinus* e *S. rattus* são favorecidos por serem resistentes. A presença de cristal violeta na composição do meio evita proliferação de outras bactérias Gram-positivas (GOLD; JORDAN; VAN HOUTE, 1973; JORGE, 2012).

O preparo de AMSBS requer que, após a esterilização e resfriamento a 50 °C, se adicione 1 mL de telurito de potássio 1% previamente esterilizado por filtração, e de 3,3 miligramas de bacitracina em 10 mL de água destilada para cada litro final de preparado de acordo com a metodologia empregada por Campos (2006).

As colônias do *S. mutans* crescidas em AMSBS (Figura 3) têm aspecto liso, brilhante, levemente elevado e arredondado, pegajoso, semelhante a uma gota e/ou aspecto multilocular parecido com vidro moído, com centro elevado e cor azul escura que ao toque, é dura e quebradiça (SARAIVA, 2010; ZHOU; LI, 2015).

Capítulo 4
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

Figura 3 – Morfologia macroscópica de colônias crescidas em ágar *mitis salivarius* bacitracina sacarose (AMSBS) a 37 °C após 72 horas em microaerofilia. A, aspecto geral. B, Detalhe em aproximação. Colônias de cor azul escuro, centro levemente mais escurecido. Centro elevado, aspecto pegajoso

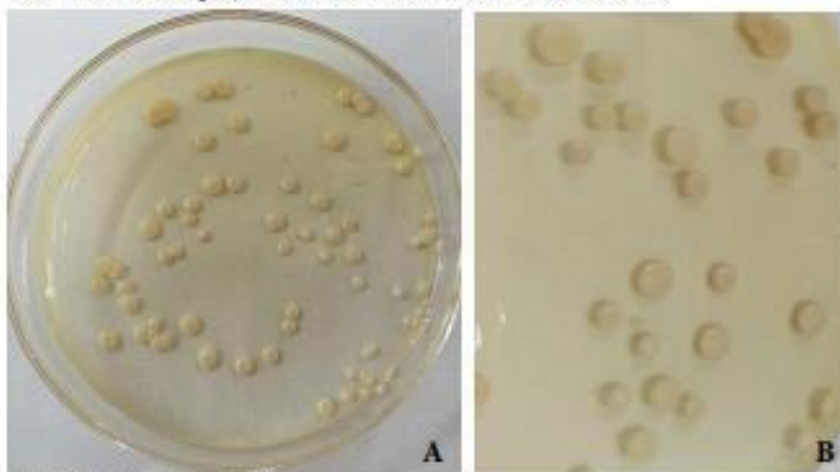


Fonte: Próprios autores (2021).

A morfologia macroscópica típica de *C. albicans* em ASDC (Figura 4) é de colônias esbranquiçadas a amarelas, opacas, com centro levemente mais escurecido que as bordas e cheiro característico de pão (fermentação).

Após os períodos de incubação das placas, foi realizada a identificação presuntiva por meio da análise da morfologia colonial em ambos os meios de cultivo. Assim que identificadas, colônias típicas de *S. mutans* e *C. albicans* foram repicadas em outras placas com ASDC e AMSBS e incubadas para o isolamento do cultivo. A partir dessas placas, 3 a 5 colônias típicas e isoladas foram transferidas para tubos, contendo caldo, infusão, cérebro e coração (BHI) com 20% de glicerol e, após incubação, alíquotas de 1 mL do caldo crescido foram transferidas para tubos *Eppendorf* e, estes, armazenados em refrigerador a 8 °C durante sete dias e congelamento em *freezer* a -20 °C para armazenamento para as próximas etapas do estudo (SILVA; COSTA; RECHE, 2008, adaptado).

Figura 4 – Morfologia macroscópica de colônias crescidas em ágar *Sabouraud* dextrose cloranfenicol (ASDC) a 37 °C após 72 horas em microaerofilia. A, aspecto geral. B, Detalhe em aproximação. Colônias esféricas esbranquiçadas, centro levemente mais elevado



Fonte: Próprios autores (2021).

5.2 Ensaio da formação de biofilme

Aliquotas congeladas dos micro-organismos foram repicadas em placas com AMSBS e ASDC, conforme descrito previamente. Após a incubação, colônias crescidas típicas foram transferidas para tubos contendo 3 mL de SFE 0,9%. Em seguida, a turvação da suspensão foi ajustada visualmente com a escala 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ ufc/mL) e 0,2 mL foram transferidos para um tubo Falcon com 19,8 mL de caldo BHI e o inóculo inicial dos micro-organismos foi ajustado a $1,5 \times 10^6$ ufc/mL para a realização do ensaio de formação de biofilme.

Uma escova nova foi assepticamente colocada no tubo com a suspensão bacteriana, seguido de homogeneização e incubação (OLIVEIRA, 2004). Logo após, a escova foi transferida para outro tubo contendo 20 mL de SFE 0,9% e agitada em homogenizador por 10 segundos (CAMARGO *et al.*, 2013). Em seguida, a escova foi colocada em outro tubo com 20 mL de SFE 0,9% e submetido a ultrassom por 5 minutos para desprendimento dos micro-organismos associa-

Capítulo 4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

dos ao biofilme formado (CHAVES *et al.*, 2007). Posteriormente, as escovas foram retiradas e a suspensão dos micro-organismos foi diluída e plaqueada para a determinação de número de unidades formadoras de colônias recuperadas do biofilme.

5.3 Ensaio da inibição da formação de biofilme

Os ensaios de inibição da formação de biofilme foram realizados seguindo o mesmo protocolo para os ensaios de formação, entretanto, a formação de biofilme foi verificada na presença de concentrações subinibitórias de digluconato de clorexidina 0,06%, quitosana 1,5% e uma mistura de ambos a proporção de 1:1.

Todos os testes foram feitos em triplicata e os resultados foram organizados como média e desvio padrão. A significância das diferenças encontradas é testada com o teste t de *Student* com nível de significância de 5%.

6 CONCLUSÕES

O controle de biofilme na cavidade bucal constitui um grande desafio e é parte fundamental na garantia da saúde humana. A dinâmica do desenvolvimento dessa estrutura microbiana impacta na etiologia e evolução das doenças bucais. Assim, a higienização incipiente da cavidade oral propicia o contato dos micro-organismos residentes com nutrientes que favorecem o desenvolvimento do biofilme. Nesse contexto, o conhecimento de métodos para a redução da carga microbiana bucal é fundamental para limitar a maturação do biofilme ao menor nível possível (MEYLE; CHAPPLE, 2015).

O potencial da combinação da quitosana com o digluconato de clorexidina abre um panorama no controle de formação de biofilme em escovas dentárias, em outros produtos bucais e na própria cavidade bucal. Sua investigação deve ser estimulada devido à atividade antimicrobiana dos compostos, à viabilidade econômica e à eficiência clínica da associação da clorexidina.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade Estadual de Goiás – Câmpus Central – Anápolis – GO. Agradecimento especial ao professor Gustavo Adolfo Martins Mendes, pela sua colaboração imensurável.

REFERÊNCIAS

- AAS, J. A.; GRIFFEN, A. L.; DARDIS, S. R.; LEE, A. M.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E.; LEYS, E. J.; PASTER, B. J. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 4, p. 1407-1417, 2008.
- ALMEIDA, A. K.; GUIMARÃES, M. C. M.; GRISI, D. C.; DAME-TEIXEIRA, N. Doença cárie em portadores de diabetes mellitus: uma revisão narrativa da literatura. *Oral Sciences*, v. 9, n 1, p. 18-23, 2017.
- ANAÏSSIE, E. J.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. *Clinical Mycology*. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- ARAÚJO, N. C.; FONTANA, C. R.; BAGNATO, V. S.; GERBI, M. E. M. Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 20, n. 7, p. 293-399, 2012.
- CAMARGO, R. SCHIMIM, S. C.; ALVES, F. B. T.; CHIBINSKI, A. C. R. Avaliação microbiológica da efetividade de uma escova antibacteriana: um estudo *in vivo*. *Revista de Odontologia da UNESP*, v. 41, n. 1, p. 54-58, 2013.
- CAMPOS, C. C. *Estreptococos do grupo mutans: transmissão vertical entre crianças com Síndrome de Down e suas mães*. 2006. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- CARRANZA, F. A.; NEWMAN, M. G.; TAKEI, H. H.; KLOKKEVOLD, P. R. *Periodontia clínica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- CHAVES, R. A. C.; RIBEIRO, D. M. L.; ZAIA, J. E.; ALVES, E. G.; SOUZA, M. G. M.; MARTINS, C. H. G.; MESTRINER, S. F. Avaliação de soluções antibacterianas na descontaminação de escovas dentais de pré-escolares. *Revista de Odontologia da UNESP*, v. 36, n. 1, p. 29-33, 2007.

Capítulo 4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

FARIA, J. B.; SANTIAGO, M. B.; SILVA, C. B.; GERALDO-MARTINS, V. R.; NOGUEIRA, R. D. Development of *Streptococcus mutans* biofilm in the presence of human colostrum and 3 -sialyllactose. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, v. 33, p. 1-6, 2020.

FEJERSKOV, O.; NYVAD, B.; KIDD, E. *Cárie dentária: fisiopatologia e tratamento*. 3. ed. São Paulo: Santos, 2017.

GOLD, O. G.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology*, v. 18, p. 1357-1364, 1973.

HAN, T. L.; CANNON, R. D.; VILLAS-BÔAS, S. G. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genetics and Biology*, v. 48, n. 8, p. 747-763. 2011.

HILLER, E.; ZAVREL, M.; HAUSER, N.; SOHN, K.; KENTISCHER-BURGER, A.; LEMUTH, K.; RUPP, S. Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host-focus on the function of cell wall proteins. *International Journal of Medic Microbiology*, v. 301, n. 5, p. 384-389. 2011.

HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies and the microbiota. *Journal of Microbiology*, v. 54, n. 3, p. 149-169, 2016.

JEON, J. G.; ROSALEN, P. L.; FALSETTA, M. L.; KII, H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Research*, v. 45, p. 243-263, 2011.

JIN, L.; LI, J.; WANG, J.; JIANG, J.; ZUO, Y.; LI, Y.; YANG, F. Global burden of oral diseases: emerging concepts, management and interplay with systemic health. *Oral Diseases*, v. 22, n. 7, p. 609-619, 2016.

JORGE, A. O. C. *Microbiologia e Imunologia Oral*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012

LEMO, J. A.; PALMER, S. R.; ZENG, L.; WEN, Z. T.; KAJFASZ, J. K.; FREIRES, L., A.; ABRANCHES, J.; BRADY, L., J. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Gram-Positive Pathogens*, v. 7, p. 435-448, 2018.

LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, T. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

MALTZ, M.; GROISMAN, S.; TENUTA, L. M. A.; CURY, J. A. *Cárie dentária: conceitos e terminologia*. 2016. Disponível em: <https://statics-submarino.b2w.io/sherlock/books/firstChapter/128369051.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2020.

MARTIN, R.; WÄCHTLER, B.; SCHALLER, M.; WILSON, D.; HUBE, B. Host-pathogen interactions and viruance-associated genes during *Candida albicans* oral infections. *International Journal of Medical Sciences*, v. 301, n. 5, p. 417-422. 2011.

MEI, M-L.; CHU, C-H.; LOW, K-H.; CHE, C-M; LO, E-C-M. Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with *S. mutans* and *L. acidophilus* dual-species cariogenic biofilm. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, v. 18, n. 6, p. 824-831, 2013.

MELO, N. I.; CARVLHO, C. E.; FRACAROLLI, L.; CUNHA, W. R.; SOLA, V. R. C.; MARTINS, C. H. G.; CROTTI, A. E. M. Antimicrobial activity of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd. (Lamiaceae) against cariogenic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 2, p. 1-7, 2015.

MEYLE, J.; CHAPPLE, I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000*, v. 69, n. 1, p. 7-17, 2015.

MORAES, J. J. C. **Avaliação da função do sistema de dois componentes VicRK na biologia de *Streptococcus sanguinis***. 2011. Tese (Doutorado em Estomatologia) – Faculdade de Odontologia, UNICAMP, Piracicaba, 2011.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 51, n. 5, p. 561-570, 2010.

NUNEZ, S.; GARCEZ, A. S.; RIBEIRO, M. S. **PDT- Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Odontologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

OLIVEIRA, R. A. **Avaliação do efeito antimicrobiano *in vitro* de quitosana e da associação quitosana/clorexidina sobre a saliva e *Streptococcus mutans***. 2004. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

OPPERMANN, R. V.; HAAS, A. N.; ROSING, C. K.; SUSIN, C. Epidemiology of periodontal diseases in adults from Latin America. *Periodontology 2000*, v. 67, n. 1, p. 13-33, 2015.

PEDRAZZI, V.; SOUZA, S. L. S.; OLIVEIRA, R. R.; CIMÕES, R.; GUSMÃO, E. S. Métodos mecânicos para o controle do biofilme dentário supragengival. *Revista Periodontia*, v. 19, n. 3, p. 26-33, 2009.

PEREIRA, D. A.; SENEVIRATNE, C. J.; KIGA-ITO, C. Y.; SAMARANAYAKE, L. P. Is the oral fungal pathogen *Candida albicans* a cariogen? *Oral Diseases*, v. 24, n. 4, p. 518-526, 2018.

PETERS, B. M.; OVCHINNIKOVA, E. S.; KROM, B. P.; SCHLECHT, L. M.; ZHOU, H.; HOYER, L. L.; BUSSCHER, H. J.; van der Mei, H. C.; JABRA-RIZK, M. A.; SHIRTLIFF, M. E. *Staphylococcus aureus* adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. *Microbiology*, v. 158, n. 12, p. 2975-2986, 2012.

RODRIGUES, A. C. C. **Análise proteômica do biofilme dentário em crianças portadoras de hipomineralização molar-incisivo (HMI)**. 2019. Dissertação

Capítulo 4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

(Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Ciência da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

SANTANA, D. P.; RIBEIRO, E. L.; MENEZES, A. C. S.; NAVES, P. L. F. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 12, n. 2, p. 229-233, 2013.

SARAIVA, M. E. **Quantificação e identificação morfológica e bioquímica para confirmação fenotípica de *S. mutans* e *S. sobrinus*, utilizando o meio de cultura SB-20 modificado: Estudos *in vitro* e *in vivo***. 2010. Tese (Doutorado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

SCHMALZLE, S. A classic and fatal case of *Streptococcus mutans* subacute bacterial endocarditis; a now potentially underappreciated disease. *IDCases*, v. 19, p. 1-3, 2020.

SILVA, A. C. B.; CRUZ, J. S.; SAMPAIO, F. C.; ARAÚJO, D. A. M. Detection of oral streptococci in dental biofilm from caries-active and caries-free children. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, n. 4, p. 648-651, 2008.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE, S. H. C. Manutenção de leveduras por congelamento a -20°C. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 40, n. 1, p. 73-74, 2008.

SOARES, D. G. S.; OLIVEIRA, C. B.; LEAL, C.; DRUMOND, M. R. S.; PADILHA, W. W. N. Atividade antibacteriana *in vitro* da tintura de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na descontaminação de escovas dentais contaminadas pelo *S. mutans*. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, v. 7, n.3, p. 253-257, 2007.

SVOBODA, J. M. Periodontal disease: prophylaxis and oral hygiene procedures. *EMC Dentisterie*, v. 1, p. p. 349-360, 2004.

TORTORA, G. T.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VASCONCELOS, G. L.; LOURENÇO, L. S.; SILVA, R. M.; PUCCI, F. V. C. Atividade antifúngica dos *Lactobacillus* presentes no iogurte sobre a *Candida albicans in vitro*. *REVISA*, v. 8, n. 3, p. 322-328, 2019. Disponível em: <http://revistafacsa.senaaires.com.br/index.php/revisa/article/view/428/323>. Acesso em: 31 jul. 2020.

WALL, G.; JAUREGUI-MONTELONGO, D.; BONIFACIO, B. V.; RIBOT-LOPEZ, J. L. L.; UPPULURI, P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, v. 52, p. 1-6, 2019.

WILLIAMS, D. L.; JORDAN, R. P. C.; WEI, X. Q.; ALVES, C. T. A.; WISE, M. P.; MELANIE, J. W.; LEWIS, M. A. O. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *Journal of Oral Microbiology*, v. 5. n. 22434, p. 1-8, 2013.

ZENG, L.; BURNE, R. A. Comprehensive mutational analysis of sucrose-metabolizing pathways in *Streptococcus mutans* reveals novel roles for the sucrose phosphotransferase system permease. *Journal of Bacteriology*, v. 195, n. 4, p. 833-843, 2013.

ZHOU, X.; LI, Y. *Atlas of oral microbiology: from healthy microflora to disease*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

Capítulo 2: USO DE QUITOSANA E CLOREXIDINA NO CONTROLE DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO mutans NA CAVIDADE BUCAL

Resumo A cavidade é colonizada por mais de 700 espécies de micro-organismos, patógenos ou comensais. E portanto, a formação e maturação de biofilme constitui importante fator na patogenia desses micro-organismos. Diante disso, produtos com ação antimicrobiana são amplamente utilizados como adjuntos na higiene bucal e alternativas funcionais são amplamente estudadas. A clorexidina é vastamente utilizada e é determinada como padrão-ouro pelo amplo espectro de ação sobre micro-organismos. Por outro lado, há vasta literatura ressaltando a ação antimicrobiana da quitosana. O objetivo deste estudo foi realizar um levantamento bibliográfico sobre o emprego de quitosana e clorexidina no controle microbiano oral.

Palavras-chave: quitosana, clorexidina, cavidade bucal, antimicrobiano, biofilme

Abstract The pathogen is colonized by more than 700 species of microorganisms, pathogens or commensals. Therefore, the formation and maturation of the biofilm is an important factor in the pathogenesis of these microorganisms. Furthermore, with antimicrobial actions suitable for oral hygiene used as adjuncts, functional alternatives are suitable for oral hygiene. Chlorhexidine is widely used and determined as a pattern of action on microorganisms. On the other hand, there is a vast literature highlighting the antimicrobial action of chitosan. The aim of this study was to carry out a literature review on the use of chitosan and chlorhexidine in oral microbial control.

Key words: chitosan, chlorhexidine, oral cavity, antimicrobial, biofilm

2. 1 Introdução

Após o nascimento, a cavidade oral é colonizada por micro-organismos que ali vão permanecer por toda a vida. Inicialmente, as superfícies de tecido mole são colonizadas e então com a erupção dos dentes, aumenta a gama de sítios de colonização e a diversidade de micro-organismos. A cavidade bucal humana é altamente colonizada por diversas espécies: comensais ou patógenas. De maneira geral, estando em equilíbrio local, a coexistência microbiana induz saúde bucal que depende diretamente de fatores como higiene bucal, competência imunológica, uso de medicamentos, doenças sistêmicas (como diabetes, AIDS), tratamentos médicos como radioterapia e quimioterapia.

Na cavidade bucal humana existem micro-organismos residentes permanentes que participam e mantêm a saúde local com relações harmônicas com o hospedeiro na maioria do tempo e micro-organismos transitórios, que podem ser potencialmente patogênicos ou não pertencerem à microbiota da boca. O estabelecimento da microbiota transitória é geralmente controlada através de antagonismo microbiano com a microbiota residente, de modo que seu pouco tempo no local não gera prejuízo ao hospedeiro (BARBOZA-SOLIS; ACUÑA-AMADOR, 2020).

Nesse contexto, o controle dos micro-organismos bucais é uma área de importância clínica, na qual há a especialidade de “odontologia hospitalar” que é encarregada de cuidar do ambiente bucal de modo a evitar disseminação de infecções, manter e acelerar a recuperação do paciente em tratamento intenso (NOMURA et al., 2020).

Estreptococos bucais

Os estreptococos do grupo *mutans* estão relacionados à patogênese da cárie dentária, sendo que nem todos habitam cavidade bucal de humanos. A terminologia estreptococos do grupo *mutans*, identifica um grupo com 7 espécies contendo 9 sorotipos diferentes: *S. cricetus* (sorotipo a), *S. rattus* (sorotipo b), *S. mutans* (sorotipos c,e,f,k), *S. ferus* (sorotipo c), *S. macacae* (sorotipo c), *S. sobrinus*

(sorotipos d, g) e *S. downeii* (sorotipo h). Em seres humanos há o predomínio dos *S. mutans* e *S. sobrinus* (MOMENI et al., 2019).

No Quadro 1 está descrita a caracterização dos componentes desse grupo. É importante salientar que o grupo do estreptococos do grupo *mutans* apresenta 4 subgrupos de acordo com a composição celular externa de polissacarídeo ramnose-glicose, sendo 75% tipo C, 20% são do tipo E e os 5% restantes são pertencentes aos subgrupos F ou K. Além de ser essencial para diferenciação entre os microorganismos da mesma espécie, tal identificação também permitiu elucidar e diferenciar ação, contaminação, instalação e desenvolvimento de *S. mutans* (LEMOS et al., 2019).

Quadro 1. Caracterização dos estreptococos do grupo *mutans*.

Espécies	Diferenciação	Identificação
<i>S. sobrinus</i>	Não produzem amônia. Colonizam a superfície dentária humana e formam colônias empilhadas ásperas de 1 mm	Fermentação de manitol, lactose, sorbitol, rafinose. Produção de H ₂ O ₂ através da enzima piruvato-oxidase (converte piruvato em acetil-fosfato em presença de O ₂ e libera H ₂ O ₂ e CO ₂).
<i>S. rattus</i>	Isolados da microbiota bucal de roedores. Ocasionalmente são isolados da boca humana.	Produção de glucano como polissacarídeo extracelular. São acidogênicos a partir de carboidratos assim como <i>S. mutans</i> .
<i>S. ferus</i>	Isolados da microbiota bucal de roedores.	Não sintetizam glucano. São acidogênicos a partir de carboidratos assim como <i>S. mutans</i> e <i>S. rattus</i> .
<i>S. macacae</i>	Isolados da microbiota bucal de primatas	Produção de polissacarídeos extracelulares. São acidogênicos a partir de carboidratos assim como <i>S. mutans</i> , <i>S. rattus</i> e <i>S. ferus</i> .
<i>S. cricetus</i>	Presente na boca de roedores (ratos e hamsters). Ocasionalmente são isolados da boca humana.	Produção de polissacarídeos extracelulares como <i>S. mutans</i> e <i>S. macacae</i> . São acidogênicos a partir de carboidratos. <i>S. mutans</i> , <i>S. rattus</i> , <i>S. macacae</i> e <i>S. ferus</i>

<i>S. mutans</i>	São isolados aderidos à superfície dentária humana e são grandes metabolizadores de sacarose. Estão relacionados à cárie humana	Fermentação de manitol, sorbitol, rafinose, lactose, manose e produz ácido em presença de carboidratos. Não fermentam xilose, glicerol. Possuem 3 antígenos polissacarídeos <i>c,e,f</i> . Produz H ₂ O ₂ . Produzem polissacarídeos extracelulares e intracelulares.
------------------	---	---

Fonte: ZHOU; LI, 2015.

S. mutans e *S. sobrinus* têm relação com o desenvolvimento da cárie dentária e guardam relação com endocardite infecciosa, bacteremias, abscessos e infecções do trato respiratório. É complexa a diferenciação entre ambas as espécies, sendo necessária a realização de testes bioquímicos (ODA et al., 2017).

Instalação e progressão da cárie dentária

Em 1924, J. Kilian Clarke relatou de maneira inédita associação entre cárie dentária e a bactéria que o autor chamou de “*S. mutans*”, dado seu aspecto ovalado e diferenciado dos padrões obtidos até então; o autor relatou como um grupo “mutante” de estreptococos. Neste trabalho, fica explícito que até então não havia nenhuma fundamentação real sobre a causa da cárie. Foi observado em dentes humanos com cavidades cariosas, uma grande retenção alimentar que rapidamente adquiria caráter ácido. Acreditava-se que um grupo de bactérias chamado *Bacillus acidophilus* poderia induzir e manter o processo carioso. Após análise laboratorial em 24 dentes humanos, não se isolou *Bacillus acidophilus* regularmente. A análise foi repetida com outros 24 dentes e foi constatada presença de material esbranquiçado que se mostrou ser composto por uma película de estreptococos bastante distintos e com característica de serem acidogênicos na superfície dentária.

A cárie dentária é multicausal e tem forte relação com fatores sociais, alimentares, padrões de eficiência de higiene, composição da saliva e acesso aos serviços de saúde gratuitos ou privados (DA SILVA et al., 2021).

Durante muito tempo, a premissa de que *S. mutans* era o único causador da cárie dentária foi adotada. Porém, atualmente sabe-se que as características de formação de meio polissacarídico e baixo pH criam um local ideal para outras

espécies tolerantes e produtoras de ácido. Isto explica a presença de biofilme polimicrobiano com presença de *S. mutans* (LEMOS et al., 2019).

Tendo em vista a cariogenicidade das cepas, a boca humana mantém uma constante troca de íons entre o meio, a saliva e os dentes, de modo que minerais são constantemente retirados e integrados à estrutura dentária. A cárie dentária deve-se a uma quebra do equilíbrio bucal no processo de desmineralização e remineralização dentária quando a perda mineral se sobressai ao ganho. A definição atual caracteriza-a como uma doença não passível de erradicação dada sua natureza microbiológica e confluência de fatores causadores e intensificadores: dieta, microbiota local, com altos níveis da bactéria causadora da cárie e tempo que correlaciona-se diretamente com o intervalo em que o pH local permanece abaixo de 5,0 (pH crítico) (SAMARANAYAKE 2013).

A cariogenicidade está ligada a fatores como a síntese de polissacarídeos intra e extracelulares, ao poder acidógeno, acidodófilo e acidúrico, a propriedade de adesividade em película adquirida para formação de biofilme, produção de bacteriocinas que facilita a seletividade de microbiota (LAMONT; KOO e HAJISHENGALLIS, 2018).

Importante fator de cariogenicidade e sobrevivência de *S. mutans* é sua capacidade de abaixar, manter e sobreviver em pH ácido. Basicamente o metabolismo de carboidratos de *S. mutans* é essencial e eficiente de modo a manter os níveis de ATP celular, afinal a bactéria envia para fora prótons usando ATP de modo a equilibrar e manter o pH baixo (CHEN et al., 2020).

A sacarose oriunda da alimentação é a principal fonte de alimento para *S. mutans*. Sendo assim, 90% da sacarose é absorvida através da enzima EIIScr PTS (específica para transporte de sacarose e fosforilação de carboidratos) – esta permite a obtenção de energia através da respiração celular em presença de sacarose. Então tem-se a ativação da via de regulação do sistema LevQRST (sistema de quatro componentes) que ativa a resposta extracelular na presença de açúcares (ZENG; DAS e BURNE, 2011).

Basicamente, a progressão patogênica da cárie se dá por glicosiltransferases produzidas por bactérias, que sintetizam polissacarídeos (especialmente glucanos) formando matriz extracelular de placa bacteriana. Essa placa favorece acúmulo de estreptococos do grupo *mutans* permitindo aderência à superfície dentária; então esses micro-organismos vão metabolizar carboidratos e sintetizar ácidos, entre os quais o ácido láctico, que desmineralizam o dente. Iniciado esse processo, outras cepas invadem os tecidos dentários e fortalecem o processo cariioso. A evolução da cárie dentária passa pela colonização pelas cepas, formação de biofilme, metabolismo e excreção de ácido (ITO et al., 2019).

A sacarose é o carboidrato com maior potencial cariogênico; identificada como composto dissacarídeo β 2,1 formado por glicose e frutose. *S. mutans* possui diversos mecanismos para digerir a sacarose e liberar ácido: enzimas glicosiltransferases (GTFs) transformam a sacarose em uma “cola” (um polímero extracelular, glucano) que é o primeiro passo no sentido de aderir e acumular micro-organismos formadores de biofilme (LEMOS et al., 2019).

S. mutans depende do metabolismo sacarolítico para obter energia e cresce em presença de sacarose, frutose ou glicose. Cinco enzimas agem diretamente na sacarose a nível extracelular: três glicosiltransferases (GtfB, GtfC, GtfD) internalizam a glicose presente na sacarose como homopolímeros (polímeros feitos de unidades de monômeros iguais) que induzem o biofilme a ser formado; uma frutano hidrolase (enzima que associa-se à água e quebra ligações) que libera frutose de sacarose, frutanos e outros β -frutosídeos; uma frutossiltransferase (Ftf) que acelera a internalização de frutose para ser utilizada como carboidratos extracelulares inseridos na matriz do biofilme (ITO et al., 2019).

O biofilme é essencial no desenvolvimento da cárie dentária e é definido como agregação bacteriana, geralmente por diversas espécies que se desenvolvem imersas em uma matriz viscosa que adere à superfície lisa do dente através da película adquirida, esta que se forma imediatamente após a higienização. Por sua vez, a matéria viscosa tem composição básica de água, exopolissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos e substâncias absorvidas pela colônia que estejam em contato com o biofilme. (GONG et al., 2021).

Controle microbiano na cavidade bucal

Em face da presença de biofilme bucal, são necessários meios de controle microbiano, uma vez que a presença microbiana é essencial, porém a quantidade e tipos de cepas podem determinar a patogênese (PROCTOR et al., 2020).

Portanto, é necessário esclarecer os tipos de controle microbiano na cavidade bucal: mecânico e químico. O meio mecânico refere-se ao contato das cerdas da escova e do fio dental com a estrutura dentária de modo a remover e/ou desorganizar as formações celulares ali presentes e o químico é o uso de medicamentos/enxaguantes (SCHULDT et al., 2021). No quadro a seguir são apresentadas técnicas de escovação com as respectivas particularidades.

Quadro 2. Principais técnicas de escovação dental

Técnica	Execução
Stillman modificada	Escova posicionada obliquamente em direção ao ápice radicular do dente modo que a cabeça gira em direção à oclusal/incisal
Bass	Cabeça da escova obliquamente localizada em relação ao ápice tendo as cerdas em 45 graus em relação ao sulco gengival, pressionadas contra este com movimentos vibratórios curtos, e leves de dois em dois dentes
Fones	Indicada principalmente para pacientes com alguma inabilidade motora. As cerdas são posicionadas no longo eixo do dente com movimentos rotatórios, exceto na face oclusão que recebe "vai-vem"
Leonard	Cerdas da escova apoiadas apicalmente no tecido gengival e trazida em movimento único até a borda incisal/oclusal por vestibular e palatina/lingual dos dentes. Nos anteriores, a escova é colocada na vertical em relação ao longo eixo do dente
Charters	As cerdas da escova são posicionadas em 45 graus em relação ao dente, e apenas a porção inicial ou final da escova contata o dente. Então, é feita uma pressão no tecido gengival de apical para oclusal/incisal com vibrações rápidas
Scrub	As cerdas posicionadas na face vestibular. Então, é feito um movimento ântero-posterior (vai-vem) a cada par de dentes, em todas as faces dos dentes.

Fonte: CARRANZA et al., 2012.

Todavia, há situações em que o controle mecânico somente não tem a eficácia desejada ou não pode ser executado. Nessas situações, abre-se mão do controle por meios químicos através de medicamentos. São classificados como agente não iônico, agente alógeno, produtos naturais, óleos essenciais, plantas medicinais, agentes catiônicos (BUDASSORI, 2013). O quadro a seguir apresenta resumo sobre os tipos de medicamentos de controle de biofilme bucal e suas principais características.

Quadro 3. Agentes de controle químico de biofilme bucal

Agente	Descrição
Não iônico: Triclosan	Ação germicida e anti-inflamatória. É usado em enxaguantes na concentração de 0,03%. Rompe a membrana do plasma por aumentara permeabilidade celular, o que impede o metabolismo e a reprodução. Amplo espectro Gram-positivas, Gram-negativas, esporos e <i>Candida</i>
Alógeno: flúor	Altera o biofilme devido à rápida interação com a estrutura dentária. Atrapalha o metabolismo dos açúcares gerando redução da acidogênese e da desmineralização; também age na síntese de polissacarídeos responsáveis pela aderência ao dente
Compost os naturais	Camomila, própolis, tomilho e sálvia tem ação antisséptica, anti-inflamatória e adstringente antimicrobiana, Cacau inibe Glicosiltransferase de <i>S. mutans</i> . Quitosana tem já relatado ações anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana e cicatrizante. O ponto positivo dos produtos naturais é os poucos efeitos colaterais
Óleos essenciais	Timol, mentol e eucaliptol: antibacterianos pois se ligam ao biofilme e alteram a viabilidade da parede celular sobre Gram-positivas e leveduras. Sabor desagradável
Plantas medicinais	Alecrim, agrião, ipê, tanchagem: propriedades cicatrizantes e adstringentes, sem ação bactericida; apresenta sinergismo quando adicionados à outros componentes ativos
Catiônicos	Cloreto de cetilperidínio: Eficiente contra Gram-positivas e Gram-negativas: reduz metabolismo e aderência esmalte; o mecanismo de ação é semelhante ao da clorexidina, mas com menor eficácia devido à menor substantividade. Comercialmente usado a 0,05%. Clorexidina: eficiente, fácil manuseio, valor de mercado relativamente baixo. Padrão ouro de ação antimicrobiana. Efetiva mesmo em presença de sangue e saliva. Pode causar alteração gustativa, coloração dentária superficial marrom, descamação mucosa

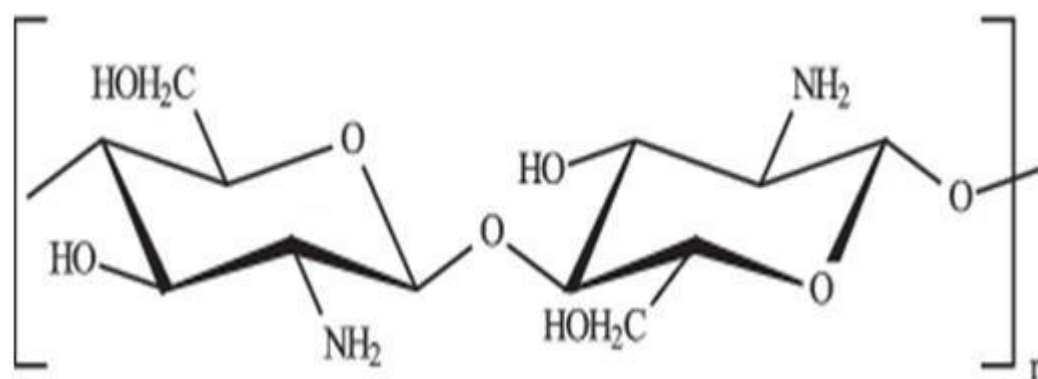
Fonte: DE ARAÚJO et al., 2012; BUDASSORI, 2013; MARINHO; ARAÚJO, 2007; BERNARDES et al., 2010; PILLONI et al., 2021; SLOT et al., 2014.

Atividade antimicrobiana da quitosana na cavidade bucal

A quitosana é um polímero obtido através da desacetilação da quitina, sendo este um polissacarídeo presente em grandes quantidades em reservas naturais, principalmente a partir do exoesqueleto de animais marinhos, dando um caráter relativamente barato à sua obtenção, em função de parcerias com a indústria de pescados e pesqueira. Também está presente em carapaças de insetos e parede celular de fungos (XING et al., 2014).

Na figura a seguir é possível identificar que sua estrutura é composta por unidades β (1-4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose (ou D-glucosamina) e dotada de cadeia de polímeros. Sua química é representada por $(C_6H_{11}O_4N)_n$ (ASSIS; SILVA, 2003).

Figura 1. Fórmula estrutural da quitosana



Fonte: ASSIS; SILVA, 2003.

Estudos recentes indicam várias funções da quitosana. Tem se mostrado um composto de ampla empregabilidade, variando desde indústria farmacológica até agroindústria (BRAGA et al., 2019).

A versatilidade de uso, sem dúvida é a característica mais forte do polímero, haja visto suas capacidades de ser biodegradável, hidrofílico, atóxico e altamente biocompatível (ZARGAR; ASHGARI e DASHTI, 2015).

Ademais, há pesquisas que revelam uso na produção e desenvolvimento de tecidos e como auxiliar na cicatrização de feridas. Essas aplicações são baseadas

por ter liberação controlada enquanto medicamento, aderência ao tecido mucoso, permeável, catiônico e especialmente antimicrobiano (ALI; AHMED, 2018).

A inibição bacteriana, porém, é notada apenas em meio ácido devido à sua carga positiva; portanto, sua atividade em meios aquosos torna-se inviável. Porém, com vistas a melhorar a solubilidade aquosa, pesquisas vêm investigando alterações moleculares do composto de modo a deixá-lo mais solúvel enquanto mantém ou aumentam a característica antimicrobiana (JUNG et al., 2010).

O mecanismo de ação contra bactérias é indefinido até o momento. A teoria mais aceita afirma que há interações eletrostáticas entre os grupos amino protonados, que estariam com carga positiva em ambiente ácido e a membrana celular bacteriana teria carga negativa (LI; YANG e YANG, 2015). Para Gram-positivas, o peptidoglicano da parede da célula sofre hidrólise com consequente extravasamento. Nas Gram-negativas, a quitosana causa aumento da permeabilidade do envelope externo que impede o trânsito de nutrientes que resulta em morte celular (TANG et al., 2010).

Outro mecanismo proposto sugere que a quitosana se liga ao DNA e impede a síntese de RNA. Ao penetrar no núcleo do patógeno, a interferência no mecanismo do RNA inibe a síntese proteica (KE et al., 2021). Os autores relatam que em seu estudo foi observada a ausência de atividade bactericida da quitosana em pH 7,0 ou acima e creditam tal fato à baixíssima solubilidade em tal condição.

Outra hipótese apresentada afirma que os íons metálicos na parte externa da bactéria são quelados (metais se ligam à aminoácidos/peptídeos/polissacarídeos) pelos grupos amino da quitosana, já que a ligação impede o crescimento da cepa por impedir a liberação de toxinas (KOŁODYNSKA, 2012)

Alterações de grupos funcionais como trimetil, 2-hidroxi-3-trimetilamônio, guanidínil, trimetil amônio, piridínil e grupos alquila quaternários conferem ao composto energia positiva, dando solubilidade em meio aquoso e por consequência, o uso em atividades biomédicas em pH neutro (SAHARIAH et al., 2015).

A desacetilação (transformação do grupo acetamida (NHCOH₃) em amina (NH₂) através de uma base alcalina) está intimamente ligada ao comportamento biológico e às propriedades da quitosana, de maneira especial na questão hidrofílica. Para tanto, a quitosana deve ter alterada a quantidade de grupos acetyl, que determinam a repelência à água. (FENG, et al., 2012). A figura a seguir apresenta as implicações do grau de desacetilação nas propriedades da quitosana.

Figura 2. Implicações práticas da desacetilação da quitosana



Fonte: ROLIM et al., 2018 (adaptado).

O grau de desacetilação leva a um aumento da atividade antimicrobiana em fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de forma especial em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Indicam ainda que grau de acetilação de 25% (desacetilação de 75%) induz ótima característica contra bactérias; as faixas entre 92 e 88% também mostraram alta inibição. Indústrias médica e farmacêutica estudam as características microbicida, antitumoral e cicatrizante em função da boa resposta biológica da quitosana no corpo humano (CHUNG; CHEN, 2008).

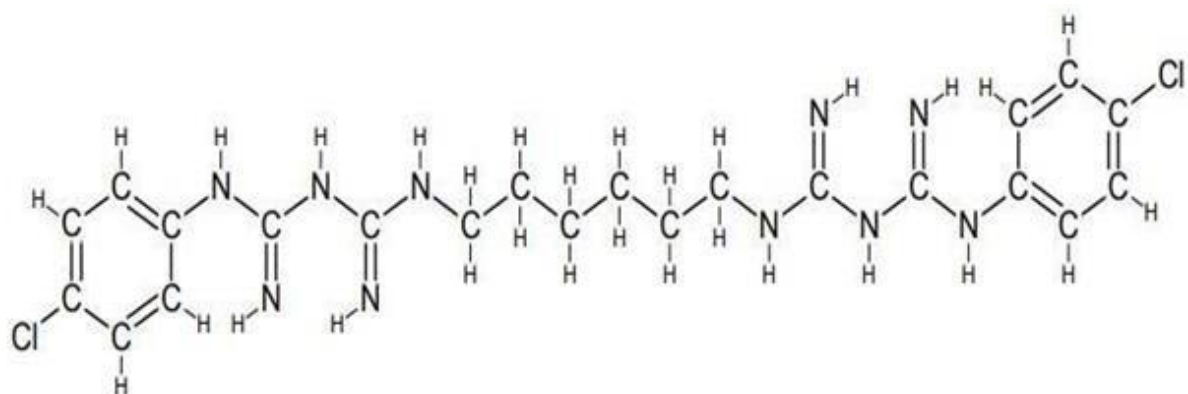
Por outro lado, temos o grau de substituição que significa a quantidade de grupos funcionais presentes na quitosana, que geralmente implica na substituição dos grupos amino ou hidroxila. Tal substituição dá maior ação antimicrobiana contra fungos e bactérias. Posição e a quantidade de carga positiva geram maior efeito bactericida, devido à mais grupos funcionais presentes na fórmula molecular (BADAWY; RABEA, 2012).

A quitosana guarda uma relação entre repelência à água e atividade antimicrobiana; porém, não é claro como isso acontece. Diante disso, estudos indicam que adição ou alteração de mais um grupo funcional na estrutura da quitosana visa aumentar a ação microbicida e facilitar a manipulação ou utilização em áreas como farmácia e medicina (SAHARIAH; MÁSSON, 2017).

Atividade antimicrobiana da clorexidina na cavidade bucal

A estrutura da clorexidina consiste em dois anéis clorofenólicos e dois grupos bis-guanidina unidos por cadeias de hexametilênica. Devido aos grupos bis-guanidina e uma base forte positiva insolúvel em água, a apresentação comercial é do tipo sal (HORTENSE et al., 2010). A figura a seguir apresenta a estrutura química da clorexidina.

Figura 3. Fórmula estrutural da clorexidina



Fonte: BARBIN, 2008.

Como substância química sintética, o digluconato de clorexidina é uma molécula estável que, em caso de ingestão, é secretada por vias metabólicas

normais e em pequenas quantidades não é tóxica. A ação antimicrobiana já é amplamente conhecida, porém, não é eficaz contra esporos, salvo em altas temperaturas (BAMBACE et al., 2003).

A clorexidina é uma grande aliada em saúde bucal: em tratamento gengival, pré, trans e pós cirúrgico, antissepsia e descontaminação e principalmente controle de biofilme. Basicamente é um composto desinfetante de origem sintética, resultante de pesquisas para controle da malária na década de 1940. Tem espectro de ação contra Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (SERRA et al., 2018).

Seu mecanismo de ação aumenta a permeabilidade da membrana celular que acarreta em morte celular devido à lise do micro-organismo. É um produto altamente empregado na prática clínica devido a características de controle da microbiota bucal através de um efeito bacteriostático dado pela inativação de ATPases que impede a replicação celular. Com esse efeito, especificamente em controle de biofilme, clorexidina reduz a capacidade de adesão entre cepa bucal e esmalte (FIORILLO, 2019).

Clorexidina tem afinidade pela membrana das células orais, saliva e hidroxiapatita, de modo que adere ao dente e mucosa e é liberada gradualmente no período de 24 horas. Nesse tempo age com mecanismo bacteriostático (HERRERA et al., 2007).

Foi investigada a redução de cárie por uso de clorexidina; entretanto foi revelado que, apesar de reduzir a quantidade de *S. mutans*, não se pode determinar redução de cárie por uso de clorexidina (FIORILLO, 2019).

Clorexidina adere ao biofilme de modo a reduzir a multiplicação dos micro-organismos. É bastante utilizado como auxiliar na higienização e, especialmente em pacientes que não conseguem fazer o controle mecânico do biofilme bucal (HORTENSE et al., 2010).

Como medicamento a 0,12%, o uso de clorexidina deve ser prescrito e acompanhado por um profissional a fim de evitar seus efeitos colaterais: manchamento superficial de dentes e restaurações, alteração de paladar (cessa

quando suspenso o uso), gosto metálico na boca, sensação de queimação, descamação da mucosa. Em relação ao uso, é recomendado usar entre 30 minutos e 2 horas após a escovação para evitar interferência dos ingredientes do creme dental (estudos indicam que o monofluorfosfato de sódio e o laurel sulfato de sódio reduzem a ação da clorexidina pela atração por ânions - átomo negativo e cátions - átomo positivo); necessário bochecho por pelo menos 1 minuto (CERVINO et al., 2017).

Conclusões

O biofilme bucal além de ter papel fundamental na instalação de diversas doenças bucais, é considerado um dos mecanismos de resistência bacteriana. Sendo assim, a diminuição e controle do biofilme bacteriano reduzem a instalação e disseminação de infecções (FREIRE et al., 2018).

Em face do exposto anteriormente, a pesquisa em saúde apresenta alternativas de associação de tratamentos naturais, químicos e mecânicos de modo a combater doenças bucais, reduzir contagem microbiana, restabelecer e manter a saúde do paciente, ao mesmo tempo que evita ocorrência de quaisquer efeitos colaterais como por exemplo sabor desagradável (DE ASSIS et al., 2022). Produtos como clorexidina, quitosana, óleos essenciais e flúor constituem grandes aliados na busca pela melhora da saúde bucal da população como um todo.

Portanto, é necessário o constante aperfeiçoamento dos métodos de controle de biofilme e da microbiota bucal e neste contexto é relatado potencial antimicrobiano da quitosana ao passo que a clorexidina é o padrão ouro de controle de biofilme oral. Sendo assim, esperamos contribuir com a avaliação destes compostos isolados e em associação na inibição da formação de biofilme em escovas dentais pelos micro-organismos isolados.

Referências bibliográficas

1. ALI, A.; AHMED, S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 109, p. 273-286, out./ dez. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078>.
2. ASSIS, O., B., G.; DA SILVA, V., L. Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. São Carlos, v. 12, n. 4, p. 223-228, jan. 2003.
3. ASSIS, T. R. T.; DOS SANTOS, P. B. R. E.; DA SILVA, A. M.; OLIVEIRA, L. D.; PALMA, A. L. R. As propriedades antimicrobianas do extrato glicólico de *Casearia sylvestris* Sw. em biofilme monotípico de cepas de *Candida albicans* e *Candida glabrata*. **Research, Society and Development**. [s.l.], v. 11, n. 1, p. 1-14. jan. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.25222>.
4. BADAWY, M., E., I.; RABEA, E., I. Characterization and antimicrobial activity of water-soluble N-(4-carboxybutyryl) chitosans against some plant pathogenic bacteria and fungi. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 87, n. 1, p. 250-256, jul./ago. 2012. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.07.054.
5. BAMBACE, A., M., J.; BARROS, E., J., A.; SANTOS, S., S., F.; JORGE, A., O., C. Eficácia de soluções aquosas de clorexidina para desinfecção de superfícies. **Revista Biociências**. Taubaté, v. 9, n. 2, p. 73-81, abr./jun. 2003.
6. BARBOZA-SOLÍS, C.; ACUÑA-AMADOR, L. A. The Oral Microbiota: A Literature Review for Updating Professionals in Dentistry. Part I. **Odovtos - International Journal of Dental Sciences**, [s.l.], n. 22, p. 59-68, set./dez. 2019.
7. BERNARDES, W. A.; LUCARINI, R.; TOZATTI, M. G.; BOCALON FLAUZINO, L. G.; SOUZA, M. G. M.; TURATTI, I. C. C.; ANDRADE E

SILVA, M. L.; MARTINS, C. H. G.; SILVA FILHO, A. A. da; CUNHA, W. R. Antibacterial Activity of the Essential Oil from *Rosmarinus officinalis* and its Major Components against Oral Pathogens. **Zeitschrift für Naturforschung C**, [s.l.], v. 65, n. 9-10, p. 588-593, mar./mai. 2010.

8. BRAGA, L. A. S.; JUNIOR, A. F.; GONZÁLEZ, M. E. L.; QUEIROZ, A. A. A. Membranas termossensíveis baseadas em redes poliméricas semi-interpenetrantes de Quitosana e Poli (N-isopropilacrilamida). **Res. Soc. Dev.** Itajubá, v. 8, n. 3, p. 1-16, nov./dez. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v8i3.748>.
9. BUDASSORI, C. M. **Avaliação de enxaguatórios bucais na atividade Biológica do biofilme formado em braquetes ortodônticos**. 2013. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.
10. CARRANZA, F. A.; NEWMAN, M. G.; TAKEI, H. H.; KLOKKEVOLD, P. R. NEWMAN, M. G. **Periodontia Clínica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 2603 p.
11. CERVINO, G.; FIORILLO, L.; SPAGNUOLO, G.; BRAMANTI, E.; LAINO, L.; LAURITANO, F.; CICCÌÙ, F.. Interface between MTA and dental bonding agents: Scanning electron microscope evaluation. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 64-68, fev. 2017. DOI: 10.4103/jispcd.JISPCD_521_16.
12. CHEN, H.; ZHOU, X.; REN, B.; CHENG, L. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. **Virulence**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 337-348, jan./fev. 2020.
13. CHUNG, Y-C.; CHEN, C-Y. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. **Bioresource Technology**. Taipei, v. 99, n. 2008, p. 1-9, dez. 2008. DOI:10.1016/j.biortech.2007.06.044.

14. DA SILVA, S. G. N.; DOS SANTOS, M. T. B. R.; DE MOURA, K. V. N.; MONLLEÓ, I. L.; BRANDÃO, D. G. Prevalência de cárie e fatores relacionados em pacientes com fibrose cística. **Research, Society and Development**, [s.l.], v. 10, n. 9, p. 1-11, jul. 2021.
15. DE ARAUJO, D. B.; CAMPOS, E. J.; BASTOS, I. H. A.; PAULA, D. M.; JUNIOR, E. R. T.; ARAUJO, R. P. C. Mouthrinses: active ingredients, pharmacological properties and indications. **Rev Gaúcha Odontol**. Porto Alegre, v. 60, n. 3, p. 349-357, jul./set. 2012.
16. DE ASSIS, T.R.T.; DOS SANTOS, P. B. R. E.; DA SILVA, A. M.; DE OLIVEIRA, L. D.; PALMA, A. L. R. As propriedades antimicrobianas do extrato glicólico de *Casearia sylvestris* Sw. em biofilme monotípico de cepas de *Candida albicans* e *Candida glabrata*. **Research, Society and Development**. [s.l.], v. 11, n. 1, p. 1-14, jan. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.25222>.
17. FENG, F.; LIU, Y.; ZHAO, B.; HU, K. Characterization of half N-acetylated chitosan powders and films. **Procedia Engineering**, Suzho, v. 27, p. 718-732, jan. 2012. DOI: 10.1016/j.proeng.2011.12.511.
18. FIORILLO, L. Chlorhexidine Gel Use in the Oral District: A Systematic Review. **Gels**, [s.l.], v. 5, n. 2, p. 31, jun. 2019. DOI: 10.3390/gels5020031.
19. FREIRE, N. B.; PIRES, L. C.S.R.; OLIVEIRA, H. P.; COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de prata sobre isolados de *Aeromonas* spp. obtidos de organismos aquáticos. **Pesq. Vet. Bras**. [s.l.], v. 38, n. 2, p. 244-249, jun./dez. 2018. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-4805.
20. GONG, T.; HE, X.; CHEN, J.; TANG, B.; ZHENG, T.; JING, M.; LIN, Y.; PAN, Y.; MA, Q.; LI, Y.; ZHOU, X. Transcriptional Profiling Reveals the Importance of RcrR in the Regulation of Multiple Sugar Transportation and Biofilm Formation in *Streptococcus mutans*. **mSystems**, [s.l.], v. 6, n. 4, p. 1-15, ago. 2021.

21. HERRERA, B., S.; MENDES, G., I. A., C.; PORTO, R., M.; RIGATO PAPEL DA CTO, H., M.; MOREIRA, L., D.; MUSCARÁ, M., N.; MAGALHÃES, J., C., A.; MENDES, G., D. O papel da clorexidina no tratamento de pacientes com gengivite no distrito de São Carlos do Jamari - RO. **Revista de Periodontia**. [s.l.], v. 17., n. 4, mar./jun. 2007.
22. HORTENSE, S., R.; CARVALHO, R., S.; CARVALHO, F., S.; DA SILVA, R., P., R.; BASTOS, J., R., M.; BASTOS, R., S. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na Odontologia. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, [s.l.], v. 22, n. 2, p. 178-184, mai./ago, 2010.
23. ITO, S.; MISAKI, T.; NAKA, S.; WATO, K.; NAGASAWA, Y.; NOMURA, R.; OTSUGU, M.; MATSUMOTO-NAKANO, M.; NAKANO, K.; KUMAGAI, H.; OSHIMA, N. Specific strains of *Streptococcus mutans*, a pathogen of dental caries, in the tonsils, are associated with IgA nephropathy. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 1-10, dez. 2019.
24. JUNG, E. J.; YOUN, D., K.; LEE, S., H.; NO, H., K.; HA, J., G.; PRINYAWIWATKUL, W. Antibacterial activity of chitosans with different degrees of deacetylation and viscosities: Antibacterial activity of chitosan. **International Journal of Food Science & Technology**, [s.l.], v. 45, n. 4, p. 676-682, jan. 2010. DOI: doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02186.x.
25. KE, C.-L.; DENG, F.-S.; CHUANG, C.-Y.; LIN, C.-H. Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan. **Polymers**, [s.l.], v. 13, n. 6, p. 904, fev./mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym13060904>.
26. KOŁODYNSKA, D. Adsorption characteristics of chitosan modified by chelating agents of a new generation. **Chemical Engineering Journal**, Lublin, v. 179, p. 33-43, ago./out. 2012. DOI: 10.1016/j.cej.2011.10.028.

27. LAMONT, R. J.; KOO, H.; HAJISHENGALLIS, G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 16, n. 12, p. 745-759, dez. 2018.
28. LEMOS, J. A.; PALMER, S. R.; ZENG, L.; WEN, Z. T.; KAJFASZ, J. K.; FREIRES, L., A.; ABRANCHES, J.; BRADY, L., J. The Biology of *S. mutans*. **Gram-Positive Pathogens**, [s.l.], v. 7, p. 435-448, jan. 2019.
29. LI, Z.; YANG, F.; YANG, R. Synthesis and characterization of chitosan derivatives with dual-antibacterial functional groups. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guangzhou, v. 75, p. 378-387, jan. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.056>.
30. LSAHARIAH, P.; ÓSKARSSON, B., M.; HJÁLMARSDÓTTIR, M., A.; MÁSSON, M. Synthesis of guanidinylated chitosan with the aid of multiple protecting groups and investigation of antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers**, Reykjavík, v. 127, p. 407-417, jan. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.carbpol.2015.03.061>.
31. MARINHO, B. S.; ARAÚJO, A. C. C. O uso dos enxagatários bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. **International Journal of Dentistry**. [s.l.], v. 6, n. 4, p. 124-131, out./dez. 2007.
32. MOMENI, S. S.; GHAZAL, T.; GRENETT, H.; WHIDDON, J.; MOSER, S. A.; CHILDERS, N. K. *S. mutans* serotypes and collagen-binding proteins *Cnm/Cbm* in children with caries analysed by PCR. **Molecular Oral Microbiology**, [s.l.], v. 34, n. 2, p. 64-73, jan. 2019.
33. NOMURA, Y.; OHARA, Y.; YAMAMOTO, Y.; OKADA, A.; HOSOYA, N.; HANADA, N.; TAKEI, N. Dental Hygienists Practice in Perioperative Oral Care Management According to the Japanese Dental Hygienists Survey 2019. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 114, dez. 2020.
34. ODA, Y.; HAYASHI, F.; WAKITA, A.; NAGATANI, Y.; OJADA, M. Five-year longitudinal study of dental caries risk associated with *S. mutans* and

Streptococcus sobrinus in individuals with intellectual disabilities. **Journal of Oral Science**, Hiroshima, v. 59, n. 1, p. 39-46, dez. 2017.

35. PILLONI, A.; CECCARELLI, S.; BOSCO, D.; GERINI, G.; MARCHESE, C.; MARINI, L.; ROJAS, M. A. Effect of Chlorhexidine Digluconate in Early Wound Healing of Human Gingival Tissues. A Histological, Immunohistochemical and Biomolecular Analysis. **Antibiotics**, [s.l.], v. 10, n. 1192, p. 1-13, ago./out. 2021.
36. PROCTOR, D. M.; SHELEF, K. M.; GONZALEZ, A.; DAVIS, C. L.; DETHLEFSEN, L.; BURNS, A. R.; LOOMER, P. M.; AMITAGE, G. C.; RYDER, M. I.; MILLMAN, M. E.; KNIGHT, R.; HOLMES, S. P.; RELMAN, D. A. Microbial biogeography and ecology of the mouth and implications for periodontal diseases. **Periodontology 2000**, [s.l.], v. 82, n. 1, p. 26-41, jan. 2020.
37. ROLIM, A. E. H.; CARVALHO, F. A. A.; COSTA, R. C. C.; ROSA, F. P. Chitosan Scaffolds - Physico - Chemical and Biological Properties for Bone Repair. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v.10, n. 2 p. 211-228, abr. 2018. DOI: 10.21577/1984-6835.20180018.
38. SAHARIAH, P.; MÁSSON, M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship. **Biomacromolecules**, [s.l.], v. 18, n. 11, p. 3846-3868, set. 2017. DOI: 10.1021/acs.biomac.7b01058.
39. SAMARANAYAKE, L. **Fundamentos de Microbiologia e Imunologia na Odontologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 24 p.
40. SCHULDT, L.; BI, J.; OWEN, G.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M.; HÄKKINEN, L.; LARJAVA, H. Decontamination of rough implant surfaces colonized by multispecies oral biofilm by application of leukocyte- and platelet-rich fibrin. **Journal of Periodontology**, [s.l.], v. 92, n. 6, p. 875-885, abr./mai. 2021.
41. SERRA, E.; HIDALGO-BASTIDA, AL., A.; VERRAN, J.; WILLIAS, D.; MALIC, S.. Antifungal activity of commercial essential oils and biocides

against *Candida albicans*. **Pathogens**, [s.l.]. v. 7, n. 1, p. 15, jan. 2018.
DOI: 10.3390/pathogens7010015.

42. SLOT, D.; BERCHIER, C.; ADDY, M.; VAN DER VELDEN, U.; VAN DER WEIJDEN, G. The efficacy of chlorhexidine dentifrice or gel on plaque, clinical parameters of gingival inflammation and tooth discoloration: a systematic review. **International Journal of Dental Hygiene**, [s.l.]. v. 12, n. 1, p. 25-35, jul. 2014.

43. TANG, H.; ZHANG, P.; KIEFT, T., L.; RYAN, S., J.; BAKER, S., M.; WIES. *mutans*ANN, W., P.; ROGELJ, S. Antibacterial action of a novel functionalized chitosan-arginine against Gram-negative bacteria. **Acta Biomaterialia**, Claremont, v. 6, n. 7, p. 2562-2571, jan. 2010. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.01.002.

44. XING, K.; ZHU, X.; PENG, X.; QIN, S.; Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. **Agron. Sustain. Dev.** [s.l.], v. 35, n. 2, p. 569-588, set. 2014. DOI 10.1007/s13593-014-0252-3.

45. ZARGAR, V.; ASHGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. **ChemBioEngRev.** [s.l.], v. 2, n. 3, p. 204-226, dez. 2015.

46. ZENG, L.; DAS, S.; BURNE, R. A. Genetic Analysis of the Functions and Interactions of Components of the LevQRST Signal Transduction Complex of *S. mutans*. **PLoS ONE**, Gainesville, v. 6, n. 2, p. 1-6, jan./fev. 2011.

47. ZHOU, X.; LI, Y. **Atlas of oral microbiology: from healthy microflora to disease**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

**Capítulo 3: BIOFILM FORMATION ON TOOTHBRUSHES BY *mutans* GROUP
STREPTOCOCCI AND *Candida* sp. ISOLATED FROM ORAL CAVITY OF
STUDENTS OF THE STATE UNIVERSITY OF GOIÁS, BRAZIL**

S Submetido à "Bioscience Journal" (conforme "print" de confirmação de e-mail recebido) como publicação interdisciplinar. Qualis CAPES: B2 Interdisciplinar Triênio 2013-2016 segundo Plataforma Sucupira.

BIOFILM FORMATION ON TOOTHBRUSHES BY *mutans* GROUP STREPTOCOCCI AND *Candida* spp. ISOLATED FROM ORAL CAVITY OF STUDENTS OF THE STATE UNIVERSITY OF GOIÁS, BRAZIL

(TYPE: LABORATORY STUDY)

Reuber Mendes Rocha ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8915-0512>. Postgraduate Program in Sciences Applied to Health Products. Bioassay Laboratory, Exact and Technological Sciences Campus, State University of Goiás, Anápolis, Goiás, Brazil.

e-mail: reuber.mr@gmail.com

Amanda dos Reis Correia ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5378-7140>. Postgraduate Program in Sciences Applied to Health Products. Bioassay Laboratory, Exact and Technological Sciences Campus, State University of Goiás, Anápolis, Goiás, Brazil.

e-mail: amanda.dosreiscorreia@gmail.com

Plínio Lázaro Faleiro Naves ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1936-1837>. Postgraduate Program in Sciences Applied to Health Products. Bioassay Laboratory, Exact and Technological Sciences Campus, State University of Goiás, Anápolis, Goiás, Brazil.

e-mail: plinionaves@ueg.br

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank our laboratory colleagues Kamila Cecílio, Osvaldo Gomes and Pabline Gasparotti for their contributions at various stages of the work, and to the volunteers who kindly participated in the sample collection stage. We also thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for granting a scholarship to the second author.

Authors' contributions:

Reuber Rocha - Acquisition, analysis and interpretation of data, initial writing of the manuscript and final approval of the version to be published.

Amanda Correia - Acquisition of data, writing of the manuscript and final approval of the version to be published.

Plínio Naves - Conception and design, analysis and interpretation of data, final writing of the manuscript and final approval of the version to be published.

3. Resumo

A escovação dentária é uma medida importante na promoção da saúde bucal. No entanto, a escova sofre a deposição e proliferação de micro-organismos em suas cerdas durante o seu uso. Além disso, foi demonstrada uma correlação entre a carga microbiana encontrada nas escovas de dente e o estado dentário dos pacientes. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar a formação de biofilme em escovas dentais por estreptococos do grupo *mutans* e *Candida* sp. isolados da cavidade oral de estudantes da Universidade Estadual de Goiás. A metodologia empregada permitiu a coleta, isolamento e identificação morfológica presuntiva de micro-organismos bucais, bem como a avaliação da formação de biofilme por ambos os micro-organismos em escovas dentais estéreis. Os resultados indicaram que todos os isolados microbianos foram capazes de formar biofilmes nas condições testadas, com contagens de células microbianas aderidas ao biofilme variando de 6,75 a 11,00 Log₁₀ ufc.ml⁻¹ para estreptococos do grupo *mutans* e 4,94 a 5,79 Log₁₀ ufc.ml⁻¹ para *Candida* sp. Foram isolados estreptococos do grupo *mutans* e *Candida* sp. em 92.31% das escovas usadas na coleta de amostras da cavidade bucal dos voluntários. Todos os micro-organismos isolados foram capazes de formar biofilme nas escovas, o que reforça a importância dos cuidados com a descontaminação das escovas dentais na promoção da saúde bucal.

Palavras-chave: biofilme microbiano, boca, cárie dentária, candidíase bucal, estudantes

3.2. Abstract

Tooth brushing is an important measure in promoting oral health. However, the brush suffers the deposition and proliferation of microorganisms in its bristles during its use. In addition, a correlation has been demonstrated between the microbial load found on toothbrushes and the dental status of patients. In this context, this work aims to evaluate the biofilm formation on toothbrushes by *mutans* group streptococci and *Candida* sp. isolated from the oral cavity of students at the State University of Goiás. The methodology employed allowed the collection, isolation and presumptive morphological identification of oral microorganisms, and also allowed the evaluation of biofilm formation by both microorganisms in sterile toothbrushes. The results indicated that all microbial isolates were able to form biofilms under the tested conditions, with microbial cell counts adhered to the biofilm ranging from 6.75 to 11.00 Log₁₀ cfu.ml⁻¹ for *mutans* group streptococci, and 4.94 to 5.79 Log₁₀ cfu.ml⁻¹ for *Candida* sp. *mutans* group streptococci and *Candida* sp. were isolated from 92.31% of the brushes used in the collection of samples from the oral cavity of the volunteers. All microorganisms isolated were able to form biofilm on toothbrushes, which corroborates the importance of care with decontamination of toothbrushes in promoting oral health.

3.2.1. Key words: microbial biofilm, mouth, tooth decay, oral candidiasis, students

Introduction

Oral microbiota refers to the term used to determine the group of more than 700 species of microorganisms that symbiotically inhabit the oral cavity and that may be beneficial or harmful to the human host. Current evidence demonstrates that the microbiota plays a crucial role in the associations between oral and general systemic health (Barboza-solis and Acuña-amador 2020).

Streptococci of the *mutans* group constitute about 70% of the cultivable microorganisms in the oral cavity. They are Gram-positive, ovoid bacteria, organized in pairs or chains that ferment dietary sugars and have acidogenic and adherence capacity. In addition, they initiate and have a strong role in the production, increase and maturation of biofilms (Schubert et al. 2021).

Previously, *Streptococcus mutans* were thought to be the only cause of dental caries (Philip et al. 2018). However, it has recently been shown that *C. albicans* also plays a critical role in the development of root caries, causing significant microbial dysbiosis and increased abundance of acidogenic/aciduric *S. mutans*, which leads to the formation of a more cariogenic polymicrobial biofilm (Du et al. 2021).

The microbial biofilm is the polymicrobial grouping involved in a viscous matrix composed of water, exopolysaccharides, proteins, nucleic acids and substances absorbed by the attached microorganisms that bind to the film acquired on the surface of the tooth (Gong et al. 2021). This film is formed within 15 minutes after cleaning and polishing the dental enamel and is considered the first step for the fixation of *S. mutans* and the formation of dental biofilm (Faria et al. 2020).

Adequate control of the biofilm in the oral cavity results in a lower risk for the development of oral and systemic diseases arising from the oral microbiota (Da Silva et al. 2021), and the toothbrush is an important instrument in the promotion of oral health.

Apposite tooth brushing provides partial removal of oral biofilm with reduction of microorganisms related to the etiology of dental caries (Greenfield and Marangoni 2019). However, the brush itself can become an environment for deposition and proliferation of microorganisms in its bristles (Ansari et al. 2019). In addition, a correlation has been demonstrated between the microbial load found on toothbrushes and the dental status of patients (Bargrivan et al. 2018).

In this context, the objective of this work was to evaluate, under laboratory conditions, the formation of biofilm on toothbrushes by streptococci of the *mutans* group and *Candida* spp. isolated from the oral cavity of students at the State University of Goiás in Brazil.

Material and methods

Obtaining saliva samples

This study was submitted to the Research Ethics Committee of the State University of Goiás (UEG) in accordance with resolutions 196/96 and 466/12 for research involving human beings of the Ministry of Health and the National Health Council through the Brazil Platform. with Approval Opinion N°. 3.604.978. The Free and Informed Consent Term (FICT) was signed and a copy delivered to the participant before any procedure in this research.

Saliva samples were collected with stimulation by tooth brushing, from 13 students at the Central Campus of the State University of Goiás in the city of Anápolis. Volunteers were included according to the inclusion criteria: being of legal age, agreeing to participate in the research by signing the necessary documentation, having good systemic health, not having eaten in the period between the last brushing and collection, not having brushed their teeth before collection and not having any missing tooth in the oral cavity, except for third molars.

In the act of collecting the material, information was collected and then the volunteers were instructed on brushing with the modified Bass technique (Lindhe et al. 2010). An illustrated insert was presented in order to facilitate brushing and standardize sample collection by the participants, and the brushing time was timed. Toothpaste or dental floss was not used and the tongue was not brushed.

Saliva samples were collected with new, disposable brushes with a size 30 rounded head, 20 tufts and 14 cm long soft bristles that were previously sterilized in an autoclave at 125°C for 15 minutes.

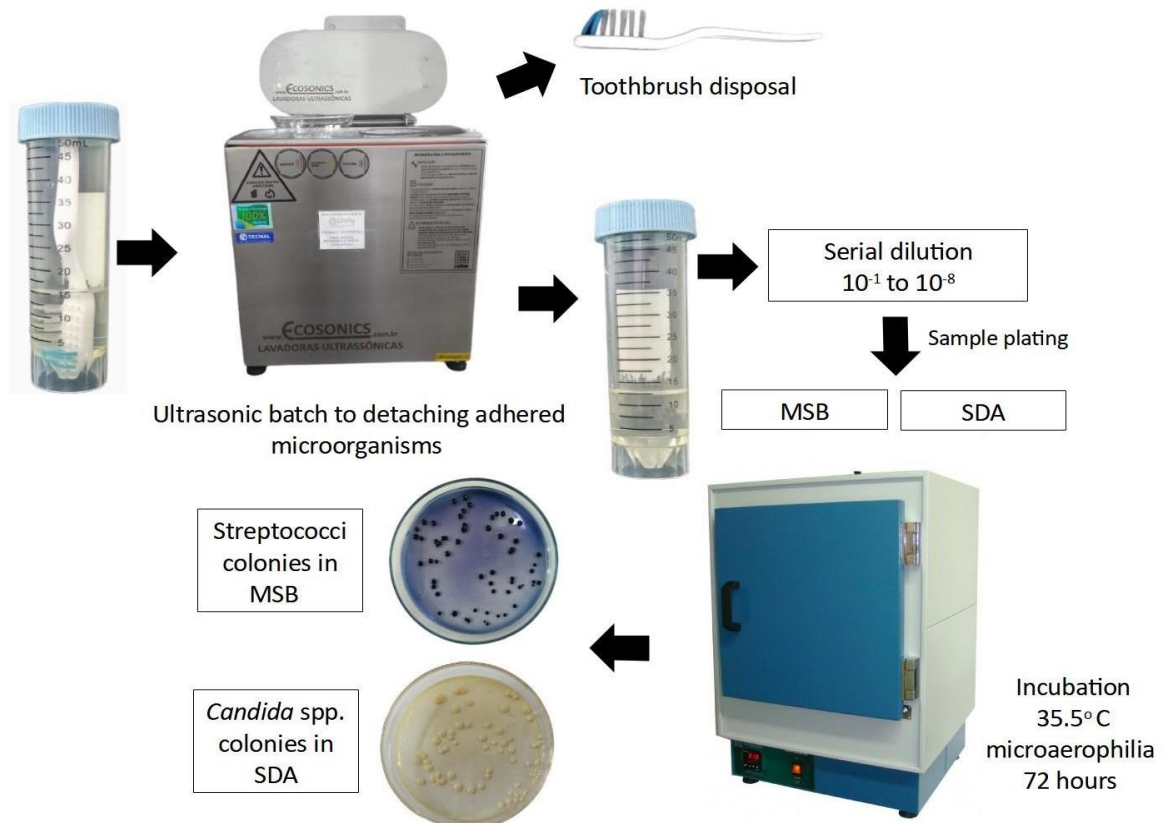
Volunteers were taken to the bathroom and requested that, as soon as brushing was completed, the brushes were immediately returned to be placed in Falcon tubes containing 15 mL of 0.9% sodium chloride sterile saline solution for transport, and subsequent processing in the Microbiology Laboratory.

Microbiological processing

The samples were submitted to sonication to detach the microorganisms adhered to the brushes in an ultrasonic bath at 40 kHz (Ultronique Q 5.9/40A, Indaiatuba, São Paulo) for 5 minutes at room temperature (Chaves et al. 2007). Then the brushes were discarded and the supernatants were diluted and plated up to 10^{-8} for the isolation of the collected microorganisms.

Microbial samples were subcultured onto mitis salivarius agar (MSB) (Himedia, Mumbai, India) supplemented with 20% sucrose PA (Neon, São Paulo, Brazil), 0.2 IU bacitracin (Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany) and 1% potassium tellurite (Dinâmica, Indaiatuba, Brazil) for the isolation of *mutans* group streptococci as described by Cota and Alvim (2018) and on Sabouraud dextrose chloramphenicol agar (SDA) (KASVI, São José dos Pinhais, Brazil) for isolation of *Candida* sp. The plates were incubated at 35.5 °C in microaerophilia for 72 hours (Figure 1).

Figure 1. Microbiological processing of samples



Source: authors, 2022.

After incubation, growth readings were performed in the culture media with a colony counter (MA-6000, Marconi, Piracicaba, Brazil) for the presumptive identification of the microorganisms recovered from each brush.

The presumptive identification of the isolated microorganisms was carried out based on the analysis of colonial aspects such as morphology, color, texture and odor after growth in the respective selective culture media. The enriched MSB medium is highly selective for *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. salivarius* and *S. mitis*. Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch were identified as *mutans* group streptococci in this study (Saravia et al. 2020; Zhou and Li, 2020).

For the isolation and identification of *Candida* spp., the criteria used were growth in SDA with chloramphenicol, with formation of whitish, spherical colonies, with a slightly darker center and odor of the plates similar to bread fermentation (Sridhar et al. 2019).

After identification, the isolated microorganisms were frozen in aliquots for further studies of biofilm formation (Silva et al. 2008).

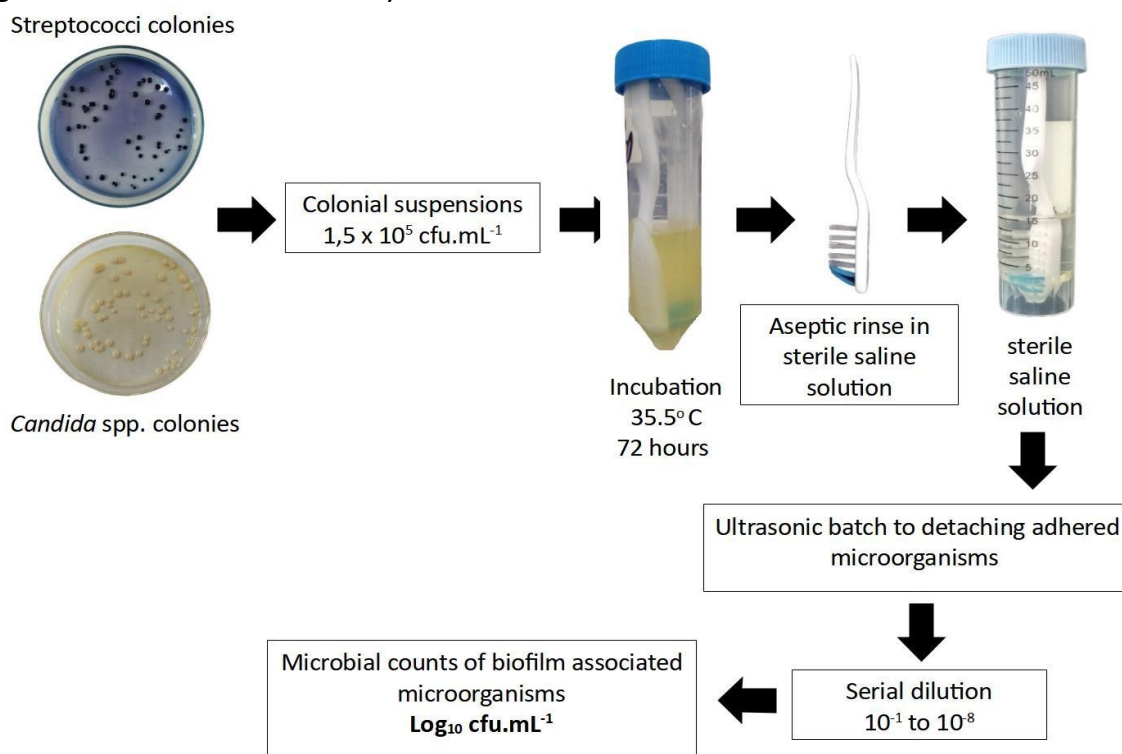
Biofilm formation on brushes

Aliquots of the isolated microorganisms were subcultured in the respective culture media and after incubation at 35.5 °C in microaerophilia for 72 hours, and then the purity of the cultures was checked. Subsequently, three to five typical colonies were dissolved in 0.9%

sterile saline solution (0.9% SSS) at approximately 1.5×10^8 cfu.mL⁻¹ with the 0.5 McFarland scale. Then, 200 µL of the suspension was transferred to Falcons tubes with 19,800 µL of Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Himedia, Mumbai, India) adjusting and the initial inoculum for the biofilm formation assay at 1.5×10^5 cfu.mL⁻¹.

After preparation of the microbial inocula, sterile toothbrushes were aseptically placed in Falcon tubes and the samples were incubated. Then, the brushes were removed with sterile forceps and then rinsed in a Falcon tube with 20 mL of 0.9% SSS. After this procedure, the brushes were transferred to other tubes with 20 mL of 0.9% SSS and sonicated in an ultrasonic bath at 40 kHz (Ultronique Q 5.9/40A, Indaiatuba, São Paulo) for 5 minutes at room temperature (Chaves et al. 2007) for detachment of attached colonies and subsequent counting in MSB and SDA media, for growth of *mutans* streptococci and *Candida* sp., respectively (Figure 2).

Figure 2. Biofilm formation assay on sterile toothbrushes



Source: authors, 2022.

All microorganisms were evaluated in three independent replicates. The results of the counts were transformed into Log₁₀ and the means and standard deviations were calculated. Sterility controls and the *Candida albicans* ATCC 10231 were included in the assay.

Results

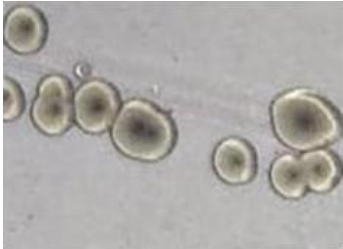

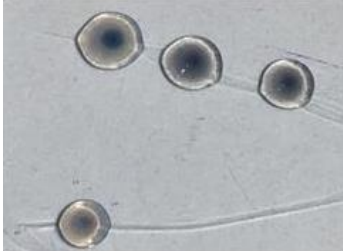
3.5.1. Isolation and presumptive identification


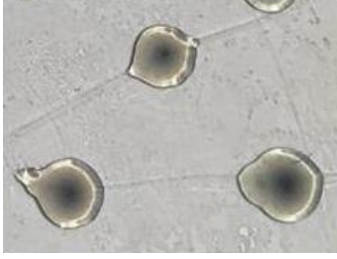




Of the total of 13 brushes processed, microorganisms were isolated in 12 (92.31%), in 1 (7.69%) brush were not isolated. A toothbrush that showed microbial growth was removed from the study due to the waiving of a volunteer from participating in the investigation.


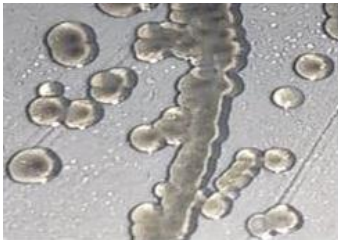
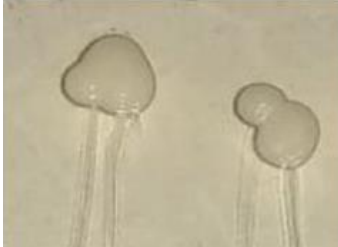
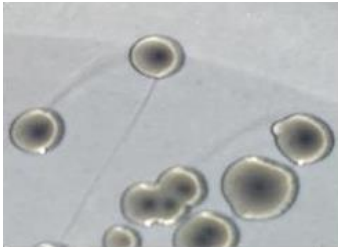


A total of 15 types of colonies were obtained in the 11 brushes with microbial growth. Of these, 10 colonies were suggestive of *mutans* group streptococci and 5 colonies of *Candida* sp. In 6 (54.54%) brushes were isolated only streptococci of the *mutans* group, in 4 (36.36%) brushes were isolated both microorganisms and in 1 (9.10%) brush only *Candida* sp. was found.

Table 1 presents the morphological description and presumptive identification of the isolated microorganisms.

Table 1. Presumptive identification based on colonial morphology of the isolated microorganisms.

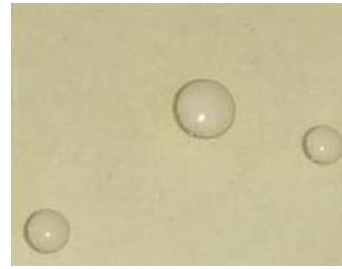
Brush	Culture medium / Colonial morphology	Image	Identification
2	MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch		<i>mutans</i> group streptococci
	SDA / Colonies with a spherical shape, whitish or beige color, slightly pigmented center and characteristic odor of bread.		<i>Candida</i> sp.
4	MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch		<i>mutans</i> group streptococci

5	<p>MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch</p>		<p><i>mutans</i> group streptococci</p>
6	<p>MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch</p>		<p><i>mutans</i> group streptococci</p>
7	<p>MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch</p>		<p><i>mutans</i> group streptococci</p>
	<p>SDA / Colonies with a spherical shape, whitish or beige color, slightly pigmented center and characteristic odor of bread</p>		<p><i>Candida</i> sp.</p>
8	<p>MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch</p>		<p><i>mutans</i> group streptococci</p>
	<p>SDA / Colonies with a spherical shape, whitish or beige color, slightly pigmented center and characteristic odor of bread</p>		<p><i>Candida</i> sp.</p>

9	MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch		mutans group streptococci
10	MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch		<i>mutans</i> group streptococci
11	SDA / Colonies with a spherical shape, whitish or beige color, slightly pigmented center and characteristic odor of bread		<i>Candida</i> sp.
12	MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch		<i>mutans</i> group streptococci
	SDA / Colonies with a spherical shape, whitish or beige color, slightly pigmented center and characteristic odor of bread		<i>Candida</i> sp.
14	MSB / Smooth and convex colonies of light blue color and raised center with the appearance of a dark blue central drop, with a sticky texture and soft to the touch		<i>mutans</i> group streptococci

Ca
ATCC
10321

SDA / Colonies with a spherical
shape, whitish or beige color,
slightly pigmented center and
characteristic odor of bread



*Candida
albicans*

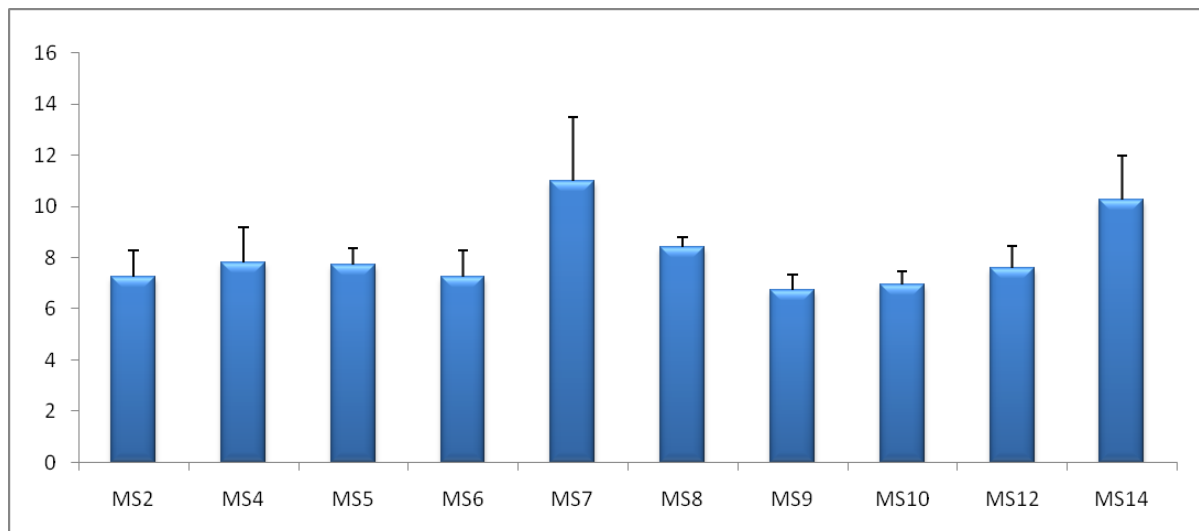
Source: authors, 2022.

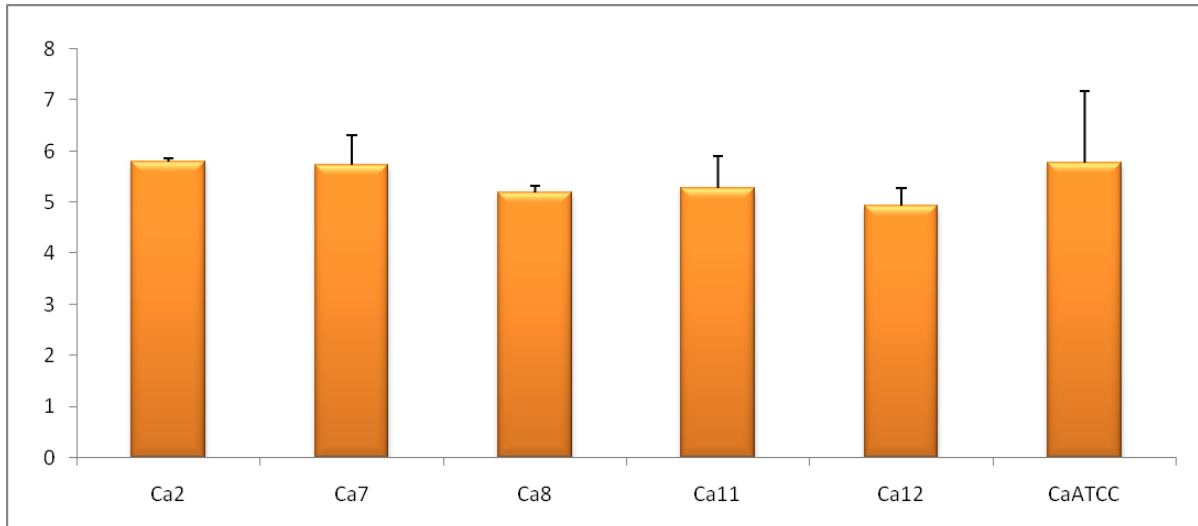
3.3.2 Biofilm formation on brushes

All microbial isolates were able to form biofilms under the tested conditions, with microbial cell counts adhered to the biofilm ranging from 6.75 to 11.00 Log_{10} cfu.ml⁻¹ for *mutans streptococci*, and 4.94 to 5.79 Log_{10} cfu.ml⁻¹ for *Candida* sp.

The isolates MS7 and MS14 were the major biofilm formers, with counts of 11.00 ± 2.51 and 10.28 ± 1.70 Log_{10} cfu.ml⁻¹, respectively. The other streptococci remained with more homogeneous counts. The isolated yeast counts were more uniform, as shown in Figure 3.

Figure 3. Cell counts (Log_{10} cfu.ml⁻¹) recovered from the microbial biofilms adhered in toothbrushes





MS: mutans group streptococci; Ca: *Candida* sp.; cfu: colony forming unit; ATCC: American Type Culture Collection

Source: authors, 2022.

Discussion

The oral cavity is colonized by several types of microorganisms, with the establishment of a transient microbiota, generally controlled by microbial antagonism with the resident microbiota and by routinely employed hygiene (Barboza-solis and Acuña-amador 2020).

In the present study, brushes were used to isolate *mutans* group streptococci and *Candida* sp. of the oral cavity of volunteers. Subsequently, we verified the ability of the isolates to form biofilms on sterile brushes. In the first stage of the study, microorganisms were isolated in 92.31% of the brushes used to obtain the microbial samples. Of the 15 microorganisms isolated, 10 were *mutans* group streptococci and 5 were *Candida* sp.

Tooth brushing is essential for oral hygiene, however the use of a toothbrush requires care such as proper cleaning and frequent replacement to minimize contamination, because during brushing, part of the oral microbiota can be transferred to the brush and the toothbrush, and from then on, the microbial load tends to increase and diversify with each use (Mantovani et al. 2019; Watanabe et al. 2010).

The *mutans* group streptococci are present in 90% of the world population, while *Candida albicans* are isolated in 30-50% (Dabas, 2013). *S. mutans* are related to the installation and progression of dental caries due to their ability to primarily adhere to the smooth surface of the tooth and allow the subsequent aggregation of other acidogenic microorganisms, with increased sucrose metabolism, lactic acid release and maturation of polymicrobial biofilm (Kumar et al. 2017).

Yeasts of the *Candida* genus are part of the oral microbiota in situations of normality of the host, but they can behave as pathogens when local and systemic factors are triggered (Williams et al. 2013). In addition, *Candida albicans* has the ability to colonize the oral mucosa and denture surfaces, and is reported as a frequent cause of oropharyngeal

infections and has cariogenic potential, being found in 10% of decayed teeth without *S. mutans* (Pereira et al. 2018).

By itself, *C. albicans* has no cariogenic capacity, but in the presence of sucrose, aggregation with *S. mutans* occurs, increasing the amount of aciduric acid-tolerant microorganisms and the production of extracellular matrix. Therefore, there is a relationship between the levels of caries, the amount of microorganisms and their ability to form biofilms. In this way, the mixed biofilm of these microorganisms can intensify the carious processes (Koo et al. 2018; Sounah and Madfa 2020). Furthermore, *Candida* is an opportunistic fungus, and oral pathological manifestations are directly related to the immune status of the host (Sharma 2019) since the occurrence of microbial biofilm in this anatomical site is related to the oral health of the patient.

The data presented in Figure 3 indicate that all the isolates were able to form biofilms on the brushes, with high counts of microorganisms associated with the biofilms. These results are similar to the results obtained by other authors, although using different substrates and methodologies. In a study on *S. mutans* biofilm formation on bovine tooth enamel, the counts obtained in the control group ranged from 5.00 to 10.00 Log₁₀ cfu.ml⁻¹ (De Souza et al. 2020). The results found in the viability controls of studies that evaluated the inhibition of biofilm formation by *S. mutans* were 6.5 and 10.00 Log₁₀ cfu.ml⁻¹, respectively (Tokubo et al. 2018; Jafri et al. 2020). Regarding the cell counts associated with *Candida* biofilm, other authors found counts ranging from 4.02 to 9.50 Log₁₀ cfu.ml⁻¹ cells (Khan et al. 2022; Coimbra et al. 2021; Da Silva et al. 2019; Palma et al. 2018).

Biofilms constitute a form of existence of microorganisms encapsulated in an extracellular matrix that holds cells together and forms a three-dimensional structure resistant to extrinsic adversities (Li et al. 2019). In the oral cavity, the biofilm is adhered to the surfaces of the mouth in general and tends to establish itself and increase if there is no chemical or mechanical interference (De Menezes et al. 2020). Thus, microbial control methods are used to reduce microbial biofilm and maintain oral health, the use of mouthwashes and tooth brushing are common methods used for this purpose.

Conclusions

In summary, in this work we evaluated the biofilm formation on toothbrushes by *mutans* group streptococci and *Candida* sp. isolated from the mouths of students at the State University of Goiás. The sample collection methodology proved to be effective, as microorganisms were not recovered in just one brush collected. In the second part of the study, it was detected that all isolates were able to form biofilms on the brushes, and that the isolates showed considerable counts of microorganisms associated with the biofilm, with emphasis on the counts of streptococci of the *mutans* group. In agreement with other authors (Queiros and Passos 2019; Unahalekhaka et al. 2022), the results obtained in this study highlight the importance of taking care with the decontamination of toothbrushes in the promotion of oral health.

References

- ANSARI, G., et al. Comparing the effect of dry and wet brushing on dental plaque removal in children. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*. 2019, **37**(1), 292-296. https://doi.org/10.4103/JISPPD.JISPPD_71_19
- BARBOZA-SOLÍS, C. and ACUÑA-AMADOR, L.A. The Oral Microbiota: A Literature Review for Updating Professionals in Dentistry. Part I. *Odovtos - International Journal of Dental Sciences*. 2020, **22**(3), 59-68. <https://doi.org/10.15517/ijds.2020.39178>
- BARGRIZAN, M., et al. Effects of antibacterial photodynamic therapy on salivary *mutans* streptococci in 5- to 6-year-olds with severe early childhood caries. *Lasers in Medical Science*. 2018, **34**(3), 433-440. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2650-2>
- CHAVES, R.A.C., et al. Avaliação de soluções antibacterianas na descontaminação de escovas dentárias de pré-escolares. *Revista de Odontologia da UNESP*. 2007, **36**(1), 29-33. Available from: <https://www.revodontolunesp.com.br/article/588018047f8c9d0a098b4a22>
- COIMBRA, F.C.T., et al. Antimicrobial activity of effervescent denture tablets on multispecies biofilms. *Gerodontology*. 2021, **38**(1), 87-94. <https://doi.org/10.1111/ger.12500>
- COTA, A.L.S. and ALVIM, R. G. Effect of storage temperature on *Streptococcus mutans* viability. *Revista de Odontologia da UNESP*. 2018, **47**(2), 74-78. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-2577.08317>
- DA SILVA, F.C., et al. Fluorescence spectroscopy of *Candida albicans* biofilms in bone cavities treated with photodynamic therapy using blue LED (450 nm) and curcumin. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2019, **26**, 366-370. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.05.002>
- DA SILVA, M.B., et al. Condição bucal e doenças respiratórias em pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva. *Archives of Health Investigation*. 2021, **10**(1), 147-152. Available from: <https://www.archhealthinvestigation.com.br/ArcHI/article/view/4935/7006>
- DABAS, P.S. An approach to etiology, diagnosis and management of different types of candidiasis. *Journal of Yeast and Fungal Research*. 2013, **4**(6), 63-74. Available from: <https://academicjournals.org/journal/JYFR/article-stat/7A1725910069>
- DE MENEZES, M.L.F., et al. A importância do controle do biofilme dentário: uma revisão da literatura. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*. 2020, **55**(1), 1-12, <https://doi.org/10.25248/reas.e3698.2020>
- DE SOUZA, C.M., et al. Chitosan enhances the Antimicrobial Photodynamic Inactivation mediated by Photoditazine® against *Streptococcus mutans*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102001>

- DU, Q., et al. *Candida albicans* promotes tooth decay by inducing oral microbial dysbiosis. *The ISME Journal*. 2021, **15**, 894-908. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00823-8>
- FARIA, J.B., et al. Development of *Streptococcus mutans* biofilm in the presence of human colostrum and 3'-sialyllactose. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2020, **35**(4), 630-635, <https://doi.org/10.1080/14767058.2020.1730321>
- GONG, T., et al. Transcriptional Profiling Reveals the Importance of RcrR in the Regulation of Multiple Sugar Transportation and Biofilm Formation in *Streptococcus mutans*. *mSystems*. 2021, **6**(4), 1-15, <https://doi.org/10.1128/mSystems.00788-21>
- GREENFIELD, E. and MARANGONI, A.L.F. Avaliação comparativa entre escovas dentais manuais e ultrassônicas para remoção do biofilme. *Revista Odonto*. 2019, **27**(54), 19-24. Available from: <https://www.metodista.br/revistas/revistas-metodista/index.php/Odonto/article/view/10155/7274>
- JAFRI, H. et al. Synergistic interaction of eugenol and antimicrobial drugs in eradication of single and mixed biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *AMB Express*. 2020, **10**(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01123-2>
- KHAN, F. et al., Inhibitory activities of phloroglucinol-chitosan nanoparticles on mono- and dual-species biofilms of *Candida albicans* and bacteria. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2022, **211**. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112307>
- KOO, H. et al. *Candida*-streptococcal interactions in biofilm associated oral diseases. *PLoS Pathogens*. 2018, **14**(12), 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007342>
- KUMAR, A., et al. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 2017, **307**(8), 481-489. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.09.016>
- Li, R., et al. Synthesis and evaluation of a chitosan oligosaccharide-streptomycin conjugate against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Marine drugs*. 2019, **17**(43), 1-12. <https://doi.org/10.3390/md17010043>
- LINDHE, J., et al. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- MANTOVANI, R.P., et al. Toothbrushes may convey bacteria to the cystic fibrosis lower airways. *Journal of Oral Microbiology*. 2019, **11**(1), 1-8. <https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1647036>
- PALMA et al. Biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus sanguinis* and their susceptibility to antimicrobial effects of photodynamic inactivation. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2018, **24**, 95-101. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.07.003>
- PEREIRA, D.F.A., et al. Is the oral fungal pathogen *Candida albicans* a cariogen? *Oral Diseases*. 2018, **24**(4), 518-526. <https://doi.org/10.1111/odi.12691>

PHILIP, N., SUNEJA, B., WALSH, L. Beyond *Streptococcus mutans*: clinical implications of the evolving dental caries aetiological paradigms and its associated microbiome. *British Dental Journal*. 2018, **224**, 219-225. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.81>

QUEIROS, E.C.F. and PASSOS, M.A.N. Aspectos de contaminação e descontaminação das cerdas de escovas dentais. *Revista Ciências e Odontologia*. 2019, **3**(1), 1-5. Available from: <http://revistas.icesp.br/index.php/RCO/article/view/433/519>

SARAVIA, M.E., et al. Morphological identification of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in SB-20M culture medium has efficiency comparable to proteomic identification by the MALDI-TOF mass spectrometry technique. *Archives of Oral Biology*. 2020, **110**, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104595>

SCHUBERT, A., et al. Influence of the Manufacturing Method on the Adhesion of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* to Oral Splint Resins. *Polymers*. 2021, **13**(15340), 1-11. <https://doi.org/10.3390/polym13101534>

SHARMA, A. Oral candidiasis: An opportunistic infection: A review. *International Journal of Applied Dental Sciences*. 2019, **5**(1), 23-27. Available from: <https://www.oraljournal.com/archives/2019/5/1/A/5-1-9>

SILVA, J.O., COSTA, P.P., and RECHE, S.H.C. Manutenção de leveduras por congelamento a -20°C. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 2008, **40**(1), 73-74. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-510681>

SOUNAH, S.A. and MADFA, A.A. Correlation between dental caries experience and the level of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* in saliva and carious teeth in a Yemeni adult population. *BMC Research Notes*. 2020, **13**(112), 1-6. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-04960-3>

SRIDHAR, S., et al. Association of *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* and oral health practices with activity status of caries lesions among 5-year-old children with early childhood caries. *Oral Health & Preventive Dentistry*. 2020, **18**(1), 911-919. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a45411>

TOKUBO, L.M., et al. Antimicrobial effect of the photodynamic therapy using erythrosine/methylene blue combination on *Streptococcus mutans* biofilm. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2018, **23**, 94-98. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.05.004>

UNAHLEKHAKA, A. et al. Contamination of antimicrobial-resistant bacteria on toothbrushes used with mechanically ventilated patients: A cross sectional study. *Intensive and Critical Care Nursing*. 2022, **68**, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.iccn.2021.103120>

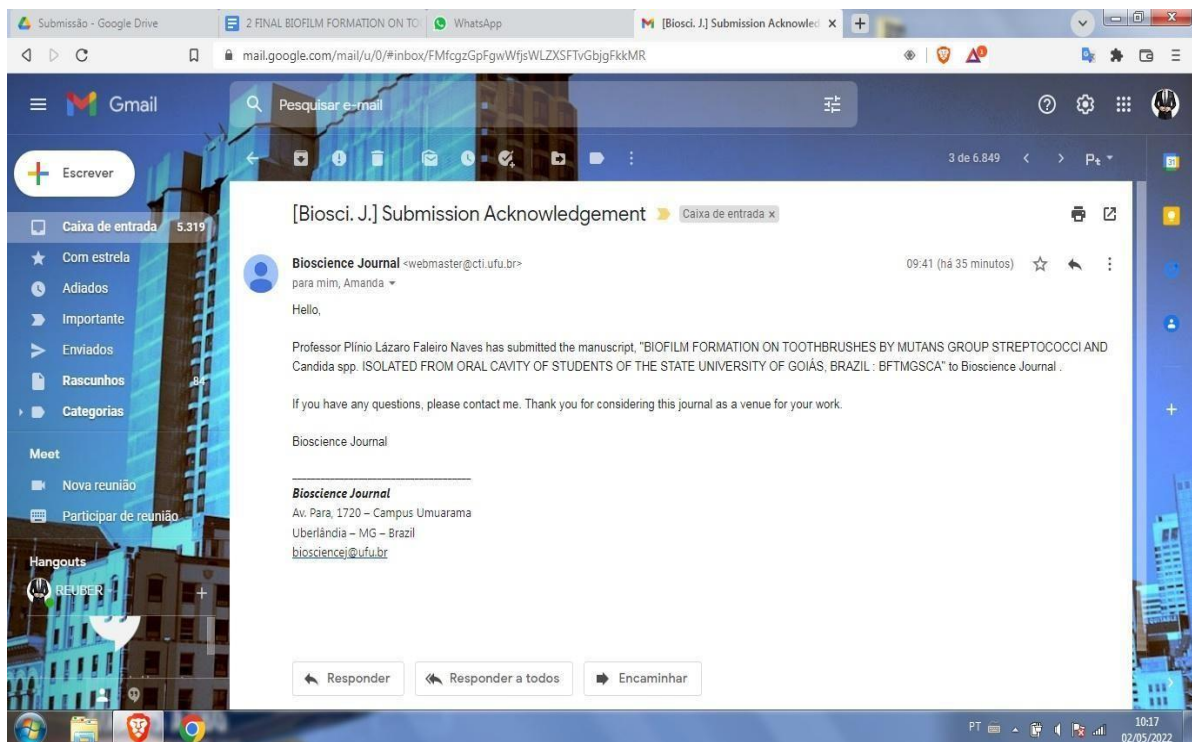
WATANABE, A.P. Toothbrush Contamination by *Candida* sp. and Efficacy of Mouthrinse Spray for Their Disinfection. *Mycopathologia*. 2010, **169**, 133-138. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9239-z>

WILLIAMS, D.W., et al. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *Journal of Oral Microbiology*. 2013, **5**, 1-8. <https://doi.org/10.3402/jom.v5i0.22434>

ZHOU, X. and LI, Y. Atlas of oral microbiology: from healthy microflora to disease. 2nd ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2020.

Anexo 1

E-mail confirmatório de submissão do manuscrito à equipe editorial do "Bioscience Journal" ISSN 1981-3163



Capítulo 4 EFEITO DA QUITOSANA E DO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA NA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ESTREPTOCOCOS DO GRUPO *mutans* E *Candida* sp. EM ESCOVAS DENTAIS

Autor correspondente: *Reuber Mendes Rocha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8915-0512>. Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos de Saúde. Laboratório de Bioensaios, Campus de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, Goiás, Brasil. e-mail: reuber.mr@gmail.com

Plínio Lázaro Faleiro Naves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1936-1837>. Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos de Saúde. Laboratório de Bioensaios, Campus de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, Goiás, Brasil. e-mail: plinionaves@ueg.br

Resumo: A cavidade bucal humana é colonizada por diversos micro-organismos que estão constantemente produzindo e maturando biofilme bucal. Este, por sua vez deve ser controlado para manutenção de uma boa saúde bucal. Vários métodos de controle físicos ou químicos são utilizados e de maneira especial a clorexidina se mostra bastante eficiente na redução do biofilme polimicrobiano. Como todo medicamento, tem efeitos colaterais, o que induz investigação de produtos tão eficientes quanto. A quitosana se mostra eficiente principalmente como agente antimicrobiano. O objetivo deste ensaio clínico foi comparar a formação de biofilme por estreptococos do grupo *mutans* (EGM) e *Candida* sp. (Ca) em escovas dentais tratadas com quitosana 1 mg.ml⁻¹ e digluconato de clorexidina 0,60 mg.mL⁻¹ clorexidina e ambos associados. Os resultados revelam ação de redução da formação de biofilme em escovas nos três cenários testados. da quitosana sobre EGM; clorexidina reduziu a formação de biofilme de ambos os micro-organismos; a associação não pareceu reforçar a ação antimicrobiana dos compostos.

Palavras-chave: quitosana, clorexidina, *streptococcus mutans*, *candida albicans*, boca

Abstract: The human oral cavity is colonized by several microorganisms that are constantly producing and maturing oral biofilm. This, in turn, must be controlled to maintain good oral health. Several methods of physical or chemical control are used and, in a special way, chlorhexidine is shown to be quite efficient in reducing the polymicrobial biofilm. Like any drug, it has side effects, which leads to the investigation of products that are as efficient as possible. Chitosan is shown to be efficient mainly as an antimicrobial agent. The objective of this clinical trial was to compare biofilm formation by *mutans* group streptococci (EGM) and *Candida* sp. (Ca) in toothbrushes treated with chitosan 1 mg.ml⁻¹ and chlorhexidine digluconate 0.60 mg.mL⁻¹ chlorhexidine and both associated. The results reveal action in reducing the formation of biofilm on the brushes in the three scenarios tested. of chitosan in the EGM; chlorhexidine reduced biofilm formation of both microorganisms; the association did not seem to reinforce the antimicrobial action of the compounds.

Key words: chitosan, chlorhexidine, *mutans streptococcus*, *candida albicans*, mouth

Introdução

A cavidade bucal é vastamente colonizada por micro-organismos que podem ser patogênicos ou não. A cavidade bucal permite ampla gama de micro-organismos devido à diferentes superfícies/estruturas, escovação, alimentação e estado imunológico do hospedeiro que libera mediadores de inflamação (CAMPO, 2018; ZHU, WANG & LI, 2010).

No contexto de cavidade bucal, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* são diretamente ligados à cárie dentária e candidíase bucal respectivamente de modo que o biofilme bucal tem papel fundamental na instalação e progressão das doenças bucais. *S. mutans* é considerada formador inicial de biofilme e também o mais cariogênico micro-organismo. Também é relatado que a associação entre *S. mutans* e *C. albicans* aumenta o potencial cariogênico do biofilme bucal (CUGINI et al., 2019; DU et al., 2020). A presença de mais de 700 espécies de presentes na cavidade bucal permite um biofilme polimicrobiano (KRAGH et al., 2016; EBRAHIMI, SCHWARTZMAN & CORDERO, 2019).

O biofilme bucal se instala na boca como uma camada viscosa e esbranquiçada sobre os dentes e devido à sua formação são altamente virulentos e resistentes à antibióticos, quando maduros. Todavia, é necessária sua remoção e controle sem alteração da microbiota bucal normal (RATH, BAL & DUBEY, 2021).

S. mutans inicialmente adere à superfície lisa dentária e inicia a formação de matriz com co-agregação de outros micro-organismos de modo a formar um microambiente propício para proliferação microbiana resistente ao ácido que *S. mutans* produz.

C. albicans é um fungo comensal da cavidade oral humana em condições de equilíbrio local, mas com potencial patogênico em caso de queda de imunidade, uso de medicações por longos períodos, tratamento de câncer, SIDA, imunodeprimidos, retenção protética prolongada na boca (TALAPKO et al., 2021). Pode se manifestar nas formas da candidíase bucal.

Diante disso, é necessário o emprego de alternativas viáveis para controle de biofilme. A quitosana é um polímero resultante da desacetilação da quitinaé vastamente encontrado na natureza a partir do exoesqueleto de animais marinhos, carapaças de insetos e parede celular de fungos. Tem ação cicatrizante, antimicrobiana, cicatrizante, antitumoral (XING et al., 2014).

A clorexidina é considerada padrão-ouro no controle de biofilme bucal sendo um composto desinfetante de origem sintética, resultante de pesquisas para controle da malária na década de 1940. Tem espectro de ação contra Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Seu uso prolongado pode gerar gosto desagradável, manchamento nos dentes, sensação de ardência bucal (SERRA et al., 2018).

Nesse cenário, produtos naturais vêm sendo amplamente estudados e a quitosana tem uma gama de efeitos benéficos que podem ser aliados nas indústrias farmacêutica, médica, biomédica e odontológica. Atentando a isso, resolveu-se avaliar sua ação frente a micro-organismos bucais em escovas de dente.

O presente trabalho objetivou avaliar a formação de biofilme por estreptococos do grupo *mutans* e *Candida* sp. em escovas dentais tratadas com soluções de quitosana 1 mg.ml⁻¹ e digluconato de clorexidina 0,60 mg.mL⁻¹ isoladas e em combinação.

Material e métodos

Processamento microbiológico

Foi avaliado um total de 6 micro-organismos, 3 estreptococos do grupo *mutans* e 3 *Candida* sp. mantidos na coleção do Laboratório de Bioensaios e isolados da cavidade bucal de voluntários avaliados em projeto prévio aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da UEG com parecer n° 3.604.978.

Os estreptococos do grupo *mutans* (EGM) foram reativadas em ágar *mitis salivarius* (MSB) (Himedia, Mumbai, Índia) suplementado com 20% de sacarose PA (Neon, São Paulo, Brasil), 0,2 UI de bacitracina (Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Alemanha) e 1% de telurito de potássio (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil). As foram reativadas em ágar *Sabouraud* dextrose cloranfenicol (SDA) (KASVI, São José dos

Pinhais, Brasil). Todos micro-organismos foram incubados em microaerofilia a 35,5° C por 72 horas, com a confirmação dos aspectos macroscópicos das colônias e o isolamento das amostras antes do início dos testes (SARAVIA et al., 2020; ZHOU & LI, 2020; SRIDHAR et al., 2019).

Preparação dos compostos

Foi utilizada quitosana Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) (Lote #SLBF5331V-% GA de 25% e massa molar viscosimétrica de 155000 g.mol⁻¹) gentilmente cedida pela profa. Roberta Signini do Laboratório de Síntese, Isolamento e Modificação de Compostos Orgânicos - LaBSIMCO/UEG

A solução de quitosana 1 mg.mL⁻¹ foi preparada assepticamente com pesagem e dissolução de 20 mg em 20 mL de solução de ácido acético a 1% sob agitação magnética durante 24h. Em seguida o pH foi ajustado para 5,0 com a adição gradual de carbonato de sódio.

A solução de digluconato de clorexidina 0,60 mg.mL⁻¹ foi preparada com a diluição de 1 mL do composto comercial a 2% (Reymer, Goiás, Brasil) em 32 mL de água destilada esterilizada seguido da completa homogeneização.

O preparo da mistura dos dois compostos foi realizada com a adição de 10 mL de cada suspensão com o dobro da concentração de cada solução isolada em um tubo Falcon de modo a se obter uma solução de 20 mL com as mesmas concentrações dos compostos isolados.

Pré-tratamento das escovas dentais

Escovas dentais descartáveis com cabeça arredondada de tamanho 30 e 840 cerdas de *nylon* de dureza média e com cabo de 14 centímetros foram esterilizadas em autoclave. Posteriormente, as escovas foram assepticamente transferidas para tubos Falcon contendo as soluções teste e mantidas em contato durante 1 minuto (MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, REDA & HANNIG, 2020, adaptado). Em seguida as escovas foram retiradas com auxílio de pinça estéril e reservadas para a etapa seguinte dos ensaios de formação de biofilme.

Ensaio de formação de biofilme

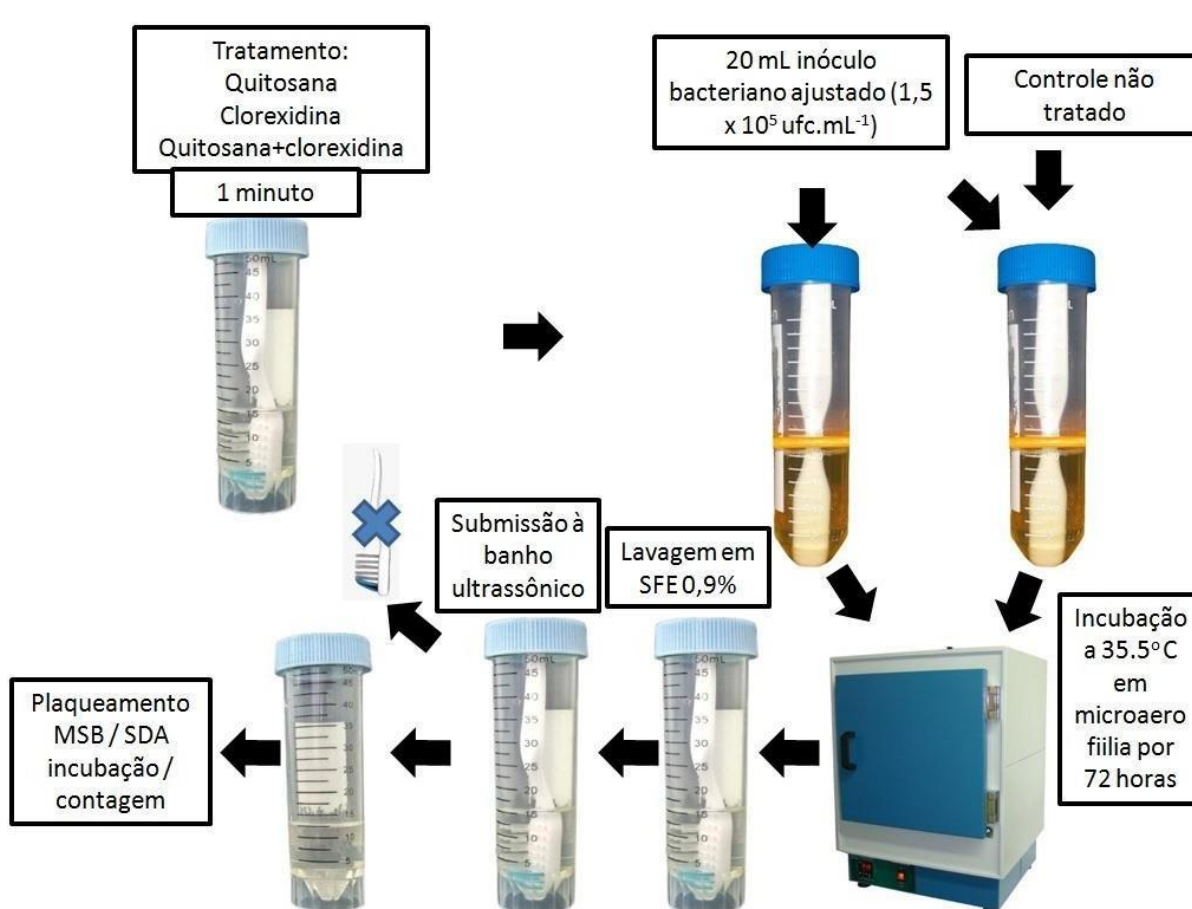
Alíquotas dos micro-organismos foram repicadas nos respectivos meios de cultura e após a incubação a 35,5° C em microaerofilia durante 72 horas, três a cinco colônias típicas foram dissolvidas em SFE 0,9% e os inóculos ajustados com a escala 0,5 de McFarland. Em seguida, 200 µL da suspensão foram transferidos para tubos Falcons com 19.800 µL de caldo Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Himedia, Mumbai, Índia) ajustando-se o inóculo inicial para o ensaio de formação de biofilme a $1,5 \times 10^5$ ufc.mL⁻¹.

Posteriormente, escovas não tratadas e pré-tratadas com as soluções-teste foram assepticamente inseridas nos tubos Falcon com os inóculos microbianos e foram incubadas a 35,5° C durante 72 horas. Após a incubação, cada escova foi cuidadosamente transferida para outro tubo Falcon e enxaguada uma vez com SFE 0,9%.

Em seguida, as escovas foram transferidas para outros tubos Falcon com SFE 0,9% e submetidas à sonicação em banho ultrassônico por 5 minutos a 40 kHz (Ultronique Q 5.9/40A, Indaiatuba, São Paulo) em temperatura ambiente para despreendimento das células associadas aos biofilmes nas escovas (CHAVES et al., 2007). Logo, as escovas foram descartadas e os sobrenadantes diluídos e plaqueados para a contagem dos micro-organismos viáveis. Todos os micro-organismos foram avaliados em três repetições independentes e os resultados das contagens foram transformados em Log₁₀ e as médias e os desvio-padrão, calculados (*Microsoft Excel 2010*).

O esquema a seguir apresenta as etapas da execução da formação de biofilme.

Figura 1. Ensaio da formação de biofilme em escovas dentais



Fonte: os autores, 2022.

A significância das diferenças entre os resultados observados nas escovas não tratadas e nas tratadas foi analisada com o teste t de Student pareado convencional bicaudal com $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95% (*Quickpad*).

Resultados

A quitosana teve efetividade sobre 33,3% das amostras, quando utilizada sozinha. Apenas as amostras de Ca 2 e 7 não tiveram resultados de inibição pela clorexidina, perfazendo uma efetividade sobre 66,6% das amostras testadas. Em se tratando da combinação pelos compostos associados, a efetividade se deu sobre 50% das amostras, sendo duas EGM e uma Ca.

A tabela a seguir apresenta os dados obtidos nos ensaios de formação de biofilme na ausência e na presença dos compostos testados (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados de formação de biofilme na ausência e presença dos compostos antimicrobianos.

Isolados	CNT	Log ₁₀ ufc.mL ⁻¹ (MED±DP)					
		Quitosana 1 mg.mL ⁻¹	<i>p</i>	Clorexidina 0,60 mg.mL ⁻¹	<i>p</i>	Combinação	<i>p</i>
EGM4	8,62±0,20	5,59±0,46	0,0334	4,47±1,10	0,0247	3,29±0,31	0,0075
EGM5	7,73±0,66	5,40±0,53	0,0366	3,79±0,74	0,0001	4,12±0,47	0,0013
EGM8	8,44±0,36	7,45±0,84	-	6,71±0,15	0,0191	6,99±1,00	-
Ca2	5,79±0,08	6,35±0,82	-	5,01±0,81	-	4,49±0,44	0,0322
Ca7	5,72±0,59	7,06±1,39	-	5,05±0,71	-	5,87±1,22	-
Ca8	5,20±0,12	5,84±0,59	-	4,15±0,22	0,0052	5,73±1,56	-

MED - Média

DP - Desvio padrão

CNT - Controle não tratado

p - Nível de significância

EGM - Estreptococos do grupo *mutans*

Ca - *Candida* spp.

Fonte: os autores, 2022.

Discussão

O acúmulo de biofilme bucal constitui importante fator de virulência e disseminação de micro-organismos bucais sendo crucial na proteção e patogenia ao permitir sinergia e/ou antagonismo entre as cepas presentes (DIAZ & VALM, 2020).

Sendo assim, o controle de biofilme bucal é fundamental na manutenção e promoção da saúde bucal seja de maneira física (escovação/fio dental) ou química (uso de medicamentos/enxaguantes). Óleos essenciais, flúor, triclosan, cloreto de cetilperidínio, clorexidina são vastamente utilizados no controle microbiano bucal e produtos naturais como a quitosana estão se destacando devido à ação antimicrobiana relatada. A literatura informa que a quitosana têm características

antioxidante, imunológica, cicatrizante biocompatível, biodegradável, atóxica antitumoral, antibacteriana (WANG, XUE & MAO, 2020; ZARGAR, ASHGARI & DASHTI, 2015; ALI & AHMED, 2018).

Streptococcus mutans é o colonizador primário da superfície dentária e portanto é o inicial e principal causador da cárie dentária devido à síntese de sacarose, formação de biofilme e permissão de co-agregação com consequente formação de biofilme polimicrobiano que por sua vez, gera um ambiente ácido de desmineralização dentária. Sendo assim, a quitosana em suas diversas concentrações e apresentações tem sido usada como agente antimicrobiano contra este micro-organismo. Em estudo sobre quitosana gel sozinho e associado à zinco e zeólita, Afrasiabi, Bahador & Partoazar (2021) indicaram que houve redução da formação de biofilme pelo gel de quitosana de 3.15%, e que a associação dos três componentes reduziu a formação por estreptococos do grupo *Streptococcus mutans* em até 33%.

Cavalcante et al. (2020), em estudo sobre inibição de biofilme de *Streptococcus mutans* por nanopartículas de quitosana associada à fototerapia, elucidam que os resultados foram equiparados aos da clorexidina sem fototerapia. Nossos testes ajustaram o pH em 5,0 para melhor ação antimicrobiana e a escolha da concentração de 1 mg.mL⁻¹) utilizada é relatada como subinibitória 10 vezes menor que a empregada por Afrasiabi, Bahador, & Partoazar (2021). Nossos resultados evidenciaram que a quitosana teve efetividade sobre 33,3% das amostras (EGM4 e EGM5) mas não teve efeito de inibição de biofilme sobre EGM 8 nem sobre as amostras de Ca.

Em contraponto, também há relatos na literatura de uso da quitosana na redução de biofilme formado por *Candida*. Garcia et al. (2021) apresentaram resultados de até 80% de redução de biomassa de biofilme de *Candida* sp.

Gondim et al. (2018) testaram nanopartículas de quitosana na inibição da formação de biofilme na superfície de próteses e nas três concentrações testadas, houve redução entre 25 a 50%, comparável ao hipoclorito de sódio. Todavia, nossos resultados não indicaram ação significativa da quitosana na redução da formação de biofilme de *Candida* sp.

Testes também foram feitos empregando a clorexidina que é fartamente utilizada na prática clínica por agir na diminuição de patógenos e controle de placa

bacteriana (HEDGE & KAMATH, 2017). A clorexidina é o composto mais utilizado para controle microbiano na cavidade bucal e controle negativo em estudos devido à sua eficácia de amplo espectro (VADHANA et al., 2019). A concentração utilizada neste ensaio é sub-inibitória, uma vez que comercialmente, é adotada concentração mínima inibitória de 0,12% (1,20 mg.ml).

Dias et al. (2018) investigaram a ação da clorexidina sobre biofilme de *Streptococcus mutans* em bráquetes ortodônticos e concluíram que mesmo mesmo com em superfícies com composições diferentes, a clorexidina tem forte potencial de redução de biofilme. Nesse sentido, nossos resultados vão de encontro ao proposto pela literatura: clorexidina foi capaz de reduzir a formação de biofilme de estreptococos do grupo *mutans* nas três amostras testadas.

Em relação à *Candida*, Ramachandran et al. (2022) avaliaram a ação antimicrobiana de clorexidina, quitosana, e mais dois compostos antimicrobianos e descobriram que a clorexidina tem inibição máxima da formação de biofilme de *Candida* e a quitosana tem efeito inibitório ligeiramente menor. Nossos resultados indicam que a ação da clorexidina foi capaz de reduzir a formação de biofilme em uma das 3 amostras de *Candida* e em todas as amostras de EGM testadas.

Por fim, testou-se também a associação da quitosana e clorexidina contra estreptococos do grupo *mutans*. Vilasan et al. (2020) concluíram em seu estudo que o colutório de quitosana e clorexidina associadas têm melhor ação antimicrobiana quando comparado ao uso dos enxaguantes separados. Mhasake et al (2018) testaram a efetividade de quitosana e clorexidina separadas e associadas no controle de biofilme de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* e indicaram que ambos compostos são efetivos no controle do biofilme bucal separados e que a associação potencializa o controle do biofilme desses micro-organismos. Nossos achados indicam que a associação dos compostos teve 50% de eficácia contra os seis micro-organismos testados, sendo que houve efetividade em duas amostras de EGM e uma amostra de *Candida*.

Conclusões

A efetividade da quitosana em relação à clorexidina foi menor conforme relatado nos manuscritos consultados, de modo que a clorexidina sozinha teve a

maior efetividade na redução do biofilme. Todavia, a associação da quitosana e clorexidina no pré-tratamento das escovas não foi mais efetivo que o pré-tratamento apenas com clorexidina. O pré-tratamento com ambos os compostos foi mais efetivo que o pré-tratamento com a quitosana.

Agradecimentos

Aos colegas de laboratório Kamila Cecílio, Osvaldo Gomes e Pabline Gasparotti pelas contribuições nas diversas etapas do trabalho. Aos voluntários que participaram da etapa de coleta das amostras. À Professora Doutora Roberta Signini pela doação da quitosana.

À Amanda Correia pela ajuda acerca da manipulação da quitosana.

Referências

1. AFRASIABI, S.; BAHADOR, A.; PARTOAZAR, A. Combinatorial therapy of chitosan hydrogel-based zinc oxide nanocomposite attenuates the virulence of *Streptococcus mutans*. **BMC Microbiology**, [s.l.], v. 21, n. 62, p. 1-8, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02128-y>
2. ALI, A.; AHMED, S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 109, p. 273-186, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078>
3. CAMPO, M. J. A. Características do Microbioma Bucal Humano. **Journal of Dentistry & Public Health**, [s.l.]: v. 163, n. 9, p. 145-155, 2018. <https://doi.org/10.17267/2596-3368dentistry.v9i2.2001> 2018
4. CAVALCANTE, L. L. R.; TEDESCO, A. C.; TAKAHASHI, L. A. U.; CURYLOFO-ZOTTI, F. A.; SOUZA-GABRIEL, A. S.; MILORI, S. A. Conjugate of chitosan nanoparticles with chloroaluminium phthalocyanine: Synthesis, characterization and photoinactivation of *Streptococcus mutans* biofilm. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [s.l.], v. 30, p. 1-9, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101709> 2020

5. CHAVES, A. R. C.; RIBEIRO, D. M. L.; ZAIA, J. E.; ALVES, E. G.; SOUZA, M. G. M.; MARTINS, C. H. G.; MESTRINER, S. F. Avaliação de soluções antibacterianas na descontaminação de escovas dentais de pré-escolares. **Revista de Odontologia da UNESP**, [s.l.], v. 36, n.1, p. 29-33, 2007.
6. CUGINI, C.; SHANMUGAM, M.; LANDGE, N.; RAMASUBBU, N. The Role of Exopolysaccharides in Oral Biofilms. **Journal of Dental Research**, [s.l.], v. 98, n. 7, p. 739-745, 2019. <https://doi.org/10.1177/0022034519845001>
7. DIAS, A. P.; PASCHOAL, M. A. B.; DINIZ, R. S.; LAGE, L. M.; GONÇALVES, L. M. Antimicrobial action of chlorhexidine digluconate in self-ligating and conventional metal brackets infected with *Streptococcus mutans* biofilm. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, [s.l.], v. 10, p. 69-74, 2018. <https://doi.org/10.2147/CCIDE.S148700>
8. DÍAZ, P. I. & Valm, A. M. Microbial Interactions in Oral Communities Mediate Emergent Biofilm Properties. **Journal of Dental Research**, [s.l.], v. 99, n. 1, p. 18-25, 2020. <https://doi.org/10.1177/0022034519880157>
9. DU, Q.; REN, B.; HE, J.; PENG, X.; GUO, Q.; ZHENG, L.; LI, J.; DAI, H.; CHEN, X. V.; ZHANG, L.; ZHOU, X.; XU, X. *Candida albicans* promotes tooth decay by inducing oral microbial dysbiosis. **The ISME Journal**, [s.l.], v. 15, p. 894-908, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00823-8>
10. EBRAHIMI, A.; SCHWARTZMAN, J.; CORDERO, O. Multicellular behaviour enables cooperation in microbial cell aggregate. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, [s.l.], v. 25, n. 374, p. 1-7, 2019. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0077>
11. GARCIA, L. G. S.; ROCHA, M. G.; LIMA, L. R.; CUNHA, A. P.; OLIVEIRA, J. S.; ANDRADE, A. R. C.; RICARDO, N. M. P. S.; PEREIRA-NETO, A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; VIEIRA, R. S., BRILHANTE, R. S. N. Essential oils encapsulated in chitosan microparticles against *Candida albicans* biofilms. **Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 166, p. 621-632, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.220>

12. GONDIM, B. L. C.; CASTELLANO, L. R. C.; CASTRO, R. D.; MACHADO, G.; CARLO, H. G.; VALENÇA A. M. G.; CARVALHO, F. G. Effect of chitosan nanoparticles on the inhibition of *Candida* sp. biofilm on denture base surface. **Archives of Oral Biology**, [s.l.], v. 94, p. 99-107, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.07.004>
13. HEGDE, R. J.; & KAMATH, S. Comparison of the *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* colony count changes in saliva following chlorhexidine (0.12%) mouth rinse, combination mouth rinse, and green tea extract (0.5%) mouth rinse in children (2017). **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, [s.l.], v. 35, n. 2, p. 150-155, 2017. https://doi.org/10.4103/JISPPD.JISPPD_13_17
14. KKRAGH, N. K.; HUTCHISON, J. B.; MELAUGH, G.; RODESNEY, C.; ROBERTS, A. E. L.; IRIE, Y.; JENSEN, P. Ø.; DIGGLE, S. P.; ALLEN, R.J.; GORDON, V.; BJARNSHOLT, T. Role of Multicellular Aggregates in Biofilm Formation. **mBio**, [s.l.], v. 22, n. 7, p. 1-11, 2016. <https://doi.org/10.1128/mBio.00237-16>
15. MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, M.; REDA, B.; & HANNIG, M. Chlorhexidine rinsing inhibits biofilm formation and causes biofilm disruption on dental enamel *in situ*. **Clinical Oral Investigations**, [s.l.], v. 24, p. 3843-3853, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03250-3>
16. MHAKE, S. P.; AMBITI, R.; JAGGA, U.; PAUL, U.; SHANMUKAPPA, S. M.; ISKA, D. Clinicomicrobiological Evaluation of 2% Chitosan Mouthwashes on Dental Plaque. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 94-97, 2018. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-2218>
17. RAMACHANDRAN, V. S.; RATHAKRISHNAN, M.; RAVINDRRAN, M. B.; ALAGARSAMY, V. Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Mangosteen, Triphala, Chitosan, and 2% Chlorhexidine on Mono- and Dual-Species Biofilms of – and *Candida albicans*: An *in Vitro* Study. **European Endodontic Journal**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 58-66, 2022. <https://doi.org/10.14744/eej.2021.70783>

18. RATH, S.; BAL, S. C. B.; DUBEY, D. Oral Biofilm: Development Mechanism, Multidrug Resistance, and Their Effective Management with Novel Techniques. **Rambam Maimonides Medical Journal**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 1-8, 2021. <https://doi.org/10.5041/RMMJ.10428>
19. SARAIVA, M. E.; SILVA, L. A. B.; SILVA, R. A. B.; CUDMANI, S. M.; TINEO, S.; HILLEN, N. E.; LUCIANO, M. P.; QUEIROZ, A. M.; EMILSON, C-G.; NELSON-FILHO, P. Morphological identification of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in SB-20M culture medium has efficiency comparable to proteomic identification by the MALDI-TOF mass spectrometry technique. **Archives of Oral Biology**, [s.l.], v. 110, p. 1-4, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104595>
20. SERRA, E.; HIDALGO-BASTIDA, L. A.; VERRAN, J.; WILLIAMS, D.; MALIC, S. Antifungal Activity of Commercial Essential Oils and Biocides against *Candida albicans*. **Pathogens**, [s.l.], v. 7, n. 15, p. 1-12., 2018. <https://doi.org/10.3390/pathogens7010015>
21. SRIDHAR, S.; SUPRABHA, B. S.; SHENOY, R.; SUMAND, E.; RAO, A. Association of *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* and Oral Health Practices with Activity Status os Caries Lesions Among 5-Year-Old Children with Early Childhood Caries. **Oral Health and Preventive Dentistry**, [s.l.], v. 18, p. 911-919, 2020. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a45411>
22. TALAPKO, J.; JUZBAŠIĆ, M.; MATIJEVIC, T.; PUSTIJANAC, E.; BEKIĆ, S.; KOTRIS, I.; ŠKRLEC, I. *Candida albicans* - The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. **Journal of Fungi**, [s.l.], v. 7, n. 2, 1-19, 2021. <https://doi.org/10.3390/jof7020079>
23. VADHANA, V. C.; SHARATH, A.; GEETHAPRIYA, P. R.; VIJAYASANKARI, V. Effect of sesame oil, ozonated sesame oil, and chlorhexidine mouthwash on oral health status of adolescents: A randomized controlled pilot trial. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, [s.l.], v. 37, n. 4, p. 365-371 2019. https://doi.org/10.4103/JISPPD.JISPPD_244_19

24. VILASAN, A.; PRABHUJI, M. L.; VARADHAN, K. B.; GEORGE, J. P. Comparative Evaluation of Chitosan Chlorhexidine Mouthwash in Plaque Control: A Preliminary Randomized Controlled Clinical Trial. **Journal of the International Academy of Periodontology**, [s.l.], v. 22, n. 4, p. 166-173, 2020
25. WANG, W.; XUE, C.; MAO, X. Chitosan: Structural modification, biological activity and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 164, p. 4532-4546, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.042>
26. XING, K.; ZHU, X.; PENG, X.; QIN, S. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, [s.l.], v. 35, p. 569-588, 2014.
<https://doi.org/10.1007/s13593-014-0252-3> 2014

5 Anexos

A - Parecer do comitê de ética em pesquisa

UEG - UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE GOIÁS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da ação antimicrobiana da quitosana contra Streptococcus mutans isolados de discentes da Universidade Estadual de Goiás

Pesquisador: REUBER MENDES ROCHA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 18846619.9.0000.8113

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Goiás

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.604.978

Apresentação do Projeto:

Título da Pesquisa: Avaliação da ação antimicrobiana da quitosana contra Streptococcus mutans isolados de discentes da Universidade Estadual de Goiás

Pesquisador Responsável: REUBER MENDES ROCHA

CAAE: 18846619.9.0000.8113

Resumo:

Introdução - A cavidade bucal é colonizada por micro-organismos como bactérias, fungos, vírus, podendo estar em harmonia e não desencadeando nenhuma doença. Mais de 700 espécies bacterianas foram identificadas compondo a microbiota da boca humana, mas o Streptococcus mutans possui um papel central no estabelecimento da doença cárie. A quitosana é obtida através da desacetilação da quitina, estando presente principalmente no exoesqueleto de animais marinhos. Estudos recentes indicam várias ações da quitosana tais como antifúngica e antibacteriana e tem se mostrado um composto promissor e de ampla empregabilidade. **Objetivo** - Avaliar o efeito da quitosana sobre Streptococcus mutans isolados de discentes da Universidade Estadual de Goiás. **Metodologia** - Serão alvo desse estudo discentes matriculados nos cursos de graduação e pós- graduação do CCET/UEG. Para definição do número de representativo amostral, será confirmado quantos alunos estão regulamente matriculados e será abordado nível de confiança de 95%. Os dados serão fornecidos pela Secretaria Geral da Universidade. Serão recolhidas amostras salivares e de biofilme em escovas dentais de cerdas médias através da

Endereço: BR 153 Quadra Área, Km 99 ç Bloco III ç Térreo
Bairro: FAZENDA BARREIRO DO MEIO **CEP:** 75.132-903
UF: GO **Município:** ANAPOLIS
Telefone: (62)3328-1434

E-mail: cep@ueg.br

Continuação do Parecer: 3.604.978

higienização feita pelo participante espontaneamente e a partir disso, haverá isolamento de *Streptococcus mutans*. Esse procedimento será filmado. Haverá um mini-curso com os participantes sobre como melhorar sua higiene bucal e sua importância. Resultados esperados – que a quitosana tenha ação bactericida e /ou bacteriostática sobre *Streptococcus mutans*, melhorar a higienização bucal dos participantes da pesquisa de acordo com a técnica Bass modificada.”

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o efeito da quitosana sobre *Streptococcus mutans* isolados de discentes da Universidade Estadual de Goiás.

Objetivos Secundários:

- Coletar amostras salivares de universitários da Universidade Estadual de Goiás utilizando escovas dentais descartáveis livres de contaminação, e promover isolamento de *Streptococcus mutans*;
- Executar uma atividade dinâmica do tipo mini curso para elucidar os principais pontos a serem melhorados na higienização utilizando como base referência bibliográfica de Periodontia Clínica, para elucidar a Técnica de Bass modificada.
- Avaliar se há ação bactericida/bacteriostática in vitro da quitosana nas bactérias isoladas neste estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

“A saliva será coletada escova nova específica para a pesquisa, porém o ato de esfregar as cerdas com os dentes pode implicar em sangramento gengival e devido à força ou movimento inadequado, sendo tais riscos inerentes à escovação feita no âmbito doméstico; no momento da coleta, você receberá instruções para uma técnica específica, de forma oral, visando uma coleta padronizada para todos os participantes. Em segundo lugar, a higiene bucal é particular e sua execução na pesquisa poderia gerar desconforto, porém esta será executada individualmente, em banheiro apropriado com a porta fechada, previamente higienizado. Sinta-se à vontade para executar a escovação que for pedida pelo pesquisador, sem preocupação com o tempo. Assim que você terminar, é só chamar o pesquisador para recolher a escova.”

Benefícios:

Endereço: BR 153 Quadra Área, Km 99 ç Bloco III ç Térreo
Bairro: FAZENDA BARREIRO DO MEIO CEP: 75.132-903
UF: GO Município: ANAPOLIS
Telefone: (62)3328-1434 E-mail: cep@ueg.br

Continuação do Parecer: 3.604.978

"A quitosana tem excelentes resultados quando utilizada contra *Streptococcus mutans* e por isso abre-se aqui o panorama do primeiro benefício: possibilidade de emprego do composto (obviamente se obtidos resultados que permitam), na indústria de higiene bucal que podendo adicionar a quitosana nos seus produtos dando a eles efeito antimicrobiano que poderia resultar em redução da cárie dentária. Em segundo lugar, com a execução de mini-curso sobre escovação dental, você terá informações sobre qual melhor técnica para cada caso melhorando sua saúde gengival e dentária. Ainda é provável os conhecimentos repassados a você sejam disseminados no convívio denotando saúde pública. O terceiro aspecto é dado pela produção de conhecimento científico para a comunidade acadêmica, afinal o objetivo dessa pesquisa é melhoria da saúde como um todo. Você poderá solicitar acesso a dados da sua amostra, como por exemplo sua contagem bacteriana total, pois todo paciente é portador da bactéria *S. mutans*. Quando você escova os dentes, não elimina a bactéria da saliva, mas sim reduz substancial o biofilme (placa dentária), pois apenas por "limpeza" profissional é possível reduzir substancialmente o biofilme bucal. Um dos critérios de vulnerabilidade para a cárie dentária é justamente a quantidade de bactérias presentes e você poderá solicitar individualmente orientações sobre como reduzir os níveis de colônias bacterianas tomando por base as contagens de suas amostras. Não será uma consulta sobre a microbiologia bucal, mas sim orientações generalizadas sobre medidas de melhora e adequação da escovação para cada caso de cada paciente, onde você poderá solicitar esclarecimentos sobre sua escovação, usando o material didático empregado e a forma que você relatar executar sua higienização."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente protocolo de pesquisa trata-se de um projeto de mestrado do discente Reuber Mendes Rocha para o programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás orientado pelo Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Neves.

Pretende-se avaliar o efeito da quitosana sobre *Streptococcus mutans* isolados de discentes de graduação e pós-graduação do CCET/UEG através da coleta de amostras salivares e de biofilme em escovas dentais de cerdas médias através da higienização feita pelo participante espontaneamente. Dessas amostras, serão isoladas as secas de *Streptococcus mutans*. Os participante também responderão a um questionário contendo perguntas que versam sobre sua saúde bucal. Os pesquisadores realizarão um mini curso aberto ao público, e em especial aos voluntários da pesquisa sobre como melhorar a técnica de higienização e maximar o resultado da limpeza bucal. Os resultados do biofilme doado pelos participantes estão disponíveis para acesso

Endereço: BR 153 Quadra Área, Km 99 ; Bloco III ; Térreo
 Bairro: FAZENDA BARREIRO DO MEIO CEP: 75.132-903
 UF: GO Município: ANAPOLIS
 Telefone: (62)3328-1434 E-mail: cep@ueg.br

Continuação do Parecer: 3.604.978

destes a qualquer momento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados neste protocolo os seguintes documentos obrigatórios:

- Folha de rosto apresenta.
- Termo de compromisso datado e assinado pelos pesquisadores.
- Instrumentos de coleta de dados apresentado.
- Cronograma dispoendo de 60 dias para apreciação do CEP-UEG.
- Termo de Anuência substituído pela Folha de Rosto.
- TCLE apresentado e de acordo com os critérios éticos vigentes

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A análise dos documentos apresentados não apresentou divergências éticas de acordo com as normas vigentes. O Protocolo de Pesquisa está Aprovado por este CEP.

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UEG considera o presente protocolo APROVADO e que o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado e lembramos que o pesquisador responsável deverá encaminhar os Relatórios Parciais (semestralmente) e o Relatório Final de acordo com o disposto nas Resoluções do Conselho Nacional de Saúde. Os modelos encontram-se disponíveis na página do CEP-UEG. O prazo para a entrega do Relatório Final, via notificação na Plataforma Brasil, é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, previsto para março de 2021.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1389008.pdf	27/08/2019 19:42:12		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE.docx	27/08/2019 19:39:01	REUBER MENDES ROCHA	Aceito

Endereço: BR 153 Quadra Área, Km 99 ç Bloco III ç Térreo
 Bairro: FAZENDA BARREIRO DO MEIO CEP: 75.132-903
 UF: GO Município: ANAPOLIS
 Telefone: (62)3328-1434 E-mail: cep@ueg.br

Continuação do Parecer: 3.604.978

Ausência	TCLE.docx	27/08/2019 19:39:01	REUBER MENDES ROCHA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO27DEAGOSTODE2019.docx	27/08/2019 19:38:35	REUBER MENDES ROCHA	Aceito
Folha de Rosto	FOLHAROSTO27082019.pdf	27/08/2019 19:37:43	REUBER MENDES ROCHA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodecompromissoassinadoedigitaliza do.pdf	07/08/2019 09:43:54	REUBER MENDES ROCHA	Aceito
Outros	TERMODECOMPROMISSOMODELOU EG.docx	30/08/2019 21:50:10	REUBER MENDES ROCHA	Aceito
Outros	questionarioDEautopercepcaosaudebuc al.docx	30/08/2019 21:48:05	REUBER MENDES ROCHA	Aceito
Outros	questionariosocioeconomico.docx	30/08/2019 21:47:08	REUBER MENDES ROCHA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ANAPOLIS, 27 de Setembro de 2019

Assinado por:
Luciana de Souza Ondei
(Coordenador(a))

Endereço: BR 153 Quadra Área, Km 99 ç Bloco III ç Térreo
 Balro: FAZENDA BARREIRO DO MEIO CEP: 75.132-903
 UF: GO Município: ANAPOLIS
 Telefone: (62)3328-1434 E-mail: cep@ueg.br

B - Questionário sobre escovação

Paciente	NOME	IDADE	TEMPO DE ESCOVAÇÃO	HORA DA ÚLTIMA ESCOVAÇÃO	HORA DA COLETA	CONSUMIU ALIMENTO APÓS A ESCOVAÇÃO?
X	X	X	X	X	X	X
2	D2	21	03:34	10:00	13:14	NÃO
3	D3	21	01:45	08:00	11:00	NÃO
4	D4	30	01:45	07:40	11:00	NÃO
5	D5	20	01:41	07:20	10:30	NÃO
6	D6	22	01:42	12:32	15:30	NÃO
7	D7	20	03:52	12:10	15:40	NÃO
8	D8	21	03:52	07:15	10:10	NÃO
9	D9	22	01:07	07:20	10:40	NÃO
10	D10	29	01:33	07:00	09:20	NÃO
11	D 11	26	01:06	07:00	10:00	NÃO
12	D12	21	01:43	08:10	10:12	NÃO
X	X	X	X	X	X	X
14	D14	23	02:20	07:40	10:20	NÃO

C - TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa intitulada “**Associação da quitosana e clorexidina contra formação de biofilmes por estreptococos do grupo *mutans* e *Candida albicans* em escovas dentais**”. Meu nome é Reuber Mendes Rocha, sou o pesquisador responsável e minha área de atuação é Odontologia. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, se você aceitar fazer parte do estudo, rubricue todas as páginas e assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias, sendo que uma delas é sua e a outra pertence ao pesquisador responsável. Esclareço que em caso de recusa na participação você **não será penalizado(a) de forma alguma**. Mas se aceitar participar, as dúvidas *sobre a pesquisa* poderão ser esclarecidas pelo pesquisador responsável, **via e-mail reuber.mr@gmail.com e, inclusive, sob forma de ligação a cobrar, acrescentando o número 9090 antes do seguinte contato telefônico: (62)9 9441-0107**. Ao persistirem as dúvidas *sobre os seus direitos* como participante desta pesquisa, você também poderá fazer contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa** da Universidade Estadual de Goiás (CEP-UEG), localizado no Prédio da Administração Central, BR 153, Km 99, Anápolis/GO, CEP: 75132-903, telefones: (62) 3328-1439 e (62) 98325-0342, funcionamento: 8h às 12h e 13h às 17h, de segunda a sexta-feira.

1. Informações Importantes sobre a Pesquisa:

Título: "**Associação da quitosana e clorexidina contra formação de biofilmes por estreptococos do grupo *mutans* e *Candida albicans* em escovas dentais**"

Justificativa: Tendo em vista a microbiota oral polimicrobiana, métodos e meios de controle de biofilme mecânicos e químicos são sempre aperfeiçoados. Sendo a clorexidina o padrão ouro de controle de biofilme oral, comparar a quitosana à ela torna-se um ótimo meio de avaliação de eficácia, uma vez que entre as várias características, a quitosana tem antimicrobiana. Neste mérito, este escrito avalia o comportamento da quitosana 1 mg.mL⁻¹ contra cepas selvagens de *EGM* e

Candida sp. e ATCC 10231 de *C. albicans*. Os resultados de quitosana serão comparados aos obtidos com clorexidina sub-inibitória 0,60 mg.mL⁻¹

Objetivos:

Objetivo Geral

Avaliar a formação de biofilme microbiano por EGM e *C. albicans* em escovas dentais pré-tratadas com solução de clorexidina 0,60 mg.mL⁻¹ e quitosana 1 mg.mL⁻¹

Objetivos específicos

Isolar e identificar presuntivamente EGM e *C. albicans* de estudantes voluntários na Universidade Estadual de Goiás.

Determinar o índice de formação de biofilme dos isolados em escovas dentais.

Determinar o índice de formação de biofilme por EGM e *C. albicans* em escovas dentais pré-tratadas com solução de clorexidina 0,06 mg.mL⁻¹ e quitosana a 1 mg.mL⁻¹ e em combinação.

Procedimentos utilizados da pesquisa

será fornecida uma escova de dentes nova para que você faça sua escovação normal, sem creme dental em banheiro fechado e você ficará **sozinho** durante a escovação; b) sua saliva retida na escova será encaminhada para análise laboratorial e cultivo da bactéria *S. mutans*.; c) haverá preenchimento de questionário sobre como você realiza sua higienização em casa e sobre sua condição socioeconômica; d) **você não terá nenhum tipo de gasto, exposição ou retaliação (em qualquer aspecto de como você escova os dentes, conservação da saúde bucal, etc) se participar e poderá se retirar do estudo à qualquer momento**; e) não haverá pagamento, gratificação ou seguro para participação.

() Permito a divulgação da minha imagem/voz/opinião nos resultados publicados da pesquisa;

() Não permito a publicação da minha imagem/voz/opinião nos resultados publicados da pesquisa.

Você poderá entrar em contato com o pesquisador a qualquer instante e por qualquer meio de comunicação citado acima para esclarecer dúvidas sobre a pesquisa.

Você tem o direito de se recusar a responder questões que lhe causem *desconforto emocional* e/ou *constrangimento* em entrevistas e questionários que forem aplicados na pesquisa e pode também se retirar da pesquisa a qualquer momento sem qualquer penalização

Os resultados da pesquisa serão tornados públicos, sejam eles favoráveis ou não, por motivo de publicações científicas ou apresentações em eventos científicos;

Se ocorrer algum dano físico ou material ao pesquisado, é reforçado compromisso de total assistência e se for o caso, cobrimento de eventuais despesas.

Os dados da pesquisa serão armazenados em meio físico, como impressões ou em meio digital através da gravação em computador. Serão mantidos por 5 anos sob cuidado do pesquisador, UEG e orientador e após esse prazo serão deletados ou picotados.

2. Riscos

De acordo com a resolução 466 de 2012, em seu inciso V, toda pesquisa envolvendo seres humanos apresenta riscos para o participante, seja na coleta de dados, fornecimento de informações pessoais ou coletadas de fontes secundárias ou obtenção de material audiovisual.

Estes são os riscos aos quais você estará submetido:

A saliva será coletada com escova nova específica para a pesquisa, porém o ato de esfregar as cerdas com os dentes pode implicar em sangramento gengival devido à força ou movimento inadequado, sendo tais riscos inerentes à escovação feita em âmbito doméstico; no momento da coleta, você receberá instruções para uma técnica específica, de forma oral, visando uma coleta padronizada para todos os participantes.

Em segundo lugar, a higiene bucal é particular, e sua execução na pesquisa poderia gerar desconforto, porém **esta será executada individualmente, em banheiro apropriado com a porta fechada, previamente higienizado. Sinta-se à vontade para executar a escovação que for pedida pelo pesquisador, sem preocupação**

com o tempo. Assim que terminar, é só chamar o pesquisador para recolher a escova.

3. Benefícios

A quitosana tem excelentes resultados quando utilizada contra *S. mutans* e por isso abre-se aqui o panorama do primeiro benefício: possibilidade de emprego do composto (obviamente se obtidos resultados que permitam), na indústria de higiene bucal que podendo adicionar a quitosana nos seus produtos dando a eles efeito antimicrobiano que poderia resultar em redução da cárie dentária. Ainda é provável que os conhecimentos repassados a você sejam disseminados no convívio denotando saúde pública. O terceiro aspecto é dado pela produção de conhecimento científico para a comunidade acadêmica, afinal o objetivo dessa pesquisa é melhoria da saúde como um todo.

Você poderá solicitar acesso a dados da sua amostra, como por exemplo sua contagem bacteriana total, **pois o paciente é portador da bactéria *S. mutans*.** Quando você escova os dentes, não elimina a bactéria da saliva, mas sim reduz o biofilme (placa dentária), pois apenas por “limpeza” profissional é possível reduzir substancialmente o biofilme bucal. Um dos critérios de vulnerabilidade para a cárie dentária é justamente a quantidade de bactérias presentes e você **podará solicitar individualmente orientações sobre como reduzir os níveis de colônias bacterianas tomando por base as contagens de suas amostras. Não será uma consulta sobre a microbiologia bucal, mas sim orientações generalizadas sobre medidas de melhora e adequação da escovação para cada caso de cada paciente, onde você** poderá solicitar esclarecimentos sobre sua escovação, usando o material didático empregado e a forma que você relata executar sua higienização.

4. Declaração do pesquisador responsável:

Eu, Reuber Mendes Rocha, pesquisador responsável por este estudo, esclareço que cumprirei as informações acima e que o participante terá acesso, se necessário, a assistência integral e gratuita por danos diretos e indiretos, imediatos ou tardios devido a sua participação nesse estudo; e que suas informações serão tratadas com

confidencialidade e sigilo. O participante poderá sair do estudo quando quiser, sem qualquer penalização. Se tiver algum custo por participar da pesquisa, será ressarcido; e em caso de dano decorrente do estudo, terá direito a indenização, conforme decisões judiciais que possam suceder.

5. Consentimento do Participante de Pesquisa/Responsável legal:

Eu,, abaixo assinado, discuti com o pesquisador Reuber Mendes Rocha sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de assistência, confidencialidade e esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é voluntária e isenta de despesas e que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício.

Anápolis, de de

Assinatura do(a) participante de pesquisa/Responsável legal

Data: _____/_____/_____

Assinatura do(a) pesquisador(a) responsável

Data: _____/_____/_____

A) Outros anexos específicos de cada pesquisa

Meios de cultura, soluções e reagentes

Os meios do tipo “ágar” foram preparados para adicionar entre 10 e 20 mL em cada placa de Petri 50x10mm. As placas foram submetidas à teste de esterilidade estando seladas hermeticamente.

Ágar *mitis salivarius* bacitracina sacarose (AMSBS)

Descrito como meio seletivo para EGM (Biolog).

Composição	(g/L)
Triptona	10
BioPeptona	10
D(+)-Glicose anidra ACS	1
D-Sacarose ACS	50
Fosfato Dipotássico anidro	4
Azul Tripán certificado	0,075
Violeta Cristal certificado	0,0008
Ágar Bacteriológico	15

Para preparo de 400 mL do meio, 36 gramas são pesados em balança analítica e colocados em tubos com tampa. Então, os 400 mL de água destilada são adicionados, junto com 80 gramas de sacarose, referentes à 20% do conteúdo seguido de homogeneização e autoclavagem a 125° C por 15 minutos em pressão de trabalho 1,5 kgf/cm². Enquanto isso, a solução de AMSBS esfria naturalmente até 50 °C para adicionar a bacitracina e telurito de potássio. Então, adiciona-se 1% (400µL) de solução de bacitracina na concentração de 0,2UI e 400 µL de telurito de potássio. As placas foram armazenadas em geladeira e foram utilizadas em até 7 dias, por isso foram feitos 400 mL de cada vez, afim de evitar desperdício.

Solução de bacitracina

Pesa-se 13,20 mg do sal de bacitracina (Dr. Ehrenstorfer GmbH) em balança analítica e, em assepticamente adiciona-se 40mL de água destilada. Esta solução foi utilizada proporcionalmente à quantidade de meio preparado (CAMPOS, 2006).

Solução de telurito de potássio

Vinte mL solução de telurito de potássio 1% (pronta para uso) foi retirada do recipiente original e filtrados com auxílio de filtro de papel do tipo “*Millipore*” de 0,22 µm na ponta da seringa e guardado em tubo *Falcon* esterilizado com proteção da luz.

Ágar *Sabouraud* dextrose cloranfenicol

Descrito como meio seletivo para *Candida* (Kasvi).

Composição (g/L)

Digestão Enzimática de Caseína.....	5,0
Digestão Enzimática de Tecido Animal	5,0
Glicose	40,0
Cloranfenicol	0,5
Ágar.....	15,0

Caldo BHI

Meio de cultura rico e não seletivo, aqui utilizado para congelamento de cepas e crescimento não seletivo das amostras das escovas (Himedia).

Quando acrescido de 20% de glicerina em relação ao preparado total, é usado na congelamento e manutenção das cepas isoladas.

Composição (g/L)

Pó de infusão de HM.....	12,5
BHI em pó	5,0
Peptona protéica	10,0
Dextrose (glicose)	2,00
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato dissódico	2,5
Ágar.....	15,0

Glicerina (glicerol)

Adicionada ao caldo BHI para conservação e viabilidade dos micro-organismos congelados. Teor de pureza $\geq 99,7\%$

Adicionada na proporção de 20% em relação à quantidade de caldo BHI preparado.

Ágar nutriente

Meio nutritivo não seletivo utilizado nos testes de esterilidade.

Composição (g/L)

Extrato de Carne	1,0
Extrato de Levedura	2,0
Peptona	5,0
Cloreto de sódio	5,0
Ágar	15,0

Solução fisiológica estéril 0,9%

Usada na para manter a inércia das cepas coletadas, lavagem, diluição dos inóculos.

Composição (g/L).

Água destilada.....	1000 mL
Cloreto de sódio	9