



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

MARIA JOSÉ BARBARESCO

**IMPACTO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA
FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *Candida sp.* E
Streptococcus mutans ISOLADOS DA CAVIDADE BUCAL**

**Anápolis
2024**

MARIA JOSÉ BARBARESCO

**IMPACTO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA
FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *Candida sp.* E
Streptococcus mutans ISOLADOS DA CAVIDADE BUCAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Aplicadas a Produtos para Saúde da
Universidade Estadual de Goiás para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
Aplicadas a Produtos para Saúde.

Orientador: Plínio Lázaro Faleiro Naves
Co-orientadora: Luciana Rebelo Guilherme

**Anápolis
2024**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno(a): Maria José Barbaresco

Orientador(a): Plínio Lázaro Faleiro Naves

Co-Orientador(a): Luciana Rebelo Guilherme

Membros:

1. Plínio Lázaro Faleiro Naves

2. Fernando Cruvinel Damasceno

3. Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão

OU

4. Luciana Rebelo Guilherme

5. Alliny das Graças Amaral

Data: 04/10/2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS UEG (anexar no verso na folha II)

Dedico este trabalho ao meu querido irmão, Eduardo Barbaresco Filho, pelos conselhos, incentivo e apoio para continuar os meus estudos; à minha mãe, Divina Barbaresco, pelo suporte, dedicação e carinho dispensados, e à minha filha, Isabella Barbaresco Bomfim, motivo dos meus esforços.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Goiás pelo apoio através do programa de mestrado em Ciências aplicadas à produtos para a saúde (CAPS). À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À toda a minha família que esteve ao meu lado nesse período, me apoiando e acreditando em mim.

Ao meu orientador, professor Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves, que compartilhou comigo todo seu conhecimento com maestria, muita dedicação e paciência.

À minha co-orientadora, professora Dra. Luciana Rebelo Guilherme, por aceitar esse desafio e apoiar o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Francisco Nunes de Souza Neto, que me acolheu no Laboratório de Química de Materiais da UEG me instruindo com seus profundos conhecimentos.

Ao mestre Reuber Rocha Mendes, por me apoiar no laboratório, com seus conhecimentos odontológicos.

À todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Aplicadas para Produtos a Saúde, que se doam para contribuir com o crescimento e sucesso de cada aluno.

A cada colega de mestrado que conheci nessa caminhada e que colaborou direta ou indiretamente na realização deste trabalho, em especial à Amanda Correia, Aline Fernandes, Samarina de Jesus Rodrigues Barreto , João Salviano Simões Chagas da Silva e demais colegas.

À toda a equipe do Laboratório de Bioensaios, com quem dividi dias intensos de muito trabalho, dedicação e aprendizado. “Cada pessoa que passa em nossa vida é única. Sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós.” Foram muitos, os que me ajudaram a concluir este estudo. Meus sinceros agradecimentos.

À Deus, pela minha vida.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a chegada desse grande e esperado dia.

“(...) talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito (...) não somos o que deveríamos ser, mas somos o que iremos ser. Mas graças a Deus, não somos o que éramos.”

(Martin Luther King)

SUMÁRIO

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS.....	10
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	13
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
APRESENTAÇÃO.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 MÉTODOS.....	22
4 RESULTADOS.....	25
4.1 Artigo 1.....	26
4.1.1 INTRODUÇÃO.....	28
4.1.2 METODOLOGIA.....	29
4.1.2.1 Síntese de nanopartículas de prata.....	30
4.1.2.2 Caracterização das nanopartículas de prata.....	31
4.1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
4.1.5 REFERÊNCIAS.....	43
4.2 Artigo 2.....	46
4.2.1 INTRODUÇÃO.....	48
4.2.2 METODOLOGIA.....	51

4.2.2.1 Manutenção dos micro-organismos.....	51
4.2.2.2 Identificação fenotípica de <i>Candida sp.</i>	52
4.2.2.3 Identificação fenotípica de <i>Streptococcus mutans</i>	53
4.2.2.4 Ensaio de formação de biofilme microbiano.....	56
4.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
4.2.5 REFERÊNCIAS.....	75
4.3 Artigo 3.....	78
4.3.1 INTRODUÇÃO.....	80
4.3.2 METODOLOGIA.....	81
4.3.2.1 Síntese e caracterização das nanopartículas.....	82
4.3.2.2 Ensaio de formação de biofilme.....	83
4.3.2.3 Atividade antimicrobiana das nanopartículas.....	84
4.3.2.4 Atividade das nanopartículas contra a formação de biofilme.....	84
4.3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	85
4.3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98
4.3.5 REFERÊNCIAS.....	100
4.4 Artigo 4.....	104
4.4.1 INTRODUÇÃO.....	106
4.4.2 METODOLOGIA.....	107
4.4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	109
4.4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	115
4.4.6 REFERÊNCIAS.....	116
5 CONCLUSÃO.....	119

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	120
7 PRODUTOS GERADOS.....	121
8 REFERÊNCIAS.....	122
ANEXOS.....	124

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

4.1. Artigo 1

Figura 1: Síntese etanólica das nanopartículas de prata.....	30
Figura 2. Espectro de absorvância no UV-vis para AgNP(1) e AgNP(2).....	34
Figura 3. A) Potencial zeta (mV) B) Diâmetro hidrodinâmico.....	35
Figura 4. Esquema representativo de agregados de AgNP.....	37
Figura 5. A) Imagem de Micrografia Eletrônica de Transmissão (MET) de AgNP(1) B) Imagem de Micrografia Eletrônica de Transmissão (MET) de AgNP(2).....	38
Figura 6. Histograma de distribuição de tamanho de nanopartículas. A) AgNP(1) B) AgNP(2).....	39
Figura 7. Difração de elétrons da área selecionada SAED das nanopartículas de prata A) AgNP(1) e B) AgNP(2).....	40
Tabela 1. Concentração nanopartículas de prata AgNP(1) e AgNP(2).....	33
Tabela 2. Potencial zeta, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e índice de dispersão diâmetro hidrodinâmico (ID _H).....	35
Tabela 3. Análise de d-spacing e planos cristalográficos para AgNP(1).....	40
Tabela 4. Análise de d-spacing e planos cristalográficos para AgNP(2).....	41

4.2 Artigo 2

Figura 1. Identificação fenotípica de <i>Candida sp.</i>	53
Figura 2. Identificação fenotípica de <i>Streptococcus mutans</i>	55
Figura 3. Preparação e processamento da microplaca para o ensaio da determinação da biomassa total dos biofilmes de <i>Candida sp.</i> e <i>Streptococcus mutans</i>	58

Figura 4. Processamento para a quantificação das leveduras associadas ao biofilme maduro de 48h (1) e das leveduras planctônicas no inóculo inicial (2).....	59
Figura 5. Quantificação das leveduras viáveis associadas ao biofilme maduro de 48h.....	59
Figura 6. Quantificação de leveduras planctônicas viáveis no inóculo inicial.....	60
Figura 7. Quantificação dos <i>S. mutans</i> viáveis associados ao biofilme em escovas dentais.....	61
Figura 8. DO _{600nm} biomassa total de biofilme de <i>C.albicans</i> e <i>C. krusei</i>	69
Figura 9. Correlação entre biomassa total dos biofilmes e contagem de células associadas para <i>S. mutans</i>	72
Tabela 1. Classificação dos isolados testados quanto à capacidade de formação de biofilme.....	57
Tabela 2. Identificação fenotípica das leveduras do gênero <i>Candida</i>	63
Tabela 3. Identificação fenotípica de bactérias do gênero <i>Streptococcus</i>	64
Tabela 4. Testes de identificação fenotípica de <i>S. mutans</i>	68
Tabela 5. Formação de biofilme de <i>Candida sp.</i>	69
Tabela 6. Formação de biofilme de <i>Streptococcus mutans</i>	71

4.3 Artigo 3

Figura 1. Espectro de absorbância no UV-Vis para AgNP(1) e AgNP(2).....	86
Figura 2. A) Potencial zeta (mV) B) Diâmetro hidrodinâmico (nm)...	87
Figura 3. Fotomicrografia eletrônica de transmissão (MET) de A) AgNP(1) e B) AgNP(2).....	88
Figura 4. Histograma de distribuição de tamanho de nanopartículas A) AgNP(1) e B) AgNP(2).....	88
Figura 5. Difração de elétrons da área selecionada SAED das nanopartículas de prata. A) AgNP(1) e B) AgNP(2).....	89
Figura 6. DO _{620nm} dos biofilmes das leveduras detectadas pelo método do cristal violeta.....	90

Figura 7. Densidade óptica dos biofilmes das leveduras na presença de concentrações de AgNP(1).....	95
Figura 8. Densidade óptica dos biofilmes das leveduras na presença de concentrações de AgNP(2).....	95
Tabela 1. Caracterização das nanopartículas de prata.....	85
Tabela 2. Atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata contra as leveduras.....	92
Tabela 3. Concentração Mínima Inibitória da Formação de Biofilme (CMIB ₅₀) das nanopartículas de prata contra leveduras.....	96
4.4 Artigo 4	
Figura 1. Ensaio de formação de biofilme.....	108
Figura 2. Contagem de <i>Streptococcus mutans</i> viáveis aderidos nas escovas.....	109
Figura 3. Aspectos do <i>S. mutans</i> ATCC 700610.....	109
Figura 4. Aspecto macroscópico das escovas inoculadas com <i>S. mutans</i> nos ensaios de formação de biofilme.....	111
Figura 5. Determinação do biofilme bacteriano - Biomassa total e Contagens das bactérias viáveis associadas.....	113
Tabela 1. Formação de biofilme de <i>Streptococcus mutans</i>	110
Tabela 2. Contagem do número de <i>Streptococcus mutans</i> viáveis associados ao biofilme em escovas dentais.....	112

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AAS: espectroscopia de absorção atômica

Ag⁺: íons prata

Ag⁰: átomos de prata

AgNO₃: Nitrato de prata

AgNP: nanopartículas de prata

AgNP(1): nanopartícula de prata sintetizada sem hidróxido de amônio no meio reacional

AgNP(2): nanopartícula de prata sintetizada com hidróxido de amônio no meio reacional

AMS-BS: ágar *mitis salivarius* bacitracina sacarose

ASDC: ágar Sabouraud dextrose cloranfenicol

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHIS: Caldo infusão de cérebro e coração bovino adicionado de 2 % de sacarose

Ca: *Candida albicans*

CFC: cristalinos cúbicos de face centrada

Ck: *Candida krusei*

CMF: concentração mínima fungicida

CMI: concentração mínima inibitória

CMIB₅₀: Concentração mínima inibitória da formação de biofilme

CNI: controle não inoculado

DLS: espalhamento dinâmico de luz

DO: densidade óptica

DP: desvio padrão

DRX: difração de raios X de pó.

EPS: exopolissacarídeos

ID_H: índice de dispersão do diâmetro hidrodinâmico

ID_{MET}: índice de dispersão do diâmetro das nanopartículas obtidos por microscopia eletrônica de transmissão

MET: microscopia eletrônica de transmissão

mV: milivolts

mW: miliwatt

NH₄OH: Hidróxido de amônio

nm: nanômetro

O₂: oxigênio

pH: potencial hidrogeniônico

PVP: polivinilpirrolidona

ROS: espécies reativas de oxigênio

SAED: difração de área selecionada

SFE: solução fisiológica estéril

Sm: *Streptococcus mutans*

TA: temperatura ambiente

ufc: unidades formadoras de colônias

UV-vis: espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta e visível

A adição nanomateriais com atividade antimicrobiana às superfícies dentais ou rígidas pode reduzir a formação de biofilmes microbianos, combater doenças infecciosas neste sítio anatômico e promover a melhoria da saúde bucal. As nanopartículas de prata são agentes promissores no desenvolvimento de alternativas para o tratamento e controle de doenças infecciosas, portanto o presente trabalho, objetivou sintetizar e caracterizar nanopartículas de prata, avaliar a formação de biofilme de *Candida sp.* e *Streptococcus mutans* da cavidade bucal de estudantes da Universidade Estadual de Goiás, avaliar a atividade das nanopartículas de prata contra biofilme de *Candida sp.* e avaliar a atividade de nanopartículas de prata contra a formação de biofilmes de *Streptococcus mutans* em escovas dentais. Foram sintetizadas nanopartículas de prata utilizando a metodologia de Lee e Oh (2015) na ausência e presença de hidróxido de amônio, nesta ordem AgNP(1) e AgNP(2), com morfologias quase esféricas de 7,37 nm e 11,40 nm, respectivamente. Foram identificadas seis leveduras do gênero *Candida*, sendo 2 *Candida albicans* e 4 *Candida krusei*, e 8 *Streptococcus mutans*. Tanto os isolados de *Candida sp.* quanto os de *S. mutans* foram capazes de formar biofilme nos ensaios de biomassa total e na quantificação dos micro-organismos viáveis aderidos nos microtubos e nas escovas dentais. Todas as leveduras avaliadas foram inibidas pelas nanopartículas de prata. Tanto AgNP(1) como AgNP(2) inibiram as leveduras Ck7; Ck8; Ck11 e Ck12 com as menores concentrações de 15,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para AgNP(1) e de 15,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para AgNP(2). As leveduras mais resistentes às nanopartículas foram Ca2, Ca4 e CaATCC 10231, inibidas com as concentrações de 60,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AgNP(1) e de 61,71 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AgNP(2). Em relação à atividade fungicida, ambas nanopartículas necessitam de concentrações oito vezes (8x) maiores contra as *C. krusei* enquanto que para as *C. albicans* os valores das CMF foram idênticos aos da CMI para a maioria das leveduras e o dobro para a Ca4. As infecções causadas por bactérias formadoras de biofilme são difíceis de tratar, por isto a importância da busca de inibidores de biofilme.

Palavras-chave: nanopartículas; biofilme; microbiota oral; antibiofilme.

The addition of nanomaterials with antimicrobial activity to dental or hard surfaces can reduce the formation of microbial biofilms, combat infectious diseases in this anatomical site and promote improved oral health. Silver nanoparticles are promising agents in the development of alternatives for the treatment and control of infectious diseases. The aim of this study was therefore to synthesize and characterize silver nanoparticles, evaluate the biofilm formation of *Candida* sp. and *Streptococcus mutans* biofilm formation in the oral cavity of students at the State University of Goiás, to evaluate the activity of silver nanoparticles against *Candida* sp. biofilm, and to evaluate the activity of silver nanoparticles against *Streptococcus mutans* biofilm formation on toothbrushes. The results showed that silver nanoparticles were synthesized without ammonium hydroxide AgNP(1) and in the presence of ammonium hydroxide AgNP(2), with spherical morphologies of approximately 7.37 nm for AgNP(1) and 11.4 nm for AgNP(2), active against the microorganisms tested. Six yeasts of the genus *Candida* were identified, 2 *Candida albicans* and 4 *Candida krusei*, and 8 *Streptococcus mutans*. Both the *Candida* and *S. mutans* isolates were able to form biofilms in the total biomass tests and in the quantification of viable microorganisms adhered to the microtubes and toothbrushes. All the yeasts evaluated were inhibited by the silver nanoparticles. Both AgNP(1) and AgNP(2) inhibited the yeasts Ck7, Ck8, Ck11, and Ck12 with the lowest concentrations of 15.11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for AgNP(1) and 15.42 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for AgNP(2). The yeasts most resistant to the nanoparticles were Ca2, Ca4, and CaATCC 10231, that were inhibited at concentrations of 60.46 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of AgNP(1) and 61.71 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of AgNP(2). In terms of fungicidal activity, both nanoparticles required 8x higher concentrations against *C. krusei*, while for *C. albicans* the MFC values were identical to MIC for most yeasts and double for Ca4. Infections caused by biofilm-forming bacteria are difficult to treat, hence the importance of searching for biofilm inhibitors.

Keywords: nanoparticles; biofilm; oral microbiota; antibiofilm.

As nanopartículas de prata têm uma ampla aplicação devido às suas propriedades e podem apresentar atividades antimicrobianas para utilização na saúde e medicina com incorporação em antissépticos e desinfetantes, nos revestimentos de cateteres e dispositivos médicos, em curativos e bandagens e na estabilização de cosméticos. Na odontologia podem ser encontradas em produtos de higiene oral e no tratamento de canal, para reduzir o número de cáries e doenças gengivais. Na indústria química e engenharia, as nanopartículas podem ser empregadas como materiais de revestimento de superfícies para reduzir a adesão e proliferação de micro-organismos.

A prata, em sua forma nanoparticulada, possui características morfológicas como tamanho e forma que podem influenciar na ação antimicrobiana. As nanopartículas de prata liberam íons de prata (Ag^+) que possibilitam a desestabilização da membrana celular, a inibição da replicação do DNA e a formação de espécies reativas de oxigênio, interferindo em processos metabólicos essenciais para a sobrevivência dos micro-organismos. As nanopartículas de prata podem penetrar e interferir na estrutura do biofilme, tornando-os mais suscetíveis, dificultando a adesão dos micro-organismos e a formação de novas camadas de biofilme.

Neste contexto, o estudo da atividade nanopartículas de prata na formação de biofilmes de *Candida sp.* e *Streptococcus mutans* em isolados da cavidade oral fornece subsídios para o combate a micro-organismos associados aos biofilmes orais.

Nossos estudos, foram realizados no Laboratório de Química de Materiais e Modelagem Molecular e no Laboratório de Bioensaios da Universidade Estadual de Goiás, na linha de pesquisa de Desenvolvimento de Produtos para Saúde do Programa de Pós Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde, mostraram a empregabilidade das nanopartículas de prata sintetizadas por reação alcóolica e sua atividade na formação de

biofilmes de *Candida sp.* e *Streptococcus mutans* isolados da cavidade bucal para avaliar a potencialidade no controle dos micro-organismos.

As nanopartículas de prata foram sintetizadas em meios reacionais com e sem hidróxido de amônio e em seguida foram avaliadas contra isolados de *Candida sp.* e *Streptococcus mutans*, para se verificar as atividades antimicrobiana e contra a formação de biofilme. As duas nanopartículas sintetizadas apresentaram propriedades diferentes, impactaram nos micro-organismos testados de forma distinta e demonstraram atividades que denotam potencialidade para o desenvolvimento de novos tratamentos antimicrobianos.

APLICABILIDADE

- a) Ampliação do conhecimento a respeito do tamanho de nanopartículas de prata e sua ação em biofilmes de *Candida sp.* e *Streptococcus mutans*.
- b) No desenvolvimento de tratamentos alternativos com novos medicamentos possibilitando que as nanopartículas de prata ajam como carreadores juntamente com medicamentos no combate de micro-organismos resistentes.
- c) No estudo de novos materiais impregnados com nanopartículas de prata para uso principalmente na medicina e odontologia.

IMPACTOS SOCIAIS, ECONÔMICOS E AMBIENTAIS

Nossos estudos trazem uma ampla possibilidade de uso das nanopartículas de prata principalmente na medicina e odontologia.

O uso de nanopartículas de prata na medicina pode promover o melhoramento de terapias medicamentosas antibacterianas. Enquanto que

seu uso na odontologia pode contribuir na elaboração de produtos odontológicos com ação principalmente no biofilme oral.

Estas possibilidades podem causar grande impacto econômico e social no sentido da diminuição de internações hospitalares causadas por infecções ou resistência microbiana, bem como na redução de cáries no caso do uso odontológico.

1. INTRODUÇÃO

Micro-organismos como o *Streptococcus mutans* colonizam as superfícies da cavidade bucal e formam biofilmes, que podem desenvolver cárie dentária (ZAYED *et al.*, 2021). A identificação de *S. mutans* e *Candida sp.* pode ser realizada por técnicas de cultura microbiana e testes bioquímicos).

As infecções causadas por bactérias e leveduras formadoras de biofilme são difíceis de tratar, por isso a importância da busca de novos inibidores de biofilme (SIDDIQUE *et al.*, 2020). Portanto, a adição de nanomateriais com atividade antimicrobiana às superfícies de dispositivos utilizados na cavidade bucal pode ser uma boa solução contra a formação de biofilmes (DORGHAM *et al.*, 2022).

A atividade antibacteriana de metais como a prata depende de características como a sua superfície de contato. Uma área superficial de contato maior das nanopartículas permite ampla interação com micro-organismos e moléculas orgânicas (HERNÁNDEZ-SIERRA *et al.*, 2008).

As nanopartículas de prata são agentes microbianos promissores no desenvolvimento de alternativas para o tratamento e controle de doenças infecciosas e apresentam vantagens como atividade de amplo espectro, baixo potencial de indução de resistência e atividade antibiofilme (TABARAN *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2024).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata sintetizadas em distintos meios reacionais contra leveduras do gênero *Candida* e *Streptococcus mutans* isolados da cavidade bucal.

2.2. Objetivos Específicos

Capítulo 1 – Sintetizar e caracterizar nanopartículas de prata por meio redução de alcoólica.

Capítulo 2 – Avaliar a formação de biofilme de *Candida sp.* e *Streptococcus mutans* isolados da cavidade bucal de estudantes da Universidade Estadual de Goiás.

Capítulo 3 – Verificar a atividade de nanopartículas de prata contra biofilmes de *Candida sp.* isoladas da cavidade bucal.

Capítulo 4 – Determinar o perfil de formação de biofilme de *Streptococcus mutans* isolados da cavidade bucal em escovas dentais.

Delineamento do Estudo

Os procedimentos metodológicos de cada capítulo que compõem esta dissertação estão listados a seguir de forma resumida.

Capítulo 1

Síntese alcoólica de nanopartículas de prata em meio reacional na ausência e presença de hidróxido de amônio conforme metodologia descrita por LEE e OH, 2015. As nanopartículas foram caracterizadas com a determinação da carga superficial, distribuição de tamanho dos agregados, dispersão do diâmetro hidrodinâmico, tamanho das partículas e índice de dispersão.

Capítulo 2

Formação de biofilme de *Candida sp.* e *Streptococcus mutans* isolados da cavidade bucal de estudantes da Universidade Estadual de Goiás. Testes bioquímicos foram realizados para a identificação fenotípica dos micro-organismos, assim como o perfil da formação de biofilme com o estudo da biomassa total e contagens dos micro-organismos viáveis associados ao biofilme.

Capítulo 3

Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata contra *Candida sp.* isoladas da cavidade bucal com a determinação da concentração inibitória mínima (CMI) e concentração mínima fungicida (CMF). Além disso, foram realizados ensaios de formação de biofilme e avaliação da atividade inibitória das nanopartículas contra leveduras associadas ao biofilme com a determinação da concentração inibitória da formação de biofilme (CMIB₅₀).

Capítulo 4

O perfil da formação de biofilme de *Streptococcus mutans* isolados da cavidade bucal foi avaliado em escovas dentais. Todos os isolados analisados formaram biofilmes e foram classificados como formadores fortes. Portanto, essas bactérias são capazes de aderir e formar biofilmes nas escovas dentais. Neste contexto, compreender o comportamento e as relações associadas ao *S. mutans* são essenciais para controle desse micro-organismo e consequentemente, prevenir ou controlar a cárie dentária.

4. RESULTADOS

Artigo 1 – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR REDUÇÃO ALCOÓLICA

Autores: Maria José Barbaresco, Luciana Rebelo Guilherme, Plínio Lázaro Faleiro Naves

Artigo 2 – FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Candida sp.* E *Streptococcus mutans* ISOLADOS DA CAVIDADE BUCAL DE ESTUDANTES DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS

Autores: Maria José Barbaresco, João Salviano Simões Chagas Silva, Luciana Rebelo Guilherme, Plínio Lázaro Faleiro Naves

Artigo 3 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA CONTRA BIOFILMES DE *Candida sp.* ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL

Autores: Maria José Barbaresco, João Salviano Simões Chagas Silva, Francisco Nunes de Souza Neto, Luciana Rebelo Guilherme, Plínio Lázaro Faleiro Naves

Artigo 4 – PERFIL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Streptococcus mutans* ISOLADOS DA CAVIDADE BUCAL EM ESCOVAS DENTAIS

Autores: Maria José Barbaresco, Justino Carlos Baptista, João Salviano Simões Chagas Silva, Reuber Mendes Rocha, Luciana Rebelo Guilherme, Plínio Lázaro Faleiro Naves

Selecionado no X EEPEX para a publicação na Revista Sapiência: Sociedade, Saberes e Práticas Educacionais (Qualis A4)

4.1. Artigo 1

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR REDUÇÃO ALCOÓLICA

Maria José Barbaresco, Luciana Rebelo Guilherme, Plínio Lázaro Faleiro
Naves

RESUMO

As nanopartículas de prata são promissoras alternativas para o desenvolvimento de antimicrobianos, pois apresentam atividade contra bactérias, fungos e vírus. As características morfológicas das nanopartículas de prata são elementos cruciais para a sua atividade contra micro-organismos. O objetivo do estudo foi sintetizar e caracterizar nanopartículas de prata preparadas pelo método alcoólico, com redução química da prata com etanol e polivinilpirrolidona (PVP), sem hidróxido de amônio para a síntese de AgNP(1) e com adição de hidróxido de amônio para a síntese de AgNP(2), conforme metodologia descrita por LEE e OH, 2015. O sistema reacional foi mantido sob refluxo e sob agitação constante por 4 h a 80°C. A caracterização dos coloides formados foi realizada com espectroscopia de absorção atômica (AAS), espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-vis), potencial zeta, espalhamento dinâmico de luz (DLS), microscopia eletrônica de transmissão (MET), difração de área selecionada (SAED) e difração de raios X de pó. A concentração de íons prata foi de 3870 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para AgNP(1) e de 3950 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para AgNP(2). Os espectros UV-vis apresentaram uma forte banda plasmônica centrada em 418 nm, para AgNP(1) e de 407 nm para a AgNP(2), confirmando a presença da formação de nanopartículas de prata esféricas. Os coloides apresentaram potencial zeta de -0,201 mV para AgNP(1) e de -1,784 mV para AgNP(2). Os resultados para o DLS foram respectivamente de 154,2 nm ($\text{ID}_H=0,32$) e 108,3 nm ($\text{ID}_H=0,45$) para AgNP(1) e AgNP(2). As micrografias de MET/SAED, mostraram nanopartículas de prata de formato esférico com estreita distribuição de tamanhos 7,37 nm ($\text{ID}_{\text{MET}}=1,90$) e 11,40 nm ($\text{ID}_{\text{MET}}=0,015$) para a amostra AgNP(1) e AgNP(2), respectivamente. As estruturas cristalinas para ambas amostras foram cúbicas de face centrada (CFC). Concluímos que a síntese das nanopartículas de prata AgNP(1) e AgNP(2) resultaram em suspensões coloidais alcoólicas, estabilizadas por repulsão estérica. Com diferentes distribuições de tamanho, em que AgNP(1) é polidispersa e AgNP(2) é monodispersa. Essa diferença pode ser atribuída à presença do hidróxido de amônio na síntese.

Palavras chave: síntese alcoólica; dispersões coloidais; hidróxido de amônio.

ABSTRACT

Silver nanoparticles are promising alternatives for the development of antimicrobials, as they are active against bacteria, fungi and viruses. The morphological characteristics of silver nanoparticles are crucial to their activity against microorganisms. The aim of the study was to synthesize and characterize silver nanoparticles prepared by the alcoholic method, with chemical reduction of silver with ethanol and polyvinylpyrrolidone (PVP), without ammonium hydroxide for the synthesis of AgNP(1) and with the addition of ammonium hydroxide for the synthesis of AgNP(2), according to the methodology described by LEE and OH, 2015. The reaction system was kept under reflux and constant stirring for 4 h at 80°C. The colloids formed were characterized using atomic absorption spectroscopy (AAS), electronic absorption spectroscopy in the ultraviolet and visible (UV-vis) region, zeta potential, dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscopy (MET), selected area diffraction (SAED) and powder X-ray diffraction. The concentration of silver ions was 3870 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for AgNP(1) and 3950 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for AgNP(2). The UV-vis spectra showed a strong plasmonic band centered on 418 nm for AgNP(1) and 407 nm for AgNP(2), confirming the presence of spherical silver nanoparticles. The colloids showed a zeta potential of -0.201 mV for AgNP(1) and -1.784 mV for AgNP(2). The DLS results were 154.2 nm ($\text{ID}_H=0.32$) and 108.3 nm ($\text{ID}_H=0.45$) for AgNP(1) and AgNP(2) respectively. The MET/SAED micrographs showed spherical silver nanoparticles with a narrow size distribution of 7.37 nm ($\text{ID}_{\text{MET}}=1.90$) and 11.40 nm ($\text{ID}_{\text{MET}}=0.015$) for AgNP(1) and AgNP(2), respectively. The crystal structures for both samples were face-centered cubic (FCC). We conclude that the synthesis of AgNP(1) and AgNP(2) silver nanoparticles resulted in alcoholic colloidal suspensions, stabilized by steric repulsion, but with different size distributions, with AgNP(1) being polydisperse and AgNP(2) monodisperse. This difference can be attributed to the presence of ammonium hydroxide in the synthesis.

Key words: alcoholic synthesis; colloidal dispersions; ammonium hydroxide.

4.1.1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia diz respeito a materiais e sistemas cujas estruturas e componentes exibem propriedades e fenômenos físicos, químicos e/ou biológicos significativamente novos e modificados devido à sua escala nanométrica (DURÁN, MATTOSO, MORAIS, 2006). A nanomedicina é um campo da ciência que lida com a manipulação e fabricação de nanopartículas. Essas partículas são encontradas na faixa de 1 a 100 nm, juntamente com as propriedades biomédicas únicas que as diferenciam da forma elementar em massa (RIBEIRO *et al.*, 2018).

As nanopartículas de prata são agentes microbianos promissores no desenvolvimento de alternativas para o tratamento e controle de doenças infecciosas (TABARAN *et al.*, 2020). São conhecidas por apresentarem vantagens, tais como atividade de amplo espectro, baixo potencial de indução de resistência e atividade antibiofilme (SANTOS *et al.*, 2024). A atividade antibacteriana dos metais, com prata, depende da sua superfície de contato. Uma área superficial de contato maior das nanopartículas permite ampla interação com micro-organismos e moléculas orgânicas (HERNÁNDEZ-SIERRA *et al.*, 2008).

O uso de nanopartículas de prata envolve o aumento da superfície de contato, o que é importante para os efeitos antibiofilme da prata (BRETT, 2006). Dois aspectos relevantes das forças eletrostáticas são predominantes na nanotecnologia: as forças de van der Waals e o movimento browniano. À medida que as dimensões diminuem, as forças de atrito tornam-se de menor importância, enquanto a força eletrostática se torna mais importantes (DURÁN *et al.*, 2019).

Embora existam diversificados métodos de produção de nanopartículas de prata, duas rotas são as mais utilizadas: a síntese por redução química (tradicionalmente empregada) e a síntese biogênica ou biológica, desenvolvida mais recentemente devido a sua rapidez, simplicidade e sustentabilidade. Ambas as rotas são baseadas na redução de íons prata (Ag^+) a Ag^0 , formando as nanopartículas de prata (DURÁN *et al.*, 2019). Nanopartículas metálicas são geralmente sintetizadas por meio de reações químicas de oxidação-redução,

onde utilizam-se solventes orgânicos, como o etanol, ou borohidreto de sódio como agentes redutores, além de tensoativos e polímeros como agentes estabilizantes (DE BRITO *et al.*, 2021). Os íons de Ag^+ podem ser reduzidos por substâncias orgânicas como o citrato de sódio, álcoois, carboidratos, ácido tartárico, ácido ascórbico e outros (EVANOFF e CHUMANOV, 2005).

Existem evidências de que nanopartículas de prata podem danificar diretamente as membranas celulares das bactérias através da liberação de íons de prata, seguida (individualmente ou em combinação) por aumento da permeabilidade da membrana, perda da força motriz do próton, induzindo a destruição e interrupção da replicação do DNA (DURÁN *et al.*, 2019).

Nanopartículas de prata com tamanho médio de 25 nm podem ser eficazes para controlar micro-organismos causadores da cárie como *Streptococcus mutans* e leveduras do gênero *Candida*, além disso, em baixas concentrações a prata pode evitar manchas nos dentes (BRETT, 2006).

Os biofilmes de micro-organismos orais participam da formação da cárie dental, tendo o *Streptococcus mutans* o principal micro-organismo causador (YANG *et al.*, 2021). As nanopartículas de prata apresentaram forte atividade antibacteriana contra *S. mutans* e isso pode embasar o desenvolvimento de produtos comerciais como creme dental e enxaguatório bucal que incorporam nanopartículas (NORA *et al.*, 2021).

Neste trabalho, realizamos as sínteses alcoólicas de nanopartículas de prata em meios reacionais na ausência e na presença de hidróxido de amônio conforme metodologia previamente descrita (LEE e OH, 2015). Em seguida, as propriedades ópticas, estruturais, de estabilidade química e morfológica das nanopartículas sintetizadas foram caracterizadas.

4.1.2. METODOLOGIA

4.1.2.1 Síntese das nanopartículas de prata

A síntese das nanopartículas de prata foi realizada utilizando o método de redução alcoólica proposto por LEE e OH, 2015. O método consiste na redução

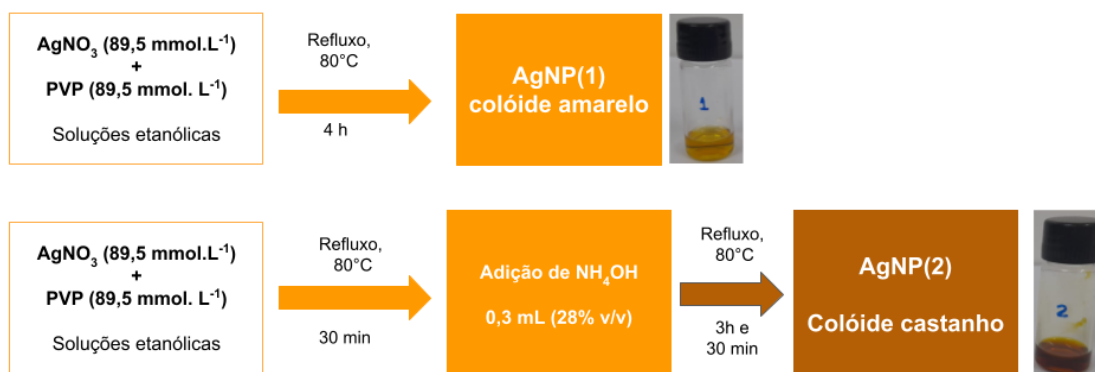
dos íons Ag^+ na solução de nitrato de prata (AgNO_3) na qual o etanol anidro atua como solvente e como agente redutor para a formação das partículas de prata. A polivinilpirrolidona (PVP) foi utilizada como agente estabilizante e o hidróxido de amônio (NH_4OH) foi adicionado para influenciar no tamanho e na concentração das nanopartículas formadas.

O sal de nitrato de prata (AgNO_3) (4,5 mmol, 99,9%, Sigma-Aldrich, Brasil) e o PVP (4,5 mmol), Mw 10.000, $(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$, (99%, Vetec Química®) foram preparados separadamente com a dissolução dos respectivos precursores em 50 mL de etanol (p.a.). No processo de síntese preparou-se 0,76 g de AgNO_3 solubilizados em 50 mL de etanol (p.a.) e 0,5 g de PVP em 50 mL de etanol (p.a.) com o auxílio de placa aquecedora. As duas partes do sistema foram colocadas em refluxo e agitação magnética constante por 4 h a 80°C .

Para avaliar a influência do hidróxido de amônio (NH_4OH) (26%, Dinâmica®) no processo sintético, foi adicionado 0,3 mL de hidróxido de amônio ao sistema em refluxo quando atingiu a temperatura de 80°C .

Formaram-se assim, a nanopartícula de prata AgNP(1) no meio reacional sem hidróxido de amônio e AgNP(2) sintetizada em meio reacional com hidróxido de amônio, conforme Figura 1 a seguir.

Figura 1: Síntese etanólica das nanopartículas de prata.



Fonte: os autores

Legendas: AgNP(1): nanopartícula de prata; AgNP(2): nanopartícula de prata em meio reacional amoniacal.

Os experimentos foram feitos a fim de demonstrar a distribuição de tamanhos diferentes e verificar a influência deste parâmetro na atividade biológica.

4.1.2.2 Caracterização das nanopartículas de prata

As propriedades ópticas, estruturais, de estabilidade química e morfológica das nanopartículas de prata foram caracterizadas pelas seguintes técnicas: espectroscopia de absorção atômica (AAS), espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-vis), potencial zeta e espalhamento dinâmico de luz (DLS), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e difração de elétrons de área selecionada (SAED) e difração de raios X (DRX).

A) Espectroscopia de absorção atômica (AAS):

O teste de absorção atômica foi realizado na empresa FUNMINERAL, situada em Goiânia-GO. Realizou-se inicialmente a abertura das dispersões coloidais das nanopartículas de prata sintetizadas. Em dois tubos de ensaio contendo 5 mL de água destilada em cada tubo, adicionou-se respectivamente 100 µL de cada amostra a ser testada, e 100 µL de ácido nítrico (HNO₃) concentrado. Os dois tubos com as amostras preparadas foram mantidos em manta aquecedora a 100°C com ebulição por 10 minutos. Foi observada a mudança na coloração das amostras para transparente, indicando a abertura das amostras. Transferiu-se o volume do tubo de ensaio para um balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com água deionizada. Aproximadamente 1 mL das amostras diluídas foram utilizadas para a leitura no espectrofotômetro de absorção atômica AAnalyst 400 da *Perkin Elmer*.

B) Espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-vis):

A análise de espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-vis) foi realizada no Centro de Análises, Inovação e Tecnologia da Universidade Estadual de Goiás (CAITEC-UEG). Os espectros eletrônicos das amostras foram obtidos a partir de solução alcoólica em um espectrofotômetro Ultravioleta/visível 5100 *Metash*. O experimento varreu a região de 300 nm a 800 nm, utilizando-se de cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. Foi utilizado o etanol como solução branco. As absorbâncias foram normalizadas utilizando o programa estatístico *OriginPro 2015*.

C) Potencial zeta e espalhamento dinâmico de luz (DLS):

Os experimentos de potencial zeta e espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram realizados com 2 mL de etanol como solvente para diluição das amostras, nas proporções de 100 µL de cada amostra. Foi utilizado o aparelho *ZETASIZER PRO BLUE UNIT*, marca MALVERN PANALYTICAL do CAITEC-UEG. Aproximadamente 1 mL das amostras preparadas anteriormente foi transferido para uma célula em forma de U de poliestireno Malvern do potencial zeta, em seguida estabilizou-se a temperatura a 25 °C e um ângulo fixo de 173° equipado com laser de 50 mW em 533 nm e um correlacionador automático digital.

D) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Difração de Elétrons de Área Seleccionada (SAED):

Uma alíquota de cada amostra dispersa em etanol foi gotejada em uma tela de cobre recoberta com filme de carbono de 400 mesh. Após a secagem as amostras, estas foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão (MET) da marca JEM-2100 (Jeol, Tóquio, Japão) equipado com EDS, Thermo scientific, operando em 200 Kv. do Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução da Universidade Federal de Goiás (LABMIC-UFG).

Padrões de difração de elétrons de áreas seleccionadas (SAED), mostrando a cristalinidade das nanopartículas e a distância entre os planos cristalinos, também foram obtidos junto às imagens de MET. A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) forneceu micrografias, as quais foram analisadas com o *software Image J* para a medição dos diâmetros das nanopartículas de prata.

E) Difração de raio X (DRX):

Amostras dos dois colóides foram impregnadas em superfícies de microplaca de poliestireno (Cralplast, Cral, Cotia, São Paulo, Brasil) que foram analisadas pelo DRX. Os difratogramas de DRX foram adquiridos em um difratômetro de marca SHIMADZU modelo DRX-6000, localizado na Central de Análise Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás

(CAM-UFG), utilizando radiação CU K α ($k=1,54^\circ\text{A}$), operando a 40 Kv e 20 mA, passo de $0,05^\circ$ e varredura no intervalo de 2θ de 5° a 80° , com velocidade de varredura de 1° por minuto.

4.1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Duas nanopartículas de prata foram obtidas: AgNP(1) sintetizada com PVP e sem adição de hidróxido de amônio no meio reacional e AgNP(2) sintetizada com adição de PVP e de hidróxido de amônio no meio reacional. O hidróxido de amônio aumenta a conversão de íons Ag^+ em átomos Ag^0 , acelerando a reação de oxidação do álcool. A quantidade de Ag^0 formado afetou o tamanho e a distribuição das nanopartículas de prata.

A concentração de íons de prata foi de $3870 \mu\text{g mL}^{-1}$ para AgNP(1) e de $3950 \mu\text{g mL}^{-1}$ para AgNP(2), conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração dos íons prata nas nanopartículas sintetizadas

Amostras	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
AgNP(1)	3870
AgNP(2)	3950

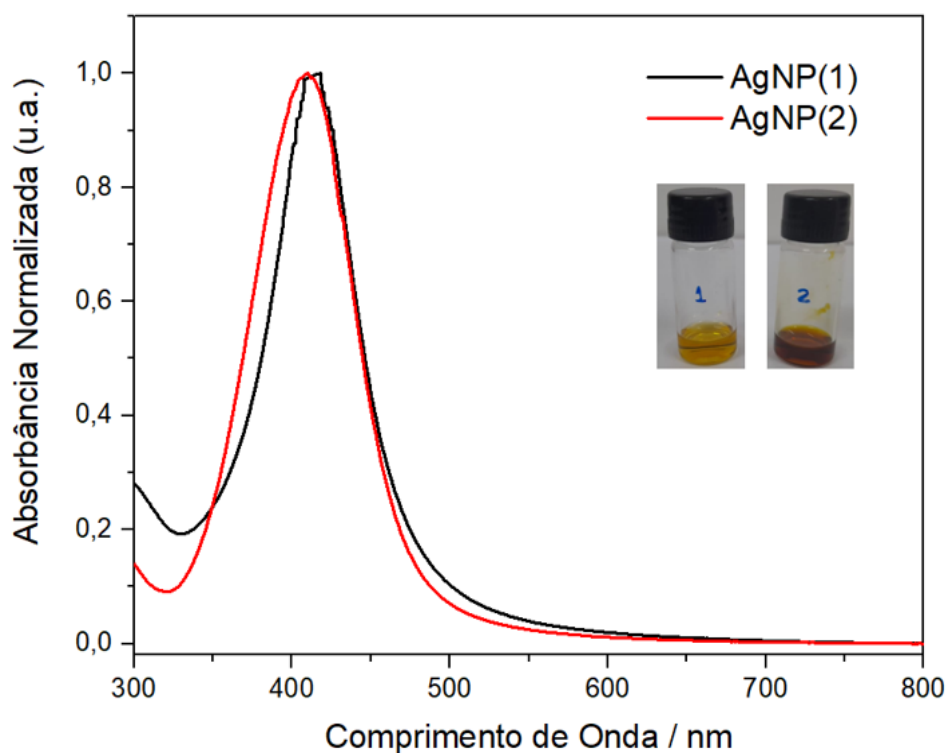
Fonte: Dados da pesquisa

A obtenção de nanopartículas coloidais de prata passa pela formação de alta densidade de núcleos no início do processo. A adição do etanol como agente redutor ao nitrato de prata foi necessária para formar um grande número de nanopartículas simultaneamente, diminuindo a concentração total de íons disponíveis. Apenas uma fração dos íons de prata é reduzida a metal, mesmo quando se usa um excesso de reagente redutor (GORUP *et al.*, 2011).

Foi possível observar na espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta visível (UV-vis), uma forte banda plasmônica centrada em 418 nm e 407 nm, para AgNP(1) e AgNP(2), respectivamente (Figura 2). As bandas são muito similares no que diz respeito ao comprimento de onda máximo, em torno

de 420 nm, característico de nanopartículas de prata. A oscilação ressonante da densidade de elétrons presentes na superfície das AgNP resulta na formação da ressonância plasmônica de superfície observada a 420 nm, principal característica da formação de nanopartículas de prata (RIBEIRO *et al.*, 2023).

Figura 2. Espectro de absorbância no UV-vis para AgNP(1) e AgNP(2).



Fonte: Dados da pesquisa

Dispersões de nanopartículas de prata apresentam o fenômeno de ressonância plasmônica de superfície (RPS) e são de coloração observada amarela, podendo ser monitoradas por UV-vis. Nanopartículas de diferentes tamanhos e formas exibem diferentes fenômenos de RPS e, conseqüentemente, absorvem luz de diferentes comprimentos de onda (λ) (LEE *et al.*, 2015). As bandas de RPS observadas entre 422 nm e estabilizadas a 430 nm após a reação completa, denotam sínteses de nanopartículas de prata bem sucedidas de forma esférica (PATIL e CHOUGALE 2021). Deste modo, os resultados obtidos sugerem que as nanopartículas de prata sejam esféricas.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da carga superficial, estado de agregação e diâmetro hidrodinâmico, das nanopartículas de prata feita pelas análises de potencial zeta, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e índice de dispersão do diâmetro hidrodinâmico (ID_H).

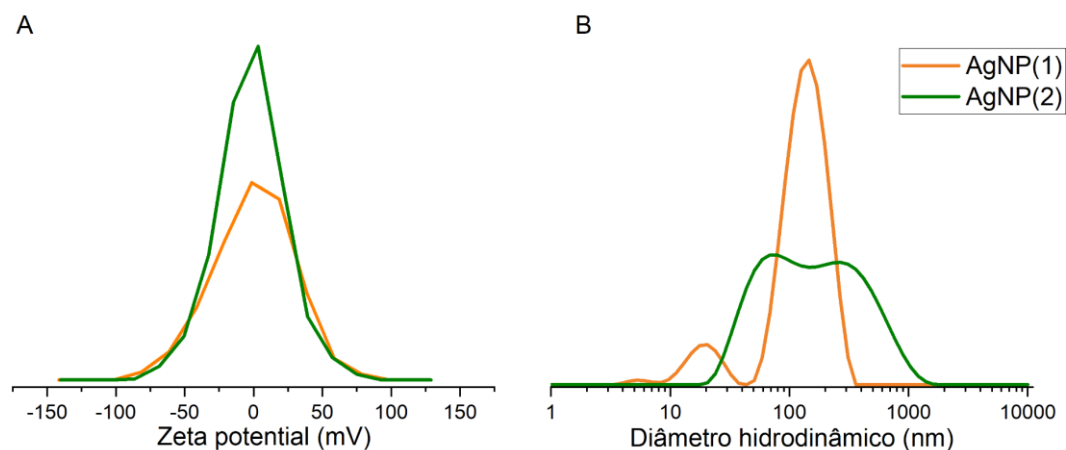
Tabela 2. Potencial zeta, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e índice de dispersão diâmetro hidrodinâmico (ID_H)

Amostras	Potencial zeta (mV)	DLS (nm)	Índice de dispersão do diâmetro hidrodinâmico (ID _H)
AgNP(1)	-0,201 mV	154,2 nm	0,32
AgNP(2)	-1,784 mV	108,3 nm	0,45

Fonte: Dados da pesquisa

É possível observar nas Figura 3A, que as amostras de nanopartículas de prata apresentaram valores próximos à 0 mV na determinação do potencial zeta, de -0,201 mV para AgNP(1) e de -1,784 mV para AgNP(2), o que sugere que a estabilidade coloidal das amostras ocorre principalmente por meio do impedimento estérico (repulsão estérica) causado pelo capa de PVP formada como estabilizante. Apesar do potencial zeta possuir carga nula, as dispersões coloidais encontram-se estáveis após quase dois anos de sua síntese.

Figura 3. A) Potencial zeta (mV) **B)** Diâmetro hidrodinâmico (nm)

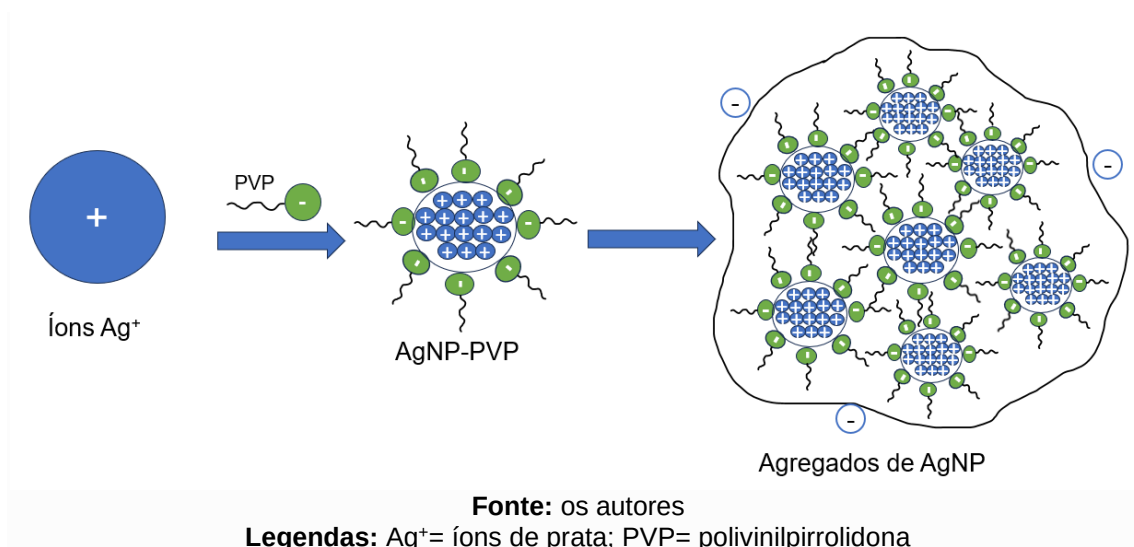


Fonte: Dados da pesquisa

Em estudo semelhante usando polivinilpirrolidona (PVP) como agente estabilizador nas reações envolvendo álcool, foram encontrados resultados de potencial zeta de -5,6 mv, próximo a zero, semelhantes ao encontrado no nosso trabalho. A capa de PVP disperso em álcool formado sugere um valor negativo de potencial zeta, resultado da transferência de elétrons e da densidade de carga da superfície (BEHERA e RAM, 2015).

A carga superficial das AgNP é definida pela presença de moléculas carregadas negativa ou positivamente em seu revestimento, o que é uma propriedade relevante para a estabilidade das nanopartículas. A carga negativa gera repulsividade entre as partículas e uma baixa constante de força entre elas, impedindo a formação de agregados (LEITE *et al.*, 2012). Os resultados obtidos neste trabalho, demonstram potencial zeta próximo a zero, o que indica, ao contrário do trabalho anteriormente citado, que se formaram agregados conforme foi apresentado pelos resultados do DLS (Tabela 2) e esquematizado na Figura 4.

Figura 4. Esquema representativo de agregados de AgNP.



Os resultados obtidos no DLS foram de 154,2 nm para a AgNP(1) e de 108,3 nm para a AgNP(2) (Tabela 2), entende-se que as nanopartículas de prata sintetizadas podem estar envoltas em um agregado conforme os resultados de DLS (Figura 3B). As amostras neste trabalho, mostram distribuição pouco homogêneas dos diâmetros hidrodinâmicos, isso pode ser observado na Figura 3B, que mostra conjuntos de diferentes distribuições de tamanho.

A AgNP(1) apresentou uma distribuição de tamanho maior, e portanto contém mais íons prata envoltos no aglomerado em comparação a AgNP(2). O DLS é útil para medição do tamanho e distribuição das nanopartículas em meios aquosos ou fisiológicos, depende da interação da luz com as partículas e as medições são feitas na faixa de 2–500 nm (MURDOCK *et al.*, 2008). A medição do tamanho depende do núcleo metálico das nanopartículas e de quais substâncias estão adsorvidas nas superfícies, como estabilizadores, por exemplo (PATIL e CHOUGALE 2021).

Os índices de dispersão do diâmetro hidrodinâmico (ID_H) representam a distribuição de tamanho e diâmetro hidrodinâmico de 0,32 nm para AgNP(1) e de 0,45 nm para AgNP(2) (Tabela 2). Como padrão ISO 22412:2017, temos que um ID_H inferior a 0,07 pode ser atribuído para amostras monodispersas de partículas esféricas, para amostras com valores menores que 0,4, as partículas são consideradas homogêneas. Já para amostras com valores maiores que 0,4,

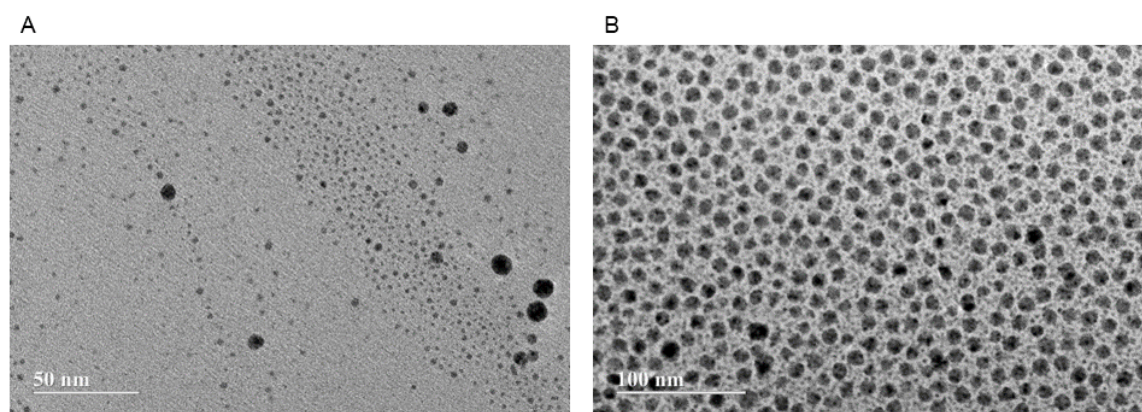
são pouco homogêneas. Valores maiores que 1 são atribuídos a amostras heterogêneas.

As propriedades físico-químicas das AgNP como tamanho na faixa de 43,4 a 120,6 nm (DLS) e de 21,8 a 35,8 nm (MET), morfologia esférica e regular e potencial zeta negativo, podem estar relacionadas à atividade antifúngica, pois melhoram a interação com alvos biológicos e a biocompatibilidade (RIBEIRO *et al.*, 2023). Vários estudos demonstram o poder antimicrobiano das AgNP para bactérias e fungos (BOCATE *et al.*, 2019; HWANG *et al.*, 2012).

A boa dispersibilidade das nanopartículas de prata em vários solventes é atribuída ao invólucro de PVP, que independente da polaridade do solvente, pode exibir um efeito de impedimento estérico. A estabilização estérica ocorre devido à adsorção do PVP na superfície da partícula (LUO *et al.*, 2014 e SALIH *et al.*, 2019), como realizado na utilização do PVP na síntese deste trabalho.

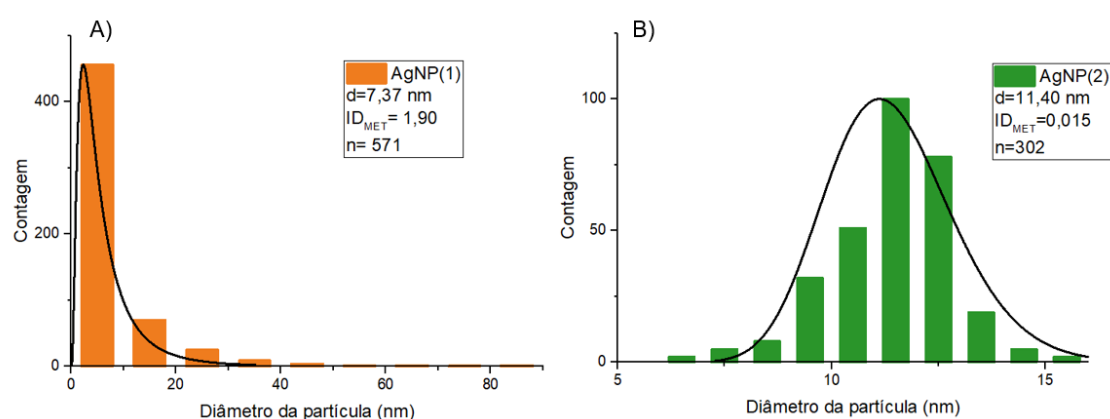
A Figura 5 apresenta as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Foram observados formatos esféricos para ambas as nanopartículas. Nos histogramas da Figura 6, são apresentadas a distribuição dos diâmetros das partículas com estreita distribuição de tamanhos de 7,37 nm para AgNP(1) e de 11,40 nm para AgNP(2). Destas micrografias obteve-se também o índice de dispersão (ID_{MET}) do diâmetro das nanopartículas de 1,90 para AgNP(1) o que significa que as nanopartículas estão em meio heterogêneo e polidisperso. A mesma análise foi feita para AgNP(2), $ID_{MET} = 0,0149$, sendo muito inferior quando comparado com o valor para AgNP(1), é considerado que as nanopartículas de prata AgNP(2) são homogêneas e monodispersas. (Figuras 5 e 6).

Figura 5. A) Imagem de Micrografia Eletrônica de Transmissão (MET) de AgNP(1) **B)** Imagem de Micrografia Eletrônica de Transmissão (MET) de AgNP(2).



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 6. Histograma de distribuição de tamanho de nanopartículas. **A)** AgNP(1) **B)** AgNP(2)



Fonte: dados da pesquisa

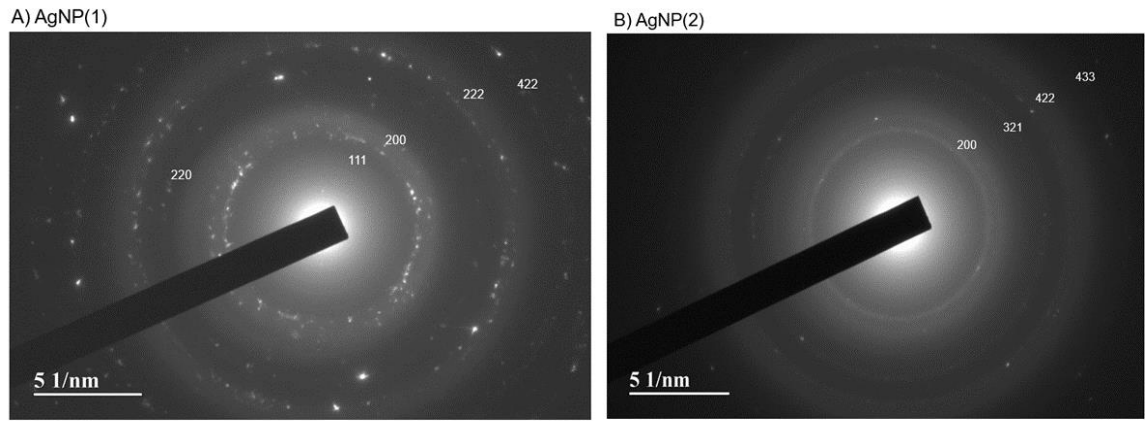
Legenda: AgNP(1) = nanopartícula de prata; AgNP(2)= nanopartícula de prata em meio reacional de amônio; d= diâmetro da partícula ID_{MET}= Índice de dispersão da microscopia eletrônica de transmissão n= número de partículas contadas;

As AgNP podem ser sintetizadas por diferentes métodos e suas atividades antifúngicas e antibacterianas foram correlacionadas ao seu tamanho, formato e modificações de superfície, dentre as diferentes características das partículas, o tamanho e a forma influenciam suas propriedades antimicrobianas; partículas pequenas (menores que 10 nm) que apresentam formato esférico são mais eficazes contra microrganismos (FONSECA *et al.*, 2022). As propriedades de transferência da carga de elétrons também são afetadas por diferentes tipos de AgNP. O papel do tamanho e da forma das nanopartículas de prata implica

diretamente na potencialização do efeito celular baseado em nanopartículas de prata (QING *et al.*, 2018).

Por meio das análises de SAED foi possível determinar as fases cristalinas cúbicas de face centrada das nanopartículas, não havendo mistura de fases cristalinas confirmadas pelos anéis de difração dos planos cristalinos. Foram encontrados para AgNP(1) os planos cristalográficos de 111, 200, 220, 222 e 422 e para AgNP(2) planos cristalográficos de 200, 321, 422 e 433 (conforme carta cristalográfica ICSD nº 00–004-0783) (Figura 7).

Figura 7. Difração de elétrons da área selecionada SAED das nanopartículas de prata.
A) AgNP(1) e B) AgNP(2)



Fonte: dados da pesquisa

Os valores de *d-spacing* conhecidos representando o plano cristalográfico estão contidos nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Análise de *d-spacing* e planos cristalográficos para AgNP(1)

Análise SAED				
$\frac{1}{2} r$	$1/r$	r	<i>d-spacing</i>	Planos
2,692	1,346	0,742942	7,429421	
9,295	4,6475	0,215169	2,151694	111
10,273	5,1365	0,194685	1,946851	200

14,291	7,1455	0,139948	1,399482	220
17,29	8,645	0,115674	1,156738	222
23,665	11,8325	0,084513	0,84513	422

Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: r = raio d-spacing = diâmetro espacial

Tabela 4. Análise de d-spacing e planos cristalográficos para AgNP(2)

Análise do SAED				
$\frac{1}{2} r$	$1/r$	r	d-spacing	Planos
2.763	1.3815	0.723851		
9.177	4.5885	0.217936	7.238509	200
10.868	5.434	0.184026	2.179361	321
14.517	7.2585	0.13777	1.840265	422
17.241	8.6205	0.116003	1.377695	433
2.763	1.3815	0.723851	1.160026	200

Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: r = raio d-spacing = diâmetro espacial

4.1.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Duas nanopartículas de prata foram sintetizadas e caracterizadas por várias técnicas que indicaram que as nanopartículas foram esféricas com tamanhos semelhantes, com cargas superficiais quase nulas e formaram aglomerados. Entretanto apresentaram diferenças significativas no índice de dispersão, pois a AgNP(1) foi polidispersa enquanto a AgNP(2), sintetizada em meio reacional de hidróxido de amônio, foi monodispersa e apresentou distribuição de tamanho mais homogênea com menos formação de agregados.

Baseando-se na observação do tamanho, forma, distribuição das nanopartículas, os coloides sintetizados possuíam propriedades físico-químicas distintas.

4.1.5. REFERÊNCIAS

BEHERA M. e RAM S. Poly(vinyl pyrrolidone) mediated solubilization and stabilization of fullerene C60 in the form of nanofluid in an alcoholic medium, Fullerenes. **Nanotubes and Carbon Nanostructures**. 2015. DOI: 10.1080/1536383X.2015.1068295.

BOCATE, K. P.; REIS, G. F.; DE SOUZA, P. C.; OLIVEIRA JUNIOR, A. G.; DURÁN, N.; NAKAZATO, G.; FURLANETO, M. C.; DE ALMEIDA, R. S.; PANAGIO, L. A. Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. **International Journal of Food Microbiology** 2019, 291, 79.

BRETT, D W. A discussion of silver as an antimicrobial agent: alleviating the confusion. **Ostomy Wound Manage**. v. 52, n.1, p 34-41. 2006 Jan. PMID: 16464989.

CAVALIERE, E.; DE CESARI, S.; LANDINI, G.; RICCOBONO, E.; PALLECCHI, L.; ROSSOLINI, G. M. & GAVIOLI, L. Highly bactericidal Ag nanoparticle films obtained by cluster beam deposition. **Nanomedicine**. v.11, p. 1417. 2015.

DURÁN, N., MATTOSO, L. H. C.; & MORAIS, P. C. Nanotecnologia: Introdução, Preparação, Caracterização e Exemplos de Aplicação. **Ed. Art Liber**. 2006.

DURÁN N., WALLACE R. ROLIN, MARCELA DURÁN; WAGNER J. FÁVARO E AMEDEA B. SEABRA. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: Toxicidade em animais e humanos. **Quim. Nova**, v.42, p.206-213, 2019. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170318>

EVANOFF, D. D., JR. & CHUMANOV, G. "Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays". **Chemphyschem**, v. 6; p. 1221; 2005.

FONSECA, M.S.; RODRIGUES, D.M.; SOKOLONSKI, A.R.; STANISIC, D.; TOMÉ, L.M.; GÓES-NETO, A.; AZEVEDO, V.; MEYER, R.; ARAÚJO, D.B.; TASIC, L.; *et al.* Activity of *Fusarium oxysporum* - Based Silver Nanoparticles on *Candida* spp. **Oral Isolates. Nanomaterials**. v.12, p. 501. 2022. <https://doi.org/10.3390/nano12030501>.

GORUP L. F.; ELSON LONGO, EDSON R. LEITE, EMERSON R. CAMARGO. Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich. **Journal of Colloid and Interface science**. v.360, p.355-358.2011. doi:10.1016/j.jcis.2011.04.099

HERNANDEZ-SIERRA J.F.; RUIZ F, PENA DC, MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ F, MARTÍNEZ AE, GUILLÉN ADE J, TAPIA-PÉREZ H, CASTAÑÓN GM. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. **Nanomedicine**. v.4, p.237-40. 2008. doi: 10.1016/j.nano.2008.04.005.

HWANG, I.; LEE, J.; HWANG, J. H.; KIM, K.-J.; LEE, D. G.; Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. **Febs journal**. v.279, p.1327.2012.

LEE C-F, YOU P-Y, LIN Y-C, HSU T-L, CHENG P-Y, WU Y-X, *et al*. Exploring the stability of gold nanoparticles by experimenting with adsorption interactions of nanomaterials in an undergraduate lab. **Journal of Chemical Education**. v. 92 p. 1066-1070. 2015. <http://dx.doi.org/10.1021/ed500819z>.

LEE YUNJI, OH SEONG-GEUN. Ostwald ripening and control of Ag ion reduction degree by ammonium hydroxide in alcohol reduction process. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. v.21, p.768-771. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.04.010>.

LEITE, F.L.; BUENO, C.C.; DA RÓZ, A.L.; ZIEMATH, E.C.; OLIVEIRA, O.N. Modelos teóricos de forças de superfície e adesão e sua medição usando microscopia de força atômica. **Int. J. Mol. Sci.**v.13, p. 12773–12856. 2012. doi: 10.3390/ijms131012773

LUO W, MA H, MOU F, ZHU M, YAN J, GUAN J. Steric-repulsion-based magnetically responsive photonic crystals. **Adv Mater**. v.26; p.1058-1064. 2014. doi:10.1002/adma.201304134.

MISIRLI M. G.; PATRÍCIO B. F. DE C.; ABRANTES S.DE MELLO P. Silver Nanoparticles for Antibacterial Use: Extrinsic and Intrinsic Factors to Increase Stability. **Rev. Virtual Quim**. v.14, p. 902-915. 2022. <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20220045>.

MURDOCK, RICHARD C.; BRAYDICH-STOLLE, LAURA.; SCHRAND, AMANDA M.; SCHLAGER, JOHN J.; HUSSAIN, SABER M. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. **Toxicological Sciences** v.101; p. 239–253; 2008.

NICULAESCU CARMEN; OLAR L.; RAZVAN S.; MIHAI T.; CORNEL-VIOREL POP. XRD and IR investigations of some commercial polystyrene samples thermally degraded. **Studia UBB Chemia**, v. 2, p.63-70, 2018 DOI:10.24193/subbchem.2018.2.06

NORA D. AL-DAHMAH, MYSOON M. AL-ANSARI, FATIMAH O. AL-OTIBI, A.J.A. RANJITH SINGH. Frankincense, an aromatic medicinal exudate of *Boswellia carterii* used to mediate silver nanoparticle synthesis: Evaluation of bacterial molecular inhibition and its pathway, **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, V. 61; p.102-137, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102337>

PATIL, RAHUL B.; CHOUGALE, ASHOK D. Analytical methods for the identification and characterization of silver nanoparticles: A brief review; **Materials Today: Proceedings**, v.47, p.5520-5532, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.03.384>.

QING Y, CHENG L, LI R, *et al*. Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced

modification technologies. **Int J Nanomedicine**, v. 13; p.3311–3327. 2018. DOI: 10.2147/IJN.S165125.

RIBEIRO, M.M.; RIBEIRO, A.M.H.; OLIVEIRA, M.A.; OLIVEIRA, M.M.; OLIVEIRA, A.; OLIVEIRA, E.A.M.; MABROUK, A.S. Avanços recentes na síntese verde de nanopartículas de prata e suas aplicações sobre direções futuras. Uma revisão. **BioNanoScience**, v.8, p. 5–16. 2018.

SALIH, H. H. M., EL BADAWY, A. M., TOLAYMAT, T. M., & PATTERSON, C. L. Removal of Stabilized Silver Nanoparticles from Surface Water by Conventional Treatment Processes. **Advances in nanoparticles**, v8, p.21–35.2019. <https://doi.org/10.4236/anp.2019.82002>.

SANTOS L.M.; RODRIGUES DM, ALVES BVB, KALIL MA, AZEVEDO V, BARH D, MEYER R, DURÁN N, TASIC L, PORTELA RW. Atividade de nanopartículas de prata biogênicas em *Corynebacterium pseudotuberculosis* plantônica e associada a biofilme. **Peer J**. v.12, p.16751. 2024 <http://doi.org/10.7717/peerj.16751>.

TABARAN A.F.; MATEA CT, MOCAN T, TABARAN A, MIHAIU M, IANCU C, MOCAN L. Nanopartículas de prata para a terapia da tuberculose. **Revista Internacional de Nanomedicina** . v.15; p.2231-2258. 2020.

YANG, S.; ZHANG, J.; YANG, R.; XU, X. Small Molecule Compounds, A Novel Strategy against *Streptococcus mutans*. **Pathogens**. v.10, p.1540. 2021 <https://doi.org/10.3390/pathogens10121540>.

4.2. Artigo 2

FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Candida sp.* E *Streptococcus mutans* ISOLADOS DA CAVIDADE BUCAL DE ESTUDANTES DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS

Maria José Barbaresco, Luciana Rebelo Guilherme, Plínio Lázaro Faleiro
Naves

RESUMO

Micro-organismos como o *Streptococcus mutans* e a *Candida sp.* formam biofilmes e colonizam as superfícies da cavidade bucal e podem ocasionar problemas como a cárie dentária e outras doenças. O desenvolvimento do biofilme é um processo que ocorre com a fixação inicial das células às superfícies, produção de polissacarídeos extracelulares que resultam numa fixação “irreversível” firmemente aderida, na maturação da arquitetura tridimensional e por fim na dispersão de células individuais do biofilme. O objetivo deste capítulo é determinar o perfil de formação de biofilme de *Streptococcus mutans* e de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal de estudantes da Universidade Estadual de Goiás e pertencentes a coleção de micro-organismos do Laboratório de Bioensaios da UEG. As espécies foram identificadas fenotipicamente e a formação de biofilme foi estudada por meio da determinação da biomassa total e da quantificação de células viáveis aderidas ao biofilme. Do total de 20 micro-organismos avaliados, foram identificadas 2 *Candida albicans*, 4 *Candida krusei* e 12 *Streptococcus mutans*, dos quais 8 foram selecionados para os estudos de formação de biofilme, além das cepas padrão *Candida albicans* ATCC 10231 e *Streptococcus mutans* ATCC 700610. Todos os micro-organismos foram capazes de formar biofilme. Dentre as leveduras, 4 (57,14%) foram formadoras fortes 2 (28,58%) moderadas e 1 (14,28%) formadora fraca, enquanto que todos os *S. mutans* foram formadores fortes de biofilme. O perfil de formação de biofilme microbiano reforça a necessidade de estudos posteriores para o controle dessa estrutura e de doenças microbianas na cavidade bucal, além de reforçar a importância da higiene oral rotineira na manutenção da saúde humana.

Palavras chave: microbiota oral; biomassa; bactérias; leveduras.

ABSTRACT

Microorganisms such as *Streptococcus mutans* and *Candida* sp. form biofilms and colonize the surfaces of the oral cavity and can cause problems such as dental caries and other diseases. Biofilm development is a process that occurs with the initial attachment of cells to surfaces, the production of extracellular polysaccharides that result in a firmly adhered “irreversible” attachment, the maturation of the three-dimensional architecture and finally the dispersion of individual biofilm cells. The aim of this chapter is to determine the biofilm formation profile of *Streptococcus mutans* and yeasts of the genus *Candida* isolated from the oral cavity of students at the State University of Goiás and belonging to the microorganism collection of the Bioassay Laboratory of the State University of Goiás. The species were identified phenotypically and biofilm formation was studied by determining the total biomass and quantifying the viable cells adhered to the biofilm. Twenty microorganisms were evaluated, 2 *Candida albicans*, 4 *Candida krusei* and 12 *Streptococcus mutans* were identified, 8 of which were selected for biofilm formation studies, in addition to the standard strains *C. albicans* ATCC 10231 and *S. mutans* ATCC 700610. All the microorganisms were capable of forming biofilm. Among the yeasts, 4 (57.14%) were strong formers, 2 (28.58%) moderate and 1 (14.28%) weak formers, while all the *S. mutans* were strong biofilm formers. The pattern of microbial biofilm formation supports the need for further studies to control this structure and microbial diseases in the oral cavity, as well as reinforcing the importance of routine oral hygiene in maintaining human health.

Key words: oral microbiota; biomass; bacteria; yeasts.

4.2.1. INTRODUÇÃO

A boca é fundamental para a alimentação, fala, respiração e está ligada à aparência social. Cuidar dos dentes deve ser um hábito presente na rotina de pessoas de todas as idades. A saúde bucal é frequentemente comprometida por doenças como cárie, lesões inflamatórias, infecciosas, cistos e tumores (JIN *et al.*, 2016).

A cavidade bucal é colonizada por mais de 500 espécies de micro-organismos, sendo habitualmente comensais ou em certas circunstâncias patogênicas, como ocorre nas infecções que são provocadas por fungos ou bactérias (SIMÕES, FONSECA e FIGUEIRAL, 2013).

Fatores como higiene, hábitos alimentares, colonização bacteriana, composição da saliva, entre outros, influenciam o metabolismo das bactérias sobre os dentes, modulando a atividade da cárie (LEITES, PINTO e SOUSA, 2006). 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 candidíase pode estar presente como uma infecção cutânea, mucosa ou de órgão profundo, que é causada por mais de 20 tipos de *Candida sp.*, sendo *C. albicans* o mais comum. Estas são leveduras patogênicas e estão presentes no microbioma oral normal. A candidíase oral resulta do crescimento excessivo de *Candida sp.* nos hospedeiros, os sintomas incluem manchas brancas na boca, língua, garganta. (BHATTACHARYA, SAE-TIA e FRIES, 2020).

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).

A levedura *Candida albicans* é um micro-organismo de interesse na cavidade bucal, pois interage de forma robusta com outros micro-organismos impactando na virulência de biofilmes polimicrobianos, promovendo cárie dentária induzindo a disbiose microbiana oral (QIAN *et al.*, 2021). A candidíase oral é um problema de saúde pública, principalmente para pacientes imunocomprometidos e usuários de próteses, pois a adesão de biofilmes e essa superfície pode funcionar como um reservatório fúngico (BRITO *et al.*, 2020).

As bactérias do gênero *Streptococcus* são comumente encontradas na cavidade oral. São cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, se organizam em cadeias curtas, e são divididos em três categorias de acordo com sua capacidade de induzir hemólise: estreptococos α -hemolíticos (também conhecido como *S. viridans*), estreptococos β -hemolíticos e estreptococos não hemolíticos (também conhecido γ -hemolíticos). São classificados de acordo com suas propriedades bioquímicas e genéticas (SARAVIA, 2010) e as espécies mais predominantes na cavidade oral são *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. gordonii* (ZHOU & LI, 2020).

O *Streptococcus mutans* é o principal agente etiológico da cárie, desempenhando um papel essencial na formação de estruturas complexas funcionais na mucosa oral e no esmalte dentário (WANG *et al.*, 2020). É uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, que produz ácidos orgânicos, os quais desmineralizam o esmalte e a dentina causando a cárie dentária após formar biofilmes na superfície do dente (CHAMLAGAIN *et al.*, 2024).

Do ponto de vista microbiológico, a cárie dental é provocada por bactérias com alta similaridade fenotípica classificadas como estreptococos do grupo mutans e fazem parte desse grupo: *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S. rattus*, *S. ferus*, *S. cricetus* e *S. macacae*, as quais pertencem aos sorotipos aos sorotipos a, b, c, d, e, f, g, ou h de *S. mutans* (ZHOU & LI, 2020). Das espécies citadas, o *S. mutans* e *S. sobrinus* apresentam potencial cariogênico em humanos.

As outras espécies são encontradas em animais e, se estão presentes em humanos, não parecem ser altamente cariogênicas (MALTZ *et al.*, 2016). Os *S. mutans* são bactérias anaeróbias facultativas, a maioria cresce no ar, sendo estimulados pelo aumento de CO₂. São catalase negativos e oxidase negativos, propriedade que, juntamente com a coloração de Gram, diferencia os estreptococos das espécies de *Neisseria* (KONEMAN *et al.*, 2017).

Micro-organismos como o *Streptococcus mutans* colonizam as superfícies da cavidade bucal e formam biofilmes, que podem sofrer maturação e desenvolvimento de cárie dentária (ZAYED *et al.*, 2021). O biofilme microbiano na cavidade bucal constitui-se de comunidades complexas e distintas, que estão propensas a alterações locais e químicas, físicas ou imunológicas (NUNES, GARCEZ, RIBEIRO, 2015). O estabelecimento de biofilme polimicrobiano é um importante fator na patogenia, pois proporciona proteção aos micro-organismos associados, que, ao fermentarem os carboidratos disponíveis reduzem o pH local e intensificam a perda mineral (MALTZ *et al.*, 2016).

Biofilmes são comunidades altamente estruturadas de micro-organismos conectados a uma superfície ou a outros micro-organismos, formando agregados envoltos por uma matriz extracelular de polissacarídeos, proteínas e glicoproteínas e ácidos nucleicos (CORIOLANO *et al.*, 2021). Inicialmente, os micro-organismos interagem para a formação do biofilme e expressam genes em resposta às condições bucais como o pH, oxidação, nutrientes e presença de superfícies sólidas (RODRIGUES, 2019).

O desenvolvimento de um biofilme é um processo de cinco etapas: fixação inicial das células à superfície, produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) resultando numa fixação “irreversível” mais firmemente aderida, desenvolvimento inicial de arquitetura do biofilme, maturação da arquitetura do biofilme, e por fim dispersão de células individuais do biofilme (STOODLEY, SAUER, DAVIES e COSTERTON, 2002).

A associação entre *S. mutans* e *C. albicans* baseia-se em seus mecanismos de virulência e características bioquímicas, bem como as características endógenas e fatores exógenos que fazem com que o hospedeiro forneça um ambiente bucal que favorece a ação de ambos os micro-organismos (BARBIERI *et al.*, 2007).

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

A caracterização de um isolado bacteriano desconhecido é realizada testando sistemas enzimáticos que são característicos de cada espécie. Desta forma, pode-se detectar alterações no pH produzidas pela utilização de substratos químicos ou mudanças de cor produzidas por subprodutos específicos. A seleção de conjuntos apropriados de características diferenciais permite a identificação de cada grupo de bactérias (KONEMAN *et al.*, 2017).

Nesse contexto, o objetivo deste capítulo é determinar o perfil de formação de biofilme de *Streptococcus mutans* e de leveduras do gênero *Candida* isolados da cavidade bucal de estudantes da Universidade Estadual de Goiás. Nosso estudo contribui no âmbito do controle de doenças microbianas na cavidade bucal, além de reforçar questões relacionadas à importância da higiene oral rotineira na manutenção da saúde humana.

4.2.2. METODOLOGIA

4.2.2.1 Manutenção dos micro-organismos

Foram selecionados 20 micro-organismos isolados da cavidade bucal de discentes da UEG (Comitê de Ética em Pesquisa da UEG, parecer nº3.604.978) e pertencentes a coleção de micro-organismos do Laboratório

de Bioensaios do Centro de Pesquisa e Pós graduação (LabBio - CPPG) da UEG.

Alíquotas dos isolados foram descongeladas à temperatura ambiente e posteriormente foram repicadas por estriação em Ágar Sabouraud Dextrose acrescido de Cloranfenicol (ASDC, FirstLab®, Paraná) e em Ágar Mitis Salivarius (AMS, Isofar®, Rio de Janeiro) acrescido de bacitracina e sacarose (AMS-BS, conforme anexo 1). As placas foram incubadas a 37°C por 48h em jarra de microaerofilia.

Após a incubação, 3 a 5 colônias isoladas e típicas foram transferidas para tubos com caldo infusão cérebro e coração (*Brain Heart Infusion* - BHI, Kasvi®, Paraná) com 20% de glicerol que foram incubados por 24 a 48h. Alíquotas de 500 µL do caldo crescido foram transferidas para microtubos Eppendorf, que em seguida foram armazenados em refrigerador a 8°C durante sete dias e congelados em *freezer* a - 20°C para manutenção dos micro-organismos para as próximas etapas do estudo (SILVA; COSTA; RECHE, 2008).

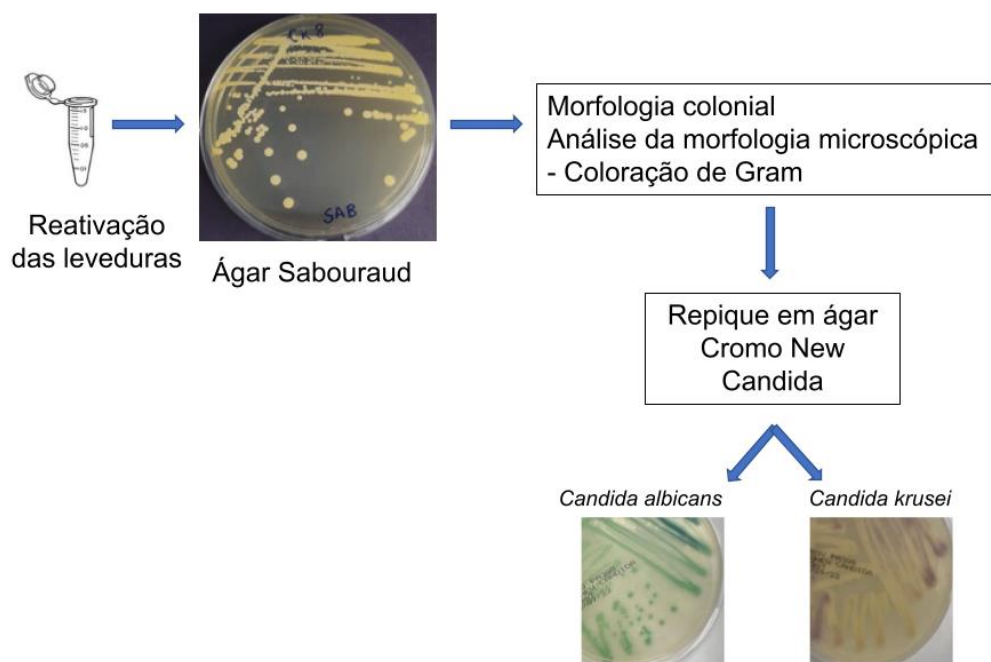
4.2.2.2 Identificação fenotípica de *Candida* sp.

As colônias isoladas em ASDC foram analisadas microscopicamente a partir de esfregaços em lâminas coradas pelo método de Gram, utilizando o Kit de Coloração de Gram (NewProv®, Paraná), para fornecer informações sobre a morfologia microscópica dos micro-organismos.

Alíquotas dos isolados de *Candida* sp. foram retiradas do *freezer* e descongeladas a temperatura ambiente. Em seguida, foram repicadas em ASDC e as placas foram incubadas a 35,5°C por 72h. As leveduras crescidas no ASDC foram semeadas em meio cromogênico (CROMONEW CANDIDA, Newprov®) para a identificação presuntiva das espécies de *Candida* sp. através de observação visual da coloração formada após a incubação em condições aeróbias a 35,5°C por 72 h.

As espécies de *Candida* foram identificadas com base nos aspectos morfológicos das colônias no meio cromogênico e microscópicos com a coloração de Gram (Figura 1).

Figura 1. Identificação fenotípica de *Candida* sp.



Fonte: os autores

4.2.2.3. Identificação fenotípica de *Streptococcus mutans*

As colônias bacterianas isoladas em AMS-BS foram analisadas macroscopicamente e microscopicamente a partir de esfregaços em lâminas e corados pelo método de Gram, utilizando o *kit* de coloração de Gram (NewProv®, Paraná), para fornecer informações sobre a morfologia das bactérias.

Alíquotas dos isolados dos estreptococos do grupo mutans foram retiradas do *freezer* e descongeladas a temperatura ambiente. Em seguida, os isolados foram repicados em AMS-BS e as placas foram incubadas em

jarra de microaerofilia com o auxílio de uma vela, a 37°C por 72h para crescimento dos micro-organismos.

Após a incubação, o aspecto macroscópico das colônias foi avaliado com auxílio de um contador de colônias (MARCONI®, São Paulo) e as colônias com aspecto liso, brilhante, levemente elevadas e arredondadas, pegajosas, semelhante a uma gota e/ou aspecto multilocular parecido com vidro moído, com centro elevado e cor azul escura que ao toque, duras e quebradiças foram selecionadas para a identificação presuntiva como *Streptococcus mutans* (SARAVIA, 2010; ZHOU & LI, 2020).

O meio AMS-BS é acrescido de sacarose que potencializa ainda mais os carboidratos fermentáveis, enquanto o acréscimo do antibiótico bacitracina, inibe a síntese de ácido teicóico, sendo ativo contra muitas bactérias Gram positivas (SARAVIA, 2010).

A identificação presuntiva dos *Streptococcus mutans* foi realizada a partir da análise das colônias típicas, da análise microscópica com a coloração de Gram, teste de catalase, produção de hemólise em ágar sangue, beta-glucuronidase em ágar cromogênico, fermentação de manitol e sorbitol e teste PYR (Figura 2) (KONEMAN *et al.*, 2017; ZHOU & LI, 2020).

O teste de catalase foi realizado com a colocação de colônias isoladas sobre uma lâmina de vidro contendo uma gota de peróxido de hidrogênio vol.10 para a observação visual da reação de desprendimento de O₂, caso a amostra fosse catalase positiva. Foram considerados como estreptococos as amostras que não desprenderam gás, sendo portanto, catalase negativa. A enzima catalase é encontrada em alguns micro-organismos e participa da conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sendo observado o desprendimento ou não de oxigênio pela formação de bolhas.

Para avaliação da hemólise, foram realizados repiques dos estreptococos em meio ágar sangue de carneiro (bioMérieux®, Rio de Janeiro). As placas foram replicadas por estriação com alça bacteriológica e incubadas em aerobiose na estufa a 37°C por 72h para observação da hemólise. O aspecto típico das colônias dos estreptococos do grupo *mutans*

no ágar sangue é o de hemólise parcial (alfa hemólise) ou de nenhuma hemólise (gama).

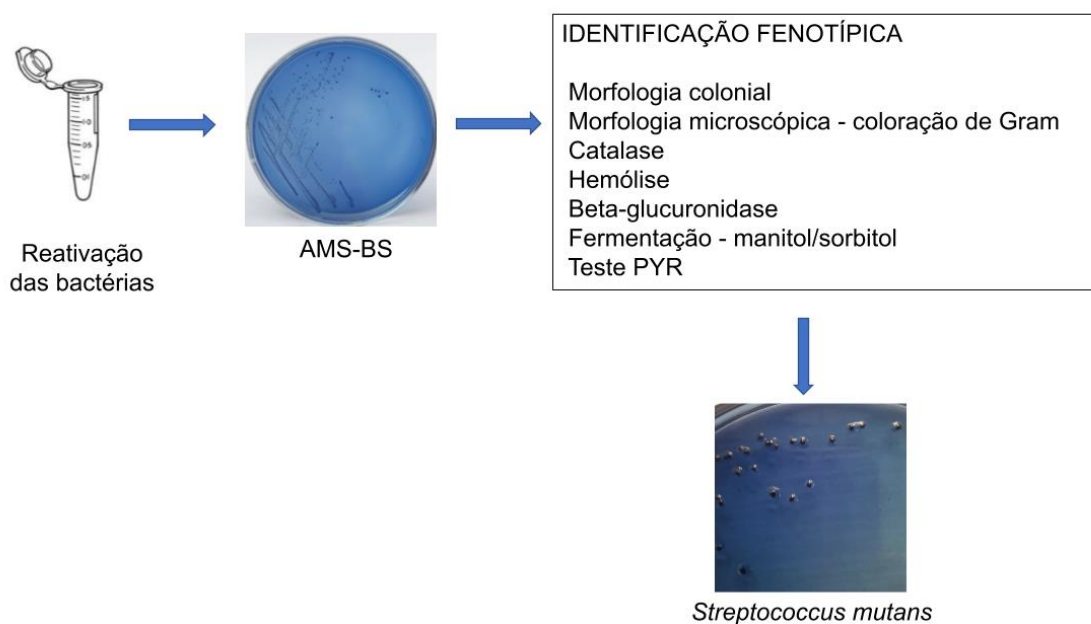
A produção de beta-glucuronidase foi verificada em meio cromogênico Strep-B (bioMérieux®, Rio de Janeiro) que foi repicado com os isolados e incubado em microaerofilia a 37°C por 72h. As amostras foram consideradas positivas quando as colônias crescidas no meio apresentaram a coloração azul. O meio Strep-B contém substratos cromogênicos que identificam a presença da enzima beta-glucuronidase e permite a identificação das diferentes espécies de estreptococos, principalmente o *Streptococcus agalactiae*, que quando positivo, possui coloração azul.

Os testes de fermentação do manitol e sorbitol foram realizados com o repique dos estreptococos em caldo tioglicolato de sódio com os açúcares separados e incubação dos tubos a 37°C por 72h. A turvação na porção inferior do tubo indicou a fermentação de cada açúcar.

O teste PYR foi realizado com a transferência de uma alíquota do caldo crescido dos isolados para um disco de papel do teste PYR (ProBac do Brasil®, São Paulo) previamente umedecido com água destilada. Após 5 minutos uma gota do reagente PYR foi acrescentado e foi observado se havia reação com o substrato em até 1 minuto de exposição.

A leitura do teste é colorimétrica, sendo a coloração vermelha para teste positivo e coloração amarela para teste negativo. O teste é baseado na hidrólise da L-pyrrolidonyl-beta-naphtylamide e destina-se à identificação dos *Streptococcus spp.* A hidrólise do L-pyrrolidonyl-beta-naphtylamide através da enzima L-pyroglutamyl-aminopeptidase foi verificada através da reação do reagente PYR com a beta-naphtylamide livre, que formou uma Base de Schiff de coloração vermelha.

Figura 2. Identificação fenotípica de *Streptococcus mutans*



Fonte: os autores

4.2.2.4. Ensaios de formação de biofilme microbiano

Determinação da biomassa total dos biofilmes

O ensaio de biofilme foi baseado na metodologia descrita por Zayed *et al.* (2021), com algumas modificações. Inicialmente, na primeira etapa, os inóculos de *S. mutans* e de *Candida sp.* foram ativados em AMS-BS e ASDC, respectivamente. As placas foram colocadas em estufa a 37°C por 72 horas, em jarra de microaerofilia.

Após a incubação, o ensaio foi realizado da mesma forma tanto para *S. mutans* como para *Candida sp.* Então, foram dissolvidas 3 a 5 colônias em 5000 µL de solução fisiológica estéril (SFE) e em seguida, a densidade do inóculo foi ajustada com a escala 0,5 de McFarland até a obtenção da turvação correspondente e após a homogeneização em vortex (Biomixer, ALFA MARE Instrumentos Científicos e Médicos LTDA, Brasil), foram transferidos 500 µL dos inóculos ajustados para tubos de ensaio com 4500 µL de Caldo infusão de cérebro coração adicionado com 2% de sacarose (BHIS).

Em microplacas de poliestireno de fundo plano com 96 poços, foram aliquoteados 200 µL do caldo BHIS contendo os inóculos ajustados e foi colocados por linha nos poços da microplaca de 1 até 8, sendo cada linha um tipo de inóculo dos micro-organismos. As colunas 9 e 10 dos poços das microplacas, foram preenchidas somente o BHIS, ou seja, controle não inoculado (CNI). As microplacas foram inoculadas em microplacas prontas com os inóculos na estufa à 37 °C por 48 h (Figura 3).

Na segunda etapa, após incubação por 48 h, as microplacas foram processadas com duas lavagens com 300 µL de SFE 0,9%, em lavadora automática de microplacas (Aquari®, Brasil) para a remoção das células não aderidas. Logo, foram adicionados 200 µL de etanol 98% em todos os poços da microplaca que foi mantida sob incubação a TA durante 20 minutos, depois o etanol foi descartado e a microplaca secada invertida por 5 minutos a TA.

Em seguida, foram adicionados 200 µL de cristal violeta 0,1% em todos os poços, e as microplacas foram mantidas na TA por 20 minutos. A microplaca foi lavada na lavadora automática de microplacas (Aquari®, Brasil) por 2 vezes com 300 µL de SFE 0,9%, e a microplaca vertida por 5 minutos. Após, foi colocado 200 µL de ácido acético 33% em cada poço, por 20 minutos e a microplaca foi levada para leitura das densidades ópticas a 600nm (DO_{600nm}) em espectrofotômetro de microplacas (Spectramax® Parading, EUA) (Figura 4).

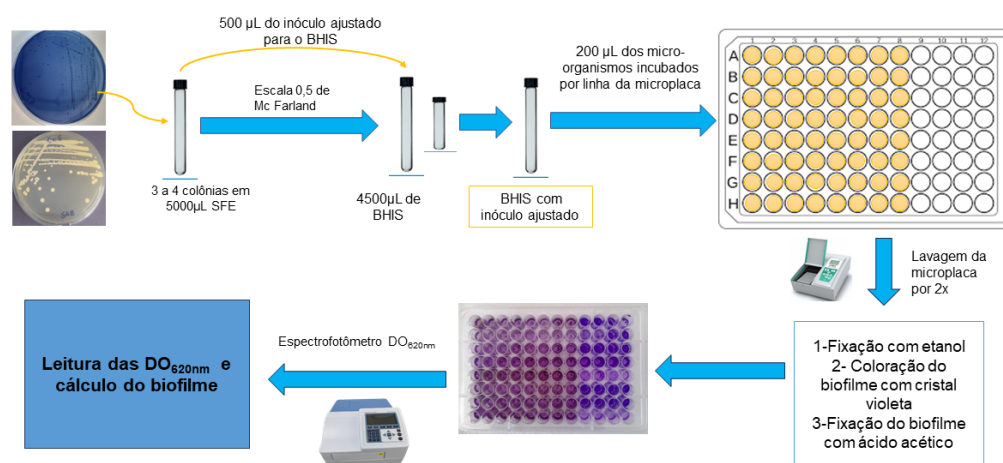
O experimento foi realizado em triplicata, as leituras das DO_{600nm} foram anotadas e as médias e desvios padrão foram obtidas no editor de planilhas Google Sheets. As leituras das DO_{600nm} permitiram classificar a formação de biofilme nas categorias forte, moderada e fraca, de acordo com a fórmula a seguir na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos isolados testados quanto à capacidade de formação de biofilme.

Leitura das DO _{600nm}	Classificação da Formação de Biofilme
$DO_{MA} \leq 2 \cdot DO_{CNI}$	Fraca
$2 \cdot DO_{CNI} < DO_{MA} \leq 4 \cdot DO_{CNI}$	Moderada
$DO_{MA} > 4 \cdot DO_{CNI}$	Forte

Fonte: Zayed e colaboradores (2021). **Legenda:** DO_{MA} = densidade óptica dos micro-organismos aderidos; DO_{CNI} = densidade óptica do caldo não inoculado.

Figura 3. Preparação e processamento da microplaca para o ensaio da determinação da biomassa total dos biofilmes de *Candida sp.* e *Streptococcus mutans*.



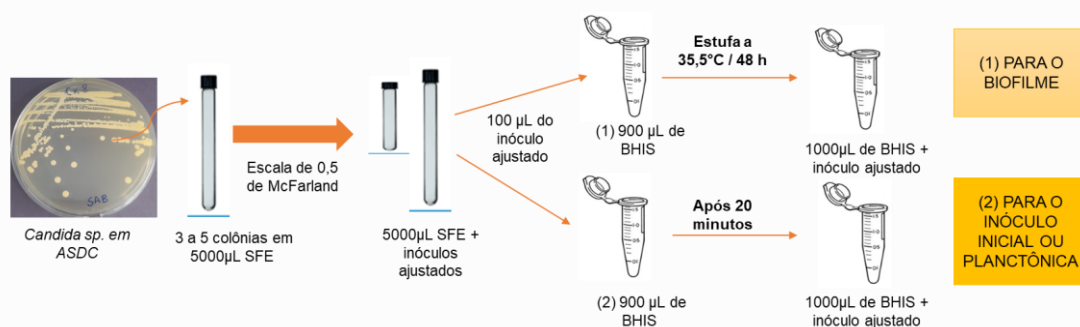
Fonte: os autores

Quantificação das leveduras viáveis aderidas ao biofilme

Na primeira etapa, os isolados foram repicados conforme descrito anteriormente para a identificação fenotípica, mas em ágar CPS elite (bioMérieux®, Rio de Janeiro) a 37 °C durante 72 h. Após a incubação, 3 a 5 colônias crescidas foram dissolvidas em 5000 µL de SFE e a densidade do inóculo foi ajustada com a escala 0,5 de McFarland. Em seguida, 100 µL dos inóculos foram transferidos para dois microtubos com 900 µL de BHIS cada.

O primeiro microtubo foi incubado a 35,5 °C por 48 h para quantificação das células aderidas ao biofilme e o segundo microtubo foi processado para quantificação das células planctônicas no inóculo inicial em até 20 minutos após a inoculação em BHIS (Figura 4).

Figura 4. Processamento para a quantificação das leveduras associadas ao biofilme maduro de 48h (1) e das leveduras planctônicas no inóculo inicial (2)



Fonte: os autores

Nos ensaios de formação de biofilme, os microtubos foram processados com a remoção asséptica dos caldos crescidos após as 48 h de incubação, lavagem por 3 vezes em SFE e desprendimento das células aderidas com sonicação por 5 minutos e homogeneização em vortex (Biomixer, ALFAMARE Instrumentos Científicos e Médicos LTDA, Brasil) por 30 segundos, diluição e plaqueamento para contagem do número de leveduras associadas ao biofilme maduro (Figura 5).

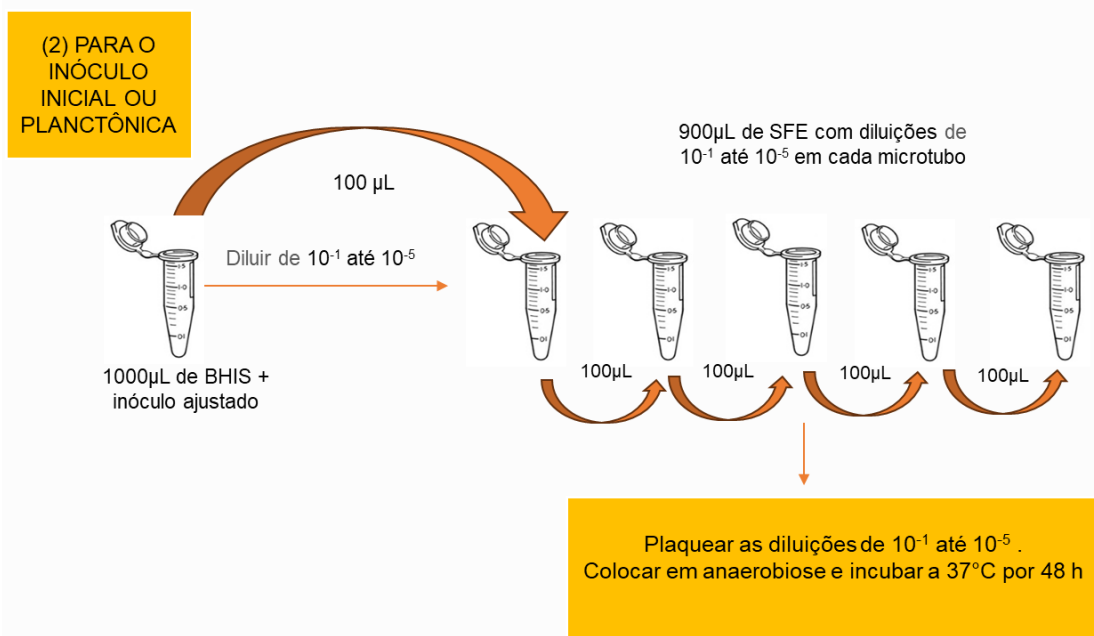
Figura 5. Quantificação das leveduras viáveis associadas ao biofilme maduro de 48h.



Fonte: os autores

O inóculo inicial foi quantificado com a diluição e plaqueamento das células planctônicas em suspensão em BHIS em até 20 minutos da preparação inicial dos microtubos (Figura 6).

Figura 6. Quantificação de leveduras planctônicas viáveis no inóculo inicial.



Fonte: os autores

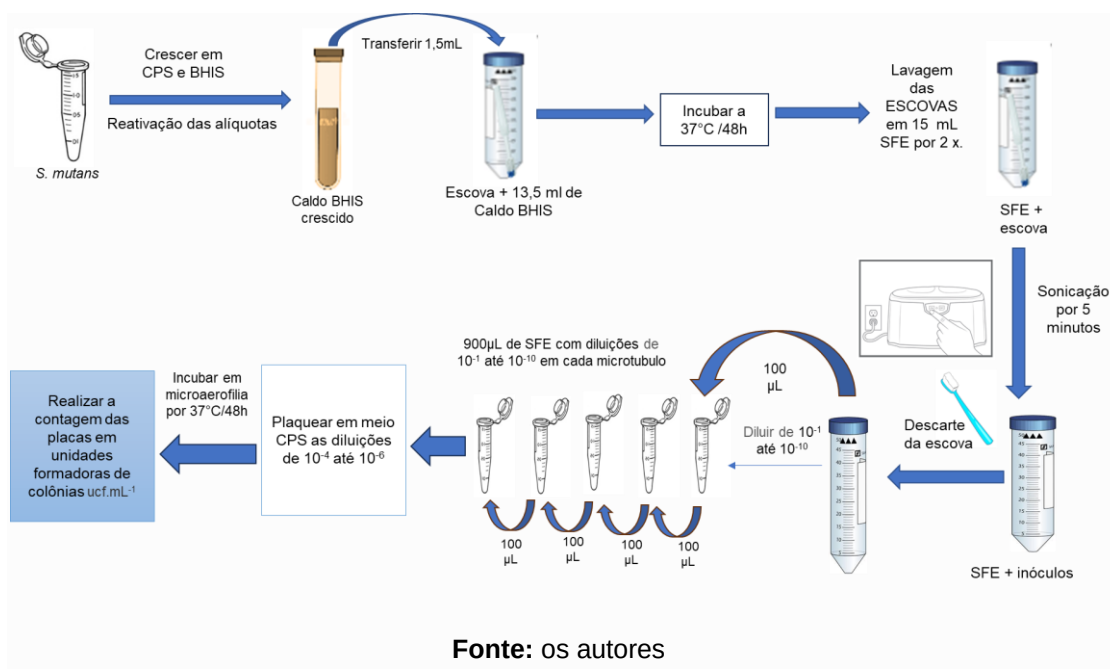
Quantificação dos *Streptococcus mutans* viáveis associados ao biofilme em escovas dentais

Para este ensaio foram selecionados 9 *Streptococcus mutans*, os isolados Sm1, Sm4, Sm5, Sm6, Sm7, Sm10, Sm11 e Sm12 e o *S. mutans* ATCC 700610. Foram feitos repiques das alíquotas congeladas em ágar CPS elite (bioMérieux®, Rio de Janeiro) para a confirmação da pureza e em tubos de ensaio com 4,5 mL de caldo BHIS que foram incubados em microaerofilia a 37 °C por 72 h.

Após o crescimento, os caldos foram homogeneizados em vortex (Biomixer, ALFAMARE Instrumentos Científicos e Médicos LTDA, Brasil) por 30 seg e 1,5 mL foi transferido para tubo Falcon com 13,5 mL de BHIS com uma escova estéril. Após a transferência, os tubos foram homogeneizados por 30 seg e incubados a 37 °C por 48 h para o crescimento do biofilme aderido na escova.

Após a incubação, a escova foi removida do caldo e lavada por 2 vezes em 15 mL de SFE para remoção das bactérias não aderidas ao biofilme. Em seguida a escova foi transferida para um terceiro tubo Falcon com 15 mL de SFE que foi submetido à sonicação em banho ultrassônico (ECOSONICS, MODELO Q3.8/40A) durante 5 minutos a temperatura ambiente seguido de agitação em vortex (Biomixer, ALFAMARE Instrumentos Científicos e Médicos LTDA, Brasil) por 30 seg para o desprendimento dos *S. mutans* associados ao biofilme. A escova foi descartada e a SFE remanescente foi diluída e plaqueada para contagem do número de células viáveis associadas ao biofilme maduro (Figura 7).

Figura 7. Quantificação dos *S. mutans* viáveis associados ao biofilme em escovas dentais.



4.2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificadas seis leveduras do gênero *Candida*, sendo 2 *Candida albicans*, 4 *Candida krusei*, além da cepa-padrão *Candida albicans* ATCC 10231. Também foram isoladas, 12 amostras sugestivas de estreptococos do grupo mutans, das quais 8 permaneceram no estudo, sendo identificadas como *Streptococcus mutans*.

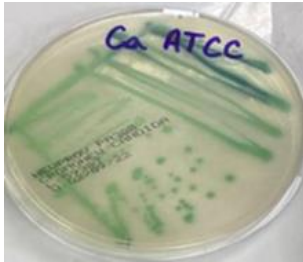
As leveduras apresentaram colônias grandes, esféricas, esbranquiçadas a amareladas, opacas, com centro levemente mais escurecido que as bordas e cheiro característico de pão (fermentação). Por meio da coloração de Gram, os isolados de *Candida sp.* apresentaram aspectos morfológicos sugestivos de leveduras. Os resultados obtidos na leitura visual das placas com o meio CROMONEW *Candida* demonstraram que os isolados Ck7, Ck8, Ck11 e Ck12 foram identificados como *Candida krusei*, devido a coloração roxa com borda esbranquiçada. As demais leveduras Ca2, Ca4 e CaATCC 10231 foram identificadas como *Candida albicans*, tendo em vista a coloração verde (Tabela 2).

A utilização de meio cromogênico apresenta algumas vantagens como resultados rápidos, fácil identificação e custo benefício, pois em uma mesma

placa é possível identificar mais de uma espécie de *Candida sp.* Devido a presença de substratos cromogênicos que liberam cromóforos específicos no meio de cultura, de acordo com as reações enzimáticas do micro-organismo específico é possível fazer a identificação por meio da leitura visual das colônias que apresentam diferentes colorações, conforme a espécie (CROMONEW CANDIDA, NEWPROV 2022).

Tabela 2. Identificação fenotípica das leveduras do gênero *Candida*

Cód ID	Ágar Cromonew Candida		Morfologia microscópica
	Morfologia Macroscópica	Imagens	
Ca2	Colônias verdes grandes, brilhosas e de superfície lisa		Levedura
Ca4	Colônias verdes grandes, brilhosas e de superfície lisa		Levedura
Ck7	Colônias roxas, com borda esbranquiçada, brilhosas, de superfície lisa e grandes		Levedura
Ck8	Colônias roxas, com borda esbranquiçada brilhosas, de superfície lisa e grandes		Levedura
			Levedura

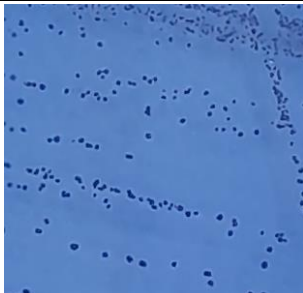
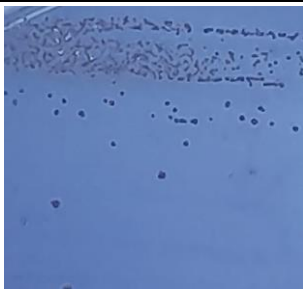
Ck11	Colônias roxas, com borda esbranquiçada brilhosas, de superfície lisa e grandes		Levedura
Ck12	Colônias roxas, com borda esbranquiçada, brilhosas, de superfície lisa e grandes		Levedura
CaATCC	Colônias verdes brilhosas, de superfície lisa e grandes		Levedura

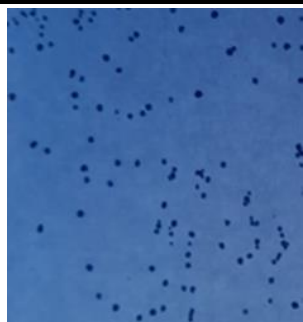
Fonte: Dados da pesquisa **Legendas:** Cod. ID.: código de identificação; Ca: *Candida albicans*; Ck: *Candida krusei*; Ca ATCC: *Candida* padrão pela American Type Culture Collection

As espécies das bactérias do gênero *Streptococcus* foram identificadas em meio diferencial ágar mitis salivarius acrescido de bacitracina e sacarose (AMS-BS). Os aspectos morfológicos das colônias permitiram a identificação e o isolamento de *Streptococcus mitis* (*Streptococcus viridans*) e *Streptococcus salivarius* (estreptococos não hemolíticos), conforme as instruções do fabricante evidenciadas anteriormente (Tabela 3).

Portanto, foram isoladas 12 amostras sugestivas de *Streptococcus*, das quais 8 permaneceram no estudo, sendo identificadas pela espécie como *S. mutans* conforme Tabela 3 de descrição fenotípica.

Tabela 3. Identificação fenotípica de bactérias do gênero *Streptococcus*

Cód ID	Ágar Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose		Morfologia microscópica
	Morfologia Macroscópica	Imagem	
Sm1	Colônias isoladas pequenas, aspecto brilhante, com centro elevado azul escuro e bordas irregulares		Cocos Gram +, de cadeias curtas e médias
Sm4	Colônias isoladas pequenas, aspecto brilhante, com centro elevado azul escuro e bordas irregulares		Cocos Gram +, de cadeias curtas e médias
Sm5	Colônias isoladas pequenas, aspecto brilhante, com o centro elevado azul escuro e bordas irregulares		Cocos Gram +, de cadeias curtas e médias
Sm6	Colônias isoladas pequenas, aspecto brilhante, com o centro elevado azul escuro e bordas irregulares		Cocos Gram +, de cadeias curtas e médias
Sm7	Colônias isoladas pequenas, aspecto brilhante, com o centro elevado azul escuro e bordas irregulares		Cocos Gram +, de cadeias curtas e médias

Sm10	Colônias isoladas pequenas, aspecto brilhante, com o centro elevado azul escuro e bordas irregulares		Cocos Gram +, de cadeias curtas e médias.
Sm11	Colônias isoladas grandes, com aspecto encapsulado transparente brilhante, com o centro elevado azul escuro e bordas irregulares		Cocos Gram +, de cadeias curtas e médias
Sm12	Colônias isoladas grandes, com aspecto encapsulado transparente brilhante, com o centro elevado azul escuro e bordas irregulares		Cocos Gram +, de cadeias curtas e médias
SmATCC 700610	Colônias isoladas grandes, com aspecto encapsulado transparente brilhante, com o centro elevado azul escuro e bordas irregulares		Cocos Gram +, de cadeias curtas e médias

Fonte: Dados da pesquisa **Legendas:** Cod. ID.: código de identificação; Sm: *Streptococcus mutans*; +: positivo.

Os *Streptococcus mutans* cresceram em AMS-BS com colônias isoladas de aspecto brilhante, com o centro elevado e arredondado, de borda irregular, de cor azul escuro, ao toque é incrustada e quebradiça. Ao microscópio foram identificados pela coloração Gram, cocos Gram-positivos, com células roxas de cadeias curtas ou médias.

São catalase negativos, indicando que não produz bolhas de oxigênio quando exposto ao peróxido de hidrogênio, fato que contribui na diferenciação de outros tipos de *Streptococcus* como o *S. gordonii* e o *S. sanguinis*, bem como para *Staphylococcus*, que são catalase-positivos. (KOVACS, FAUSTOFERRI & QUIVEY, 2017).

Em meio ágar sangue de carneiro produziram hemólise tipo alfa, indicando *Streptococcus viridans*. O teste de β -glucuronidase usando meio cromogênico Strep-B é efetivo para *Streptococcus agalactiae*. Seu uso para *S. mutans* resultou no crescimento de colônias isoladas azuis, sugerindo a presença da enzima. A produção de β -glucuronidase por essa bactéria, pode estar envolvida na hidrólise de certos compostos orgânicos, contribuindo para processos metabólicos e possivelmente afetando o ambiente bucal.

O *Streptococcus mutans* pela ação da enzima glicosiltransferase sintetiza polímeros de α -glucana intracelular e extracelular, solúvel e insolúvel (glucano) utilizando a sacarose como fonte de carbono. A maioria das cepas de *S. mutans* fermentam manitol e sorbitol, para produzir ácido (ZHOU & LI, 2020). Os resultados positivos obtidos, mostraram que através da turvação do caldo tioglicolato de sódio, os *S. mutans* fermentaram manitol e sorbitol.

O teste PYR é um ensaio padrão para a identificação presuntiva de estreptococos β hemolíticos do grupo A e enterococos, sendo para estes teste positivo. O substrato utilizado para o teste PYR é a L-naftilamida- β -naftilamida. Este composto é hidrolisado por uma enzima aminopeptidase bacteriana específica. Hidrólise do substrato por esta enzima libera β -naftilamida livre, que é detectada pela adição de N, N dimetilaminocinamaldeído. Este reagente de detecção acopla-se à naftilamida para formar uma base de Schiff vermelha, sinalizando o teste-positivo (KONEMAN *et al.*, 2017).

Caso isso não ocorra, a coloração resultante é amarela e o teste é negativo, indicando *Streptococcus* alfa hemolíticos, como os resultados obtidos neste estudo. Os resultados de todos os testes realizados para o

isolamento, identificação e caracterização de *S. mutans* estão sintetizados na tabela 4 a seguir.

Tabela 4. Testes de identificação fenotípica de *S. mutans*

Testes	<i>Streptococcus mutans</i>							
	Sm1	Sm4	Sm5	Sm6	Sm7	Sm10	Sm11	Sm12
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemólise	α	α	α	α	α	α	α	α
β-glucuronidase	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol / Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Teste PYR	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Dados da pesquisa **Legendas:** Sm: *Streptococcus mutans*; -: negativo; +: positivo; α: alfa.

Na avaliação da capacidade de formação do biofilme, as cepas foram quantificadas com o método de cristal violeta conforme citado anteriormente e todas as leveduras foram capazes de formar biofilme nas condições testadas.

As leveduras foram classificadas quanto ao perfil de formação de biofilme em 4 (57,15%) formadoras fortes - Ca4, Ck7, Ck8, Ck11; 2 (28,57%) formadoras moderadas - Ca2 e Ck12 e 1 (14,28%) formadora fraca - CaATCC (Tabela 5).

Os isolados Ck7, Ck11, Ca4 e Ck8 obtiveram as maiores DO_{600nm} de **2,811±0,361**, **2,005±0,688**, **1,422±0,492** e **1,044±0,175**, respectivamente. Por outro lado, CaATCC (**0,232±0,082**), Ck12 (**0,433±0,104**) e Ca2 (**0,626±0,179**) foram as leveduras com menor biomassa associada ao biofilme.

Nos ensaios de contagem das leveduras associadas aos biofilmes foi observado que o número de leveduras presentes nos inóculos iniciais foi, em média, de $6,11E+05$ ufc mL⁻¹. Após a incubação dos biofilmes por 48 h e o processamento das amostras para a determinação das leveduras associadas aos biofilmes, os isolados Ck8 ($2,48E+06$), Ck7 ($2,39E+06$), Ck11 ($9,37E+05$),

Ca2 (4,70E+05) e Ck12 (3,95E+05) apresentaram as maiores contagens, e Ca4 (8,90E+04) e CaATCC (2,43E+04), as menores.

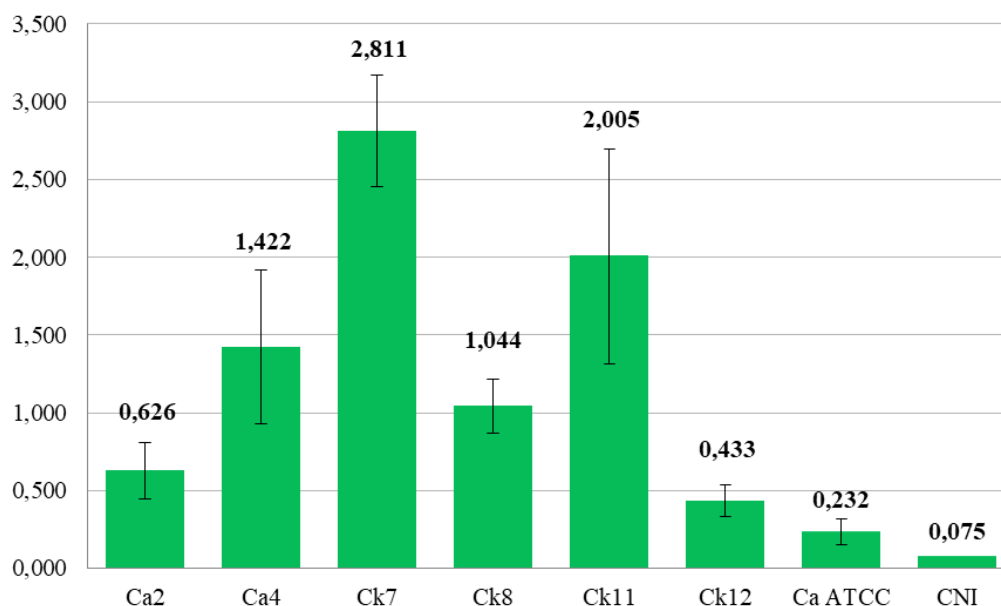
Tabela 5. Formação de biofilme de *Candida sp.*

<i>Candida sp.</i>	DO _{600nm}		Classificação	Contagens (ufc mL ⁻¹)	
	Média	± DP		Média	± DP
Ca2	0,626	± 0,179	Moderada	4,70E+05	± 5,66E+04
Ca4	1,422	± 0,492	Forte	8,90E+04	± 6,36E+04
Ck7	2,811	± 0,361	Forte	2,39E+06	± 1,79E+06
Ck8	1,044	± 0,175	Forte	2,48E+06	± 4,66E+06
Ck11	2,005	± 0,688	Forte	9,37E+05	± 1,34E+06
Ck12	0,433	± 0,104	Moderada	3,95E+05	± 2,09E+05
Ca ATCC	0,232	± 0,082	Fraca	2,43E+04	± 1,55E+03
CNI	0,075	± 0,007	-	-	-

Fonte: Dados da pesquisa **Legendas:** DO_{600nm}: Densidade óptica de 600 nm; DP: desvio padrão; Ca: *Candida albicans*; Ck: *Candida krusei*; ATCC: *American Type Culture Collection*; CNI: Controle não inoculado.

A correlação entre a biomassa total e a contagem do número de células viáveis associadas ao biofilme de *Candida sp.* foi positiva para a maioria dos isolados. Entretanto, para os isolados Ca4, Ck11 e CaATCC foi observada uma menor contagem de leveduras sem que fosse observado o mesmo grau de diminuição da biomassa total, conforme figura 8. A escova dental sofre deposição e proliferação de micro-organismos em suas cerdas durante seu uso.

Figura 8. DO_{600nm} biomassa total de biofilme de *C.albicans* e *C. krusei*



Fonte: Dados da pesquisa **Legendas:** Ca: *Candida albicans*; Ck: *Candida krusei*; ATCC: American Type Culture Collection; CNI: Controle não inoculado.

Na cavidade oral, pode ocorrer uma coadesão entre *C. albicans* e bactérias orais, sendo crucial para a colonização e persistência de *C. albicans*. Nesse sentido, a um interesse, em se concentrar no papel da coagregação de *C. albicans* com *S. mutans* durante a adesão às superfícies dentárias, pois, a uma hipótese da associação entre *S. mutans* e *C. albicans* que é baseada em seus mecanismos de virulência e características bioquímicas, assim como em fatores do hospedeiro que fornecem um ambiente bucal que favorece a ação dos micro-organismos em questão (METWALLI *et al.*, 2013).

Os isolados de *S. mutans* foram selecionados quanto à sua produção de biofilme pelo método de placa de microtitulação, que fornece uma medição precisa da formação de biofilme por micro-organismos (ZAYED *et al.*, 2021).

A avaliação do perfil de formação forte de *S. mutans* testados, sugere o quão aderente esse micro-organismo é em superfícies sólidas como o dente ou as cerdas das escovas. Todos os *S. mutans* na cavidade oral formam biofilmes que aderem às superfícies dos dentes (MELOK *et al.*, 2018). A escova dental sofre deposição e proliferação de micro-organismos em suas cerdas durante seu uso. Foi demonstrado a correlação entre a carga microbiana nas escovas de dente e o estado dentário do paciente (ROCHA, 2022). Fato este que corrobora com os resultados obtidos, confirmando que

todos os *Streptococcus mutans* foram formadores fortes de biofilme (Tabela 6).

Os maiores formadores de biofilme foram Sm1 e Sm12 com DO_{600nm} de **3,290±0,414** e **3,234±0,432**, respectivamente. Os *S. mutans* Sm11 (**2,734±0,445**) e Sm5 (**2,993±0,367**) foram as bactérias com as menores leituras, apesar da diferença não ser significativa a ponto de mudar o status de formadores fortes.

Nos ensaios de contagem das bactérias associadas aos biofilmes, foram observadas turvações características de crescimento microbiano nos tubos com BHIS e escovas após a incubação. Após o processamento das escovas, os isolados Sm10 (8,47E+07), Sm7 (7,23E+07) e Sm6 (7,18E+07) apresentaram os maiores valores de contagem de bactérias. As menores contagens bacterianas foram observadas para Sm11 (1,45E+07), Sm12 (2,03E+07) e Sm1 (2,54E+07).

Tabela 6. Formação de biofilme de *Streptococcus mutans*.

<i>S. mutans</i>	DO _{600nm}		Classificação	Contagens (ufc mL ⁻¹)	
	Média	± DP		Média	± DP
Sm1	3,290	± 0,414	Forte	2,54E+07	± 6,60E+06
Sm4	3,156	± 0,310	Forte	6,43E+07	± 1,73E+07
Sm5	2,993	± 0,367	Forte	5,46E+07	± 5,22E+07
Sm6	3,085	± 0,413	Forte	7,18E+07	± 5,85E+07
Sm7	3,094	± 0,384	Forte	7,23E+07	± 2,17E+07
Sm10	3,106	± 0,380	Forte	8,47E+07	± 4,68E+07
Sm11	2,734	± 0,445	Forte	1,45E+07	± 1,07E+07
Sm12	3,234	± 0,432	Forte	2,03E+07	± 7,02E+06

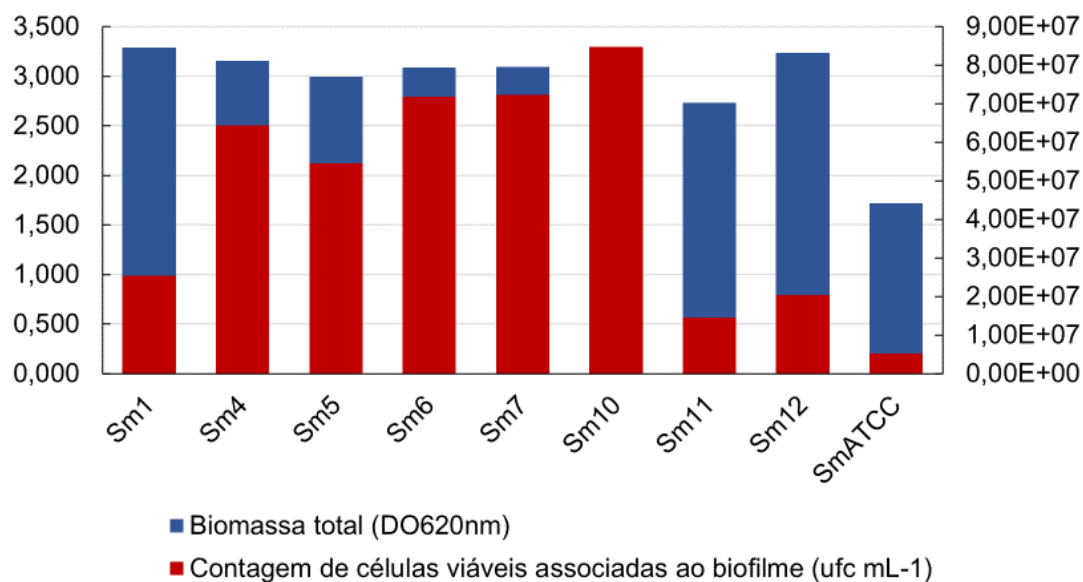
SmATCC	1,721 ± 0,125	Forte	5,25E+06 ± 2,05E+06
CNI	0,112 ± 0,007	-	- -

Fonte: os autores

Legendas: DO_{600nm}: Densidade óptica de 600 nm; DP: Desvio padrão; Sm: *Streptococcus mutans*; CNI: Controle não inoculado

A correlação entre a biomassa total dos biofilmes e a contagem do número de células viáveis aderidas de *S. mutans* em escovas dentais, está apresentada na Figura 9. A comparação entre os resultados de ambas técnicas demonstrou correlação entre elas para a maioria dos isolados. Entretanto, para os isolados Sm1, Sm11 e Sm12 foi observada uma menor contagem de bactérias sem que fosse observado o mesmo grau de diminuição da biomassa total.

Figura 9. Correlação entre biomassa total dos biofilmes e contagem de células associadas para *S. mutans*



Fonte: os autores

Legendas: DO_{620nm}: Densidade óptica de 620 nm; Sm: *Streptococcus mutans*; ATCC: American Type Culture Collection

As escovas dentais mantêm micro-organismos viáveis em suas cerdas, como predomínio de cocos Gram-positivos que podem causar periodontopatias aos seus usuários (PINTO, PAIVA e PIMENTA, 1997). A observação do crescimento de colônias isoladas de *S. mutans* nas cerdas de escovas confirmou que devemos adotar cuidados relacionados ao armazenamento e higiene das escovas dentais.

A escovação dentária é importante na promoção da manutenção saúde bucal. A diversidade metabólica e a capacidade de adaptação a stresses ambientais são características fundamentais dos micro-organismos da boca. As bactérias orais existem como células planctônicas (de vida livre), ou como células sésseis (como biofilmes). As células planctônicas são importantes para a rápida proliferação e propagação dos micro-organismos para novos territórios, enquanto que as células sésseis caracterizam a cronicidade (TRENTIN *et al.*, 2013).

A biomassa total é a quantidade de matéria orgânica presente no biofilme formado por bactérias, é revelada pela reação que envolve o cristal violeta e o exopolissacarídeo desse biofilme. Os biofilmes são compostos por uma população de células microbianas que estão aderidas entre si e à superfície sólida. Essas células microbianas estão embutidas em uma matriz extracelular viscosa, composta por substâncias extracelulares como exopolissacarídeos, proteínas e lipídios (DAVE *et al.*, 2016).

Um dos papéis fisiológicos característicos do exopolissacarídeo é a formação de biofilme sobre o substrato sólido. Exopolissacarídeos exibem um comportamento semelhante a cola; portanto, esses polissacarídeos integram a maior parte do processo de formação do biofilme no substrato sólido (RANA, UPADHYAY, 2020).

A adesão bacteriana em superfícies abióticas inanimadas, como plásticos e metais, é o primeiro estágio na formação reversível de biofilmes, sendo mediada por interações físico-químicas não específicas com receptores superficiais bacterianos (DUNNE, 2002). Interações físicas diretas entre células individuais medeiam arranjos arquitetônicos do biofilme e fornecem proximidade espacial para comunicação química e cooperação metabólica (DIAZ, VALM, 2020).

Bactérias em biofilmes constituem populações heterogêneas com variada taxa de crescimento. A heterogeneidade dos biofilmes depende de parâmetros físicos e químicos, como as condições ambientais às quais estão expostos e a atividade metabólica das bactérias dentro dos biofilmes (STEUART, FRANKLIN, 2008).

4.2.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação das leveduras com o meio cromogênico Cromonew Candida, evidenciou que os isolados são *Candida albicans* e *Candida krusei*. Enquanto para a identificação de bactérias em meio ágar mitis salivarius (AMS-BS) foi confirmado isolados de *Streptococcus mutans*, fato provado pelos testes de coloração Gram, catalase, hemólise, beta-glicuronidase, fermentação de manitol e sorbitol e teste PYR.

A identificação das diferentes espécies de estreptococos do grupo mutans, presentes em amostras de saliva ou de biofilme, inicialmente é baseada no reconhecimento das diferenças morfológicas das colônias que se desenvolveram no meio de cultura seletivo (SARAVIA, 2010). Identificar e isolar os micro-organismos permite a compreensão morfológica, fato que é importante para o tratamento correto de infecções.

Tanto os isolados de *Candida sp.* quanto os de *S. mutans* foram capazes de formar biofilme nos ensaios de biomassa total e na quantificação dos micro-organismos viáveis aderidos nos microtubos e nas escovas dentais.

Os resultados da quantificação da biomassa total através do método cristal violeta se correlacionaram com os das contagens de bactérias viáveis aderidas às escovas para a maioria dos isolados. Deste modo, concluímos que o perfil de formação de biofilme dos *Streptococcus mutans* em escovas dentais reforça a necessidade de estudos complementares para o desenvolvimento dessa estrutura.

4.2.5. REFERÊNCIAS

- AAS, J. A.; GRIFFEN, A. L.; DA RDIS, S. R.; LEE, A. M.; OSLEN, I., DEWHIRST, F.E.; LEY, E.J.; PASTER, B. J. Bacteria of dental caries in primary and primary and permanent teeth in children and young adults. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.4, p.1407-1417. 2008. doi: 10.1128/JCM.01410-07
- ALMEIDA, A.K.; GUIMARÃES, M. do C.M.; GRISI, D. C.; DAME-TEIXEIRA, N. Doença cárie em portadores de diabetes mellitus: uma revisão narrativa da literatura. **Oral Sci.** vol. 9, nº 1, p. 18-23. 2017.
- BARBIERI, D.S.V.; VICENTE, V. A.; FRAIZ, F.C.; LAVORANTI, O.J.; SVIDZINSKI, T.I.E. PINHEIRO; R.L. Analysis of the in vitro adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38 (4), 624-631.2007. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000400009>.
- BHATTACHARYA S, SAE-TIA S, FRIES BC. *Candidiasis* and Mechanisms of Antifungal Resistance. **Antibiotics (Basel)**. v. 9 p.312. 2020 doi: 10.3390/antibiotics9060312.
- BRITO, A. C.M.; BEZERRA, I. M.; BORGES, M. H. DE S.; SILVA, R. DE O. DA.; GOMES FILHO, F. N.; ALMEIDA, L. DE F. D. Adesão de biofilmes monoespécies de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* em diferentes superfícies de resina compostas convencionais e bulk fill. **Revista de Odontologia da UNESP**, 49, e20200015. 2020. <https://doi.org/10.1590/1807-2577.01520>.
- CHAMLAGAIN, M.; HU J.; SIONOV RV.; STEINBERG D. Anti-bacterial and anti-biofilm activities of arachidonic acid against the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. **Front Microbiol.** v. 15 1333274, 2024. doi: 10.3389/fmicb.2024.1333274.
- CORIOLOANO, D. L. *et al.* Antibacterial and antibiofilm potential of silver nanoparticles against antibiotic-sensitive and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 267-278, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00406-x>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42770-020-00406-x>.
- FEJERSKOV, O.; NYVAD, B.; KIDD, E. **Cárie dentária: fisiopatologia e tratamento** 3ª. Ed. São Paulo: Santos, 2017.
- 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 Medicine Microbiology**. v.301,n.5, p. 384-389. 2011. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1993-7>.
- JIN, L.; 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.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C.; WIN, W.C. The Gram-positive cocci part II: streptococci, enterococci and the 'Streptococcus-like' bacteria. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 7th. New York: Lippincott; 2017. 577-649.

LEITES, A.C.B.R.; PINTO, M. B.; SOUSA, E. R. Aspectos microbiológicos da cárie dental. **Salustivita**. v.25, n.2, p.239-52, 2006.

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>.

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

METWALLI, K. H.; KHAN, S.A.; KROM, B.P.; JABRA-RIZK, M.A. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. **PLoS pathogens**. v. 9, n. 10, 1003616. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003616>.

NEWPROV PRODUTOS PARA LABORATÓRIO LTDA. Cromonew Candida. Paraná, 16 jun 2022. Bula. (CROMONEW CANDIDA, NEWPROV 2022).

NOMURA, H.; ISSHIKI, Y.; SAKUDA, K.; SAKUMA, K.; KONDO, S. Effects of oakmoss and its components on biofilm formation of *Legionella pneumophila*. **Biol Pharm Bull**. v.36, n.5, p. 833–837. 2013. doi: 10.1248/bpb.b12-01047.

QIAN, DU; BIAO, REN; JINZHI, HE; XIAN, PENG; QIANG, GUO; LIWEI, ZHENG; JIYAO, LI; HUANQIN, DAI; VIVIAN, CHEN; LIXIN, ZHANG; XUEDONG, ZHOU; XIN, XU. *Candida albicans* promotes tooth decay by inducing oral microbial dysbiosis. **The ISME Journal**. v.15, Issue 3, Pages 894–908. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00823-8>.

ROCHA, R. M. **Associação da quitosana e clorexidina contra formação de biofilmes por estreptococos do grupo mutans e *Candida sp.* em escovas dentais**. Anápolis, 2022. Disponível em: <http://www.bdttd.ueg.br/handle/tede/1123>

RODRIGUES, A.C. **Análise proteômica de biofilme dentário em crianças portadoras de hipomineralização molar-incisivo (HMI)**. 2019. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2019.

SARAVIA, 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.

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.

SIMÕES, R.J.; FONSECA, P.; FILGUEIRAL, M. H. Infecções por *Candida* spp na Cavidade Oral. **Odontologia Clínico-Científica**. v.12, n.1, p.19-22. 2013.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu Rev Microbiol**. v. 56, p. 187-209. 2002. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160705.

WANG, Y.; SHEN, X.; MA, S.; GUO, Q.; ZHANG, W.; CHENG, L.; DING, L.; XU, Z.; JIANG, J.; GAO, L. Oral biofilm elimination by combining iron-based nanozymes and hydrogen peroxide-producing bacteria. **Biomater Sci**. v.7, n.8, p. 2447-2458. 2020.doi: 10.1039/c9bm01889a.

ZAYED, S.M.; ABOULWAFI, M.M.; HASHEM, A.M.; SALEH, S.E. Biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its inhibition by green tea extracts. **AMB Express**. v.25; n. 11, p. 73. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01232-6>.

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

4.3. Artigo 3

ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA CONTRA *Candida sp.* ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL

Maria José Barbaresco, João Salviano Simões Chagas da Silva, Francisco
Nunes de Souza Neto, Luciana Rebelo Guilherme, Plínio Lázaro Faleiro
Naves

Resumo

O biofilme de *Candida sp.* é de difícil controle devido a fraca penetração e inespecificidade dos antifúngicos contra os micro-organismos associados a esta estrutura. Diferentes nanopartículas são investigadas devido ao potencial antimicrobiano e nesse contexto, o presente estudo avalia a atividade antibiofilme de nanopartículas de prata contra *Candida* isoladas da cavidade bucal. As nanopartículas de prata foram sintetizadas com duas sínteses etanólicas distintas e caracterizadas por UV-vis, AAS potencial zeta, DLS, MET/SAED. Posteriormente, foram avaliadas contra a formação de biofilme pelas leveduras com a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI), Concentração Mínima Fungicida (CMF) e da Concentração Mínima Inibitória da Formação de Biofilme (CMIB₅₀). Foram obtidas nanopartículas esféricas, com tamanho homogêneo, próximo à monodispersão e com estabilidade coloidal devido a capa de PVP. A nanopartícula AgNP(1) apresentou a concentração de prata de 3870 µg mL⁻¹ e maior diâmetro que a AgNP(2) que apresentou 3950 µg mL⁻¹ de íons prata. Ambas nanopartículas foram ativas contra as leveduras e apresentaram atividade antibiofilme. Todas as leveduras formaram biofilme e AgNP(1) inibiu a formação de biofilme com concentrações entre 7,55 e 60,46 µg mL⁻¹ e AgNP(2) entre 7,71 e 30,80 µg mL⁻¹. A nanopartícula AgNP(2), sintetizada em meio reacional com hidróxido de amônio, foi a mais efetiva e inibiu a formação de biofilme de todas as leveduras com concentrações subinibitórias. As nanopartículas de prata foram ativas contra a formação de biofilme de *C. albicans* e *C. krusei* e podem representar alternativas inovadoras e complementares ao arsenal antifúngico disponível.

Palavras-chave: biofilme; leveduras; AgNP; *Candida krusei*; *Candida albicans*; antifúngico.

Abstract

Candida sp. biofilms are difficult to control due to poor penetration and the lack of specificity of antifungal drugs against the associated microorganisms. Different nanoparticles have been investigated for their antimicrobial potential and in this context, the present study evaluates the antibiofilm activity of silver nanoparticles against *Candida* isolated from the human oral cavity. The silver nanoparticles were synthesized using two different ethanolic syntheses and characterized by UV-vis, AAS zeta potential, DLS, MET/SAED. Subsequently, they were evaluated against biofilm formation by yeasts by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Fungicidal Concentration (MFC) and Minimum Biofilm Formation Inhibitory Concentration (MBIC₅₀). Spherical nanoparticles were obtained, with a homogeneous size, close to monodispersion and with colloidal stability due to the PVP coating. The AgNP(1) nanoparticle had a silver concentration of 3870 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and was larger in diameter than AgNP(2), which had 3950 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of silver. Both nanoparticles were active against yeasts and showed antibiofilm activity. All the yeasts formed biofilms and AgNP(1) inhibited biofilm formation at concentrations between 7.55 and 60.46 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and AgNP(2) between 7.71 and 30.80 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The AgNP(2) nanoparticle, which was synthesized in an ammonium hydroxide reaction medium, was the most effective and inhibited the biofilm formation of all the yeasts at subinhibitory concentrations. Silver nanoparticles were active against the biofilm formation of *C. albicans* and *C. krusei* and can represent innovative and complementary alternatives to the available antifungal arsenal.

Keywords: biofilm; yeast; AgNP; *Candida krusei*; *Candida albicans*, antifungal.

4.3.1 INTRODUÇÃO

Apesar das leveduras do gênero *Candida* coexistirem na microbiota humana normal das mucosas e da pele, são agentes etiológicos de infecções da cavidade oral, trato gastrointestinal, respiratório e urogenital. Isso decorre devido ao fato de que, sob certas condições, aumentam a afinidade às mucosas do que à pele e comportam-se como patogênicas (MARAK E BIRANTHABAIL, 2018; SAHAL E BILKAY, 2018).

Desta forma, as infecções causadas por *Candida sp.* estão associadas a fatores como a diminuição da imunidade, distúrbios endócrinos, lesões de tecidos moles, má higiene bucal, terapia prolongada com antibióticos, hormônios e outros. A variedade de manifestações clínicas da candidíase oral reflete a diversidade das inúmeras condições pré-determinantes (MOREIRA *et al.*, 2001).

A candidíase orofaríngea é a infecção oral mais prevalente em pacientes imunocomprometidos, associada principalmente à *Candida albicans*, contudo há evidências apontam para um papel significativo das bactérias da mucosa na transição de *C. albicans* de comensal para patogênica (BERTOLINI *et al.*, 2021).

Além disso, a candidíase oral foi descrita como processos infecciosos mistos fúngico-bacterianos, nos quais interações específicas com certas bactérias podem promover a transição fúngica de comensal para patogênico (XU *et al.*, 2014). *Candida albicans* foi detectada em lesões envolvendo a raiz do dente - cárie radicular. A colonização por *C. albicans* aumentou a cariogenicidade do biofilme na cavidade oral, alterando a ecologia microbiana, levando a um biofilme polimicrobiano com maior acidogenicidade e aumentando a desmineralização dentária e a gravidade da cárie (QIAN *et al.*, 2021).

A capacidade de formar biofilmes é um relevante fator na virulência de algumas espécies de *Candida*, pois aumenta a resistência aos tratamentos antifúngicos, limitando a penetração de substâncias através da matriz e

protegendo as células das respostas imunes do hospedeiro (MALINOVSKA, CONKOVÁ e VÁCZI, 2023).

Antifúngicos eficazes contra *C. albicans* na forma planctônica, podem não ser eficazes contra *C. albicans* associadas a biofilmes ainda que concentrações mais elevadas podem aumentar a eficácia contra biofilmes, podem causar efeitos colaterais graves ao hospedeiro, como danos renais ou hepáticos (LOHSE *et al.*, 2018).

Nanopartículas de prata têm recebido atenção como materiais antibiofilme devido a suas potentes atividades antibacterianas (GEISSEL *et al.*, 2022). O mecanismo de interação das nanopartículas de prata com biofilmes bacterianos, é um determinante significativo da patogenicidade. Vários estudos têm demonstrado que as nanopartículas de prata causam estresse oxidativo, disfunção proteica, ruptura de membrana e danos ao DNA, levando à morte microbiana, também podem alterar a adesão de células para impedir a formação de biofilme (MORE *et al.*, 2023).

As nanopartículas de prata possuem atividade contra leveduras resistentes aos antifúngicos disponíveis (YIN *et al.*, 2020). A adição de nanomateriais com atividade antimicrobiana às superfícies dentais para inibir a formação de biofilmes é outra interessante linha de investigação (DORGHAM *et al.*, 2022).

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a atividade antibiofilme de nanopartículas de prata contra leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal.

4.3.2 METODOLOGIA

Trata-se de um estudo experimental de caráter quantitativo no qual foram avaliadas sete leveduras identificadas como 4 *Candida krusei* e 2 *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de voluntários (Comitê de Ética em Pesquisa da UEG - parecer nº3.604.978) e a cepa padrão *Candida albicans* ATCC 10231 pertencentes à coleção de micro-organismos do

Laboratório de Bioensaios do Centro de Pesquisa e Pós-Graduação (LabBio-CPPG) da Universidade Estadual de Goiás.

4.3.2.1 Síntese e caracterização das nanopartículas

As dispersões coloidais de prata foram sintetizadas por meio da redução alcóolica de prata e caracterizadas de acordo com a metodologia descrita por LEE e OH, 2015. Brevemente, a uma solução alcóolica de nitrato de prata (AgNO_3) foi adicionada uma solução alcóolica de polivinilpirrolidona (PVP) como agente estabilizante, após 4h de aquecimento obteve-se o coloide AgNP(1). O coloide AgNP(2) foi preparado nas mesmas condições, diferindo apenas pela adição de 0,3 mL de hidróxido de amônio após 4h de síntese.

A caracterização das dispersões coloidais foi realizada com a confirmação das propriedades ópticas das nanopartículas de prata em espectrofotômetro ultravioleta/visível 5100 (Metash, Shanghai, China), com a determinação da concentração dos íons prata por meio de absorção atômica com espectrofotômetro AAnalyst 400 (Perkin Elmer, Shelton, Connecticut, USA). A verificação da carga elétrica e estabilidade coloidal, a determinação da distribuição do tamanho das amostras e a avaliação do diâmetro hidrodinâmico dos átomos de prata de dentro dos agregados foram realizadas por análise do potencial zeta, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e índice de dispersão (ID_H) no equipamento Zetasizer pro Blue unit (Malvern panalytical, Malvern, Reino Unido). As características morfológicas foram examinadas por microscopia eletrônica de transmissão com um microscópio eletrônico de transmissão (MET) equipado com EDS, Thermo scientific, operando em 200 Kv (JEM-2100, Jeol, Tokyo, Japan).

Os resultados foram organizados no aplicativo *Google Sheets* (Google, Mountain View, Califórnia, EUA) e permitiram a construção de gráficos e análises estatísticas no *OriginPro 8.5* (Originlab, Northampton, EUA). As imagens obtidas na MET foram analisadas com *ImageJ* do (National Institutes for Health, Bethesda, EUA).

4.3.2.2 Ensaio de formação de biofilme

A formação de biofilme foi avaliada com a detecção da biomassa total pelo método do cristal violeta descrito por Zayed *et al.* (2021), com algumas modificações e com a contagem do número de leveduras associadas ao biofilme. Os inóculos leveduriformes foram obtidos com a suspensão de colônias crescidas em solução fisiológica estéril (SFE) e ajuste da turbidez com a escala 0,5 de McFarland. Posteriormente, foram transferidos 500 µL dos inóculos para tubos contendo 4500 µL de caldo infusão de cérebro e coração bovino adicionado de 2 % de sacarose (BHIS), em seguida 200 µL dos inóculos foram transferidos assepticamente para microplacas de poliestireno de 96 poços com fundo plano (Cralplast, Cral, Cotia, São Paulo, Brasil) que foram incubadas a 35,5 °C por 48 h.

Após a incubação, as microplacas foram processadas com a remoção do caldo com crescimento total, lavagem dos poços, fixação dos biofilmes com etanol 96° e coloração com cristal violeta a 0,1 %. Depois as densidades ópticas (DO_{620nm}) dos biofilmes aderidos foram lidas em espectrofotômetro de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific, USA). O valor médio das DO_{620nm} obtidas nos poços controle não inoculados foi utilizado como referência para a classificação da formação de biofilme em forte, moderada, fraca ou não formadora. Todas as leveduras foram testadas em triplicatas independentes totalizando 24 poços e os resultados obtidos foram organizados como médias e desvios padrão.

A quantificação das leveduras viáveis associadas aos biofilmes foi determinada com incubação de 100 µL dos inóculos das leveduras em microtubos Eppendorf com 900 µL de caldo BHIS a 35,5 °C por 48 h. Em seguida, os microtubos foram processados com a remoção asséptica dos caldos crescidos após as 48 h de incubação, lavagem por 3 vezes em SFE e desprendimento das células aderidas com sonicação por 5 minutos e homogeneização em vortex (Biomixer, ALFAMARE Instrumentos Científicos e Médicos LTDA, Brasil) por 30 segundos, diluição e plaqueamento para

contagem do número de leveduras associadas ao biofilme maduro. Todas as leveduras foram testadas em triplicatas independentes e os resultados obtidos foram organizados como médias e desvios padrão.

4.3.2.3 Atividade antimicrobiana das nanopartículas

As leveduras foram submetidas ao teste de microdiluição em caldo para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima fungicida (CMF) das nanopartículas com adaptação do método preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* para testes de susceptibilidade antimicrobiana (WAYNE, 2018). As nanopartículas de prata foram diluídas em microplacas de fundo redondo (Olen, China) nas concentrações de 1548 a 12,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para AgNP(1) e de 1580 a 12,34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para AgNP(2).

As suspensões das leveduras foram preparadas com a dissolução de colônias isoladas típicas em SFE e a densidade dos inóculos foi ajustada com a escala 0,5 de McFarland. Após o ajuste, foi realizada a diluição de 1:10 em caldo BHIS e em seguida, 20 μL dos inóculos foram transferidos para os poços das microplacas.

A CMI foi determinada por meio da leitura visual da menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento leveduriforme após incubação a 35,5 °C por 48 h. A CMF foi definida como a menor concentração dos extratos capaz de inibir a recuperação de leveduras viáveis após a transferência de 100 μL do caldo BHIS dos poços sem turvação detectável para placas com ágar CPS (Biomérieux, Brasil) após a incubação das a 35,5 °C por 48 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas independentes e os valores da CMI e CMF foram obtidos.

4.3.2.4 Atividade das nanopartículas contra a formação de biofilme

A atividade das nanopartículas de prata contra a formação de biofilme das leveduras foi avaliada conforme descrito anteriormente no ensaio de biomassa total do biofilme (ZAYED *et al.*, 2021). As concentrações de 967,50

a $7,55 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AgNP(1) e de 987,50 a $7,71 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AgNP(2) foram testadas em microplacas de fundo plano (Cralplast, Cral, Cotia, São Paulo, Brasil) e as $\text{DO}_{620\text{nm}}$ dos biofilmes formados na presença das concentrações das nanopartículas foram comparadas com controles não tratados e as menores concentrações capazes de inibir ao menos 50% a formação de biofilme foram consideradas como Concentração Mínima Inibitória da Formação de Biofilme (CMIB_{50}) (MARTINEZ *et al.*, 2021).

4.3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Duas nanopartículas de prata diferentes foram obtidas: AgNP(1) e AgNP(2) com adição de hidróxido de amônio no meio reacional. A síntese alcoólica foi realizada com hidróxido de amônio com o objetivo de estabilizar o tamanho e distribuição das nanopartículas formadas. As características das nanopartículas sintetizadas estão mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização das nanopartículas de prata

Características	AgNP(1)	AgNP(2)
Concentração de íons prata ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	3870	3950
Propriedades ópticas das nanopartículas de prata - comprimento de onda (nm)	418	407
Carga elétrica e estabilidade coloidal (mV)	-0,201	-1,784
Distribuição de tamanho dos agregados (nm)	154,2	108,3
Diâmetro hidrodinâmico dos átomos de prata de dentro dos agregados (nm)	0,32	0,45
Tamanho das nanopartículas (nm)	7,37	11,40
Forma das nanopartículas	Esférica	Esférica

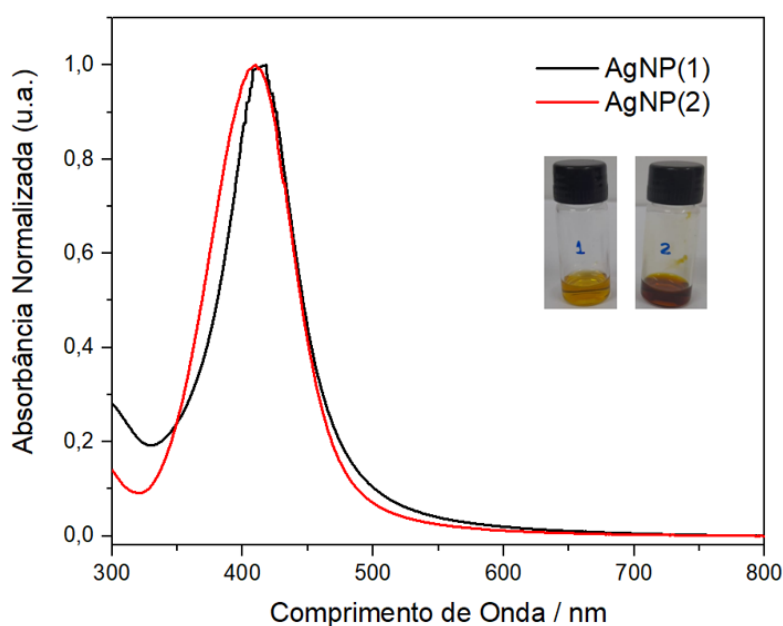
Índice de Dispersão do MET	1,90	0,015
	Polidisperso	Monodisperso
Cristalinidade	Cúbico de face centrada	Cúbico de face centrada

Fonte: Dados da pesquisa

A concentração dos íons prata encontrada foi de $3870 \mu\text{g mL}^{-1}$ para AgNP(1) e de $3950 \mu\text{g mL}^{-1}$ para AgNP(2).

Nos resultados obtidos por UV-vis foi possível observar uma forte banda plasmônica centrada em 418 nm para AgNP(1) e 407 nm para AgNP(2), característico de nanopartículas de prata esféricas e de coloração amarela (Figura 1).

Figura 1. Espectro de absorvância no UV-vis para AgNP(1) e AgNP(2)

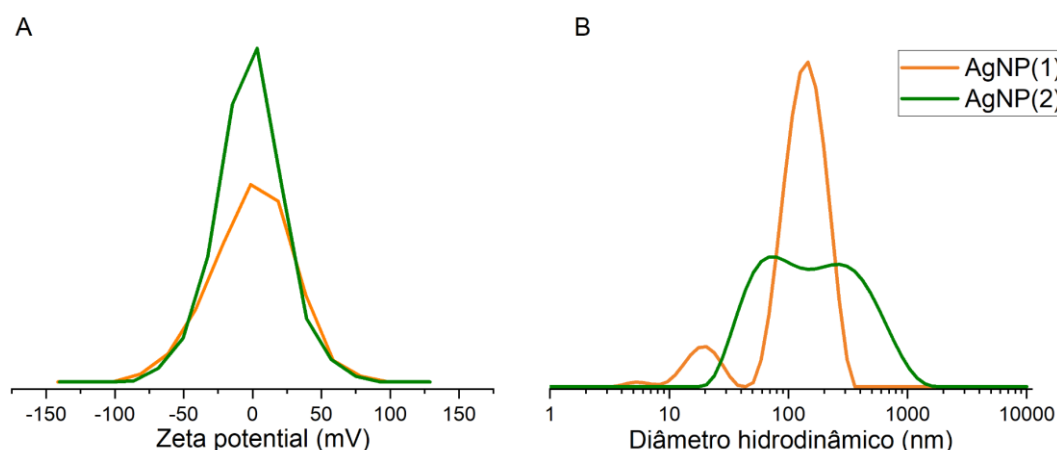


Fonte: Dados da pesquisa

As nanopartículas de prata apresentaram valores próximos à 0 mV na determinação do potencial zeta (-0,201 mV para AgNP(1) e -1,784 mV para AgNP(2)), como mostra a figura 2B. Sugerindo que a estabilidade coloidal das amostras ocorre principalmente, por meio do impedimento estérico (repulsão

estérica) causado pela presença do PVP que atua como estabilizante. Um valor de potencial zeta de ± 30 mV, é geralmente aceito como o limite de estabilidade (VAZQUEZ-MUÑOZ, BOGDANCHIKOVA e HUERTA-SQUERO, 2020). Neste caso a estabilidade coloidal ocorreu devido a capa de PVP formada.

Figura 2. A) Potencial zeta (mV) B) Diâmetro hidrodinâmico (nm)

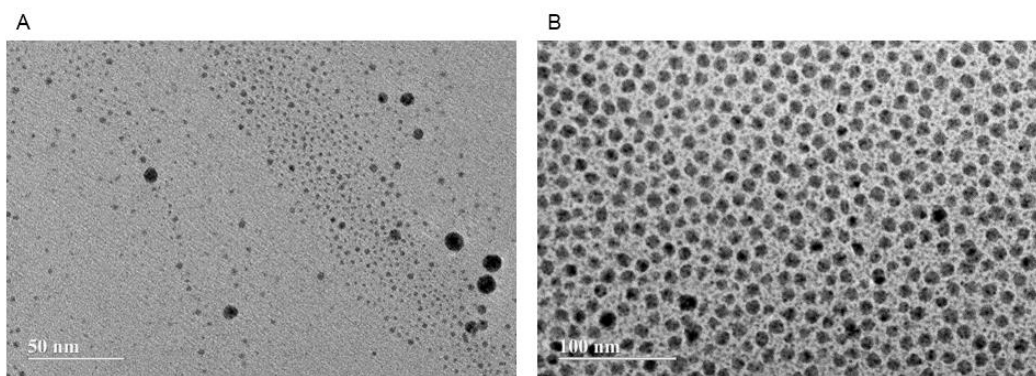


Fonte: Dados da pesquisa

A distribuição de tamanho detectada pelo DLS, demonstrou que a AgNP(1) teve o tamanho de 154,2 nm e que a AgNP(2), 108,3 nm e que as nanopartículas de prata podem estar envoltas em um agregado. Os índices de dispersão dos diâmetros hidrodinâmicos (ID_H) foram de 0,32 e 0,45 nm para AgNP(1) e AgNP(2), respectivamente. Esses resultados demonstraram que as distribuições de tamanho do diâmetro hidrodinâmico são homogêneas.

A análise obtida por MET mostrou tamanho de 7,37 nm para AgNP(1) e 11,40 nm para AgNP(2) (Figura 3). Portanto, foram obtidas nanopartículas de prata esféricas.

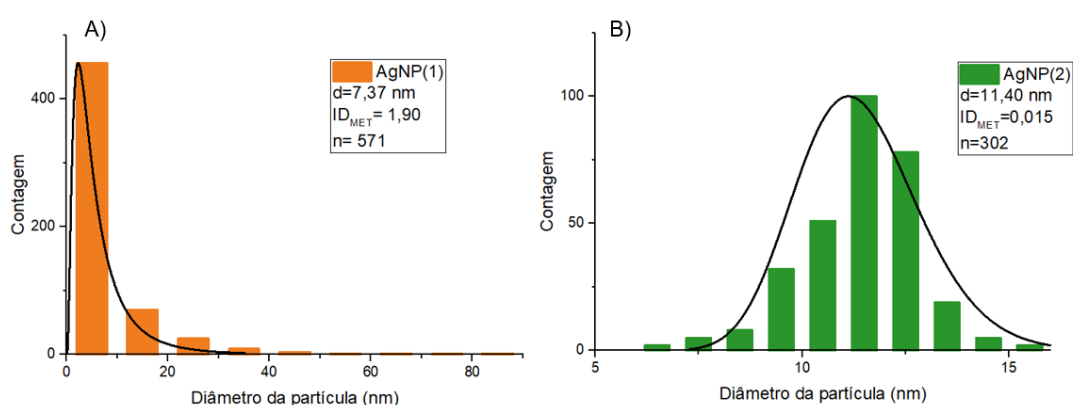
Figura 3. Fotomicrografia eletrônica de transmissão (MET) de **A** - AgNP(1) e **B** - AgNP(2).



Fonte: Dados da pesquisa

O índice de dispersão (ID_{MET}) de 1,90 para AgNP(1) indica polidispersão acentuada desta partícula, enquanto que, 0,015 para AgNP(2) indica monodispersão. As AgNP que possuem monodispersão estão dentro de um tamanho populacional único e principal, como ocorre com a AgNP(2) sendo mais homogêneas (VAZQUEZ-MUÑOZ, BOGDANCHIKOVA e HUERTA-SAQUERO, 2020).

Figura 4. Histograma de distribuição de tamanho de nanopartículas **A)** AgNP(1) e **B)** AgNP(2).



Fonte: Dados da pesquisa

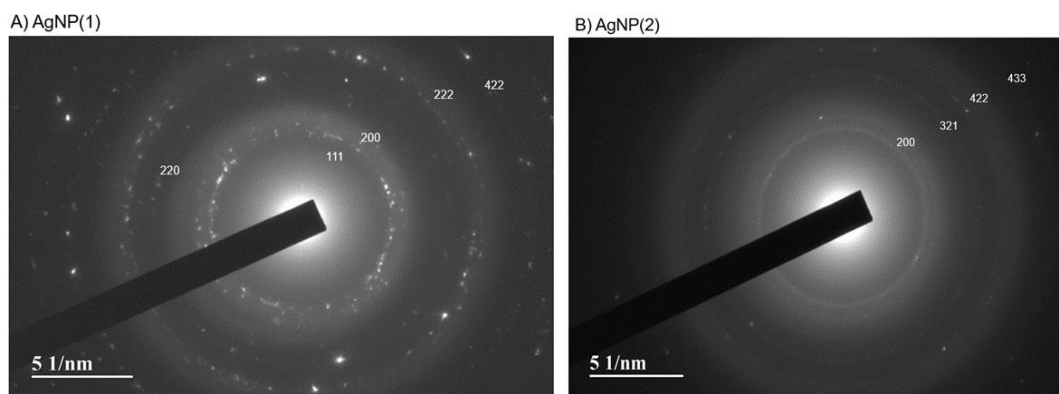
Nanopartículas de prata preparadas por diferentes métodos apresentam diferentes níveis de atividade antifúngica, dependendo do seu

tamanho, morfologia e modificação de superfície (KIM *et al.*, 2009). As nanopartículas metálicas têm uma alta relação superfície-volume, que orienta a capacidade desse material de interagir com a membrana dos micro-organismos para induzir sua ação. As duas teorias mais comumente aceitas são a morte por contato direto por danos à membrana celular e desativação de proteínas causada pela liberação de íons Ag^+ (ABDULRAHMAN *et al.*, 2020).

A influência de propriedades físico-químicas das AgNP que apresentaram tamanhos na faixa de 43,4 a 120,6 nm (DLS) e de 21,8 a 35,8 nm (MET), morfologia regular esférica, com potencial zeta negativo, pode estar relacionada à atividade antifúngica, melhorando a interação com alvos biológicos e a biocompatibilidade (RIBEIRO *et al.*, 2023).

Por meio das análises de SAED foi possível determinar as fases cristalinas cúbicas de face centrada das nanopartículas, não havendo mistura de fases cristalinas confirmadas pelos anéis de difração dos planos cristalinos. Foram encontrados para AgNP(1) os planos cristalográficos de 111, 200, 220, 222 e 422 e para AgNP(2) planos cristalográficos de 200, 321, 422 e 433 (conforme carta cristalográfica ICSD nº 00-004-0783) (Figura 5).

Figura 5. Difração de elétrons da área selecionada SAED das nanopartículas de prata.
A) AgNP(1) e **B)** AgNP(2)



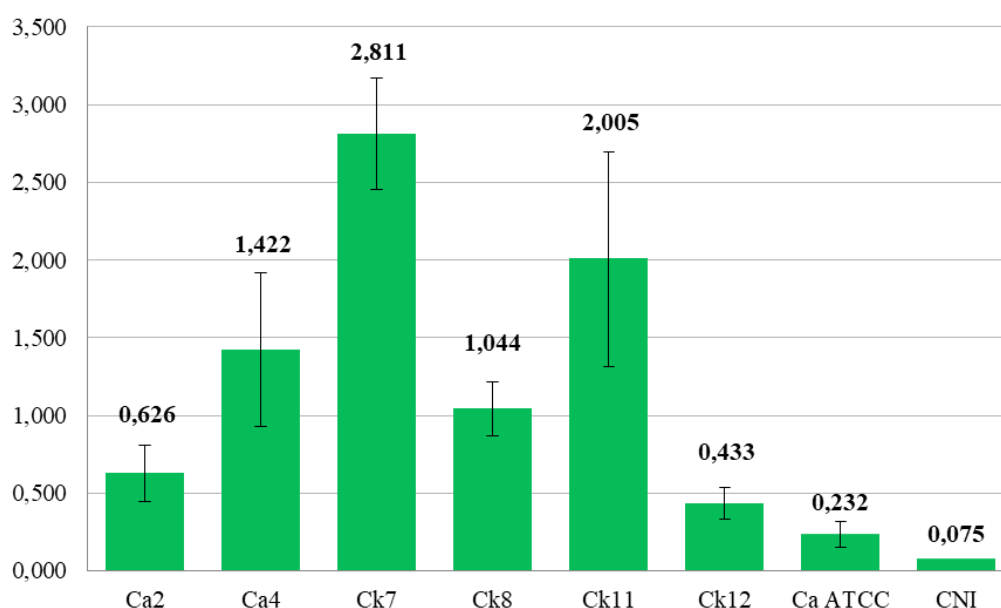
Fonte: dados da pesquisa

Todas as leveduras foram capazes de formar biofilme nas condições do ensaio. As leveduras *C. krusei* Ck7, *C. krusei* Ck11, *C. albicans* Ca4 e *C.*

krusei Ck8 obtiveram as maiores leituras de DO_{620nm} e foram classificadas como formadoras fortes. *C. albicans* Ca2 e *C. krusei* Ck12 foram classificadas como formadoras moderadas e *C. albicans* ATCC 10231 foi identificada como formadora fraca (Figura 6).

A biomassa total detectada pelo cristal violeta é a quantidade de exopolissacarídeo presente no biofilme microbiano. Portanto, os biofilmes são compostos por uma população de células microbianas aderidas entre si e a superfícies sólidas, mas que são embebidas pela matriz extracelular viscosa auto-produzida (DAVE *et al.*, 2016).

Figura 6. DO_{620nm} dos biofilmes das leveduras detectadas pelo método do cristal violeta.



Fonte: Dados da pesquisa **Legendas:** DO_{620nm} - Densidade óptica de 620 nm, Ca - *Candida albicans*, Ck - *Candida krusei*, ATCC - American Type Culture Collection e CNI - Controle não inoculado.

Na contagem das leveduras associadas aos biofilmes foi observado que os isolados *C. krusei* Ck8 ($2,48 \times 10^6$), *C. krusei* Ck7 ($2,39 \times 10^6$), *C. krusei* Ck11 ($9,37 \times 10^5$), *C. albicans* Ca2 ($4,70 \times 10^5$) e *C. krusei* Ck12 ($3,95 \times 10^5$) apresentaram as maiores contagens enquanto que *C. albicans* Ca4 ($8,90 \times 10^4$) e *C. albicans* ATCC 10231 ($2,43 \times 10^4$), as menores. Apenas a *C. albicans*

Ca4 não apresentou correlação entre a biomassa total do biofilme e a contagem de células viáveis associadas ao biofilme ($8,90 \times 10^4$ ufc mL⁻¹).

Previamente, *C. albicans* ATCC 10231 foi identificada como produtora forte de biofilme (SACHIVKINA *et al.*, 2023) enquanto que em outro trabalho, a mesma levedura apresentou $DO_{630nm} = 0,175$ nm e contagens de células viáveis de $2,30 \times 10^8$ ufc mL⁻¹ (ATIENCIA-CARRERA, 2022). Entretanto, em nosso trabalho, a mesma cepa apresentou as menores leituras ($DO_{630nm} = 0,232$ nm), contagem de $2,43 \times 10^4$ ufc mL⁻¹ e quando comparada com as leveduras isoladas da cavidade bucal, teve menor capacidade de formar biofilmes. Essa diferença entre os resultados pode ser devida a diferentes condições metodológicas empregadas nos estudos.

A avaliação do perfil de formação de biofilme é determinante no prognóstico das infecções por *Candida*, essa habilidade pode estar relacionada ao aumento de mortalidade, pois impacta na resistência das leveduras e os processos infecciosos leveduriformes associados aos biofilmes têm mortalidade quase duas vezes maior que infecções planctônicas (TSAY *et al.*, 2020).

Os biofilmes de *Candida* são formados por uma mistura material extracelular e de células de levedura e hifas que são fundamentais para o seu desenvolvimento. A transição de leveduras para hifa contribui para a virulência geral das células de *Candida* e pode constituir um alvo significativo para o desenvolvimento de medicamentos antifúngicos (SHARECK e BELHUMEUR, 2011).

Todos os fungos passam pelos mesmos estágios gerais de fixação, adesão, desenvolvimento e disseminação, a cinética desse processo varia dependendo da espécie (MOHANTA *et al.*, 2023). A capacidade das leveduras de *Candida* de proliferar e estabelecer biofilmes também é influenciada por sua interação com a homeostase e variação do hospedeiro (mudanças de pH da mucosa ou alterações nutricionais) e pelo estado do sistema imunológico do hospedeiro (CHANDRA e MUKHERJEE, 2015; LOHSE *et al.*, 2018).

Candida krusei pertence ao grupo dos agentes etiológicos da candidíase, embora não seja isolada com tanta frequência como as outras espécies de *Candida*, causa infecções com relevância no ambiente clínico devido à sua resistência intrínseca ao fluconazol (GOMEZ-GAVIRIA e MORA-MONTES, 2020).

Os resultados da atividade antifúngica das nanopartículas são apresentados na tabela 2. Todas as leveduras foram inibidas pelas nanopartículas. As leveduras *C. krusei* foram as mais sensíveis, sendo inibidas por AgNP(1) com CMI = 15,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e AgNP(2) com CMI = 15,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que as *C. albicans* foram mais resistentes com CMI = 60,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AgNP(1) e CMI = 61,70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AgNP(2).

Em relação à atividade fungicida, ambas nanopartículas necessitaram de concentrações 8x maiores que as CMI contra as *C. krusei* enquanto que para as *C. albicans* os valores das CMF foram idênticos aos da CMI para a maioria das leveduras e o dobro para a *C. albicans* Ca4.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata contra as leveduras

Leveduras	AgNP(1) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		AgNP(2) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>C. albicans</i> Ca2	60,46	60,46	61,70	61,70
<i>C. albicans</i> Ca4	60,46	120,93	61,70	61,70
<i>C. krusei</i> Ck7	15,11	120,93	15,40	123,43
<i>C. krusei</i> Ck8	15,11	120,93	15,40	123,43
<i>C. krusei</i> Ck11	15,11	120,93	15,40	123,43
<i>C. krusei</i> Ck12	15,11	120,93	15,40	123,43
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	60,46	60,46	61,70	61,70

Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: CMI - Concentração Mínima Inibitória, CMF - Concentração Mínima Fungicida; AgNP(1) - nanopartícula de prata e AgNP(2) - nanopartícula de prata sintetizada em meio reacional com hidróxido de amônio

Nanopartículas de prata podem danificar diretamente as membranas celulares das bactérias através da liberação de íons de prata e ocasionar o aumento da permeabilidade da membrana, a perda da força motriz do próton e induzir a interrupção da replicação do DNA (DURÁN *et al.*, 2019).

Contra leveduras, as nanopartículas de prata produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) que atuam na parede celular e na interrupção da replicação do DNA (RADHAKRISHNAN *et al.*, 2018; DURÁN *et al.*, 2019). A atividade antifúngica da nanopartícula de prata está associada à indução de apoptose disfuncional mitocondrial por meio do aumento de estresse oxidativo, geração de ROS, especialmente de radicais hidroxila (HWANG *et al.*, 2012).

Além disso, foi observado aumento dos níveis endógenos de ROS em cerca de 73% na presença da concentração subinibitória (5 µg/mL) de AgNP e em quase mais que o dobro em 40 µg/mL (CMI₉₀) das AgNP, demonstrando que as nanopartículas de prata induziram a formação de ROS e exerceram efeito antifúngico. O tratamento com nanopartículas de prata também alterou a morfologia da superfície, a ultraestrutura celular, o microambiente da membrana, a fluidez da membrana, o conteúdo de ergosterol e a composição de ácidos graxos, principalmente o ácido oleico (RADHAKRISHNAN *et al.*, 2018).

A atividade das AgNP contra leveduras foi verificada em um trabalho prévio, no qual AgNP de tamanhos na faixa de 43,4 a 120,6 nm, carga negativa e presença de revestimento em sua superfície apresentaram atividade antifúngica, com CMI entre 1,25 a 40 µM, contra isolados clínicos de *Candida albicans*, *Candida krusei*, dentre outras (KAISER *et al.*, 2023).

Nossos resultados indicaram que as nanopartículas foram esféricas com tamanhos semelhantes, com cargas superficiais quase nulas e formaram aglomerados. Entretanto apresentaram diferenças significativas no índice de

dispersão, pois a AgNP(1) foi polidispersa enquanto a AgNP(2), sintetizada em meio reacional de hidróxido de amônio, foi monodispersa e apresentou distribuição de tamanho mais homogênea com menos formação de agregados, tais diferenças podem explicar a ação homogênea obtida para AgNP(2) na concentração mínima fungicida (CMF).

A eficiência antimicrobiana das nanopartículas depende dos métodos de síntese, do tamanho e formato (triangular, bastonete e esférico) das nanopartículas formadas (KOROGLU *et al.*, 2016). De forma complementar, a taxa de liberação de nanopartículas metálicas está relacionada à sua composição química, estrutura, núcleo metálico, revestimento de superfície e condições ambientais, como pH e força iônica (DE SOUZA, 2022).

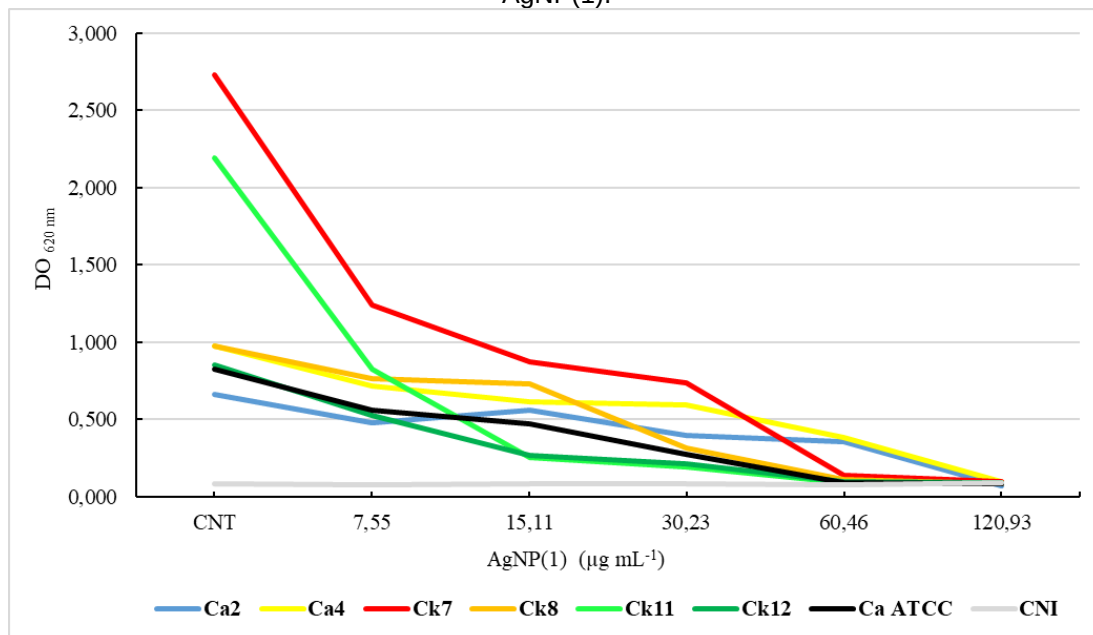
A parede celular da *C. albicans* é uma estrutura dinâmica que é modulada para gerar formas elípticas e tubulares que definem uma ampla gama de morfologias nas quais esse fungo pode crescer (DA SILVA DANTAS *et al.*, 2016). Sua composição química, apesar de não estar totalmente esclarecida, é composta por uma camada esquelética interna amorfa de $\beta(1,3)$ - e $\beta(1,6)$ -glucano e quitina; e outra uma camada fibrilar externa, que se acredita ser dominada por proteínas de parede celular altamente manosiladas de tamanhos que podem variar entre 40-60nm (LENARDON *et al.*, 2020).

As alterações morfológicas da superfície observadas nas células fúngicas podem ser ocasionadas devido ao dano na parede celular e na membrana celular. É possível que os efeitos exercidos por AgNP na parede celular e na membrana celular possam alterar o estado físico e, portanto, a fluidez da membrana. A depleção de ergosterol após o tratamento com AgNP também é apontada como responsável pela sensibilidade das células fúngicas, a integridade da membrana e suas mudanças no microambiente celular (RADHAKRISHNAN *et al.*, 2018).

Nas Figuras 7 e 8 são apresentados os impactos das concentrações das nanopartículas de prata na formação de biofilme das leveduras. A atividade inibitória da formação de biofilme pelas nanopartículas foi concentração-dependente. A maior atividade da AgNP(1) foi detectada a partir de $60,46 \mu\text{g mL}^{-1}$, exceto para *C. albicans* Ca2 e *C. albicans* Ca4. A AgNP(2)

apresentou maior atividade a $61,70 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra todas as leveduras, entretanto a partir de $15,40 \mu\text{g mL}^{-1}$ inibiu a formação de biofilme.

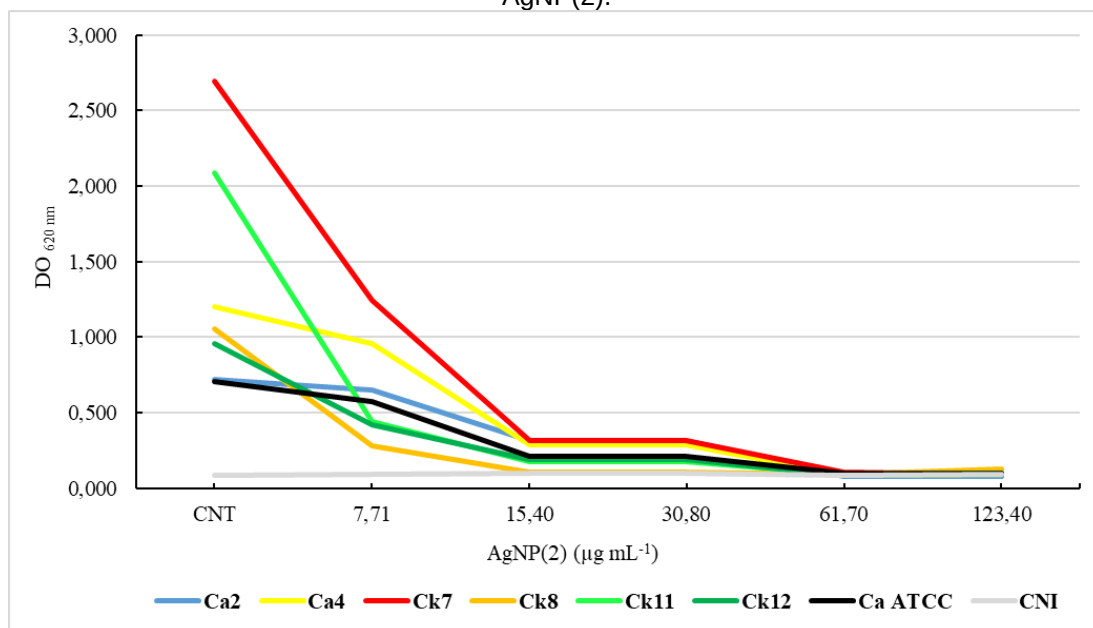
Figura 7. Densidade óptica dos biofilmes das leveduras na presença de concentrações de AgNP(1).



Fonte: Dados da pesquisa

Legendas: DO_{620nm} - Densidade óptica a 620 nm, CNT - Controle não tratado, Ca - *Candida albicans*, Ck - *Candida krusei*, ATCC - American Type Culture Collection e CNI - Controle não inoculado

Figura 8. Densidade óptica dos biofilmes das leveduras na presença de concentrações de AgNP(2).



Fonte: Dados da pesquisa

Legendas: DO_{620nm} - Densidade óptica a 620 nm, CNT - Controle não tratado, Ca - *Candida albicans*, Ck - *Candida krusei*, ATCC - American Type Culture Collection e CNI - Controle não inoculado

As nanopartículas de prata atuam de maneira sinérgica e potencializam compostos ativos contra biofilmes, permitindo o uso mais eficiente de antimicrobianos (MOHANTA *et al.*, 2023). Exercem um efeito inibitório contra biofilmes fúngicos danificando a parede celular principalmente por distorção e ruptura da superfície externa da parede celular fúngica, causando um aumento das ROS e da produção de radicais hidroxila, que também contribuem para danos à membrana celular. (ATRIWAL *et al.*, 2021).

A inibição da formação de biofilme da AgNP(1) variou entre 7,55 e 60,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As leveduras mais sensíveis foram as *C. krusei* Ck7 e Ck11 com $\text{CMIB}_{50} = 7,55 \mu\text{g mL}^{-1}$. *C. albicans* Ca2 e Ca4 foram as mais resistentes com $\text{CMIB}_{50} = 60,46 \mu\text{g mL}^{-1}$. A atividade antibiofilme da AgNP(2) ficou compreendida entre 7,71 e 30,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As *C. krusei* foram as mais sensíveis com $\text{CMIB}_{50} = 7,71 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a *C. albicans* Ca4 foi a mais resistente com $\text{CMIB}_{50} = 30,80 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração Mínima Inibitória da Formação de Biofilme (CMIB_{50}) das nanopartículas de prata contra leveduras

Leveduras	AgNP(1) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			AgNP(2) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	CMIB_{50}	CMI	relação $\text{CMIB}_{50}/\text{CMI}$	CMIB_{50}	CMI	relação $\text{CMIB}_{50}/\text{CMI}$
<i>C. albicans</i> Ca2	60,46	60,46	1x	15,40	61,70	0,25x
<i>C. albicans</i> Ca4	60,46	60,46	1x	30,80	61,70	0,5x
<i>C. krusei</i> Ck7	7,55	15,11	0,5x	7,71	15,40	0,5x
<i>C. krusei</i> Ck8	30,23	15,11	2x	7,71	15,40	0,5x
<i>C. krusei</i> Ck11	7,55	15,11	0,5x	7,71	15,40	0,5x
<i>C. krusei</i> Ck12	15,11	15,11	1x	7,71	15,40	0,5x
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	30,23	60,46	0,5x	15,40	61,70	0,25x

Fonte: Dados da pesquisa

Ambas as nanopartículas inibiram a formação de biofilme pelas leveduras analisadas. Apesar das concentrações dos íons prata serem semelhantes entre as duas nanopartículas, fatores como os tamanhos das partículas, a distribuição de tamanho dos aglomerados e o raio hidrodinâmico podem ter influenciado nos resultados encontrados.

A relação entre a CMIB₅₀ e a CMI da nanopartícula AgNP(1) foi diferente entre as leveduras, pois a formação de biofilme foi inibida por metade da CMI para as leveduras Ck7, Ck11 e Ca ATCC 10231. Entretanto, a mesma relação foi igual para as *C. albicans* Ca2, Ca4 e *C. krusei* Ck12, sendo necessária a mesma concentração de AgNP(1) para inibir tanto o crescimento quanto a formação de biofilme pelas leveduras. O mesmo efeito não foi observado contra *C. krusei* Ck8, pois a formação de biofilme só foi inibida com 2x CMI.

A AgNP(2) apresentou uma relação CMIB₅₀/CMI mais homogênea entre as leveduras, pois a formação de biofilme foi inibida por 1/2 CMI para Ca4, Ck7, Ck8, Ck11 e Ck12 e por 1/4 CMI para Ca2 e Ca ATCC 10231.

Apesar da atividade inibitória de ambas nanopartículas ter sido mais intensa contra *C. krusei* do que *C. albicans*, a inibição da formação de biofilme da AgNP(2) foi mais homogênea entre as leveduras testadas, isto pode ser explicado devido sua monodispersão de 0,15 por ID_{MET}.

Nanopartículas menores tendem a apresentar maiores efeitos microbicidas devido à maior área de superfície em contato com o micro-organismo (DURÁN *et al.*, 2019). As dimensões reduzidas das AgNP desempenham um papel crucial na penetração mais efetiva na célula, influenciando na permeabilidade seletiva da membrana. Uma vez em contato com o meio intracelular, as AgNP atuam reduzindo determinadas funções metabólicas, desaceleram suas atividades vitais e levam a danos celulares (YIN *et al.*, 2020).

As interações entre nanopartículas de prata e o biofilme podem ser descritas pelos mecanismos sequenciais de transporte das nanopartículas

para a interface biofilme-fluido, fixação à superfície do biofilme e migração para dentro do biofilme (FULAZ *et al.*, 2019).

Interações entre biofilmes de *Candida* e nanopartículas de prata devem levar em consideração fatores como o tipo de síntese, o tamanho e a carga das nanopartículas formadas e interações específicas das espécies de *Candida* que compõem o biofilme. A alteração induzida por AgNP observada em alvos celulares pode potencialmente afetar a resistência a medicamentos, a patogênese e a virulência de patógenos fúngicos (RADHAKRISHNAN *et al.*, 2018).

A etapa inicial de penetração na matriz EPS é controlada principalmente pelo tamanho das AgNP, enquanto as interações com componentes da matriz EPS são governadas pelas propriedades da superfície das AgNP, como a carga e os grupos funcionais. Quando as AgNP entram em contato com um ambiente contendo moléculas orgânicas, um revestimento semelhante a uma corona é formado na superfície da nanopartícula de prata e a natureza desta corona influencia as interações AgNP-biofilme (FULAZ *et al.*, 2019).

4.3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho avaliou a atividade das nanopartículas de prata na formação de biofilmes por leveduras isoladas da cavidade bucal. Verificamos atividade fungistática e fungicida e que as duas nanopartículas não apresentaram diferenças significativas de atividade antifúngica (CMI e CMF).

As interações entre as nanopartículas de prata e os micro-organismos dependem de suas características físico-químicas, como tamanho hidrodinâmico, carga de superfície, agregação e disponibilidade de taxa de liberação de prata iônica (VAZQUEZ-MUÑOZ, BOGDANCHIKOVA e HUERTA-SAQUERO, 2020).

As concentrações da AgNP(1) que foram inibitórias da formação de biofilme foram iguais ou semelhantes as CMI, portanto esta nanopartícula

impactou a formação de biofilme devido a inibição do crescimento, não devido a uma atividade antibiofilme propriamente dita. Entretanto, a nanopartícula AgNP(2) sintetizada em meio reacional com hidróxido de amônio foi ativa contra a formação de biofilmes de *C. albicans* e *C. krusei*, sendo capaz de atuar com concentrações subinibitórias.

A morfologia esférica, a distribuição de tamanho dos aglomerados, a carga superficial quase nula, e principalmente a monodispersão das nanopartículas de prata AgNP(2), afetaram o modo como elas interagem com a matriz extracelular dos biofilmes. A atividade inibitória se deve não apenas ao tamanho em nanoescala mas também à sua grande proporção homogênea dos tamanhos de partículas. Elas podem aumentar a permeabilidade das membranas celulares, produzir espécies reativas de oxigênio e interromper a replicação do ácido desoxirribonucleico liberando íons de prata (YIN *et al.*; 2020).

Nanopartículas de prata perturbam a integridade do biofilme ao interagir com a matriz polimérica extracelular, DNA, lipídeos e proteínas dos biofilmes, tais interações dependem de forças coloidais, bem como de interações biofísico-químicas dinâmicas (QAYYUM e ASAD, 2016; NEL *et al.* 2009). Estudos recentes sugerem que o processo de produção e entrega da matriz extracelular fornece um alvo terapêutico útil para biofilmes de várias espécies de fungos (MASSEY *et al.*, 2023).

O entendimento de como as nanopartículas de prata interagem com biofilmes, levam ao desenvolvimento de novas abordagens no tratamento de infecções fúngicas orais, incluindo inovadoras possibilidades de formulações de medicamentos, melhorando a eficácia de doenças causadas por *Candida*. Estes fatores, salientam a importância dos estudos com nanopartículas de prata e sua interação com biofilmes, como alternativa futura no combate a infecções fúngicas resistentes.

4.3.5 REFERÊNCIAS

ABDULRAHMAN A. BALHADDAD, ISADORA M. GARCIA, MARIA SALEM IBRAHIM, JULIANA P.M.L. ROLIM, EDISON A.B. GOMES, FREDERICO C. MARTINHO, FABRICIO M. COLLARES, HOCKIN XU, AND MARY ANNE S. MELO Prospects on Nano-Based Platforms for Antimicrobial Photodynamic Therapy Against Oral Biofilms. **Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery** v.38; p. 8, 481-496. 2020.<https://doi.org/10.1089/photob.2020.4815>

ATRIWAL T, AZEEM K, HUSAIN FM, HUSSAIN A, KHAN MN, ALAJMI MF AND ABID M Mechanistic Understanding of *Candida albicans* Biofilm Formation and Approaches for Its Inhibition. **Front. Microbiol.** v.12 p.638-609. 2021.doi: 10.3389/fmicb.2021.638609

ATIENCIA-CARRERA, M.B; CABEZAS-MERA, F.S; TEJERA, E; MACHADO, A. Prevalence of biofilms in *Candida* spp. bloodstream infections: A meta-analysis. **PLoS One.** v. 17; p.2. 2022.. doi: 10.1371/journal.pone.0263522.

ATIENCIA-CARRERA, M. B., CABEZAS-MERA, F. S., VIZUETE, K., DEBUT, A., TEJERA, E., & MACHADO, A. Evaluation of the biofilm life cycle between *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Frontiers in cellular and infection microbiology.** v.12 p.953168. 2022.<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.953168>

BERTOLINI M, VAZQUEZ MUNOZ R, ARCHAMBAULT L, SHAH S, SOUZA JGS, COSTA RC, THOMPSON A,ZHOU Y, SOBUE T, DONGARI-BAGTZOGLOU A. Mucosal Bacteria Modulate *Candida albicans* Virulence in Oropharyngeal Candidiasis. **mBio.** v.12 p. 193721.2021. doi: 10.1128/mBio.01937-21. Epub 2021 Aug 17. PMID:34399623; PMCID: PMC8406182.

CHANDRA, JYOTSNA; e MUKHERJEE, P. K. Candida Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. **Microbiology spectrum.** v.3; p. 115-134. 2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015>

DA SILVA DANTAS. A, K.K. LEE, I. RAZIUNAITE, K. SCHAEFER, J. WAGENER, B. YADAV, N.AR. GOW. Cell biology of *Candida albicans* – host interactions. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 34, p. 111-118. 2016.

DE SOUZA, A.O. Overview of nanomaterials and cellular interactions. **Biointerface Res. Appl. Chem.** v.13 p.367.2022. <https://doi.org/10.33263/BRIAC13134.367>

DAVE, S. R. *et al.* Microbial exopolysaccharide-an inevitable product for living beings and environment. **J Bacteriol Mycol Open Access**, v. 2, n. 4, p. 109-111, set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2016.02.00034>. Disponível em: <https://medcraveonline.com/JBMOA/microbial-exopolysaccharide---an-inevitable-product-for-living-beings-and-environment.html>. Acesso em: 21 abr. 2024.

DORGHAM, R. A.; ABD, AL, MOATY.; M, N.; CHONG, K.P.; ELWAKIL, B.H. Molasses-Silver Nanoparticles: Synthesis, Optimization, Characterization, and Antibiofilm Activity. *Int. J. Mol. Sci.* v.23, p.10243. 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms231810243>.

DURÁN N., WALLACE R. ROLIN, MARCELA DURÁN; WAGNER J. FÁVARO E AMEDEA B. SEABRA. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: Toxicidade em animais e humanos. *Quim. Nova*, v.42, p.206-213, 2019. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170318>

FULAZ, STEPHANIE *et al.* Nanoparticle-Biofilm Interactions: The Role of the EPS Matrix. *Trends in microbiology*. v. 27, p. 915-926. 2019. doi:10.1016/j.tim.2019.07.004

GEISSEL, F.J.; PLATANIA, V.; GOGOS, A.; HERRMANN, I.K.; BELIBASAKIS, G.N.; CHATZINIKOLAIDOU, M.; SOTIRIOU, G.A. Antibiofilm activity of nanosilver coatings against *Staphylococcus aureus*. *J. Colloid Interface Sci.* v. 608, p. 3141–3150. 2022.

GÓMEZ-GAVIRIA, M., e MORA-MONTES, H. M. Current Aspects in the Biology, Pathogeny, and Treatment of *Candida krusei*, a Neglected Fungal Pathogen. *Infection and drug resistance*, v.13, p.1673–1689. 2020. <https://doi.org/10.2147/IDR.S247944>

HWANG IS, LEE J, HWANG JH, KIM KJ, LEE DG. Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. *FEBS J.* v. 279, p.1327–1338. 2012.

KIM KJ, SUNG WS, SUH BK, *et al.* Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biometals*, v.22, p. 235–242. 2009. DOI: 10.1007/s10534-008-9159-2

KOROGLU, A.; SAHIN, O.; I, KURKCUOGLU.; DEDE, DO, OZDEMIR, T.; HAZER B. Silver nanoparticle incorporation effect on mechanical and thermal properties of denture base acrylic resins, *J. Appl. Oral Sci.* v.24 p. 590–596. 2016.

LENARDON, MEGAN D *et al.* Scalar nanostructure of the *Candida albicans* cell wall; a molecular, cellular and ultrastructural analysis and interpretation. *Cell surface (Amsterdam, Netherlands)* vol. 6, p.100047. 2020, doi:10.1016/j.tcs.2020.100047

LEE, YUNJI.; SEONG-GEUN, OH. Ostwald ripening and control of Ag ion reduction degree by ammonium hydroxide in alcohol reduction process. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. v. 21; p. 768-771. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.04.010>.

LOHSE, M.B.; GULATI, M.; JOHNSON, A.D.; NOBILE, C.J. Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* v.16, p.19–31. 2018. doi:10.1038/nrmicro.2017.107

MALINOVSKÁ, ZUZANA; CONKOVÁ, EVA; VÁCZI, PETER. Biofilm formation in medically important *Candida* species. *Journal of Fungi*. v.9, p.955. 2023. <https://doi.org/10.3390/jof9100955>

MARAK, MUNMUN B e BIRANTHABAIL DHANASHREE. Antifungal Susceptibility and Biofilm Production of *Candida* spp. Isolated from Clinical Samples. **International journal of microbiology**. v. 2018, p.749. 2018. doi:10.1155/2018/7495218

MARTÍNEZ, A.; MANRIQUE-MORENO, M.; KLAISS-LUNA, M.C.; STASHENKO, E.; ZAFRA, G.; ORTIZ, C.I. Effect of essential oils on growth inhibition, biofilm formation and membrane integrity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v.10, n.12, p.1474, 2021.

MASSEY, JUSTIN *et al.* Role of the extracellular matrix in *Candida* biofilm antifungal resistance. **FEMS microbiology reviews** vol. 47, p. 6. 2023. doi:10.1093/femsre/fuad059

MOHANTA YK, CHAKRABARTTY I, MISHRA AK, CHOPRA H, MAHANTA S, AVULA SK, PATOWARY K, AHMED R, MISHRA B, MOHANTA TK, SARAVANAN M AND SHARMA N. Nanotechnology in combating biofilm: A smart and promising therapeutic strategy. **Front. Microbiol.** v.13, p. 1028. 2023 doi: 10.3389/fmicb.2022.1028086

MORE, P, R.; PANDIT S.; FILIPPIS, A.; FRANCI, G.; MIJAKOVIC, I.; GALDIERO, M. Silver Nanoparticles: Bactericidal and Mechanistic Approach against Drug Resistant Pathogens. **Microorganisms**. v.1; p.369. 2023. doi: 10.3390/microorganisms11020369.

MOREIRA, D.; SPOLIDÓRIO, D. M. P.; RODRIGUES, J. A. de O.; BORIOLO, M. F. G.; PEREIRA, C. V.; ROSA, E. A. R.; HOFLING, J. F. *Candida* spp. biotypes in the oral cavity of school children from different socioeconomic categories in Piracicaba - SP, Brazil. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15; n. 3; p. 187-195. 2001.

NEL, A., MÄDLER, L., VELEGOL, D. *et al.* Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. **Nature Mater.** v.8, p. 543–557. 2009. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>

QAYYUM, SHARIQ. e KHAN, ASAD ULLAH. Nanoparticles vs biofilm; A battle against another paradigm of antibiotic resistance. **Med. Chem. Commun.** v. 10 p.1039. 2016. doi:10.1039/C6MD00124F

QIAN, DU.; BIAO, REN.; JINZHI, HE.; XIAN, PENG.; QIANG, GUO.; LIWEI, ZHENG.; JIYAO, LI.; HUANQIN, DAI.; VIVIAN, CHEN.; LIXIN, ZHANG.; XUEDONG, ZHOU.; XIN, XU. *Candida albicans* promotes tooth decay by inducing oral microbial dysbiosis. **The ISME Journal**, v. 15; p. 895-908. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00823-8>

RIBEIRO, L.G.; ROQUE, G.S.C.; CONRADO, R.; DE SOUZA, A.O. Antifungal Activity of Mycogenic Silver Nanoparticles on Clinical Yeasts and Phytopathogens. **Antibiotics**. v.12, p.91. 2023. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010091>

SACHIVKINA, N.; KARAMYAN, A.; SEMENOVA, V.; IGNATIEV, A.; ABDURASULOV, A.; MURATOVA, R.; EMILBEKOVA, D.; ERMATOVA, V.;

RISVANLI, A.; SALYKOV, R.; *et al.* The Effects of *Angelica ternata* Extract from Kyrgyzstan on the Formation of *Candida albicans* ATCC 10231 Biofilms. **Appl. Sci.** v.13, p.12042. 2023. <https://doi.org/10.3390/app132112042>

SHARECK J, BELHUMEUR P. Modulation of morphogenesis in *Candida albicans* by various small molecules. **Eukaryot Cell.** v.10, p. 1004–1012. 2011. DOI: 10.1128/EC.05030-11

SAHAL, G.; BILKAY, I.S. Distribution of clinical isolates of *Candida* spp. and antifungal susceptibility of high biofilm-forming *Candida* isolates. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.51; p.644–650. 2018.

TSAY, S.V; UM, Y; WILLIAMS, S; EPSON, E, NADLE J, BAMBERG WM, BARTER DM, JOHNSTON HL, FARLEY MM, HARB S, THOMAS S, BONNER LA, HARRISON LH, HOLLICK R, MARCEAUX K, MODY RK, PATTEE B, SHRUM DAVIS S, PHIPPS EC, TESINI BL, GELLERT AB, ZHANG AY, SCHAFFNER W, HILLIS S, NDI D, GRABER CR, JACKSON BR, CHILLER T, MAGILL S, VALLABHANENI S. Burden of Candidemia in the United States, 2017. **Clin Infect Dis.** v. 71; p. 449-453. 2020. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa193>

VAZQUEZ-MUÑOZ, ROBERTO; BOGDANCHIKOVA, NINA; HUERTA-SQUERO, ALEJANDRO. Beyond the Nanomaterials Approach: Influence of Culture Conditions on the Stability and Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles. **ACS Omega.** v.5, p. 28441-28451. 2020. doi: 10.1021/acsomega.0c02007

WAYNE, P. A. Clinical and laboratory standards institute: performance standards for antimicrobial susceptibility testing: informational supplement, M100. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**, 2018.

XU H, JENKINSON HF, DONGARI-BAGTZOGLOU A. Innocent until proven guilty: mechanisms and roles of *Streptococcus* – *Candida* interactions in oral health and disease. **Mol Oral Microbiol.** v. 29, p. 99–116. 2014. <https://doi.org/10.1111/omi.12049>

YIN, I.X.; ZHANG, J.; ZHAO, I.S.; MEI, M.L.; LI, Q.; CHU, C.H. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. **Int. J. Nanomed.** v.15, p. 2555–2562. 2020.

ZAYED, S.M.; *et al.* Biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its inhibition by green tea extracts. **AMB Express**, v. 11, n. 1, p. 73, 2021.

4.4. Artigo 4

PERFIL DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Streptococcus mutans* ISOLADOS DA CAVIDADE BUCAL EM ESCOVAS DENTAIS

Maria José Barbaresco, Justino Carlos Baptista, João Salviano Simões
Chagas da Silva, Reuber Mendes Rocha, Luciana Rebelo Guilherme, Plínio
Lázaro Faleiro Naves

RESUMO

Os *Streptococcus mutans* são encontrados na saliva, colonizam as superfícies da cavidade bucal e formam biofilmes. Essas bactérias são os principais agentes etiológicos da cárie dental e são classificadas de acordo com suas propriedades bioquímicas e genéticas. A higienização com escovas dentais é uma das principais medidas na manutenção da saúde da cavidade bucal, contudo escovas dentais contaminadas podem servir como reservatório para inoculação de micro-organismos patogênicos. Neste contexto, o presente estudo avalia o perfil de formação de biofilme de *S. mutans* isolados de voluntários humanos através da detecção da biomassa total dos biofilmes bacterianos em microplacas de poliestireno e da contagem das bactérias viáveis associadas aos biofilmes em escovas dentais. Todos os isolados foram capazes de formar biofilme e foram classificados como formadores fortes. Os isolados que apresentaram as maiores contagens de células viáveis aderidas às cerdas das escovas foram o Sm10 ($8,47 \times 10^7$), Sm7 ($7,23 \times 10^7$) e Sm6 ($7,18 \times 10^7$) ufc mL⁻¹. Por outro lado, o *S. mutans* ATCC 700610 teve a menor contagem ($5,25 \times 10^6$). Desta forma, os resultados encontrados demonstram que os *Streptococcus mutans* são capazes de se aderir e formar biofilmes nas escovas dentais e que comportamento e as relações associadas ao *S. mutans* são essenciais para controle dessas bactérias e da cárie dentária.

Palavras-chaves: microbioma oral; placa bacteriana; cárie dentária.

ABSTRACT

Streptococcus mutans are found in saliva, colonize the surfaces of the oral cavity and form biofilms. These bacteria are the main etiological agents of dental caries and are classified according to their biochemical and genetic properties. Toothbrush hygiene is one of the main measures for maintaining the health of the oral cavity, but contaminated toothbrushes can serve as a reservoir for the inoculation of pathogenic microorganisms. In this context, the present study evaluates the biofilm formation pattern of *S. mutans* isolated from human volunteers by detecting the total biomass of bacterial biofilms on polystyrene microplates and counting the viable bacteria associated with biofilms on toothbrushes. All the isolates were able to form biofilms and were classified as strong biofilm producers. The isolates with the highest counts of viable cells adhered to the brush bristles were Sm10 (8.47×10^7), Sm7

(7.23×10^7) and Sm6 (7.18×10^7) CFU mL⁻¹. On the other hand, *S. mutans* ATCC 700610 had the lowest count (5.25×10^6). Thus, the results show that *Streptococcus mutans* are capable of adhering to and forming biofilms on toothbrushes and that the behavior and relationships associated with *S. mutans* are essential for controlling these bacteria and dental caries.

Keywords: oral microbiome; bacterial plaque; dental caries.

4.4.1 INTRODUÇÃO

O equilíbrio nas funções do microbioma oral é crucial para a manutenção da saúde bucal. A higienização com escova e fio dental asseguram a limpeza de todas as superfícies dos dentes, controlando a formação de biofilmes que desencadeiam doenças periodontais e cáries (MENEZES *et al.*, 2020).

Entretanto, as escovas dentais sofrem deposição e proliferação de micro-organismos em suas cerdas durante seu uso. Foi demonstrado a correlação entre a carga microbiana nas escovas de dente e o estado dentário do paciente (ROCHA *et al.*, 2022).

Além disso, escovas dentais contaminadas podem servir como reservatórios para inoculação de micro-organismos ou como vetores na transmissão de um indivíduo para outro, o que é muito comum em famílias de baixa renda (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Fatores como higiene, hábitos alimentares, colonização bacteriana, composição da saliva, dentre outros influenciam o metabolismo das bactérias sobre os dentes e podem modular a atividade microbiana no processo cariioso (LEITES, PINTO e SOUSA, 2006). 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).

Micro-organismos como o *Streptococcus mutans* colonizam as superfícies da cavidade bucal e formam biofilmes, que podem sofrer maturação e desenvolvimento de cárie dentária (ZAYED *et al.*, 2021). A concentração de *S. mutans* é elevada na saliva de pacientes com cárie dentária. Vários fatores relacionados ao ambiente bucal contribuem para o estabelecimento e multiplicação desse micro-organismo (BARBIERI *et al.*, 2007).

Os *S. mutans* são cariogênicos, capazes de se aderir a superfícies sólidas, colonizar e sobreviver às condições ácidas da cavidade oral. Vários fatores têm papel significativo na produção de biofilme relacionado ao *S.*

mutans como a ingestão e metabolismo de carboidratos, aciduricidade e acidogenicidade (LEMOS *et al.*, 2018).

Biofilmes são comunidades altamente estruturadas de micro-organismos conectados a uma superfície ou uns aos outros que formam agregados envoltos por uma matriz extracelular de polissacarídeos, proteínas e glicoproteínas e ácidos nucleicos (DE LACERDA CORIOLANO *et al.*, 2021).

O presente trabalho tem como objetivo estudar o perfil de formação de biofilme de *S. mutans*, com a avaliação da biomassa total e da aderência de micro-organismos viáveis nas cerdas de escovas dentais inoculadas.

4.4.2 METODOLOGIA

Oito estreptococos isolados de voluntários, mais a cepa padrão *Streptococcus mutans* ATCC 700610 pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório de Bioensaios (Comitê de Ética em Pesquisa da UEG, parecer nº3.604.978) foram reativados em placas com Ágar Mitis Salivarius Bacitracina (AMSB) (AMS, Isofar®, Rio de Janeiro) que foram incubadas em anaerobiose a 37 °C por 72 h. O aspecto colonial foi analisado com lupa e em seguida foi realizada a análise do aspecto microscópico com a coloração Gram. A identificação presuntiva dos *S. mutans* foi finalizada com os testes bioquímicos de produção de catalase, teste PYR (ProBac do Brasil®, São Paulo, hemólise em ágar sangue (bioMérieux®, Rio de Janeiro), beta-glucuronidase em ágar cromogênico (bioMérieux®, Rio de Janeiro) e fermentação de manitol e sorbitol (Biotec reagentes analíticos, Brasil) (KONEMAN *et al.*, 2017).

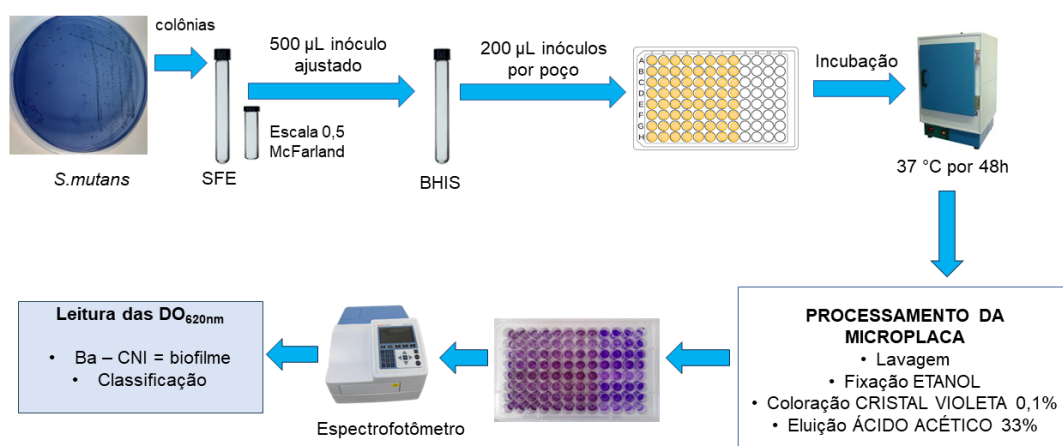
A formação de biofilme foi avaliada com a determinação da biomassa total em microplacas de poliestireno de fundo plano (Cralplast, Brasil) corada com cristal violeta (ZAYED *et al.*, 2021) e pela contagem das células viáveis aderidas às cerdas de escovas inoculadas.

Para a determinação da biomassa total dos biofilmes, as bactérias foram reativadas em ágar ChromID CPS (bioMérieux®, Rio de Janeiro) e após

a incubação, colônias típicas foram dissolvidas em solução fisiológica estéril (SFE) e a densidade foi ajustada com a escala 0,5 de MacFarland. Em seguida, 500 µL da solução bacteriana foram transferidos para 4500 µL de caldo BHI com 2 % de sacarose (BHIS) (Kasvi, Espanha). Posteriormente, 200 µL dos inóculos foram transferidos para microplacas de poliestireno de fundo chato e estas foram incubadas a 35,5 °C por 48 horas.

Após a incubação, as microplacas foram processadas com a remoção do crescimento, lavagem, fixação, coloração dos poços com cristal violeta e leitura das DO_{620nm} em leitor de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific, USA). Os resultados foram organizados com o cálculo das médias e dos desvios padrão (Figura 1).

Figura 1 - Ensaio de formação de biofilme



Fonte: os autores

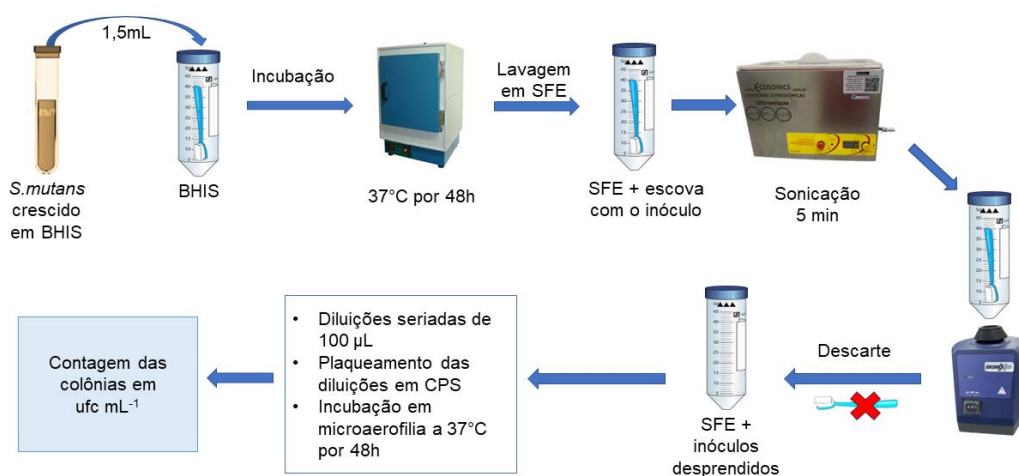
Legenda: Ba: Bactérias aderidas; CNI: Controle não inoculado

Para os ensaios de contagem das bactérias associadas aos biofilmes aderidos às escovas, as amostras congeladas de *S. mutans* foram reativadas em ágar CPS e em caldo BHIS a 37 °C por 72 h. Após esta etapa, 1,5 mL dos caldos crescidos foram homogeneizados e transferidos para tubos Falcon com 13,5 mL de BHIS e escovas que foram incubados a 37 °C por 48 h.

Após a incubação, as escovas foram transferidas para outros tubos Falcon com 15 mL de SFE para lavagem e desprendimento das bactérias não

aderidas, em seguida as escovas foram transferidas para outro Falcon com SFE para sonicação por 5 minutos e agitação em vortex por 30 segundos para desprendimento dos micro-organismos associados ao biofilme. Após agitação, a escova foi descartada e a SFE foi diluída e plaqueada para a contagem e determinação das unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc mL^{-1}) (Figura 2).

Figura 2 - Contagem de *Streptococcus mutans* viáveis aderidos nas escovas

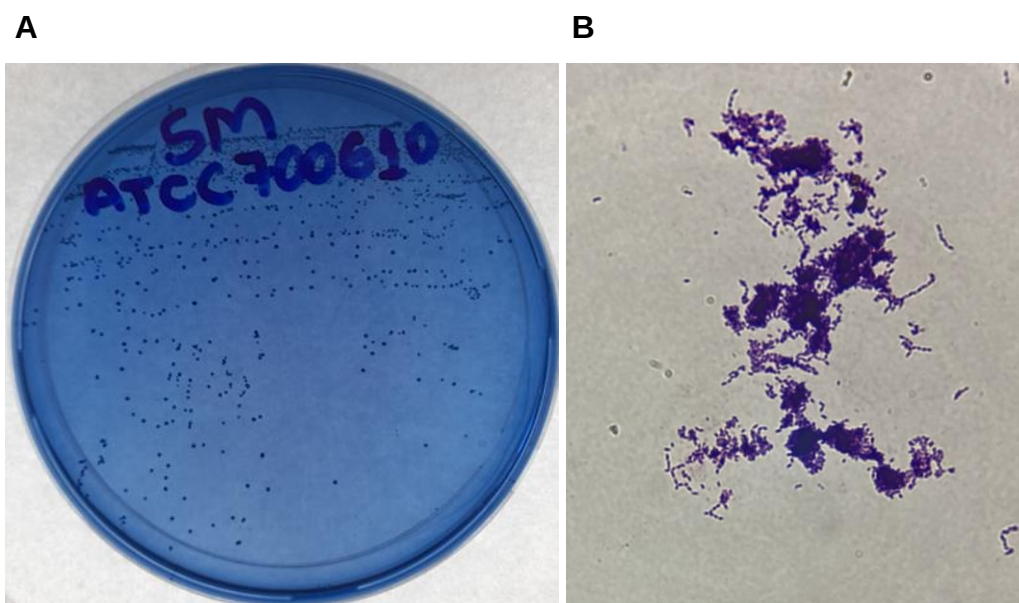


Fonte: os autores

4.4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram considerados como *S. mutans*, os estreptococos que cresceram como colônias azuis escuras incrustadas, brilhantes e com aparência de vidro moído crescidas em AMSB e com o aspecto microscópico de cocos Gram positivos isolados e aos pares (Figura 3).

Figura 3 - Aspectos do *S. mutans* ATCC 700610



Fonte: os autores

Legenda: A: Morfologia colonial em Ágar Mitis Salivarius Bacitracina e B: Morfologia microscópica (1000x) com a coloração de Gram

Os testes bioquímicos realizados com os seguintes resultados: catalase negativa, alfa hemólise, beta-glucuronidase positiva, fermentação de manitol e sorbitol e teste Pyr negativo. Todos os 9 *S. mutans* formaram biofilme, sendo todos classificados como formadores fortes de biofilme (Tabela 1).

Tabela 1 - Formação de biofilme de *Streptococcus mutans*

Bactérias	DO _{620nm}	
	Média ± DP	Classificação
<i>S. mutans</i> Sm1	3,290 ± 0,414	Forte
<i>S. mutans</i> Sm4	3,156 ± 0,310	Forte
<i>S. mutans</i> Sm5	2,993 ± 0,367	Forte
<i>S. mutans</i> Sm6	3,085 ± 0,413	Forte
<i>S. mutans</i> Sm7	3,094 ± 0,384	Forte
<i>S. mutans</i> Sm10	3,106 ± 0,380	Forte

<i>S. mutans</i> Sm11	2,734 ± 0,445	Forte
<i>S. mutans</i> Sm12	3,234 ± 0,432	Forte
<i>S. mutans</i> ATCC 700610	1,721 ± 0,125	Forte
CNI	0,112 ± 0,007	-

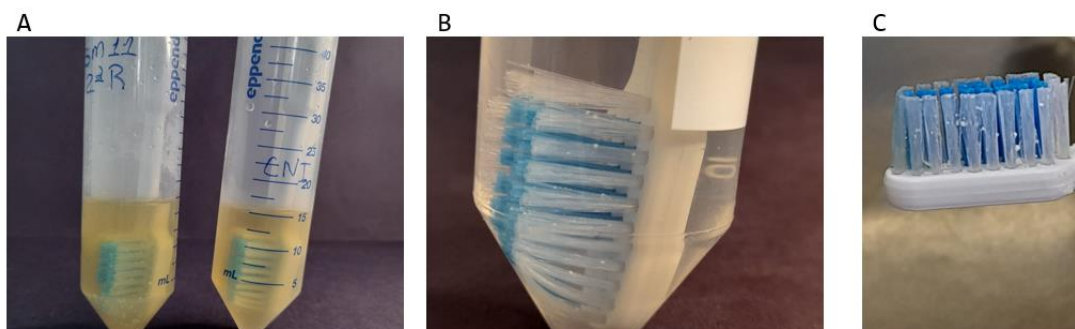
Fonte: os autores

Legenda: DO_{620nm}: Densidade óptica de 620 nm; DP: Desvio padrão; CNI: Controle não inoculado; ATCC: *American Type Culture Collection*.

Os isolados Sm1 e Sm12 obtiveram as maiores leituras de densidades ópticas de **3,234±0,414** e **3,290±0,432**, respectivamente. Por outro lado, o Sm ATCC 700610 foi a bactéria com as menores leituras de densidade óptica (**1,721±0,125**), portanto as que formaram menos biofilme.

Nos ensaios de contagem das bactérias associadas aos biofilmes, foram observadas turvações características de crescimento microbiano nos tubos com BHIS e escovas após a incubação (Figura 4).

Figura 4 - Aspecto macroscópico das escovas inoculadas com *S. mutans* nos ensaios de formação de biofilme



Fonte: os autores

Legenda: A: Após a incubação a 37 °C por 48h em caldo BHIS B: Detalhe das microcolônias bacterianas aderidas às cerdas em solução fisiológica estéril e C: Aspecto macroscópico dos biofilmes de *S. mutans* aderidos às cerdas.

Após o processamento das escovas, os isolados Sm10 ($8,47 \times 10^7$), Sm7 ($7,23 \times 10^7$) e Sm6 ($7,18 \times 10^7$) apresentaram os maiores valores de contagem de bactérias. As menores contagens bacterianas foram observadas

para a cepa SmATCC 700610 ($5,25 \times 10^6$). Os isolados com as menores contagens foram Sm11 ($1,45 \times 10^7$) e Sm12 ($2,03 \times 10^7$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Contagem do número de *Streptococcus mutans* viáveis associados ao biofilme em escovas dentais

Bactérias	Nº de bactérias associadas ao biofilme (ufc mL ⁻¹)
	Média ± DP
<i>S. mutans</i> Sm1	$2,54 \times 10^7$ ± $6,60 \times 10^6$
<i>S. mutans</i> Sm4	$6,43 \times 10^7$ ± $1,73 \times 10^7$
<i>S. mutans</i> Sm5	$5,46 \times 10^7$ ± $5,22 \times 10^7$
<i>S. mutans</i> Sm6	$7,18 \times 10^7$ ± $5,85 \times 10^7$
<i>S. mutans</i> Sm7	$7,23 \times 10^7$ ± $2,17 \times 10^7$
<i>S. mutans</i> Sm10	$8,47 \times 10^7$ ± $4,68 \times 10^7$
<i>S. mutans</i> Sm11	$1,45 \times 10^7$ ± $1,07 \times 10^7$
<i>S. mutans</i> Sm12	$2,03 \times 10^7$ ± $7,02 \times 10^6$
<i>S. mutans</i> ATCC 700610	$5,25 \times 10^6$ ± $2,05 \times 10^6$
CNI	-

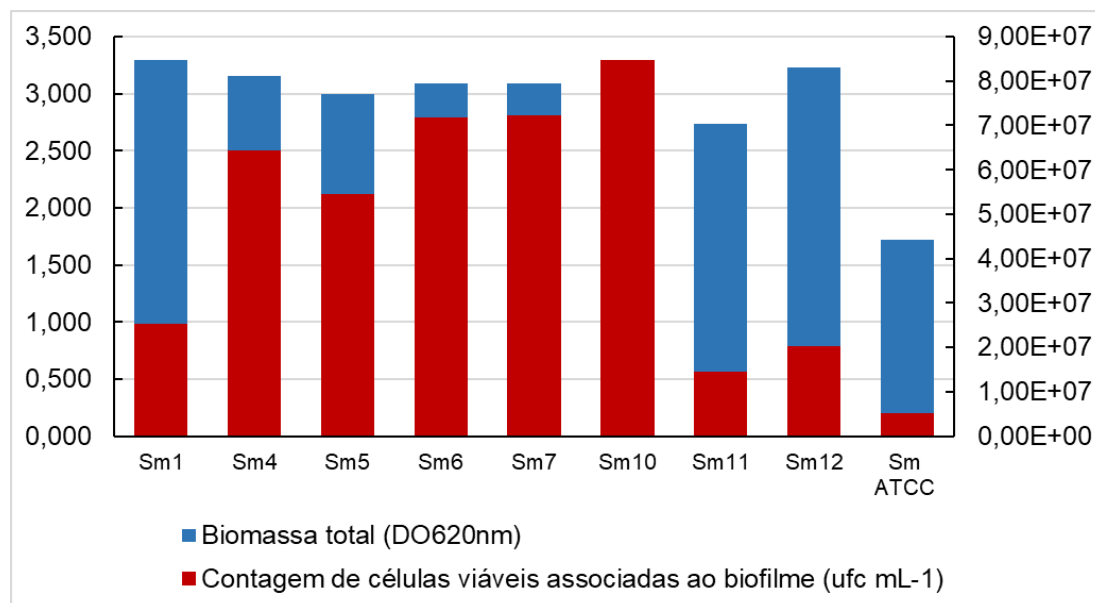
Fonte: os autores

Legenda: UFC mL⁻¹: unidades formadoras de colônias por mililitro; DP: Desvio padrão; CNI: Controle não inoculado; ATCC: *American Type Culture Collection*; NHC: Não houve crescimento.

A comparação entre os resultados de ambas técnicas demonstrou correlação entre elas para a maioria dos isolados. A cepa Sm ATCC 700610 apresentou uma menor contagem de bactérias e uma menor biomassa total. Entretanto, para os isolados Sm11, Sm12 foi observada uma menor contagem

de bactérias sem que fosse observado o mesmo grau de diminuição da biomassa total (Figura 5).

Figura 5 - Determinação do biofilme bacteriano - Biomassa total e Contagens das bactérias viáveis associadas



Fonte: os autores

Neste estudo, identificamos presuntivamente o principal causador da cárie dentária - o *Streptococcus mutans* - através de técnicas de cultura microbiana e testes bioquímicos. Posteriormente, realizamos os ensaios de determinação do perfil de formação de biofilme de *S. mutans*.

A biomassa total é a quantidade de matéria orgânica presente no biofilme formado por bactérias e é revelada pela reação que envolve o cristal violeta e o exopolissacarídeo desse biofilme.

Os biofilmes são compostos por uma população de células microbianas que estão aderidas entre si e à superfície sólida. Essas células microbianas estão embutidas em uma matriz extracelular viscosa, composta por substâncias extracelulares como exopolissacarídeos, proteínas e lipídios (DAVE *et al.*, 2016).

Bactérias em biofilmes constituem populações heterogêneas com variada taxa de crescimento. A heterogeneidade dos biofilmes depende de

parâmetros físicos e químicos, como as condições ambientais às quais estão expostos e a atividade metabólica das bactérias dentro dos biofilmes (STEWART e FRANKLIN, 2008).

Interações físicas diretas entre células individuais medeiam arranjos arquitetônicos do biofilme e fornecem proximidade espacial para comunicação química e cooperação metabólica (DIAZ e VALM, 2020).

Trabalhos prévios constataram que os *S. mutans* na cavidade oral formam biofilmes aderentes às superfícies dos dentes (MELOK *et al.*, 2018). Em nosso estudo, detectamos o predomínio do perfil de formação forte de biofilme pelos *S. mutans*, sugerindo o quão aderente esses micro-organismos são em superfícies sólidas diferentes das dos dentes, como foram as cerdas das escovas.

A adesão bacteriana em superfícies abióticas inanimadas, como plásticos e metais, é o primeiro estágio na formação de biofilmes. A adesão primária a superfícies abióticas é considerada reversível e é mediada por interações físico-químicas não específicas com receptores superficiais bacterianos (DUNNE, 2002).

A escovação dentária é importante na promoção da manutenção saúde bucal. A diversidade metabólica e a capacidade de adaptação a estresses ambientais são características fundamentais dos micro-organismos da boca. As bactérias orais existem como células planctônicas (de vida livre), ou como células sésseis associadas a biofilmes. As células planctônicas são importantes para a rápida proliferação e propagação dos micro-organismos para novos territórios, enquanto que as células sésseis caracterizam a cronicidade (TRENTIN *et al.*, 2013).

As escovas dentais mantêm micro-organismos viáveis em suas cerdas, como predomínio de cocos Gram-positivos que podem causar periodontopatias aos seus usuários (PINTO, PAIVA e PIMENTA, 1997).

A observação do crescimento de colônias isoladas de *S. mutans* nas cerdas de escovas corrobora a importância na adoção de cuidados relacionados ao armazenamento e higiene das escovas dentais.

4.4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os isolados da cavidade bucal foram identificados presuntivamente com métodos fenotípicos e todos foram capazes de formar biofilmes classificados como fortes em escovas dentais. Os *Streptococcus mutans* são capazes de se aderir e formar biofilmes nas escovas dentais e que comportamento e as relações associadas ao *S. mutans* são essenciais para controle dessas bactérias e da cárie dentária.

A escovação dental é um dos métodos mais utilizados na higiene bucal, mas ao remover o biofilme microbiano e outros resíduos, mas durante a escovação, as escovas são contaminadas com bactérias, sangue, saliva e detritos orais e podem ser uma fonte de infecção (NAIK *et al.*, 2015)

A escova de dentes é contaminada após o primeiro uso e, com o uso contínuo, o nível de contaminação aumenta. Condições como a umidade na área de armazenamento, o uso de uma tampa de plástico, o formato da escova de dentes e o tipo de cerdas tendem a aumentar a contaminação (KHAN *et al.*, 2024).

Deste modo, concluímos que o perfil de formação de biofilme dos *Streptococcus mutans* em escovas dentais reforça a necessidade de estudos complementares para o desenvolvimento dessa estrutura.

4.4.5 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. K. *et al.* Doença cárie em portadores de diabetes mellitus: uma revisão narrativa da literatura. **Oral Sciences**, v. 9, n. 1, p. 18-23, jan./dez. 2017. Disponível em: <https://portalrevistas.ucb.br/index.php/oralsciences/article/view/11131>. Acesso em: 22 abr. 2024.

BARBIERI, D. S. V. *et al.* Analysis of the in vitro adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 624-631, dez. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000400009>. Disponível em: <https://www.scielo.br/bjm/a/8m5vYGy9JZjgzXjwGMYt6vn/?lang=en>. Acesso em: 18 abr. 2024.

CORIOLOANO, D. L. *et al.* Antibacterial and antibiofilm potential of silver nanoparticles against antibiotic-sensitive and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 267-278, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00406-x>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42770-020-00406-x>. Acesso em: 29 mar. 2024.

DAVE, S. R. *et al.* Microbial exopolysaccharide-an inevitable product for living beings and environment. **J Bacteriol Mycol Open Access**, v. 2, n. 4, p. 109-111, set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2016.02.00034>. Disponível em: <https://medcraveonline.com/JBMOA/microbial-exopolysaccharide---an-inevitable-product-for-living-beings-and-environment.html>. Acesso em: 21 abr. 2024.

DIAZ, P. I.; VALM, A. M. Microbial interactions in oral communities mediate emergent biofilm properties. **Journal of Dental Research**, v. 99, n. 1, p. 18-25, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034519880157>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0022034519880157>. Acesso em: 20 fev. 2024.

DUNNE JR, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 155-166, abr. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.15.2.155-166.2002>. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/cmr.15.2.155-166.2002?casa_token=zLGZM9W_Q9sAAAAA%3Ab3civfZwt5SleJ9ufEWcV1MXHIYTeWobONfRSI2Pg45mUn8uoR9hxe3pLF1Ns9ulB65G_fVo2-fbTQ. Acesso em: 26 mar. 2024.

KHAN, S. A. *et al.* An updated systematic review on toothbrush contamination: An overlooked oral health concern among general population. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 22, n. 1, p. 95-105, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/idh.12740>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/idh.12740?casa_token=NHZW

2dk6QqQAAAAA%3AJi1bWFpt78OoLXx0ILT_vnXZvKthnHlroK3RF0ErJGAA
NZyhtFW8ScR7uKMevordlg6fYNmyl8xfOw. Acesso em: 30 abr. 2024.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WIN, W. C. The Gram-positive cocci part II: streptococci, enterococci and the 'Streptococcus-like' bacteria. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5th. ed. New York: Lippincott; 1997. 577-649.

LEITES, A. C. B. R.; PINTO, M. B.; SOUSA, E. R. Aspectos microbiológicos da cárie dental. **Salusvita**, v. 25, n. 2, p. 239-52, 2006. Disponível em: https://secure.unisagrado.edu.br/static/biblioteca/salusvita/salusvita_v25_n2_2006.htm. Acesso em: 28 abr. 2024.

LEMOS, J. A. *et al.* The Biology of *Streptococcus mutans*. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 1, p. 10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018>. Acesso em: 18 abr. 2024.

MELOK, A. L.; LEE, L. H.; YUSSOF, S. A. M.; CHU, T. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate-Stearate Inhibits the Growth of *Streptococcus mutans*: A Promising New Approach in Caries Prevention. **Dentistry journal**, v. 6, n. 3, p. 38, ago. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/dj6030038>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-6767/6/3/38>. Acesso em: 25 abr. 2024.

MENEZES, M. L. F. V. *et al.* A importância do controle do biofilme dentário: uma revisão da literatura. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 55, p. e3698-e3698, ago. 2020. DOI: <https://doi.org/10.25248/reas.e3698.2020>. Disponível em: <https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/3698>. Acesso em: 27 mar. 2024.

NAIK, R. *et al.* Contaminated toothbrushes – potential threat to oral and general health. **Journal of family medicine and primary care**, v. 4, n. 3, p. 444-448, jul. 2015. DOI: <https://doi.org/10.4103/2249-4863.161350>. Disponível em: https://journals.lww.com/jfmpc/fulltext/2015/04030/Contaminated_tooth_brushes_potential_threat_to.33.aspx. Acesso em: 23 abr. 2024.

PINTO, E. D. R.; PAIVA, E. M. M.; PIMENTA, F. C. Viabilidade de microrganismos anaeróbios da cavidade bucal em escovas dentárias. **Periodontia**, p. 8-12, jan./jun. 1997. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/porta1/resource/pt/biblio-853592>. Acesso em: 21 mar. 2024.

ROCHA, R. M. **Associação da quitosana e clorexidina contra formação de biofilmes por estreptococos do grupo mutans e *Candida sp.* em escovas dentais**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) - Câmpus Central - Sede: Anápolis - CET - Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2022. Disponível em: <http://www.bdttd.ueg.br/handle/tede/1123>. Acesso em: 27 abr. 2024.

RODRIGUES, A. P. N. **Candida ssp. Em escovas dentais e eficácia de antimicrobianos na sua desinfecção**. 2009. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009. DOI: <https://doi.org/10.11606/T.60.2009.tde-25052009-124603>. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-25052009-124603/en.php>. Acesso em: 25 mar. 2024.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 199-210, mar. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1838>. Acesso em: 10 abr. 2024.

ZAYED, S. M.; ABOULWAFA, M. M.; HASHEM, A. M.; SALEH, S. E. Biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its inhibition by green tea extracts. **AMB Express**. v. 11, n. 1, p. 73, mai. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01232-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13568-021-01232-6#citeas>. Acesso em: 24 abr. 2024.

AGRADECIMENTOS

Ao mestrado em Ciências Aplicadas à Produtos para a Saúde da UEG, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado à primeira e ao terceiro autores.

Contato dos autores/as:

Autor:

E-mail:

Manuscrito aprovado para publicação em: XX/XX/20XX

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho que se relacionam com as características das nanopartículas de prata sintetizadas AgNP(1) e AgNP(2), são a morfologia esférica, a distribuição de tamanho dos aglomerados, a carga superficial nula e principalmente a monodispersão da AgNP(2), que pode corroborar com os resultados da ação antibiofilme. Conseguimos identificar e isolar *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Streptococcus mutans*. Todos os micro-organismos selecionados foram classificados quanto à biomassa total e quantificados quanto às células viáveis aderidas nos microtubos e nas escovas dentais. Todas as leveduras foram inibidas por ambas nanopartículas de prata e não apresentaram diferenças significativas de atividade antifúngica (CMI e CMF). A nanopartícula AgNP(2) foi mais ativa contra a formação de biofilmes de *C. albicans* e *C. krusei*, sendo capaz de atuar com concentrações subinibitórias.

A nanotecnologia é usada no combate aos micro-organismos resistentes. Estudar os parâmetros químicos e biológicos desta interação pode resultar em novas tecnologias na produção de medicamentos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de hidróxido de amônio direciona o crescimento regular das nanopartículas. As duas AgNPs sintetizadas foram quase esféricas, com tamanhos e cargas superficiais semelhantes, formando aglomerados. AgNP(1) foi polidispersa, enquanto a AgNP(2) foi monodispersa, com distribuição de tamanho mais homogênea e menor formação de agregados.

Todos os micro-organismos foram capazes de formar biofilmes. Os isolados formaram mais biofilmes que as cepas-padrão ATCC. O estudo da formação de biofilmes é crucial para a compreensão do impacto dessa estrutura no desenvolvimento de estratégias para o controle e prevenção de infecções. A regularidade e o estado de agregação das AgNPs influenciaram sua atividade antimicrobiana. As duas nanopartículas não apresentaram diferenças significativas entre as atividades fungistática e fungicida. Entretanto, a AgNP(2) foi mais ativa contra a formação de biofilme, possuindo atividade antibiofilme com concentrações subinibitórias.

O forte perfil de formação de biofilme de *Streptococcus mutans* isolados das escovas dentais analisadas, pode ser um indicador da dinâmica de colonização bacteriana na cavidade bucal, do potencial patogênico e da resistência a tratamentos, contribuindo para saúde bucal geral.

Neste estudo a observação do desenvolvimento de novas abordagens no tratamento antimicrobiano com a nanotecnologia utilizada pode auxiliar no entendimento da influência das propriedades físico-químicas das nanopartículas e suas interações com micro-organismos associados aos biofilmes.

7. PRODUTOS GERADOS

- Março, 2024: Apresentação do trabalho **“Perfil de formação de biofilmes de *Streptococcus mutans* e *Candida sp.* isolados da cavidade bucal”** no III Congresso Interdisciplinar em Ciências da Saúde (CICS) da Universidade Estadual de Goiás. link: <https://www.revista.ueg.br/index.php/movimenta/article/view/15305/10> 583 pág. 63
- Maio, 2024: Apresentação do trabalho **“PERFIL DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Streptococcus mutans* ISOLADOS DA CAVIDADE BUCAL EM ESCOVAS DENTAIS”**, no X Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão - X EEPEX, Campus Central de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás.
- Agosto, 2024: Submissão do manuscrito **“PERFIL DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Streptococcus mutans* ISOLADOS DA CAVIDADE BUCAL EM ESCOVAS DENTAIS”**, selecionado em primeiro lugar no X EEPEX, para publicação na Revista Sapiência, sociedade, saberes e práticas educacionais, em 23 de agosto de 2024.

Link do Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2809031464940011>

Link do ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-5974-1548>

8. REFERÊNCIAS

- DORGHAM, R, A.; ABD, AL, MOATY.; M, N.; CHONG, K.P.; ELWAKIL, B.H. Molasses-Silver Nanoparticles: Synthesis, Optimization, Characterization, and Antibiofilm Activity. Int. **J. Mol. Sci.** v.23, p.10243. 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms231810243>.
- HERNANDEZ-SIERRA J.F.; RUIZ F, PENA DC, MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ F, MARTÍNEZ AE, GUILLÉN ADE J, TAPIA-PÉREZ H, CASTAÑÓN GM. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. **Nanomedicine.** v.4, p.237-40. 2008. doi: 10.1016/j.nano.2008.04.005.
- SANTOS L.M.; RODRIGUES DM, ALVES BVB, KALIL MA, AZEVEDO V, BARH D, MEYER R, DURÁN N, TASIC L, PORTELA RW. Atividade de nanopartículas de prata biogênicas em *Corynebacterium pseudotuberculosis* plantônica e associada a biofilme. **Peer J.** v.12, p.16751. 2024 <https://doi.org/10.7717/peerj.16751>.
- SIDDIQUE, MUHAMMAD HUSSNAIN *et al.* Effect of Silver Nanoparticles on Biofilm Formation and EPS Production of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. **BioMed research international.** v. 20 p. 6398165. 2020. doi:10.1155/2020/6398165
- TABARAN A.F.; MATEA CT, MOCAN T, TABARAN A, MIHAIU M, IANCU C, MOCAN L. Nanopartículas de prata para a terapia da tuberculose. **Revista Internacional de Nanomedicina.** v.15; p.2231-2258. 2020.
- ZAYED, S.M.; ABOULWAFI, M.M.; HASHEM, A.M.; SALEH, S.E. Biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its inhibition by green tea extracts. **AMB Express.** v.25; n. 11, p. 73. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01232-6>.

Anexo 1: Preparo de meios de cultura e soluções**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 ao teste de esterilidade em estufa a 37 °C por 48 h, seladas hermeticamente.

1. Ágar *Mitis Salivarius* (AMS, Isofar®) acrescido de Bacitracina e Sacarose (AMS-BS)

Para cada 1 Litro do meio de cultura AMSB usar:

Triptose.....	10,0 g/L
Proteose peptona nº 3	5,0 g/L
Proteose peptona	5,0 g/L
Glicose	1,0 g/L
Sacarose	50,0 g/L
Fosfato dipotássico	4,0 g/L
Azul trypan	0,075 g/L
Ágar bacteriológico	0,0008 g/L
pH	a 25 °C
Telurito de potássio	1%
Bacitracina	1%

Para preparo de 1 L de meio AMSBS, foi utilizado um frasco com tampa para autoclavagem. São pesados em balança analítica, 90,1 g de meio AMS, e acrescenta-se 150 g de sacarose e 1 L de água destilada. Homogeneizar o frasco até completa dissolução. Faz-se a autoclavagem com a tampa entreaberta a 125 °C por 15 minutos em pressão de trabalho 1,5 kgf/cm². Deixar a solução autoclavada pronta, sob fluxo laminar até a temperatura de 50 °C, e adicionar a 10 mL de bacitracina 1% com o auxílio do filtro milipore (0,22 µm) e 1mL de telurito de potássio 1% (conforme descrito abaixo). Homogeneizar o frasco novamente, e colocar o meio líquido em placas de Petri estéreis. Deixar gelatinizar, e colocar na estufa a 37°C por 48h, para o teste de esterilidade do meio. Armazenar o meio AMSBS pronto em geladeira.

2. Solução de bacitracina 1%

Foram pesados 13,20 mg de bacitracina P.A. (Dr. Ehrenstorfer GmbH) em balança analítica e sob o fluxo laminar, assepticamente adiciona-se 40 mL de água destilada. Esta solução foi utilizada proporcionalmente à quantidade de meio preparado (CAMPOS, 2006). Armazenar em tubo Falcon estéril, ao abrigo da luz e sob refrigeração.

3. Solução de telurito de potássio 1%

Sob o fluxo laminar, foi medido em proveta, 20 mL solução de telurito de potássio 1% (pronta para uso). Filtra-se a solução com o auxílio de uma seringa de 20 mL e filtro Millipore de 0,22 µm na ponta da seringa. Armazenar em tubo Falcon estéril, ao abrigo da luz e sob refrigeração.

4. Preparo de Ágar Sabouraud Dextrose Cloranfenicol (ASDC)

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

Para cada 1 L de água destilada acrescentar 62,1 g de meio ágar Sabouraud Dextrose. Acrescentar 0,5 g de cloranfenicol em pó para cada 1 L da solução pronta. Pode levar o cloranfenicol para autoclavar. Homogeneizar o frasco até completa dissolução. Faz-se a autoclavagem com a tampa entreaberta a 125 °C por 15 minutos em pressão de trabalho 1,5 kgf/cm². Deixar a solução

autoclavada pronta, sob fluxo laminar até a temperatura de 50 °C. Colocar aproximadamente 20 mL do meio pronto e autoclavado em placas de Petri, deixar gelatinizar e armazenar sob refrigeração para posterior uso.

5. Preparo do Caldo infusão coração cérebro acrescido de glicerol 20%

Meio de cultura rico e não seletivo, utilizado para congelamento, conservação e viabilidade de micro-organismos não seletivo das amostras de *S. mutans* (Himedia).

Para cada 37 g de meio BHI em pó, adicione 1 L de água destilada. Acrescentar 200 mL de glicerol para cada 1 L da solução de BHI pronta. Homogeneizar o frasco até completa dissolução. Fazer alíquotas de 4500 µL em tubos de ensaio com tampa. Faz-se a autoclavação com a tampa entreaberta a 125 °C por 15 minutos em pressão de trabalho 1,5 kgf/cm². Deixar a solução a temperatura ambiente e armazenar sob refrigeração para posterior uso.

6. Preparo do caldo infusão coração cérebro acrescido de sacarose 2% (BHIS)

Meio de cultura rico e não seletivo, utilizado para crescimento não seletivo das amostras de *S. mutans* (Himedia). Para cada 37 g de meio BHI em pó, adicione 1 L de água destilada. Acrescentar 20 g de sacarose para cada 1 L da solução de BHI pronta. Homogeneizar o frasco até completa dissolução. Fazer alíquotas de 4500 µL em tubos de ensaio com tampa. Faz-se a autoclavação com a tampa entreaberta a 125 °C por 15 minutos em pressão de trabalho 1,5 kgf/cm². Deixar a solução a temperatura ambiente e armazenar sob refrigeração para posterior uso.

7. Caldo Tioglicolato de sódio

Usado para fermentação de açúcares manitol ou sorbitol. Para cada formulação usar de cada vez, apenas um tipo de açúcar (ou manitol ou sorbitol).

Para cada 100 mL de Caldo Tioglicolato de sódio usar:

Caseína1,5g

Levedura.....0,5g

Manitol ou Sorbitol.....0,55g

Cloreto de sódio0,25g

L-cistina.....0,05g

Tioglicolato de sódio0,05g

Ágar0,075g

Solução de resazurina1 mL (não autoclavar)

Em um frasco de 1000 mL, colocou-se todos os ingredientes pesados e completou o volume. Somente acrescentou-se a resazurina após a autoclavação. Autoclavou-se a 125 °C por 15 minutos em pressão de trabalho 1,5 kgf/cm². Sob o fluxo laminar, transfiriu-se 10 mL do caldo pronto, para tubos de ensaio estéreis do tipo Falcon de 15 mL. Acrescentou-se a Resazurina filtrando. Colocou-se os tubos Falcon prontos para teste de esterilidade em estufa a 37 °C por 24 h. Com o auxílio da alça de platina, pinçou-se algumas colônias crescidas e incubadas previamente, e inoculou-se até o final do tubo, no caldo tioglicolato de sódio. Colocou-se em estufa bacteriológica a 37°C por 72h.

8.Solução de Resazurina

Para cada 10 mg ou 0,01 g de resazurina em cada 100 mL de água destilada. Colocar em um frasco âmbar ao abrigo da luz e armazenar sob refrigeração para posterior uso. Esterilizar por filtração com membrana millipore.

9. Solução fisiológica estéril 0,9% (SFE)

Utilizada para lavagem, diluição dos inóculos.

Composição (g/L):

Cloreto de sódio.....9g

Água destilada1L

ANEXO 2: Regras de publicação da Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais



O TÍTULO - FONTE 16, ESCRITO EM CAIXA ALTA COM A COR DE DESTAQUE (todo o manuscrito deve usar a fonte “consolas”)

Título em Inglês (fonte 10, itálico)

Autor (fonte 12 negrito) (preenchimento pelos editores)

Instituição (fonte 10)

Autora (fonte 12 negrito) (preenchimento pelos editores)

Instituição (fonte 10)

RESUMO

O resumo, escrito em fonte 10 não deverá ultrapassar 220 palavras. O espaçamento será simples, texto justificado.

Palavras-chaves: no máximo três palavras separadas por ponto e vírgula

ABSTRACT

The abstract, written in 10 font, should not exceed 220 words. Spacing will be simple, justified text.

Keywords: a maximum of three words separated by semicolons

INTRODUÇÃO (títulos, maiúsculo, negrito, fonte 12, sem numeração. Começando na segunda página do manuscrito)

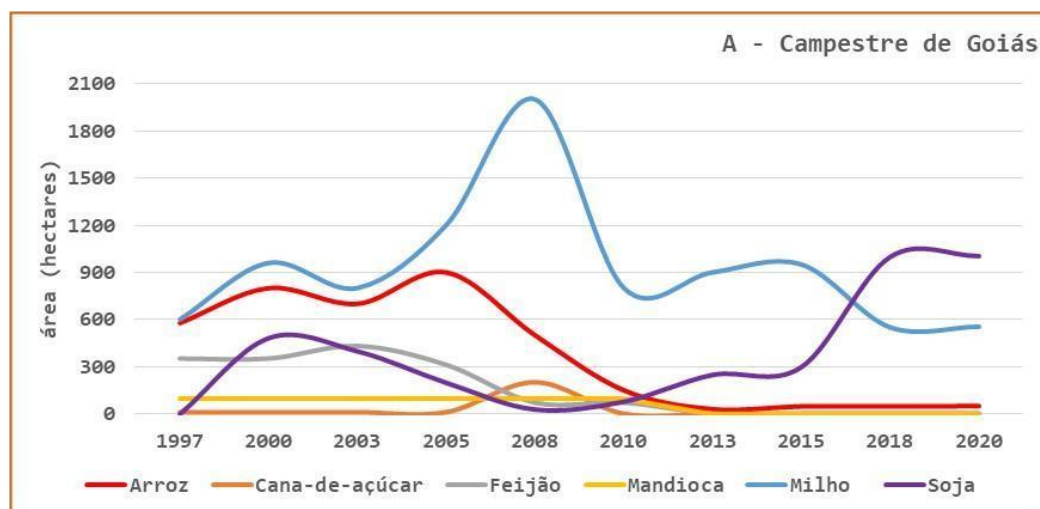
Subtítulos (minúsculo, negrito, fonte 11, sem numeração)

Os manuscritos devem ser digitados em tamanho de papel A4 (21 x 29,7 cm), com margens de 3 cm (superior, inferior, esquerda e direita). O texto deverá ser escrito em fonte 11, espaçamento simples, com recuo de 1,5cm no início do parágrafo. Deve ser respeitada a distância de 0.6 de espaçamento após cada parágrafo. Usar a norma atualizada da ABNT para citações (NBR 10520/2023).

As citações diretas, quando existirem, deve ser recuadas (4cm - esquerda), escritas em fonte 10, espaçamento simples, deixando a distância de 0.6 antes e após a citação (parágrafo). (Agostinho, 2022, p. 13).

As figuras, quadros, tabelas, gráficos, fotografias etc, precisam ter chamada no texto. O título, justificado, deve aparecer na parte superior e a fonte na parte inferior (o texto da fonte, centralizado, terá tamanho 10). Exemplo:

Figura 1 – Variação da área ocupada (hectares) por lavouras temporárias nos Municípios de Campestre de Goiás – GO no período de 1997 a 2020



Produção Agrícola Municipal para os anos de 1997 a 2020 – IBGE (2021).

REFERÊNCIAS

Usar a norma da ABNT (NBR 6023). Use espaçamento simples entre as linhas e espaçamento 6 (antes) e 12 (depois) entre cada referência. Exemplos:

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal – PAM**. (Periodicidade Anual). Rio de Janeiro, IBGE, 2021b. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 01 jun. 2021.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal – PPM**. (Periodicidade Anual). Rio de Janeiro, IBGE, 2021a. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 01 jun. 2021.

AGRADECIMENTOS

Caso seja necessário....

Contato dos autores/as:

Autor: xxxxxx

E-mail: xxxxx@

Manuscrito aprovado para publicação em: xx/xx/20xx

ANEXO 3: Resumo apresentado no X EEPEX

PERFIL DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Streptococcus mutans* ISOLADOS DA CAVIDADE BUCAL EM ESCOVAS DENTAIS

Maria José Barbaresco, Mestranda CAPS, UEG/CET, mariajbarbaresco@gmail.com; Justino Carlos Baptista, Graduando Farmácia, UEG/CET, justinobaptista95@gmail.com; João Salviano Simões Chagas da Silva, Mestrando CAPS, UEG/CET, joaosalviano14@gmail.com; Reuber Mendes Rocha, Mestre, UFG/FO, reuber.mr@gmail.com; Plínio Lázaro Faleiro Nunes, Doutor, UEG/CET, pliniofaleiro@ueg.br

Área do trabalho: PESQUISA

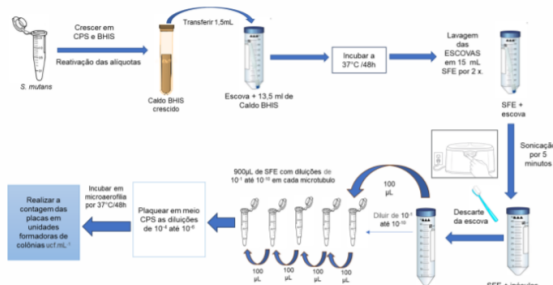
Curso: Mestrado em Ciências Aplicadas à produtos para Saúde

INTRODUÇÃO

Micro-organismos como o *Streptococcus mutans* colonizam as superfícies da cavidade bucal e formam biofilmes, que podem desenvolver cárie dentária (ZAYED *et al.*, 2021). A identificação de *S. mutans* pode ser realizada por técnicas de cultura microbiana e testes bioquímicos). A escova dental sofre deposição e proliferação de micro-organismos em suas cerdas durante seu uso. Foi demonstrado a correlação entre a carga microbiana nas escovas de dente e o estado dentário do paciente (ROCHA, 2022). Este estudo avalia o perfil de formação de biofilme de *S. mutans*, através da biomassa total (DO_{600nm}) em relação a aderência desse micro-organismo nas escovas dentais, demonstrado pela contagem de colônias crescidas.

MATERIAL E MÉTODO

Oito isolados de micro-organismos do Laboratório de Bioensaios (LabBio-UEG) foram reativados em placas com Ágar Mitis Salivarius Bacitracina (AMSB) e incubados a 37°C por 72h. O aspecto colonial foi analisado com microscópio e coloração Gram. A identificação presuntiva dos *S. mutans* foi finalizada com os testes bioquímicos de produção de catalase, hemólise em ágar sangue, beta-glucuronidase em ágar cromogênico, fermentação de manitol e sorbitol e teste Pyr. A formação de biofilme foi avaliada com a determinação da biomassa total em microplacas coradas com cristal violeta conforme ZAYED (2021), e pela contagem das células viáveis aderidas às cerdas de escovas inoculadas.



RESULTADOS

Foram considerados como *S. mutans*, os estreptococos que se apresentaram com colônias azuis escuras incrustadas, brilhantes e com aparência de vidro moído crescidas em AMSB com o aspecto microscópico de cocos Gram positivos isolados aos pares. Os testes bioquímicos realizados tiveram os seguintes resultados: catalase negativa, alfa hemólise, beta-glucuronidase positiva, fermentação de manitol e sorbitol e teste Pyr negativo. Todos os 8 *S. mutans* formaram biofilme, sendo todos classificados como formadores fortes de biofilme, de acordo com a coloração de cristal violeta.

