CARACTERIZAÇÃO DA ADESÃO E DO BIOFILME FORMADO POR *Streptococcus mutans* E *Candida albicans* EM POLIURETANO

Maria Eduarda Basso (PIC/UEM), Polyana de Souza Costa , Terezinha Inez Estivalet Svidzinski (orientadora). Email: terezinha.svidzinski@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá - UEM, Centro de Ciências da Saúde, Maringá-PR

Área e subárea do conhecimento: Microbiologia/Microbiologia aplicada

Palavras-chave: biofilme misto, alinhadores ortodônticos removíveis, microbiota bucal.

RESUMO

A formação de biofilmes por microrganismos são grande ameaça à saúde pública, visto que potencializam a expressão dos mais diversos mecanismos de virulência. Além disso, os materiais para fabricação de dispositivos usados em saúde, podem facilmente ser colonizados por fungos e bactérias da microbiota. Na odontologia, os biofilmes são extremamente relevantes, pois são responsáveis por diversas patologias bucais. A ortodontia lida com as disfunções dento-faciais e devido a alta demanda, tem contado com novas tecnologias, como os alinhadores ortodônticos removíveis, produzidos em poliuretano (PU), um elastômero transparente e flexível, que permite discrição durante o uso e diminui o tempo de tratamento. Entretanto, a facilidade de adesão microbiana e formação de biofilmes são preocupantes devido às irregularidades na sua superfície e uso diário deste dispositivo. Assim, objetivamos avaliar a interação entre *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* e o PU, através da caracterização de biofilmes simples e mistos artificialmente formados. A avaliação foi feita nos tempos, 24 e 48 horas, e os parâmetros utilizados foram: contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), biomassa total por cristal violeta, matriz extracelular por safranina, metabolismo por redução do XTT e morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As micrografias mostraram bactérias aderidas às leveduras, formando uma camada sobre *C. albicans*, sugerindo favorecimento da bactéria ao utilizar o fungo como local de base e ancoragem para o biofilme. Ambas espécies fazem parte da microbiota bucal, portanto nossos resultados são relevantes pois mostram a necessidade de medidas preventivas de higiene visando evitar a formação de biofilmes nestes dispositivos.

INTRODUÇÃO

Biofilmes são comunidades microbianas que podem ser formados por um ou mais microrganismos, sendo mono ou multiespécie e inclusive ser constituído por fungos e bactérias (Nobile, 2015; Costa *et. al*, 2022). Na cavidade bucal, os microrganismos componentes da microbiota, como por exemplo *S. mutans* e *C. albicans,* podem aderir às superfícies dentárias ou dispositivos odontológicos e, consequentemente formar biofilmes que podem resultar em patologias, infecções disseminadas e até

mesmo levar o indivíduo à óbito, sendo uma preocupação na saúde pública mundial. (Ramburrun, 2021). A ortodontia tem inovado com novas tecnologias, como exemplo, os alinhadores removíveis, que são fabricados com o elastômero poliuretano (PU), um polímero amplamente utilizado em aplicações biomédicas, que busca otimizar o tratamento e efeitos adversos dos alinhadores convencionais (Ma, 2021). O PU permite um tratamento mais rápido e seu uso é quase imperceptível, devido à transparência do material. Os estudos de interação entre *S. mutans* e *C. albicans* são imperativos, no entanto, até o momento não existem publicações que explorem especificamente a interação com a superfície do PU. Portanto, o objetivo deste estudo, foi caracterizar biofilmes produzidos artificialmente com *C. albicans* e *S. mutans* sobre a superfície de PU.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os biofilmes foram artificialmente produzidos com inóculos de *C. albicans* NEWP 0031 e *S. mutans* ATCC 25175, em concentração de 1-2x10^7, a leitura foi realizada em espectrofotômetro ELISA, onde a absorbância lida em 600 nm, com valores de 0,165 - 0,175 para levedura e entre 0,05 - 0,06 para bactéria. As placas de PU foram adquiridas comercialmente (Zendura® 9156) e cortados em círculos com 1 cm de diâmetro, os quais foram esterilizados com álcool P. A. e luz ultravioleta por 20 minutos, e denominados de corpos de prova (CP). A produção dos biofilmes foi realizada em placa de 24 poços, onde os CP foram dispostos no fundo do poço e foram adicionados 200 uL de inóculo em cada um dos biofilmes simples, enquanto que nos biofilmes mistos foi determinada a proporção de 1:1, com 100 uL de inóculo de cada espécie. Sobre cada CP foi adicionado 1000 uL de meio Caldo Sabouraud dextrose e as placas foram incubadas em jarra de anaerobiose, à 37ºC e 110 rpm em estufa shaker. Os pontos de avaliação foram 24 e 48 horas. Os biofilmes foram avaliados quanto às unidades formadoras de colônia (UFC) recuperadas das preparações, biomassa total do biofilme com impregnação de cristal de violeta e matriz extracelular com safranina, além da atividade metabólica mitocondrial 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida ensaio de redução (XTT) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados observados demonstram que a superfície do PU está suscetível à adesão microbiana e desenvolvimento de biofilme. Os dados de contagem de UFC em biofilmes simples, mostram *C. albicans* em menor quantidade em relação a *S. mutans* em ambos os tempos, sendo possível observar o mesmo comportamento com as células recuperadas do biofilme misto. Na produção de biomassa total e matriz extracelular, *C. albicans* apresentou dados superiores aos de *S. mutans* e do biofilme misto. Enquanto que, houve uma variação quanto a atividade metabólica, onde *C. albicans* isoladamente expressou maior ação metabólica em 24 horas e em 48 horas houve uma inversão de papéis, *S. mutans* dobrou sua taxa metabólica, superando a de *C. albicans*. As micrografias capturadas em MEV, possibilitaram a visualização da morfologia das espécies, no biofilme simples com *S. mutans,* foi possível ver uma homogeneidade na distribuição dos cocos sobre a superfície do PU

em ambos os períodos, e com *C. albicans* houve também um espalhamento dos blastoconídios e hifas por toda a superfície do material. Enquanto que, na preparação com a associação de ambas as espécies, foi possível visualizar as células bacterianas aderidas às estruturas fúngicas, formando uma camada sobre *C. albicans*, sugerindo um favorecimento da bactéria ao utilizar o fungo como base e local de ancoragem para a formação do biofilme.

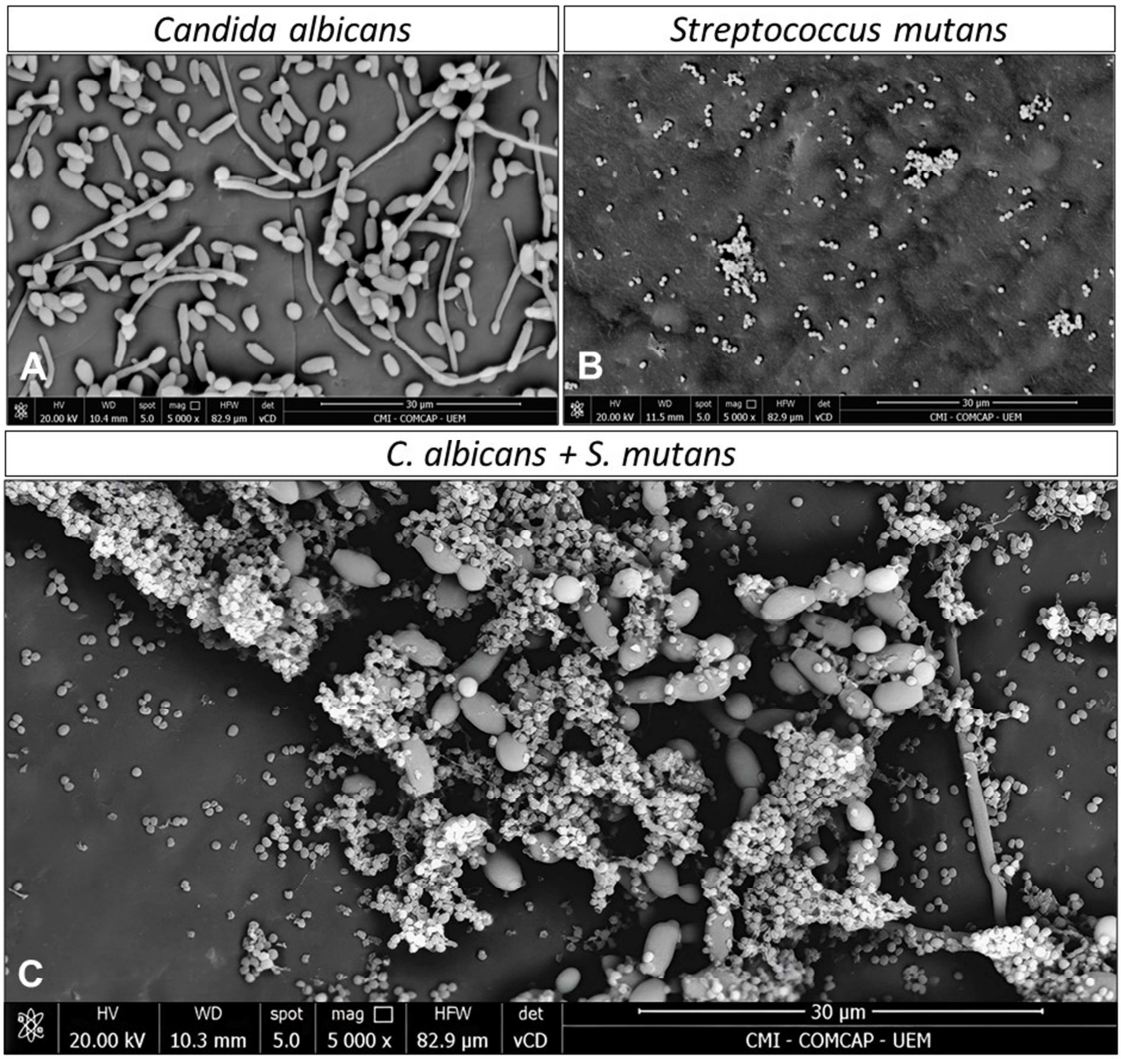

Figura 1. Micrografias capturadas dos biofilmes de 24 horas, de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* artificialmente produzidos sobre superfície de poliuretano em microscopia eletrônica de varredura. A) Conídios e hifas de *C. albicans* homogeneamente espalhadas e aderidas à superfície de PU. B) Cocos de *S. mutans* distribuídos em PU. C) Células bacterianas de *S. mutans* recobrindo as células de *C. albicans.*

Os resultados mostram uma importante associação entre *S. mutans* e *C. albicans* na formação do biofilme com potencial cariogênico. Sugere-se que *C. albicans* atua como fator adicional para o aumento da colonização e expressão da virulência de *S. mutans*. Além disso, é conhecida a afinidade do gênero *Candida* por superfícies

abióticas, inclusive com registros de infecções originadas da colonização dos mais diversos dispositivos de saúde, principalmente aqueles de longa permanência.

CONCLUSÃO

Ressaltamos que, a capacidade desses microrganismos em formar biofilme sobre a superfície de PU pode se tornar um problema para os usuários deste tipo de alinhadores, pois, se os métodos de higienização não forem capazes de remover os biofilmes, pode haver a facilitação do desenvolvimento de patologias bucais, além da dispersão das células filhas deste biofilme para outros sítios anatômicos.

AGRADECIMENTO

Agradeço em especial a Polyana que me deu a oportunidade de entrar na iniciação científica e teve muita paciência, a orientadora Terezinha por todo apoio e Fundação Araucária, pelo incentivo e oportunidade.

REFERÊNCIAS

COSTA, PS, Prado A, Bagon NP, Negri M, Svidzinski TIE. Mixed Fungal Biofilms: From Mycobiota to Devices, a New Challenge on Clinical Practice. Microorganisms. 2022;10(9). doi:10.3390/microorganisms1009172. Disponível em https://www.mdpi.com/2076-2607/10/9/1721. Acesso em: 29 de agosto de 2023

MA X, Chen J, Zhu J, Yan N. Lignin-Based Polyurethane: Recent Advances and Future Perspectives. Macromol Rapid Commun. 2021;42(3). doi:10.1002/marc.202000492. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/marc.202000492. Acesso em: 30 de agosto de 2023

NOBILE CJ, Johnson AD. Candida albicans Biofilms and Human Disease. Annu Rev Microbiol. 2015;69:71. Disponível em: https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-micro-091014-104330. Acesso em: 30 de agosto de 2023.

RAMBURRUN, Poornima. Recent advances in the development of antimicrobial and antifouling biocompatible materials for dental applications. Materials, v. 14, n. 12, p. 3167, 2021. doi: 10.3390/ma14123167. Disponível em: https://www.mdpi.com/1996-1944/14/12/3167. Acesso em: 01 de agosto de 2023.