



# Efeito inibitório de vernizes à base de produtos naturais na formação de biofilme oral multiespécies

Palavras-Chave: *STREPTOCOCCUS MUTANS*. *CANDIDA ALBICANS*. CÁRIE DENTÁRIA. FLAVONOIDES. TERPENOS. XANTINAS. PRODUTOS NATURAIS.

Autoras:

TAINÁ DE LIMA COSTA [Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba - SP]

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Regina Maria Puppim-Rontani (orientadora) [Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba - SP]

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aline Rogéria Freire de Castilho (co-autora) [Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba - SP]

## INTRODUÇÃO

A cárie dentária não tratada em dentes permanentes é a condição mais prevalente em todo mundo (Madera & Barnabé, 2021). Trata-se de uma condição que ocorre quando há uma disbiose entre o biofilme e a superfície dentária (Heimisdottir et al., 2021).

Dentre os microrganismos envolvidos na patogênese da cárie, um dos principais patógenos citados é o *Streptococcus mutans*, responsável pela adesão à superfície dentária e iniciação da formação de biofilme (Pitts et al., 2017). Apesar do papel primordial na formação de biofilme, *Streptococcus mutans* não atua sozinho, outras espécies, como a levedura *Candida albicans*, participam da sucessão microbiana e estão frequentemente associadas corroborando com a patogenicidade do biofilme (Falsetta et al., 2014).

Considerados fontes abundantes de compostos bioativos, os produtos naturais são indicados como a estratégia atualmente mais bem sucedida no desenvolvimento de agentes terapêuticos (Castilho et al., 2007; Pereira et al., 2016). A caracterização de formulações para o controle da cárie dentária contendo diferentes princípios ativos, é uma alternativa relevante na Odontologia. O emprego de novos materiais preventivos à base de compostos bioativos deve envolver não somente a capacidade de inibir microrganismos cariogênicos como também desestruturar biofilmes multiespécies. A combinação de flavonoides, terpenos e xantinas em uma única formulação pode resultar em uma formulação potencialmente favorável à inibição do crescimento de microrganismos cariogênicos.

Os compostos naturais *tt*-farnesol, quercetina e teobromina são princípios bioativos eficazes no controle antimicrobiano.

No entanto, o efeito inibitório destes bioativos em biofilme multiespécies ainda é desconhecido. Sendo assim os objetivos do presente estudo é avaliar o efeito inibitório *in vitro* de formulações orais contendo os compostos bioativos *tt*-farnesol, quercetina e teobromina sobre biofilme misto maduro formado pelos seguintes microrganismos: *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Já a hipótese do estudo é que a utilização destes compostos é capaz de inibir a formação de biofilme oral multiespécies.

## METODOLOGIA

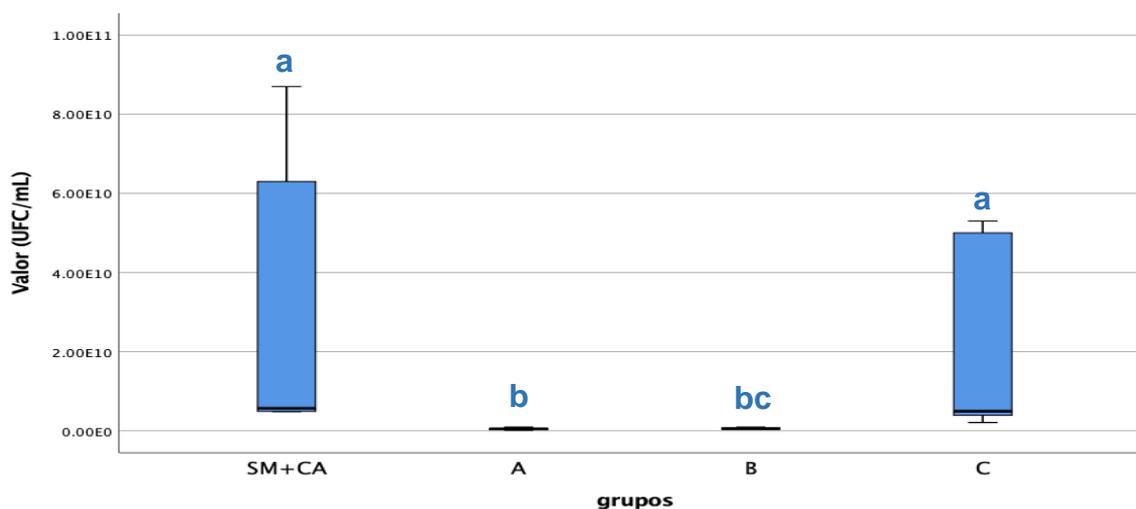
Com o objetivo de avaliar o efeito inibitório de biofilme misto *in vitro*, foram caracterizados vernizes contendo os compostos *tt*-farnesol, quercetina e teobromina em duas concentrações diferentes (A e B). Biofilmes mistos de *Streptococcus mutans* UA159 e *Candida albicans* SC5314 foram cultivados em placas de 96 poços contendo meio de cultura específico (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) e tratados com os vernizes experimentais A, B ou controle (C). Após incubação por 24 h, a viabilidade microbiana foi determinada por contagem de unidades

formadoras de colônias (UFC/mL de biofilme), enquanto que a morfologia do biofilme foi analisada qualitativamente por microscopia eletrônica de varredura.

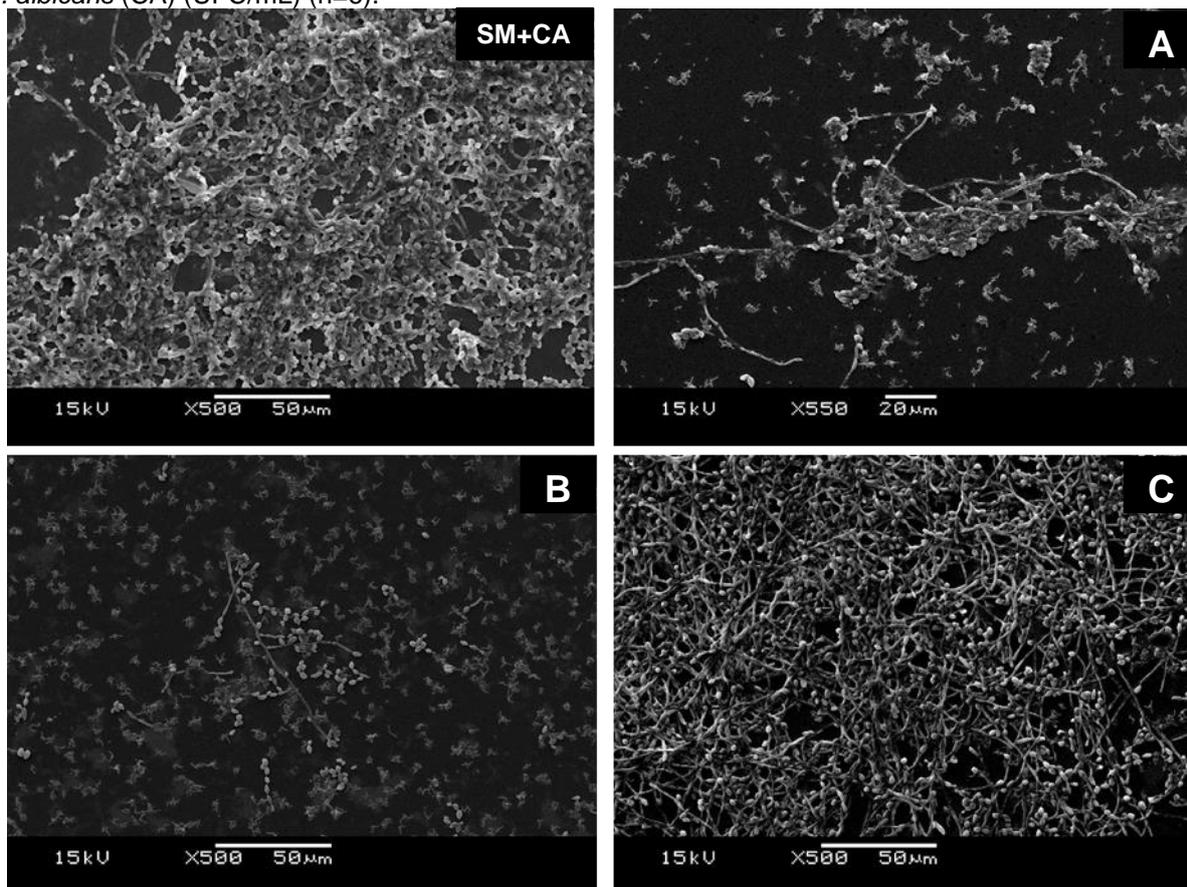
## RESULTADOS

Os dados foram submetidos estatisticamente aos testes de Shapiro-Wilks e Wald ( $p < 0,05$ ). Comparações múltiplas pelo teste de Wald evidenciaram diferença entre os grupos ( $p = 0,0131$ ). Sendo possível observar expressa redução microbiana nos grupos que receberam tratamento com os vernizes A e B (Figura 1).

Quando verificada qualitativamente a morfologia do biofilme por meio de microscopia eletrônica de varredura foi possível observar modificações na população e estrutura do biofilme quando comparados os grupos A, B, C e o de microrganismos (*S. mutans* + *C. albicans*) (Figura 2). Os biofilmes que receberam tratamento dos vernizes A e B apresentaram uma redução notável na biomassa total quando comparados com biofilmes que cresceram sem os bioativos que foram tratados com a formulação controle (C).



**Figura 1.** Box-plot das diferentes formulações de verniz (A, B e C - controle) para biofilmes de *S. mutans* (SM) e *C. albicans* (CA) (UFC/mL) (n=6).



**Figura 2.** Microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de *C. albicans* e *S. mutans*. Imagens mostram a arquitetura típica de biofilme multiespécies (SM+CA, com menos células após o tratamento com diferentes concentrações (A e B) e, nenhuma redução de biofilme (C) em aumento de 500 x.

## DISCUSSÃO

Biofilmes apresentam maior resistência e maior tolerância físico-química a agentes antimicrobianos quando comparados às células planctônicas devido à complexidade da matriz de polissacarídeos extracelulares que os circunda formando uma barreira protetora (Steenackers et al., 2016; Handorf et al., 2018).

Apesar do biofilme de *C. albicans* sozinho não ser capaz de desmineralizar a dentina, quando esta espécie está associada ao biofilme de *S. mutans* é possível perceber que há um aumento na desmineralização dentinária, devido ao aumento da

acidogenicidade do biofilme pela diminuição de pH e aumento na produção de ácido lático (Sampaio et al., 2019). Portanto, é de grande valia a utilização de um bioativo capaz de inibir o crescimento de ambas as espécies, tanto *S. mutans* quanto *C. albicans*, visto que a virulência do biofilme cariogênico aumenta na presença da levedura, evitando assim o avanço da lesão de cárie e controlando, conseqüentemente, o potencial desmineralizador do biofilme. Assim, modelos de biofilme multiespécies como o modelo aqui utilizado que associa *S. mutans* + *C. albicans* se aproxima da situação clínica crítica devido

à complexidade comprovada do biofilme de diferentes espécies (Rocha et al., 2018).

O biofilme de *S. mutans* + *C. albicans* mostrou-se susceptível às formulações experimentais A e B. Embora tenha maior concentração de ativos na composição B, o verniz B não demonstrou efetividade superior ao verniz A, mas também teve importante redução de massa de biofilme (Figura 1). Isso pode ser explicado pelo fato de, por se tratar de modelo de biofilme *in vitro*, o crescimento de colônias não é uniforme e os experimentos apresentaram grande variância. A ausência de diferença entre os grupos A e B pode ser justificada pela sensibilidade do teste estatístico empregado, evidenciando a necessidade de mais uma repetição dos ensaios.

Um estudo utilizando verniz a base de extrato de própolis verde brasileiro mostrou-se capaz de inibir o crescimento de espécies cariogênicas, sendo elas: *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivarius* e *L. casei* (De Luca et al., 2014). Em comparação ao presente estudo, o verniz testado apresenta capacidade de inibir crescimento de um biofilme multiespécies, que é mais resistente que células planctônicas e biofilme monoespécie. Outro estudo recente realizou análise dos efeitos antimicrobianos e anticárie do verniz de TiF<sub>4</sub> em biofilme microcosmo formado em esmalte (Souza et al., 2017). Embora o verniz de TiF<sub>4</sub> tenha sido capaz de reduzir a desmineralização do esmalte, o mesmo não foi capaz de interferir na adesão de microrganismos, crescimento e atividade de biofilme (Souza et al., 2017), possivelmente devido à baixa atividade

antimicrobiana. É possível considerar que o flúor é padrão ouro para controle e prevenção da doença cárie no que diz respeito ao controle do processo de desmineralização e remineralização, no entanto, como agente antimicrobiano não se mostra eficaz, não sendo capaz de tratar de forma completa o processo infeccioso da doença.

No estudo, os biofilmes multiespécies e maduros foram inibidos com uma única aplicação dos vernizes experimentais, enquanto que, clinicamente, a recomendação é que vernizes para controle e tratamento de lesões cáries sejam aplicados semanalmente durante 3 semanas. Assim, acredita-se que o efeito inibitório dos vernizes possa ser potencializado se aplicado por dias consecutivos ou semanalmente, seguindo os protocolos clínicos, pois ocorreria a liberação gradual e contínua dos compostos na cavidade bucal.

Considerando que o biofilme formado por *S. mutans* em associação com *C. albicans* é altamente organizado, resistente, e portanto, de alta cariogenicidade, os resultados obtidos aqui são extremamente relevantes, pois os vernizes ao inibirem significativamente a formação deste biofilme multiespécies mostram-se importantes alternativas antimicrobianas, capazes de contribuir para o controle da formação de biofilme e do surgimento de novas lesões cáries.

## CONCLUSÕES

Diante das limitações deste estudo *in vitro*, foi possível concluir que formulações orais na forma de vernizes odontológicos

contendo os bioativos naturais *tt*-farnesol, quercetina e teobromina apresentam efeito inibitório de biofilmes mistos maduros formados por *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, que são importantes patógenos envolvidos no processo da doença cárie.

## BIBLIOGRAFIA

- Alexandria AK, Nassur C, Nóbrega CBC, Branco-de-Almeida LS, Dos Santos KRN, Vieira AR, et al. **Effect of TiF<sub>4</sub> varnish on microbiological changes and caries prevention: in situ and in vivo models.** Clin Oral Investig. 2019 Jun;23(6):2583-2591.
- Cardoso CA, de Castilho AR, Salomão PM, Costa EN, Magalhães AC, Buzalaf MA. **Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in vitro.** J Dent. 2014 Nov;42(11):1495-501.
- Castilho AR, Pardi V, Murata RM. **[Natural products in Dentistry].** 2007, 1, 11-19.
- Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP. **Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose.** Caries Res. 2000 Nov-Dec;34(6):491-7.
- DE Luca MP, Freires IA, Gala-García A, Santos VR, Vale MP, Alencar SM, et al. **The anti-caries activity and toxicity of an experimental propolis-containing varnish.** Braz Oral Res. 2017 Jun 5;31:e45.
- Eskandarian T, Motamedifar M, Arasteh P, Eghbali SS, Adib A, Abdoli Z. **Comparison of antimicrobial effects of titanium tetrafluoride, chlorhexidine, xylitol and sodium fluoride on streptococcus mutans: An in-vitro study.** Electron Physician. 2017 Mar 25;9(3):4042-4047.
- Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, et al. **Symbiotic relationship between Streptococcus mutans and Candida albicans synergizes virulence of plaque biofilms in vivo.** Infect Immun. 2014 May;82(5):1968-81.
- Handorf O, Weihe T, Bekeschus S, Graf AC, Schnabel U, Riedel K, et al. **Nonthermal Plasma Jet Treatment Negatively Affects the Viability and Structure of Candida albicans SC5314 Biofilms.** Appl Environ Microbiol. 2018 Oct 17;84(21):e01163-18.
- Heimisdóttir LH, Lin BM, Cho H, Orlenko A, Ribeiro AA, Simon-Soro A, Roach J, Shungin D, Ginnis J, Simancas-Pallares MA, Spangler HD, Zandoná AGF, Wright JT, Ramamoorthy P, Moore JH, Koo H, Wu D, Divaris K. **Metabolomics Insights in Early Childhood Caries.** J Dent Res. 2021 Jun;100(6):615-622.
- Madera M, Bernabé E. **Estimating the prevalence of untreated caries in permanent teeth from the DMF index and lifetime caries prevalence.** J Public Health Dent. 2021 Jun;81(2):143-149.
- Marsh, P., Martins M. V., **Microbiologia oral, 4 ed,** São Paulo, 2005, p. 58-81.
- Mattos-Graner RO, Klein MI, Smith DJ. **Lessons learned from clinical studies: roles of Mutans streptococci in the pathogenesis of dental caries.** Curr Oral Health Rep (2014) 1:70-78.
- Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MP. **Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children.** J Dent Res. 2000 Jun;79(6):1371-7.
- Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. **Streptococcus mutans, Candida albicans, and the human mouth: a sticky situation.** PLoS Pathog. 2013;9(10):e1003616.
- Millsop JW, Fazel N. **Oral candidiasis.** Clin Dermatol. 2016 Jul-Aug;34(4):487-94.
- Mishra P, Fareed N, Battur H, Khanagar S, Bhat MA, Palaniswamy J. **Role of fluoride varnish in preventing early childhood caries: A systematic review.** Dent Res J (Isfahan). 2017 May-Jun;14(3):169-176.
- Pereira JV, Freires IA, Castilho AR, da Cunha MG, Alves Hda S, Rosalen PL. **Antifungal potential of Sideroxylon obtusifolium and Syzygium cumini and their mode of action against Candida albicans.** Pharm Biol. 2016 Oct;54(10):2312-9.
- Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. **Dental caries.** Nat Rev Dis Primers. 2017 May 25;3:17030.
- Rocha GR, Florez Salamanca EJ, de Barros AL, Lobo CIV, Klein MI. **Effect of tt-farnesol and myricetin on in vitro biofilm formed by Streptococcus mutans and Candida albicans.** BMC Complement Altern Med. 2018 Feb 14;18(1):61.
- Sampaio AA, Souza SE, Ricomini-Filho AP, Del Bel Cury AA, Cavalcanti YW, Cury JA. **Candida albicans Increases Dentine Demineralization Provoked by Streptococcus mutans Biofilm.** Caries Res. 2019;53(3):322-331.
- Souza BM, Fernandes Neto C, Salomão PMA, Vasconcelos LRSM, Andrade FB, Magalhães AC. **Analysis of the antimicrobial and anti-caries effects of TiF<sub>4</sub> varnish under microcosm biofilm formed on enamel.** J Appl Oral Sci. 2018;26:e20170304.
- Steenackers HP, Parijs I, Dubey A, Foster KR, Vanderleyden J. **Experimental evolution in biofilm populations.** FEMS Microbiol Rev. 2016 May;40(3):373-97.
- Zeng Y, Nikitkova A, Abdelsalam H, Li J, Xiao J. **Activity of quercetin and kaempferol against Streptococcus mutans biofilm.** Arch Oral Biol. 2019 Feb;98:9-16.