

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

MARIELLE TAÍSE DA SILVA WIZBICKI

ESTUDO *IN VITRO* DO EFEITO DE BEBIDAS LÁCTEAS COM  
*LACTOBACILLUS* PROBIÓTICOS NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO BIOFILME  
DUPLA ESPÉCIE DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* E *CANDIDA ALBICANS*.

Porto Alegre

2018

MARIELLE TAÍSE DA SILVA WIZBICKI

ESTUDO *IN VITRO* DO EFEITO DE BEBIDAS LÁCTEAS COM  
*LACTOBACILLUS* PROBIÓTICOS NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO BIOFILME  
DUPLA ESPÉCIE DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* E *CANDIDA ALBICANS*.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Prof. Dra. Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo

Co - Orientadora: Aluna de doutorado em Clínica Odontológica: Cariologia/ Dentística Laís Daniela Ev

Porto Alegre

2018

## CIP - Catalogação na Publicação

Wizbicki, Marielle Taíse da Silva

Estudo in vitro do efeito de bebidas lácteas com Lactobacillus probióticos na inibição do crescimento do biofilme dupla espécie de Streptococcus mutans e Candida albicans / Marielle Taíse da Silva Wizbicki.

-- 2018'.

37 f.

Orientador: Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo.

Coorientador: Laís Daniela Ev.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade  
de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre,  
BR-RS, 2018'.

1. Probióticos. 2. Candida albicans. 3. Leites fermentados. 4. Streptococcus mutans. 5. Cárie dentária. I. Parolo, Clarissa Cavalcanti Fatturi, orient. II. Ev, Laís Daniela, coorient. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível em minha vida.

Aos meus pais, Mário e Ana que sempre me incentivaram a ir atrás dos meus sonhos e me ajudaram sempre em tudo o que eu precisei. Muito obrigada por todo apoio e amor. Com certeza isso amenizou a distância de estar longe de casa e de toda a minha família.

Aos meus irmãos, Cristian e Daniele, agradeço sempre pelos irmãos incríveis que meus pais me deram, sem dúvidas, vocês tornam minha vida muito mais leve e me ajudam sempre que necessário.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo pela orientação nesse trabalho, amizade e carinho. Sou muito grata por ter convivido e desenvolvido essa pesquisa com uma pessoa que sempre esteve disposta a ajudar, mesmo em finais de semana. Além de todos os ensinamentos, nunca faltou com apoio, ânimo, paciência para realizar os experimentos e chegarmos ao fim do trabalho.

À aluna de doutorado, Laís Daniela Ev pela co-orientação e amizade. Sempre esteve disposta a me ajudar no trabalho experimental e na busca das amostras. Obrigada pelo carinho, paciência e pela proatividade. Tenho certeza que está no caminho certo e será uma ótima professora.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Alex Arthur por gentilmente ceder um aluno de mestrado, Heitor Sales para me ajudar no começo dos experimentos. Obrigada pela colaboração neste trabalho, além dos ensinamentos, atenção e dedicação que tiveram comigo.

À equipe responsável pelos laboratórios de Bioquímica e Microbiologia Bucal (LABIM) e Laboratório de Materiais Dentários (LAMAD) por gentilmente cederem os materiais e equipamentos necessários para a minha pesquisa.

Aos meus amigos que fiz na graduação, tenho imenso carinho por cada um de vocês. Me sinto abençoada por ter pessoas tão especiais na minha vida, que tornaram toda a graduação mais leve e divertida, além de serem ombros amigos e minha família aqui em Porto Alegre.

Por fim e não menos importante, agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, à Faculdade de Odontologia da UFRGS e todo o corpo Docente da Graduação. Obrigada por me proporcionarem um ensino de qualidade. Tenho certeza que fiz a escolha certa ao vir pra cá.

## RESUMO

A prevenção de doenças bucais é muito importante na Odontologia e está diretamente associada ao controle do biofilme bucal. Cada vez mais pesquisas estão sendo desenvolvidas para avaliar o efeito de *Lactobacillus* presentes em produtos alimentícios, sendo as bebidas lácteas fermentadas um potencial veículo para probióticos. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de bebidas lácteas com *Lactobacillus* probióticos, no biofilme dual de *Streptococcus mutans* (UA156) e *Candida albicans* (ATCC90027) durante a formação de lesões de cárie *in vitro*. Os *Lactobacillus* estavam presentes em produtos lácteos fermentados das marcas Yakult (normal e light) e Nestlé (Chamyto). Blocos de esmalte bovino foram fixados em tampas de tubos Falcon e imersos em caldo de cultura BHI (Brain Heart Infusion Broth) acrescido de 0,5% de sacarose juntamente com inóculo (*C. albicans* + *S. mutans*). Biofilmes foram cultivados por 14 dias sendo o meio de cultura substituído diariamente. Após 48h de crescimento, os biofilmes foram diariamente expostos por 5 minutos às formulações testadas (Yakult normal; Yakult light; Nestlé Chamyto; água destilada estéril; n=5 para cada). A composição do biofilme e a desmineralização do esmalte foram avaliados após o período experimental. Os resultados foram avaliados quanto à contagem de microrganismos e formação de lesão cariosa, avaliada visualmente por meio de fotografias. Os *Lactobacillus* presentes nos produtos lácteos utilizados foram capazes de se aderir ao biofilme dual e diminuir a contagem de *S. mutans*, mas não foram capazes de diminuir a contagem de *C. albicans*. Somente um dos produtos testados (Chamyto) foi capaz de reduzir a contagem total de microrganismos do biofilme. A formação de lesão cariosa foi avaliada clinicamente pelo método visual por meio de fotografias realizadas dos blocos de esmalte após o desafio cariogênico, sendo que todos os grupos apresentaram perda mineral compatível com lesão cariosa ativa com ou sem cavidade em esmalte. As bebidas fermentadas lácteas modularam o biofilme, mas não foram capazes de inibir a formação de lesão cariosa no desafio cariogênico proposto pelo experimento.

Palavras-chave: Probióticos. *Candida albicans*. Leites fermentados. *Streptococcus mutans*. Cárie dentária.

## ABSTRACT

The prevention of oral diseases is very important in dentistry and is directly associated with the control of oral biofilm. More and more research is being done to evaluate the effect of *Lactobacillus* present on food products, with fermented milk beverages being a potential vehicle for probiotics. The objective of the present study was to evaluate the effect of dairy beverages with probiotic *Lactobacillus* on the dual biofilm of *Streptococcus mutans* (UA156) and *Candida albicans* (ATCC90027) during the formation of caries lesions in vitro. *Lactobacillus* were present in fermented dairy products of the brands Yakult (normal and light) and Nestlé (Chamyto). Bovine enamel blocks were fixed in Falcon tube caps and immersed in BHI (Brain Heart Infusion Broth) broth supplemented with 0.5% sucrose along with inoculum (*C. albicans* + *S. mutans*). Biofilms were cultured for 14 days and the culture medium was replaced daily. After 48h of growth, the biofilms were daily exposed for 5 minutes to the formulations tested (Yakult normal or Yakult light or Nestlé Chamyto or sterile distilled water, n = 5 for each). The biofilm composition and enamel demineralization were evaluated after the experimental period. The results were evaluated for microorganism counts and formation of carious lesion, evaluated visually through photographs. *Lactobacillus* present in the dairy products used were able to adhere to the dual biofilm and decrease the counts of *S. mutans*, but were not able to decrease the *C. albicans* count. Only one of the products tested (Chamyto) was able to reduce the total count of microorganisms in the biofilm. The carious lesion formation was evaluated clinically by the visual method through photographs of the enamel blocks after the cariogenic challenge, and all groups presented mineral loss compatible with active carious lesion without a cavity or active carious lesion with enamel cavity in some samples. The milk fermented beverages modulated the biofilm, but were not able to inhibit the formation of carious lesion in the cariogenic challenge proposed in the experiment.

Keywords: Probiotics. *Candida albicans*. Fermented milk. *Streptococcus mutans*. Dental caries.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Brain Heart Infusion broth/ agar
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
EPS	Polissacarídeos extra celulares
KHN	Número de dureza Knoop
LABIM	Laboratório de Bioquímica e Microbiologia bucal
LAMAD	Laboratório de Materiais Dentários
MSB	Mitis Salivarius Bacitracin agar
ROG	Rogosa agar
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
SAB	Sabouraud Dextrose agar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>11</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	11
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	11
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
3.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO .....	12
3.2	COLETA DE DADOS .....	12
3.3	CÁLCULO AMOSTRAL .....	12
3.4	PREPARO DE BLOCOS DE ESMALTE .....	13
3.5	DETERMINAÇÃO DA MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE .....	14
3.6	RANDOMIZAÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE .....	15
3.7	PREPARO DAS AMOSTRAS .....	16
3.8	PREPARO DA CULTURA MICROBIANA DO BIOFILME DUPLA-ESPÉCIE ..	16
3.9	AJUSTE DA DENSIDADE ÓPTICA PARA EXPERIMENTO .....	17
3.10	MODELO EXPERIMENTAL .....	18
3.11	DILUIÇÃO SERIADA DAS AMOSTRAS E CONTAGEM DAS COLÔNIAS DE MICRORGANISMOS .....	18
3.12	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS BEBIDAS LÁCTEAS .....	19
3.13	ANÁLISE VISUAL DOS BLOCOS DE ESMALTE .....	19
3.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS .....	19
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
4.1	QUANTIFICAÇÃO DE <i>LACTOBACILLUS</i> NAS BEBIDAS LÁCTEAS .....	20
4.2	AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DO PH .....	22
4.3	FOTOGRAFIAS CLÍNICAS DOS BLOCOS DE ESMALTE .....	22
4.4	ANÁLISE DO BIOFILME .....	24
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>29</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>30</b>
	<b>APÊNDICE A: TERMO DE ANUÊNCIA DE PARCERIA .....</b>	<b>33</b>
	<b>APÊNDICE B: TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES BOVINOS .....</b>	<b>34</b>
	<b>ANEXO A: PARECER DA COMPESQ .....</b>	<b>36</b>

## 1 REFERENCIAL TEÓRICO

Os probióticos são microrganismos vivos que conferem um efeito protetor ao hospedeiro quando consumidos em quantidades adequadas, combatendo várias infecções nos indivíduos e atuando em processos imunológicos, digestivos e respiratórios (FAO/WHO, 2001). Os probióticos estão sendo cada vez mais usados em produtos alimentícios, fármacos e suplementos alimentares. Nos alimentos, as bactérias probióticas estão sendo usadas em laticínios como iogurtes, leites fermentados e queijos (HASSLÖF et al., 2010).

Leites fermentados, segundo a Instrução Normativa nº 46 de 2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), são produtos obtidos através da coagulação do leite, apresentando diminuição do pH por fermentação láctica a partir de microrganismos específicos, viáveis, abundantes e principalmente ativos no produto final (BRASIL, 2016). A partir disso, utiliza-se comumente microrganismos do gênero *Lactobacillus* spp. como probióticos relacionados às bebidas fermentadas lácticas (SANDERS, 2003). Além disso, é essencial que os leites fermentados contenham um número satisfatório de células viáveis no momento da ingestão, ou seja, de pelo menos  $10^6$  UFC / mL (Unidades Formadoras de Colônia) como fixa a Legislação brasileira durante toda a validade do produto (BRASIL, 2001). A dose terapêutica mínima de probióticos por dia seria de 100 ml de leite fermentado com 10.000.000 UFC/mL (GOMES; MALCATA, 1999 apud RASIC, J.L., KURMANN, J.A., 1983).

O efeito benéfico conhecido dos probióticos na microbiota intestinal é resultado da competição por nutrientes, o que torna o ambiente desfavorável para patógenos e promove um estímulo imunológico ao hospedeiro (BIZZINI et al., 2012; BADET; THEBAUD, 2008). Além do efeito já conhecido na microbiota intestinal, a cavidade bucal também é um local importante para o uso de uma terapia probiótica. Esses microrganismos são capazes de diminuir a patogênese de doenças bucais por meio de interações antagônicas, diminuindo o crescimento e até mesmo a colonização dos microrganismos, evitando assim, a inflamação crônica e a infecção oral (BIZZINI et al., 2012). Dessa maneira, surge um novo e interessante campo de pesquisa em microbiologia oral, onde os probióticos têm o potencial de serem eficazes seguros e acabam sendo uma alternativa profilática e terapêutica na redução, por exemplo, de patógenos como *Candida albicans* (MATSUBARA et al., 2016).

A presença desse fungo oportunista na cavidade bucal em seu estado patogênico predispõe o aparecimento da candidíase, devido à alteração do ambiente e proliferação deste, ocorrendo a mudança da existência comensal do microrganismo devido ao enfraquecimento

das defesas imunitárias do hospedeiro (WILLIAMS; LEWIS, 2011). A *C. albicans* apresenta coagregação com *Streptococcus mutans* na adesão às superfícies dentárias, fazendo com que a intensidade da colonização por *S. mutans* seja mais forte quando cultivada junto ao fungo, onde células da levedura poderiam ser usadas pelas bactérias como suporte para aderência, facilitando esta associação e a relação de protocooperação entre estes microrganismos (HWANG et al., 2015; BARBIERI et al., 2007). Portanto, a presença de *C. albicans* no ambiente bucal pode ser considerada um fator adicional que precisa ser levado em consideração na avaliação dos riscos para o desenvolvimento da doença cárie (MOALIC et al., 2001), já que o potencial de *C. albicans* em contribuir para a patogênese tem sido frequentemente associada à sua capacidade de produzir e tolerar ácidos (FALSETTA et al., 2014).

Novas evidências mostram que o desenvolvimento de biofilmes altamente cariogênicos formados com *C. albicans* e *S. mutans* na presença de sacarose, influenciam fortemente a patogênese da doença cárie (FALSETTA; KOO, 2014). Segundo observações de Gregoire et al. (2011), foi demonstrado que exoenzimas glicosiltransferases (GtfB) secretadas por *S. mutans* ligam-se fortemente à superfície de *C. albicans*, convertendo as células em produtoras de glucanos. Estas observações mostram também que o GtfB se liga a outras bactérias não-estreptocócicas, incluindo espécies de *Lactobacillus*, *Actinomyces naeslundii*, e *Veillonella sp.* Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram uma matriz extracelular rica em PEC (polissacarídeos extracelulares), o que promove aderência entre a superfície dentária e o microrganismo ou entre os microrganismos, como vista entre estreptococos e a levedura (METWALLI et al., 2013). Esses achados mostram como exoenzimas bacterianas podem converter um microrganismo moderadamente cariogênico em um dos principais contribuintes para a formação de biofilme (FALSETTA et al., 2014).

Segundo Krzyściak et al., (2017), os probióticos podem atuar na manutenção do equilíbrio interespecies na cavidade oral uma vez que este autor demonstrou que a formação de biofilme com as espécies *S. mutans* e *C. albicans* é diferente na presença do probiótico *L. salivarius* (HM6 paradens). O HM6 paradens é uma cepa probiótica que foi incorporada a um produto patentado (Hereditem®) pasteurizado, onde o micro-organismo estava presente de forma inativada, sendo o princípio ativo baseado na produção de subprodutos prévios ao processamento. Após um tempo de cultura adequado, o crescimento logarítmico em UFC/mL das espécies do biofilme misto foi menor quando comparado a um modelo sem contato com *Lactobacillus*. Isto sugere que *L. salivarius* pode estar competindo com *S. mutans* por nutrientes, além de inibir a agregação de estreptococos e leveduras orais diminuindo assim, a

virulência do biofilme. Outros estudos *in vitro* mostram que essa coagragação de *Lactobacillus* dificulta a formação do biofilme devido a hidrofobicidade gerada, reduzindo assim, a criação de um ambiente ácido pelo *S. mutans* por causa da competição por sítios de ligação e por nutrientes (STAMATOVA; MEURMAN, 2009).

O gênero *Lactobacillus* têm espécies acidogênicas e acidúricas encontrados preferencialmente em lesões cavitadas de cárie, sendo assim, não apresentam envolvimento direto com a formação inicial da lesão de cárie (BADET; THEBAUD, 2008). No entanto, diversas pesquisas estão sendo realizadas para testar o potencial probiótico de algumas cepas destes microrganismos, avaliando seu potencial de reduzir o crescimento e a formação de biofilme de microrganismos cariogênicos (HASSLÖF et al., 2010; KRZYŚCIAK et al., 2017; KELLER; TWETMAN, 2012).

No estudo de Schwendicke et al. (2014), encontrou-se um aumento do potencial cariogênico de *Lactobacillus* LGG (*Lactobacillus rhamnosus*) em cavidades de dentina em comparação com o esmalte liso, devido ao nicho adequado para manter as condições ácidas e anaeróbicas. Quando os probióticos foram associados à *S. mutans* a cariogenicidade do biofilme aumentou, e não foi encontrada uma redução significativa do número total de bactérias no biofilme misto a partir dessa associação.

Desta forma, o efeito probiótico dos *Lactobacillus* na cavidade oral ainda é controverso. Enquanto alguns estudos sugerem que os *Lactobacillus* utilizados como probióticos podem reduzir a cariogenicidade de biofilmes orais (STAMATOVA; MEURMAN, 2009), outros autores mostram que não foi possível comprovar o efeito protetor com o uso de *Lactobacillus*, pois não foi encontrada uma redução significativa do número de bactérias no biofilme misto a partir dessa associação (SCHWENDICKE et al., 2014). A elucidação do papel dos probióticos contendo *Lactobacillus* spp. no biofilme bucal e no processo carioso ainda precisa ser foco de estudos.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de *Lactobacillus* presentes em três marcas comerciais de bebidas lácteas fermentadas na formação de biofilme dual de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a incorporação de *Lactobacillus* probióticos no biofilme dual de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*.

Avaliar o efeito do uso de *Lactobacillus* probióticos na quantificação de *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* e contagem total do biofilme dual associado.

Avaliar o efeito do uso de *Lactobacillus* probióticos na formação de lesões de cárie *in vitro* a partir de um biofilme dual de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi submetido à Comissão de pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFRGS, sendo este aprovado e registrado com o número 35.576 (Anexo A).

#### 3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO

O presente estudo foi realizado nos Laboratórios de Bioquímica e Microbiologia bucal (LABIM) e Laboratório de Materiais Dentários (LAMAD) ambos da Faculdade de Odontologia, localizados na cidade de Porto Alegre – RS.

#### 3.2 COLETA DE DADOS

Foram utilizadas três marcas comerciais disponíveis no mercado regional, que apresentam em seus rótulos *Lactobacillus* spp. em suas fórmulas para avaliar o efeito probiótico de bebidas fermentadas lácteas no biofilme dual (*Candida albicans* e *Streptococcus mutans*). As amostras foram divididas entre os três grupos experimentais para cada bebida láctea, e um grupo controle sem o uso da bebida láctea.

Tabela 1 – Grupos experimentais e composição das bebidas lácteas fermentadas probióticas conforme rótulo dos produtos.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Produto comercial	Yakult Normal	Yakult Light	Chamyto
<i>Lactobacillus</i> indicados no rótulo	<i>Lactobacillus casei Shirota</i>	<i>Lactobacillus casei Shirota</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Lotes	BL04 e IL82	C153 e CL183	L8301 e L9147

#### 3.3 CÁLCULO AMOSTRAL

O cálculo amostral foi realizado com auxílio do portal openEpi, baseado na diferença de médias da perda mineral do trabalho de Schwendicke *et al.* (2017), comparando a perda mineral *in vitro* sobre blocos de esmalte sobre os quais foram cultivados *Streptococcus mutans* com e sem probióticos, sendo utilizados os valores de média 9,772 e variância de

7,281 para o grupo *S. mutans* e de média 4,835 e variância de 5,235 para o grupo da associação de *S. mutans* e *L. casei*. Considerando um intervalo de confiança de 95% e um poder de 80%, foi obtido o número amostral de cinco blocos por grupo.

### 3.4 PREPARO DE BLOCOS DE ESMALTE

Blocos de esmalte foram confeccionados a partir de dentes incisivos de bovinos extraídos de carcaças do frigorífico Callegaro e Irmãos, localizado no município de Santo Ângelo (Rio Grande do Sul) e do frigorífico GG, localizado na cidade de Araricá (Rio Grande do Sul) (Apêndice B).

Antes do preparo dos blocos, os dentes foram submetidos à remoção de restos de tecido e foram armazenados em uma solução de formaldeído tamponado 2% por 14 dias até o preparo dos blocos. A partir disso, os dentes foram fixados pela raiz em uma morsa de bancada acoplada a uma furadeira de bancada (Schulz FB13, Brasil) contendo uma broca diamantada do tipo serra-copo com 8 mm de diâmetro (Black Jack J722, Brasil) de forma que de cada dente foi obtido 1 bloco de esmalte a partir da face vestibular da coroa dos dentes bovinos, todos com 6 mm de diâmetro. Os blocos que apresentaram fraturas na superfície externa do esmalte, assim como rachaduras e hipocalcificação, foram excluídos (CURY et al., 1997).

Os blocos de esmalte foram preparados com dimensões de 6 mm de diâmetro por 2 mm de espessura em média. Para obtenção de um bloco de esmalte com 2 mm de altura e com maior área possível de esmalte plano, primeiramente a face do bloco com dentina foi aplainada. Para tal, a maior área de esmalte foi fixada com cera contra a superfície de um disco de resina acrílica pré-fabricado (3 cm x 8 mm). A dentina foi aplainada utilizando-se lixa lixa d'água de granulação 150 (Carbimet® Paper Discs Buehler) na politriz (Apl-4 Arotec, Brasil).

Após o aplainamento da dentina o bloco foi removido do disco de resina acrílica pré-fabricado, sendo a seguir fixado novamente no centro do disco com a superfície da dentina voltada para o acrílico. A politriz foi novamente utilizada em baixa rotação com lixa d'água de granulação 600 (Carbimet® Paper Discs). Após os blocos de esmalte foram submetidos ao ultrassom (Sonic Materials, Estados Unidos) em água deionizada (200 mL) para cada 6 blocos, durante 1 minuto, para remoção de possíveis resíduos que tenham se soltado da lixa.

A seguir, o procedimento foi novamente realizado na politriz, com lixa d'água de granulação 1200. Novamente os blocos de esmalte foram submetidos ao ultrassom, imersos

em água deionizada durante 1 minuto para remoção de resíduos. Para o polimento final, foi utilizado na politriz disco de papel feltro e pasta diamantada (Diamond FGM, Brasil). Após o polimento, os blocos de esmalte foram lavados em água deionizada corrente durante 2 minutos. Os blocos foram identificados e armazenados em recipiente plástico fechado com água destilada. Foram conservados em geladeira a 4°C até serem realizadas as análises de microdureza de superfície do esmalte (CURY et al., 1997).

### 3.5 DETERMINAÇÃO DA MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE

A determinação inicial da microdureza de superfície do esmalte teve o objetivo de selecionar os blocos de esmalte para o estudo e, além disso, permitir o cálculo da porcentagem de perda de dureza de superfície após os experimentos.

Após o polimento, as endentações foram realizadas utilizando o microdurômetro (HMV-2T Shimadzu, Japan). A partir do centro do bloco de esmalte, 1000 µm abaixo do limite superior e 1500 µm à direita do limite esquerdo foi realizada uma endentação de referência, utilizando-se carga estática de 100 g durante 10 segundos. Foram realizadas cinco endentações em sequência, sob um peso estático de 50 gramas, que foi aplicado por 10 segundos. Todas as endentações foram separadas entre si por uma distância de 100 µm. As leituras da diagonal maior da endentação foram transformadas no número de dureza Knoop (KHN) pela fórmula:

$$\text{KHN: } \frac{14224 \times C}{L^2}$$

KHN: Número de dureza Knoop

C: Carga aplicada em gramas

L2: comprimento da diagonal em micrômetros

Após a mensuração foram calculadas a média de dureza das cinco endentações calculadas para cada bloco de esmalte. Após isso, foi calculado por meio de uma tabela do Excel, a média geral dos blocos e o desvio padrão, considerando que os blocos que tiveram valores de dureza da superfície igual à média geral com variação de 25% acima ou abaixo da

média foram incluídos no estudo. A média geral foi o número de dureza Knoop (KHN)287,20, com valores mínimo e máximo de 215,40 a 359 KHN (Tabela 2).

Tabela 2 – Dureza Superficial (KHN) dos blocos de esmalte incluídos no estudo

Blocos	Valor dureza por endentações (n=5)					Dureza média
1	378	355	320	302	320	335
2	323	288	293	317	362	316,6
3	374	333	347	330	395	355,8
4	400	391	299	347	362	359,8
5	387	323	303	337	355	341
6	330	362	318	274	272	311,2
7	323	317	340	355	308	328,6
8	260	269	290	282	228	265,8
9	323	366	317	387	391	356,8
10	293	327	333	302	330	317
11	238	230	267	236	240	242,2
12	387	391	323	340	325	353,2
13	340	182	242	189	249	240,4
14	249	269	244	280	255	259,4
15	212	269	240	249	277	249,4
16	327	362	305	358	337	337,8
17	288	302	355	347	323	323
18	238	258	249	202	215	232,4
19	366	299	213	242	274	278,8
20	320	308	344	374	330	335,2

### 3.6 RANDOMIZAÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE

Foram selecionadas cinco amostras por grupo experimental e 5 amostras para o grupo controle. A randomização dos blocos (n = 20) para os grupos experimentais e grupo controle foi realizada através do site <http://www.randomization.com>. A partir do link de acesso Random Permutation foram geradas 4 linhas com 5 números aleatórios que variavam de 1 a 20 de acordo com a nossa amostra total (Tabela 3).

Tabela 3 – Randomização dos blocos de esmalte (números de 1 a 20) em seus respectivos grupos.

Grupos	Blocos de esmalte bovino					Média de dureza (KHN)
Grupo I: Yakult Normal	4	6	10	13	20	312,72
Grupo II: Yakult Light	3	7	11	17	19	305,68
Grupo III: Chamyto	2	5	8	9	14	307,92
Grupo Controle	1	12	15	16	18	301,56

### 3.7 PREPARO DAS AMOSTRAS

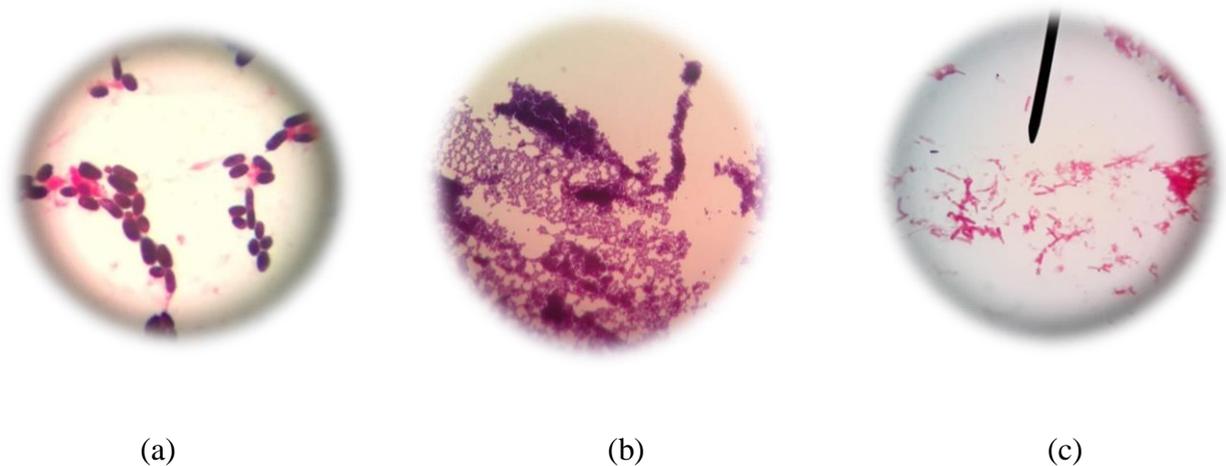
Em cada bloco de esmalte foi realizada uma delimitação da área que ficaria exposta ao desafio cariogênico. Sendo delimitada a região central do bloco onde haveria contato com o biofilme dual. Sendo que toda a área externa a esta região foi isolada com o uso de verniz de unhas. Os blocos de esmalte foram fixados a um fio ortodôntico de 9 cm utilizando para a fixação sistema adesivo convencional de 3 passos (Ácido fosfórico 37% Condac FGM, Scotchbond Multi Purpose 3M, Brasil) e resina composta (Z350 3M, Brasil) fotoativada com fotopolimerizador (Bluephase Ivoclar Vivadent, Brasil). O fio ortodôntico foi transfixado à tampa de um tubo Falcon de modo que as amostras ficassem imersas no caldo de cultura para formação da lesão cáriosa sem estar em contato com as laterais e com o fundo do tubo. Para evitar contaminação do meio via orifício da tampa, foi utilizado resina composta a tampa onde o fio ortodôntico foi transfixado. O conjunto já com os blocos fixados foi devidamente esterilizado na autoclave (Autoclave vertical Phoenix, Brasil) à 120°C antes do experimento.

### 3.8 PREPARO DA CULTURA MICROBIANA DO BIOFILME DUPLA-ESPÉCIE

Cepas padrão de *Streptococcus mutans* (UA159) e *Candida albicans* (ATCC 90028) do repositório do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LABIM) foram descongeladas e utilizou-se a pipeta P200 (Pipetman Gilson) para adicionar 100 µL da cultura em skim milk nos tubos Falcon contendo meio Brain Heart Infusion Broth - BHI (Kasvi, Itália) acrescido de

0,5% de glicose para reativação. As culturas líquidas de *Streptococcus mutans* (UA159) e *Candida albicans* (ATCC 90028) foram mantidas por 48 h a 37 ° C, em estufa (02 CB- Fanel, Brasil). Após avaliar a turbidez do meio, pipetou-se novamente 100 µL do caldo, em placas de petri com meio Brain Heart Infusion Agar – BHI (Acumedia Neogen, Estados Unidos) e Sabourad Agar Dextrose (Acumedia Neogen, Estados Unidos) para o crescimento de *S. mutans* e *C. albicans* respectivamente. A confirmação da pureza dos microrganismos isolados e dos lactobacilos presentes nas bebidas lácteas foi realizada pela análise em microscópio após coloração pelo método de Gram (Figura 1)

Figura 1 – Confirmação da pureza dos microrganismos pelo método de Gram.



Fonte: O autor

Nota: Figura 1. A imagem (a) representa *Candida albicans*; Na imagem (b) estão os microrganismos *Streptococcus mutans*; A imagem (c) representa os *Lactobacillus*.

### 3.9 AJUSTE DA DENSIDADE ÓPTICA PARA EXPERIMENTO

Após o crescimento, as culturas foram transferidas para o caldo BHI, acrescido de 0,5% de glicose. Novamente foram para a estufa para crescimento por um período de 8 horas.

Ajustou-se a densidade óptica (DO) das culturas microbiológicas no espectrofotômetro (Spectronic 21D, Milton Roy) a partir dos valores de absorbância, considerando o comprimento de onda em 600 nm e valor de OD 0,033 para *S. mutans* e de 0,044 para *C. albicans*, semelhante à proporção utilizada no estudo de Andrade (2017). Essa OD corresponde a aproximadamente  $10^2$  UFC/mL e  $10^4$  UFC/mL, respectivamente. O volume do inóculo foi realizado na proporção de 1:1 em volume de cada cultura de *S. mutans* e *C. albicans*.

### 3.10 MODELO EXPERIMENTAL

Todas as amostras ficaram imersas em 5 ml de caldo BHI com 0,5% de sacarose por 24 horas. Todos os dias às 17h30min durante um período de 14 dias, as tampas contendo os fios com os blocos eram colocados em um tubo novo contendo 5 ml de caldo BHI com 0,5% de sacarose. Esse procedimento foi realizado para que não se esgotassem as fontes nutricionais do meio e que o mesmo não atingisse demasiada acidificação. A partir do 3º dia de experimento, antes da troca do meio, houve o contato dos grupos experimentais com os produtos lácteos fermentados 1x/dia, por 5 minutos, simulando a ingestão diária do produto pelo indivíduo. No grupo controle, ao invés de ter contato com a bebida láctea, o grupo ficava imerso em água destilada estéril, por 5 minutos.

A aferição do pH do meio foi realizada com fitas medidoras de pH – Fix 0-14 (Macherey- Nagel, Estados Unidos) no início e final do experimento. Após o período estabelecido, o biofilme formado foi coletado e processado conforme descrito abaixo.

### 3.11 DILUIÇÃO SERIADA DAS AMOSTRAS E CONTAGEM DAS COLÔNIAS DE MICRORGANISMOS

Ao final do experimento de 14 dias, antes da coleta do biofilme todos os blocos foram lavados com 1mL de água destilada estéril para eliminar células não aderidas. Coletou-se então o biofilme formado no centro do bloco do esmalte com colher de dentina estéril. O biofilme coletado foi armazenado em tubos eppendorf com 900 µL de solução salina estéril. A seguir foi realizada a diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ) e alíquotas (25 µL) de cada diluição foram semeadas em duplicata nos meios seletivos e não seletivos (Ágar Sabouraud Dextrose – *C. albicans*; Ágar Rogosa SL - ROG (Himedia, Índia) - *Lactobacillus*; Ágar - MSB (Himedia, Índia) - *Streptococcus mutans*; Ágar BHI – contagem de micro-organismos totais).

Após a realização da diluição seriada, as placas de petri foram armazenadas na estufa, à 37°, num ambiente microaerofílico, pelo período de 48h (MSB; SAB) e 72h (ROG; BHI). Depois desse período, realizou-se a contagem das colônias microbianas com auxílio de lupa estereoscópica (Olympus SZ51, China) com aumento de 10x e foi realizado o cálculo de UFC/mL pela seguinte fórmula no Excel:

$$\text{UFC/mL} = \text{N}^\circ \text{ de colônias}^* \times \text{Diluição}^{**} \times 40^{***} \text{ (correção do volume)}$$

\*Média de colônias contadas nas duas gotas

\*\*O valor multiplicado deve corresponder a sua diluição (1,  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$ )

\*\*\* O volume das gotas é de 0,025 mL, é necessário multiplicar por 40.

### 3.12 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS BEBIDAS LÁCTEAS

Realizou-se a avaliação microbiológica dos leites fermentados. Para isso, foram preparadas placas de petri com o meio Rogosa para o crescimento dos *Lactobacillus*. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de cada bebida láctea foi semeada em placas de petri pela técnica de esgotamento. Além disso, foram realizadas as diluições seriadas das culturas em solução salina. Brevemente, em frascos de eppendorf, contendo 900  $\mu\text{L}$  da solução salina foram pipetados 100  $\mu\text{L}$  das bebidas lácteas. A seguir foi realizada a diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) e alíquotas (25  $\mu\text{L}$ ) de cada diluição foram semeadas em duplicata no meio Rogosa. As placas de petri semeadas foram armazenadas na estufa, à  $37^\circ$ , num ambiente microaerofílico, pelo período de 72h. Depois desse período, realizou-se a contagem das colônias microbianas e foi realizado o cálculo de UFC/mL de modo já descrito anteriormente. A partir das placas de cultivo de *Lactobacillus* com a técnica de esgotamento, foram realizadas coloração gram para confirmar a presença dessas espécies.

### 3.13 ANÁLISE VISUAL DOS BLOCOS DE ESMALTE

O aspecto visual dos blocos após o período experimental de 14 dias foi avaliado através de fotos clínicas dos blocos de esmalte bovino cariados. Todas as imagens foram obtidas através de condições padronizadas pela câmera fotográfica com lente Macro Pro acoplada ao Iphone (6S plus). As imagens foram obtidas no formato JPEG.

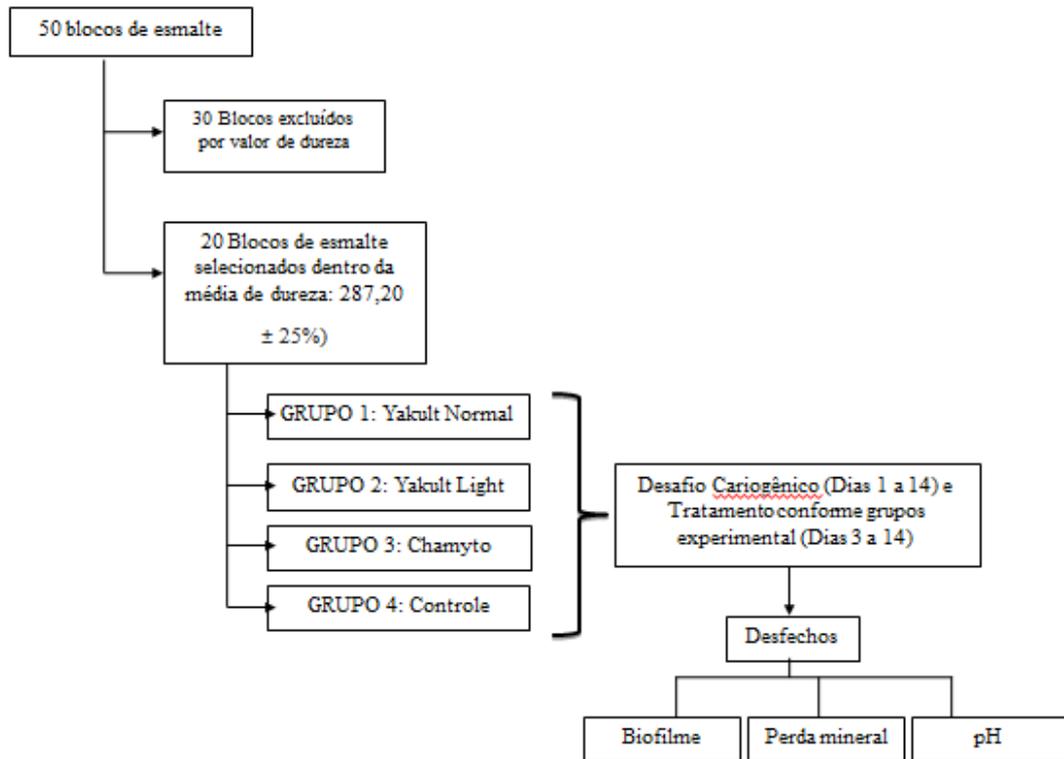
### 3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise estatística foi realizada por meio do programa SPSS, onde foi utilizado o teste ANOVA one-way seguido do teste de comparação *post-hoc* múltipla de Bonferroni. O nível de significância aceito para as análises foi de 5% ( $P < 0.05$ ).

## 4 RESULTADOS

O fluxograma abaixo (Fig.2) mostra o desenho experimental do estudo.

Figura 2: Desenho experimental.



Fonte: O autor

### 4.1 QUANTIFICAÇÃO DE *LACTOBACILLUS* NAS BEBIDAS LÁCTEAS

Os produtos utilizados nos grupos experimentais foram avaliados por meio da quantificação de *Lactobacillus* spp. presentes em cada grupo (Tabela 4). Durante o experimento foram utilizados 12 produtos de cada marca, isto é, 2 lotes diferentes. O grupo Yakult Normal e Yakult Light apresentam 80 g de bebida láctea. Já o grupo Chamyto apresenta 75 g do produto.

Tabela 4 – Quantificação de UFC/mL em  $\log_{10}$  de *Lactobacillus*.

Produto	<i>Lactobacillus</i> UFC/mL (log)
Yakult (lote 1)	9,15
Yakult (lote 2)	9,17
Yakult Light (lote 1)	9,15
Yakult Light (lote 2)	9,12
Chamyto (lote 1)	8.53
Chamyto (lote 2)	8,41

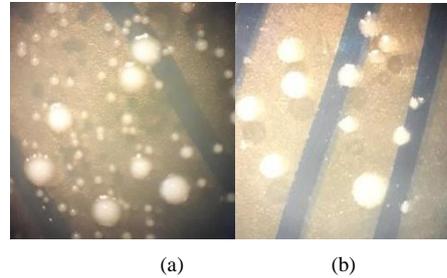
Conforme a contagem de *Lactobacillus* presentes nos produtos probióticos, o grupo Chamyto foi o que apresentou menor contagem de UFC/ml.

Quanto às informações do rótulo dos produtos, todos os grupos apresentam apenas uma espécie de probiótico na sua composição. Porém, ao avaliar a morfologia das espécies na lupa estereoscópica, verificamos que havia dois tipos morfológicos nos grupos Yakult Normal e Yakult Light. Na coloração de Gram todos eram bacilos Gram positivos. Na tabela (Tabela 5) e figura (Fig. 3) a seguir é possível verificar a morfologia encontrada das colônias.

Tabela 5 – Morfologia das colônias das espécies *Lactobacillus* spp. encontradas nos produtos lácteos.

Produto	Espécie	Morfologia
Yakult Normal e Yakult Light	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Bordos irregulares rugosos; textura lisa central; cor branco-opaco no centro e na periferia halo transparente; colônia elevada.</li> <li>2) Bordos delimitados e lisos; textura lisa; cor branco-brilhoso; colônia pequena e elevada.</li> </ol>
Chamyto	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Bordos irregulares rugosos; textura rugosa; cor branco-opaco no centro e na periferia halo transparente; colônia elevada.</li> </ol>

Figura 3 – Fotografias da morfologia das colônias das espécies *Lactobacillus* spp. nos produtos lácteos.



Fonte: O autor

Nota: Nas imagens acima, é possível avaliar a morfologia encontrada nos grupos Yakult Normal e Yakult Light (a). Na figura (b) estão representadas as colônias encontradas do Grupo Chamyto.

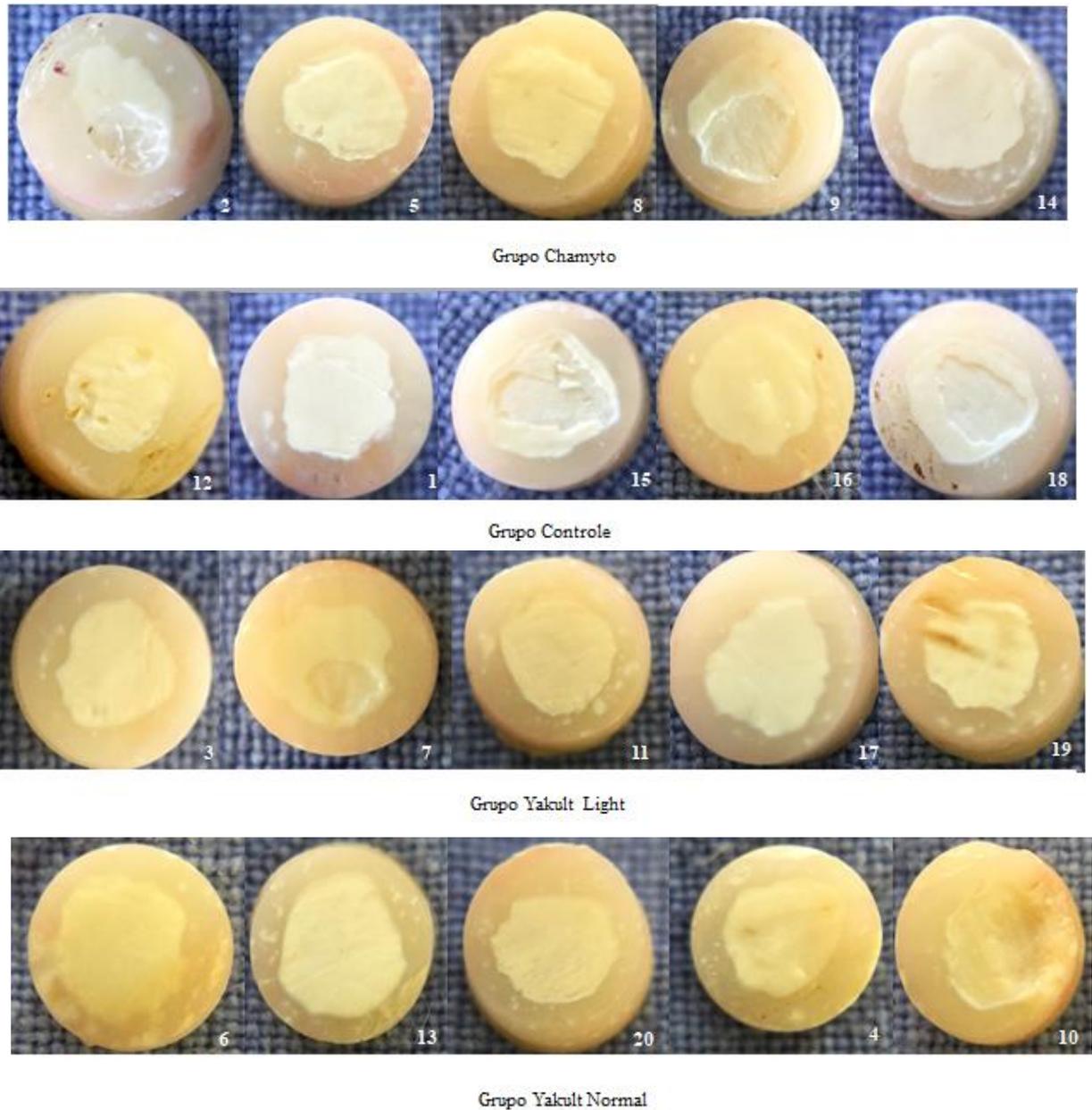
#### 4.2 AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DO PH

Durante o experimento, o pH inicial e final foi medido com as fitas de pH. O pH inicial foi aferido e todos os grupos apresentaram valor igual a pH 7. Após 24 horas o pH do meio atingiu o valor de pH igual a 4 em todos os grupos e este valor se manteve estável até o final do experimento.

#### 4.3 FOTOGRAFIAS CLÍNICAS DOS BLOCOS DE ESMALTE

Após o desafio cariogênico, foi removido o biofilme formado e foi realizada a limpeza com gaze e acetona dos blocos para remoção de restos de verniz de unhas. Com isso, foi observada uma grande desmineralização dos blocos de todas as amostras. Todos os blocos do mesmo grupo foram dispostos lado a lado na mesma linha para ter uma comparação do grau de desmineralização. Através das imagens, como mostra a figura 4, é possível avaliar que em todos os grupos houve desmineralização acentuada com formação de lesão ativa sem cavidade em esmalte e em alguns blocos houve formação de cavidade. A cavitação ocorreu em todos os grupos experimentais. Não houve diferença perceptível visualmente entre os grupos experimentais e o grupo controle.

Figura 4 : Blocos de esmalte após o fim do experimento.



Fonte: O autor

#### 4.4 ANÁLISE DO BIOFILME

A Tabela 6 mostra as modificações no biofilme dual frente ao uso de produtos lácteos fermentados.

Tabela 6 – Contagens de células viáveis (Log10 UFC/mL) para os diferentes grupos analisados

Grupos	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Lactobacillus</i>	Contagem Total
Yakult Normal	5,16 ± 0,64 <sup>a</sup>	2,69 ± 0,63 <sup>a</sup>	6,27 ± 0,51 <sup>a</sup>	6,21 ± 0,28 <sup>a</sup>
Yakult Light	5,01 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,25 ± 0,15 <sup>a</sup>	6,42 ± 0,47 <sup>a</sup>	6,02 ± 0,45 <sup>ab</sup>
Chamyto	4,91 ± 0,57 <sup>a</sup>	2,32 ± 0,67 <sup>a</sup>	4,21 ± 0,48 <sup>b</sup>	5,11 ± 0,65 <sup>b</sup>
Controle	6,11 ± 0,23 <sup>b</sup>	3,94 ± 1,69 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	6,1 ± 0,46 <sup>a</sup>

Nota: Letras minúsculas representam diferença estatística entre as bebidas lácteas.

Quando analisamos o crescimento de *Streptococcus mutans*, é possível notar que houve uma diminuição da contagem desse microrganismo em todos os grupos experimentais em relação ao grupo controle.

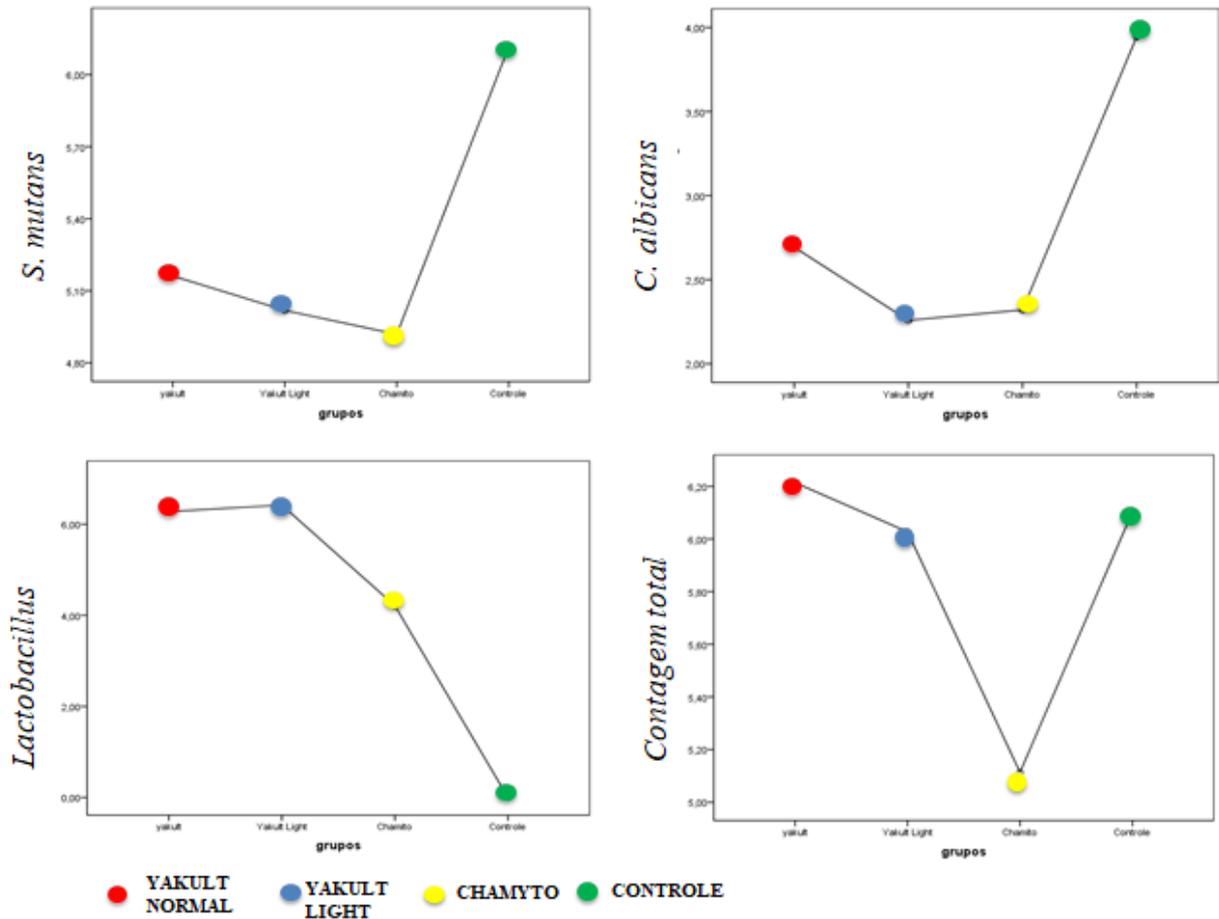
Em relação à *Candida albicans*, não houve diferença estatística entre todos os grupos analisados.

Quando avaliamos o crescimento de *Lactobacillus* spp., podemos observar que ele foi capaz de se incorporar ao biofilme dupla-espécie. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Yakult Normal e Yakult Light quanto à contagem de lactobacilos no biofilme. O grupo Chamyto apresentou resultado significativamente menor na contagem de lactobacilos quando comparado aos demais grupos experimentais. Como esperado, não houve crescimento de lactobacilos no grupo controle.

Em relação à contagem total de micro-organismos não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos Yakult Normal, Yakult Light e Controle. O grupo Chamyto foi o que apresentou menor contagem de microrganismos totais e foi semelhante ao grupo Yakult Light em relação à contagem total.

A seguir, os gráficos das curvas de contagem de microrganismos estão representados na figura 5.

Figura 5: Contagem de UFC/mL em log10 para cada grupo experimental e grupo controle em relação a contagem em meio seletivo para *S.mutans*, *C. albicans*, *Lactobacillus* e contagem em meio não seletivo para análise de microrganismos totais.



Fonte: O autor.

A partir da figura 3 é possível visualizar o que foi apresentado na tabela 6 de forma ilustrativa. Como esperado, o grupo controle não apresentou crescimento de *Lactobacillus*. O grupo Chamyto, quando comparado aos demais grupos experimentais, foi o que teve menor crescimento de *Lactobacillus* e apresentou menor contagem total de microrganismos.

## 5 DISCUSSÃO

A cárie dentária é uma doença multifatorial, ocasionada por microrganismos com capacidade de produzir ácidos orgânicos e suportar o ambiente ácido que é criado, devido à fermentação de carboidratos da dieta. O resultado desse desequilíbrio é a desmineralização do tecido dentário (SIMARK-MATTSSON et al., 2009). O protocolo de desmineralização utilizado nesse estudo *in vitro* foi capaz de formar lesão cariosa na superfície dentária dos blocos de esmalte bovinos. O inóculo microbiano inicial foi de  $10^2$  UFC/mL para *S. mutans* e  $10^4$  UFC/mL para *C. albicans*. Outro estudo *in vitro* de formação de biofilme dual utilizou um inóculo inicial maior sendo *S. mutans* de  $10^6$  UFC/mL e *C. albicans* de  $10^4$  UFC/mL (KRZYŚCIAK et al., 2017). No presente estudo, o inóculo inicial foi menor para permitir o crescimento microbiano por 24h até a troca do meio. Se a carga microbiana fosse muito alta a saturação dos nutrientes do meio poderiam esgotar-se antes do período desejado. Apesar do inóculo inicial menor, a perda mineral foi maior do que a esperada para o período experimental de 14 dias. Vários blocos perderam estrutura dentária, a ponto de formar cavidade. O planejamento inicial do estudo envolvia a mensuração da perda final de dureza superficial Knoop de superfície, porém essa mensuração não foi possível devido à grande perda mineral apresentada pelos blocos. Posteriormente serão realizados cortes longitudinais dos blocos e mensuração da perda mineral em profundidade para avaliar a perda mineral final.

Em estudos *in vitro* sobre formação de lesão de cárie, usualmente são empregados dentes bovinos (LIPPERT; BUTLER; LYNCH, 2013). No entanto, os dentes bovinos apresentam maior e mais rápida desmineralização – condição que pode ser atribuída à maior porosidade do esmalte bovino, permitindo mais rápida difusão de íons para a área desmineralizada, maior conteúdo de carbonato e diferente arranjo prismático – em relação ao esmalte humano (LIPPERT; BUTLER; LYNCH, 2013). Um dos principais microrganismo relacionado com a doença cárie é o *Streptococcus mutans* devido ao seu elevado potencial cariogênico. Suas propriedades acidogênicas e metabolismo rápido de sacarose, frutose e glicose diminui o pH desafiando a homeostase da microbiota oral (STAMATOVA; MEURMAN, 2009). A interação existente entre *S. mutans* e *C. albicans* foi investigada por Barbosa et al. (2016), onde avaliou-se o efeito de *S. mutans* no crescimento de *C. albicans* em biofilme *in vitro*. Os resultados mostraram uma maior contagem de *C. albicans* nos biofilmes mistos quando comparado ao biofilme formado apenas por *C. albicans*, indicando que as células de *S. mutans* foram capazes de estimular o crescimento de *C. albicans*. Esse sinergismo entre essas espécies mostra a capacidade que elas possuem de co-agregação, o que

melhora o processo de adesão, como foi mostrado em análise do biofilme entre essas espécies na Microscopia eletrônica de varredura (PEREIRA-CENCI et al., 2009). Considerando o sinergismo descrito entre *S. mutans* e *C. albicans*, esses microrganismos foram selecionados para compor o biofilme dual de nosso estudo, em que buscamos avaliar a capacidade das bebidas lácteas comumente consumidas por crianças em modificar o biofilme cariogênico. Durante dois dias, somente *S. mutans* e *C. albicans* foram cultivados, para então ser utilizado o produto probiótico. Desta forma, o biofilme dual já estaria estabelecido previamente ao contato com os produtos probióticos. A escolha do tempo experimental de 14 dias, uso de sacarose no meio de cultura, uso de bactérias cariogênicas, *S. mutans* e *C. albicans*, e uso de esmalte bovino podem ter contribuído para a desmineralização acentuada observada.

O efeito benéfico que um probiótico deve ter no controle ou prevenção de doença cárie é estabelecido pela adesão às superfícies dentárias e integração desses microrganismos no biofilme (BIZZINI et al., 2012; BADET; THEBAUD, 2008). Os *Lactobacillus* presentes nas bebidas lácteas probióticas analisadas foram capazes de se integrar ao biofilme dupla-espécie de maneira efetiva, diminuindo a contagem de *S. mutans*, mas não alterando significativamente a contagem de *C. albicans*. Corroborando com nosso estudo, Michalek et al., (1981) concluiu que na presença de *Lactobacillus casei* no biofilme dentário pode reduzir a concentração de *S. mutans* no biofilme. Embora diversos autores (BORIS; BARBES, 2000; HÖFS et al., 2016) apontem um possível papel antagonista entre *Lactobacillus* e *C. albicans* nossos resultados não foram significativos para comprovar essa relação. Diferentemente do nosso estudo, cepas de *Lactobacillus* usadas comercialmente em diversos produtos probióticos a fim de inibir o crescimento de *S. mutans* e *C. albicans in vitro*, mostraram que todas as cepas de *Lactobacillus* testadas reduziram o crescimento de *Candida albicans*, mas o efeito foi em geral um pouco mais fraco para *S. mutans* (HASSLÖF et al., 2010). O Chamyto foi o único produto lácteo capaz de diminuir a contagem total de microrganismos do biofilme, bem como Krzyściak et al., (2017) mostraram uma diminuição da contagem total de microrganismos com uso de probióticos.

Os produtos utilizados com *Lactobacillus* na sua composição apresentaram um número satisfatório de UFC/mL em suas composições para uso como probióticos. Nossas contagens de *Lactobacillus* spp. nos produtos mostram uma variação de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/ml, sendo, portanto suficientes para terem efeito no biofilme estudado.

O efeito dos probióticos na modulação do biofilme foi observado, mas sem efeito protetor em relação a perda mineral. Todos os grupos apresentaram perda mineral acentuada

com formação de lesão cáriosa ativa não cavitada e cavitada. Esse estudo *in vitro*, caracterizou o uso de produtos lácteos em população exposta a desafio cariogênico elevado: com presença de bactérias cariogênicas e uso contínuo de sacarose. Para essas condições experimentais os probióticos não foram capazes de inibir a desmineralização dental. Será necessária a análise da microdureza com corte longitudinal em profundidade dos blocos para confirmar os achados.

## 6 CONCLUSÃO

Os *Lactobacillus* presentes nos produtos lácteos testados foram capazes de se incorporar e modificar o biofilme dual, reduzindo as contagens de *S. mutans* sem haver redução de *C. albicans*. Apesar disso, a perda mineral parece ter sido semelhante em todos os grupos analisados. As bebidas fermentadas lácteas modularam o biofilme reduzindo a contagem de *S. mutans*, mas não foram capazes de inibir a formação de lesão cariiosa no desafio cariogênico proposto no experimento.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C. G. **Avaliação do potencial cariogênico de biofilmes contendo *Candida albicans* em relação à dentina radicular**: Estudo in vitro. 2017. 47 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica – Cariologia e Dentística). Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BADET, C.; THEBAUD, N.B. Ecology of Lactobacilli in the Oral Cavity: A Review of Literature. **The Open Microbiology Journal**, Sharjah, v.2, p. 38-48, Jan. 2008.
- BARBIERI, D.S.V. et al. Analysis of the in vitro adherence of streptococcus mutans and candida albicans. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, no .4, p. 643-641, Jul. 2007.
- BARBOSA, J.O, et al. Streptococcus mutans Can Modulate Biofilm Formation and Attenuate the Virulence of Candida albicans. **Plos One**, Switzerland, v.11, no. 3, p. 1-16, Mar. 2016.
- BIZZINI, B. et al. Probiotics and Oral Health. **Bentham Science Publishers**, Carcassonne, v. 18, no. 34, p. 5522-5531, May 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução n. 5. Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jan. 2001. Seção I, p. 19-22.
- BRASIL. Lei nº 1.283 de 18 de dezembro de 1950. Instrução normativa nº 46. Regulamento Técnico de identidade e qualidade de leites fermentados. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 out. 2007. Seção I, p. 4.
- BORIS, S.; BARBES, C. Role played by *lactobacilli* in controlling the population of vaginal pathogens. **Microbes and Infection**, v.2, no. 5, p. 543-546, Apr. 2000.
- CURY, J. A, REBELLO, M.A., CURY, A.A.D.B. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Research**, Switzerland, v. 31, p. 356-360, 1997.
- FALSETTA, M.L.; KOO, H. Beyond Mucosal Infection: a Role for C. albicans-Streptococcal interactions in the pathogenesis of Dental Caries. **Current Oral Health Report**, Heidelberg, v. 1, p.86–93, Jan. 2014.
- FALSETTA, M. L. et al. Symbiotic Relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* Synergizes Virulence of Plaque Biofilms *In Vivo*. **American Society for Microbiology Journals**, Wachington, , v.82, no.5, p. 1968-1961, May 2014.
- FAO/WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, October 2001. Disponível em: <[http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf)>. Acesso em: 2 jun. 2018.

- GREGOIRE, S. et al. Role of Glucosyltransferase B in Interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an Experimental Pellicle on Hydroxyapatite Surfaces. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.77, no. 18, p. 6357–6367, Jul. 2011.
- GOMES, A.M.P; MALCATA, F.X. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v.10, no. 5, p. 139-157, Apr. 1999.
- HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Journal of Microbiology**, London, v. 54, no. 3, p.149-169, Mar. 2016.
- HWANG, G. et al. Binding Force Dynamics of *Streptococcus mutans*–glucosyltransferase B to *Candida albicans*. **Journal of Dental Research**, Chicago, v.9 , no. 94, p. 1-8, Jul. 2015.
- KELLER, M.T.; TWETMAN, S. Acid production in dental plaque after exposure to probiotic bacteria. **Biomed Central Oral Health**, London, v.12, no. 44, p. 1-6, Oct. 2012.
- KRZYŚCIAK, W. et al. Effect of a Lactobacillus Salivarius Probiotic on a Double-Species Streptococcus Mutans and Candida Albicans Caries Biofilm. **Nutrients Journal**, Switzerland, v.9, p.1-23, Nov. 2017.
- LIPPERT, F.; BUTLER, A.; LYNCH, R. J. M. Characteristics of Methylcellulose Acid Gel Lesions Created in Human and Bovine Enamel. **Caries Research**, Switzerland, v. 47, no. 1, p. 50-55, Dec. 2013.
- MATSUBARA, V.H. et al. Probiotics as antifungals in mucosal candidiasis. **Clinical Infectious Diseases Advance**, Heidelberg, v.62, no.9, p.1143-1153, May 2016.
- METWALLI, K.H. et al. Streptococcus mutans, Candida albicans, and the human mouth: a sticky situation. **Plos Pathogen.**, San Francisco, v.9, no. 10, p. 1-5, Oct. 2013.
- MOALIC, E. et al. The Extent of Oral Fungal Flora in 353 Students and Possible Relationships with Dental Caries. **Caries Research**, Switzerland, v. 35, p. 149-155, Oct. 2001.
- PEREIRA-CENCI, T. et al. The effect of Streptococcus mutans and Candida glabrata on Candida albicans biofilms formed on different surfaces. **Archives of Oral Biology**, Amsterdam, v. 23, p. 755-764, Feb. 2008.
- STAMATOVA, I.; MEURMAN, J.K. Probiotics: Health benefits in the mouth. **American Journal of Dentistry**, v. 22, no. 6, p. 329-338, Dec.2009.
- SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Review**, Vermont, v. 61, no. 3, p. 91-9, Mar. 2003.
- SCHWENDICKE, F. et al. 2014. Cariogenic Effects of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in a Dental Biofilm Model. **Caries Research**, Switzerland, v. 48, p. 186–192, Jan. 2014.

SCHWENDICKE, F. et al. 2017. Inhibition of *Streptococcus mutans* Growth and Biofilm Formation by Probiotics in vitro. **Caries Research**, Switzerland, v. 51, p. 87 -95, Jan. 2017.

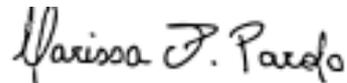
VITKOV, L. et al. Ex vivo gingival- biofilm Consortia. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 404-411, Jun. 2005.

WILLIAMS, D; LEWIS, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. **Journal of Oral Microbiology**, New York, v. 3, p. 1-11, Jan. 2011.

**APÊNDICE A - TERMO DE ANUÊNCIA DE PARCERIA****UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
COMISSÃO DE PESQUISAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****TERMO DE ANUÊNCIA DE PARCERIA**

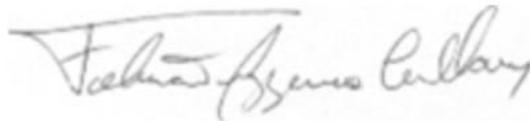
Estou ciente de que o trabalho intitulado “**Estudo *in-vitro* do efeito de *Lactobacillus* probióticos na inibição do crescimento do biofilme dupla espécie *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*”** a ser conduzido pelos pesquisadores **Profs. Dra Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo e Doutoranda Laís Daniela Ev** será realizado no Laboratório de Microbiologia (LABIM) e no Laboratório de Materiais Dentários (LAMAD) da Faculdade de Odontologia, que possui todos os recursos necessários para realização desse estudo.

Atenciosamente,



---

Profa. Dra. Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo  
Departamento de Odontologia Social e Preventiva  
Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul



---

Prof. Dr. Fabrício Mezzomo Collares  
Departamento de Odontologia Conservadora  
Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## APÊNDICE B - TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES BOVINOS

### TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES BOVINOS

O frigorífico Callegaro e Irmãos inscrito no CNPJ 02-999-886-0001-54, estabelecido na cidade de Santo Ângelo- RS, declara a doação de dentes bovinos, removidos de carcaças descartáveis, em 07/09/2018 para a realização da pesquisa intitulada “**Estudo *in vitro* do efeito de *Lactobacillus* probióticos na inibição do crescimento do biofilme dupla espécie de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans***” a ser desenvolvido pela acadêmica Marielle Taíse da Silva Wizbicki do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS - sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr. Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo e pela Doutoranda Laís Daniela Ev.

Atenciosamente,

*Eder Antunes de Oliveira*  
 MEDICO VETERINÁRIO  
 CRMV-RS: 14475  
 Responsável Técnico *Eder Antunes de Oliveira*

Assinatura do responsável pelo frigorífico  
 Médico Veterinário  
 Frigorífico Callegaro e Irmãos

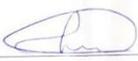
*Clarissa F. Parolo*

Profa. Dra. Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo  
 Departamento de Odontologia Social e Preventiva  
 Faculdade de Odontologia  
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES BOVINOS

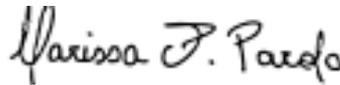
O frigorífico GG LTDA inscrito no CNPJ 09-526-718-0001-90, estabelecido na cidade de Araricá-RS, declara a doação de dentes bovinos, removidos de carcaças descartáveis, em 04/10/2018, para a realização da pesquisa intitulada “**Estudo *in vitro* do efeito de *Lactobacillus* probióticos na inibição do crescimento do biofilme dupla espécie de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*”** a ser desenvolvido pela acadêmica Marielle Taíse da Silva Wizbicki do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS - sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr. Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo e pela Doutoranda Laís Daniela Ev.

Atenciosamente,

  
Talita Molinaro  
Médica Veterinária  
CRMV 15963

---

Assinatura do responsável pelo frigorífico  
Médico(a) Veterinário  
Frigorífico GG LTDA



Profa. Dra. Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo  
Departamento de Odontologia Social e Preventiva  
Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## ANEXO A – PARECER DA COMPESQ

O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito modulador de *Lactobacillus* probióticos no biofilme dual de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* durante a formação de lesões de cárie *in vitro*. Os *Lactobacillus* serão obtidos a partir de produtos lácteos fermentados (Vigor, Yakult, Yakult light e Chamyto). Cepas de *Candida albicans* (ATCC90027) e *Streptococcus mutans* (UA156) serão utilizadas como microrganismos cariogênicos na formação de biofilme dual. Blocos de esmalte bovinos serão fixados em tampa de tubo Falcon e imersos em caldo de cultura BHI acrescido de 5% de sacarose e o inóculo das bactérias cariogênicas. Durante 14 dias ocorrerá o desafio cariogênico nos blocos e após o período experimental será avaliado a cariogenicidade do biofilme e a formação das lesões cariosas nos blocos. As amostras serão divididas em cinco grupos experimentais para cada bebida láctea fermentada, e um grupo controle sem o uso de *Lactobacillus*. Nos grupos experimentais, haverá o contato com os produtos lácteos fermentados 1x/dia, simulando a ingestão diária do produto pelo indivíduo. Os resultados serão avaliados quanto aos critérios de quantificação da massa de biofilme e terá sua estrutura observada pela Microscopia Confocal. Além disso, será avaliada a microdureza final do esmalte e fotografias serão realizadas dos blocos de esmalte após o desafio cariogênico.

O presente projeto foi aprovado quanto ao mérito pela Comissão de Pesquisa.