



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
CLÍNICA ODONTOLÓGICA – CARIOLOGIA/DENTÍSTICA**

**Dissertação**

**MEIOS DE CULTIVOS PARA BIOFILMES DE MICROCOSMOS: ANÁLISES  
EXPERIMENTAIS IN VITRO EM MODELO DO TIPO BOCA-ARTIFICIAL.**

Glenda Ávila Marques

**Porto Alegre, 2024**

GLENDÁ ÁVILA MARQUES

**Linha de Pesquisa:**

Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

**MEIOS DE CULTIVOS PARA BIOFILMES DE MICROCOSMOS: ANÁLISES  
EXPERIMENTAIS IN VITRO EM MODELO DO TIPO BOCA-ARTIFICIAL.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia como parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica com ênfase em Cariologia e Dentística.

**Orientadora:** Profa. Tamires Timm Maske

**Co-orientador:** Prof. Dr Rodrigo Alex Arthur

**Porto Alegre**

**2024**

### CIP - Catalogação na Publicação

Marques, Glenda Ávila  
Meios de cultivos para biofilmes de microcosmos:  
análises experimentais in vitro em modelo do tipo  
boca-artificial / Glenda Ávila Marques. -- 2024.  
41 f.  
Orientadora: Tamires Timm Maske.

Coorientadora: Rodrigo Alex Arthur.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa  
de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,  
2024.

1. Microcosmos. 2. Biofilme dental. 3. Cárie  
dentária. 4. Desmineralização. I. Maske, Tamires Timm,  
orient. II. Arthur, Rodrigo Alex, coorient. III.  
Titulo.

GLENDÁ ÁVILA MARQUES

**MEIOS DE CULTIVOS PARA BIOFILMES DE MICROCOSMOS: ANÁLISES  
EXPERIMENTAIS IN VITRO EM MODELO DO TIPO BOCA-ARTIFICIAL.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia como parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica com ênfase em Cariologia e Dentística.

**Orientadora:** Profa. Tamires Timm Maske

**Co-orientador:** Prof. Dr Rodrigo Alex Arthur

Porto Alegre, 22 de abril de 2024

---

Profa. Dra. Tamires Timm Maske  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Profa. Dra. Françoise Hélène van de Sande Leite  
Universidade Federal de Pelotas

---

Profa. Dra. Sandra Liana Henz  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Profa. Dra. Lina Naomi Hashizume  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Profa. Dra. Cácia Signori  
Centro Universitário Uniavan

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Pedro Paulo e Marizeti**, e irmã **Glaucia**, por acreditarem em mim e me incentivarem a buscar meus objetivos, além de pôr todo suporte para que eu finalizasse esta etapa.

À minha orientadora, **Profª. Drª. Tamires Timm Maske**, e meu co-orientador **Profº. Drº. Rodrigo Alex Arthur**, pela orientação e oportunidade de aprender com vocês, pelos conselhos e pela paciência durante esses anos. Muito obrigada por tudo!

À técnica do laboratório de microbiologia, **Luisa Mercado** obrigada pela importante contribuição no desenvolvimento deste trabalho e pelos conhecimentos transmitidos.

Às alunas de iniciação científica, **Bruna Kremer e Bruna Dalongaro**, por todo auxílio na realização deste trabalho.

À minha colega e amiga, **Raissa Ribeiro** por toda ajuda ao longo destes anos.

Ao **grupo de professores** e aos **colegas de Pós-Graduação em Cariologia/Dentística da UFRGS**, agradeço a convivência e contribuição ao meu crescimento pessoal e profissional.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul** e ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, pela oportunidade de estudo e suporte nesses 3 anos.

A todos aqueles que, contribuíram para desenvolvimento deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

**MARQUES, G.A. Meios de cultivos para biofilmes de microcosmos: análises experimentais in vitro em modelo do tipo boca-artificial.** Faculdade de Odontologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2024.

Esta dissertação de mestrado teve como objetivo avaliar a influência de meios de cultivo definidos e indefinidos quimicamente na perda mineral induzida em esmalte e dentina e na composição microbiológica dos biofilmes de microcosmos cultivados. Para isso, foi conduzido um estudo experimental in vitro, no qual biofilmes de microcosmos foram cultivados a partir de saliva humana durante 4 dias, em amostras de esmalte e dentina radicular bovina, utilizando diferentes meios de cultivo microbiológicos: a) dois definidos quimicamente - meio definido e enriquecido de mucina (DMM) e DMM com modificação química (DMMmod); b) dois indefinidos quimicamente - caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e meio McBain. As variáveis de desfecho foram a porcentagem de perda de dureza superficial (%PDS) do substrato dentário e o perfil microbiológico dos biofilmes formados (UFC/mg). Os dados foram coletados e analisados estatisticamente por meio de ANOVA de uma via, seguida pelo teste post-hoc Tukey. Observamos que tanto os meios definidos ou quimicamente indefinidos possibilitaram o desenvolvimento de lesões de cárie em esmalte quanto em dentina. Na dentina, registrou-se uma perda de dureza superficial de 75%, enquanto no esmalte houve uma variação de aproximadamente 50-75%. Em dentina não se observou diferença significativa nos valores de %PDS considerando o uso dos diferentes meios de cultura ( $p > 0,05$ ). No entanto, para o esmalte, o meio DMM apresentou a menor perda de dureza superficial, sendo estatisticamente diferente dos meios DMM modificado e BHI ( $p < 0,05$ ). O meio McBain demonstrou valores de perda de dureza superficial intermediários, semelhantes aos meios DMM, DMM modificado e BHI ( $p > 0,05$ ). Quanto a composição microbiológica, os biofilmes formados na presença de DMM, DMM modificado ou McBain não diferiram entre si no crescimento de microrganismos acidúricos totais ( $p > 0,05$ ), enquanto biofilmes formados na presença de BHI apresentaram contagens significativamente maiores de microrganismos acidúricos totais em comparação com o DMM modificado ( $p < 0,05$ ). Não foram encontradas diferenças significativas em relação aos diferentes meios testados para contagens de estreptococos do grupo mutans, microrganismos totais e lactobacilos ( $p > 0,05$ ). Maiores contagens de fungos totais foram observadas nos biofilmes cultivados na presença de DMM e de DMMmod. Com base nos achados

desta dissertação de mestrado, conclui-se que tanto os meios de cultivo quimicamente definidos quanto os indefinidos permitiram o desenvolvimento de lesões de cárie em dentina e esmalte. O tipo de meio de cultivo dos biofilmes parece interferir no desenvolvimento de lesão em esmalte dentário, mas não em dentina. Além disso, os meios de cultivo foram capazes de selecionar microrganismos cariogênicos, reproduzindo modificações microbiológicas clinicamente relevantes no que diz respeito ao desenvolvimento de biofilmes cariogênicos. Além disso, os meios quimicamente definidos apresentam uma capacidade de estimular o crescimento de fungos.

**Palavras-chave:** microcosmos; biofilme dental; cárie dentária; desmineralização.

## ABSTRACT

**MARQUES, G.A. Medium culture for microcosm biofilms: in vitro experimental analysis in an artificial mouth model.** Faculdade de Odontologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2024.

This master's dissertation aimed to evaluate the influence of chemically defined and undefined culture media on induced mineral loss in enamel and dentin, and on microbiological composition of cultivated microcosm biofilms. For this purpose, an in vitro experimental study was conducted, in which microcosm biofilms were grown from human saliva over 4 days on samples of bovine enamel and root dentin, using different microbiological culture media: a) two chemically defined media - defined and mucin-enriched medium (DMM) and chemically modified DMM (DMMmod); b) two chemically undefined media - brain heart infusion broth (BHI) and McBain medium. The outcome variables were the percentage of surface hardness loss (%SHL) of the dental substrate and the microbiological profile of the formed biofilms (CFU/mg). Data were collected and statistically analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. We observed that both media types enabled the development of caries lesions in both enamel and dentin. In dentin, a surface hardness loss of 75% was recorded, while in enamel, there was a variation of approximately 50-75%. In dentin, there was no significant difference in %SHL values considering the use of different culture media ( $p > 0.05$ ). However, for enamel, the DMM medium showed the lowest surface hardness loss, being statistically different from the modified DMM and BHI media ( $p < 0.05$ ). The McBain medium demonstrated intermediate surface hardness loss values, similar to the DMM, modified DMM, and BHI media ( $p > 0.05$ ). Regarding microbiological composition, biofilms formed in the presence of DMM, modified DMM, or McBain did not differ in the growth of total aciduric microorganisms ( $p > 0.05$ ), while biofilms formed in the presence of BHI showed significantly higher counts of total aciduric microorganisms compared to modified DMM ( $p < 0.05$ ). No significant differences were found regarding the different media tested for counts of mutans streptococci, total microorganisms, and lactobacilli ( $p > 0.05$ ). Higher counts of total fungi were observed in biofilms cultivated in the presence of DMM and DMMmod. Based on the findings of this master's dissertation, it is concluded that both chemically defined and undefined culture media allowed the development of caries lesions in dentin and enamel. The type of biofilm culture medium appears to interfere with the



development of enamel dental lesion, but not in dentin. Additionally, the culture media were able to select cariogenic microorganisms, reproducing clinically relevant microbiological modifications regarding the development of cariogenic biofilms. Furthermore, chemically defined media have a capacity to stimulate fungal growth.

**Keywords:** microcosm; dental biofilm; dental caries; demineralization.

## Sumário

<b>1. Antecedentes e justificativas .....</b>	<b>11</b>
<b>2. Proposição.....</b>	<b>15</b>
<b>3. Hipótese .....</b>	<b>15</b>
<b>4. Artigo.....</b>	<b>16</b>
<b>CONFLITO DE INTERESSES .....</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>35</b>

## 1. Antecedentes e justificativas

A cárie dentária é considerada uma doença multifatorial, polimicrobiana, crônica, biofilme-açúcar-dependente e não transmissível. Através da metabolização dos carboidratos pelos microrganismos presentes no biofilme dentário origina-se um ambiente acidificado, induzindo modificações microbiológicas e seleção de microrganismos acidogênicos e ácido-tolerantes (disbiose). Assim, decorrente da interação dos diferentes microrganismos presentes neste biofilme, ocorre o processo de desmineralização dos tecidos duros dentário, dando início ao processo de formação da lesão de cárie (MATHUR 2018; MACHIULSKIENE et al, 2019; ARTHUR et al 2022).

Ao longo do tempo, diversas teorias sobre o processo de formação de lesões de cárie foram sendo propostas, e estudos laboratoriais foram contribuindo para o que sabemos sobre a etiologia das lesões de cárie. No final do século XIX, Willoughby Dayton Miller através de sua teoria “químico-parasitária”, demonstrou que o processo de desmineralização do esmalte dentário ocorria devido à quebra de carboidratos da dieta em ácidos através da ação de microrganismos presentes na microbiota oral. A partir de 1960, sua teoria foi confirmada, mostrando que carboidratos fermentáveis e consumo excessivo de açúcar levava à desmineralização do esmalte dental hígido e, portanto, dando início as lesões de cárie (MARSH 2010).

No decorrer dos anos 1990, Marsh e Bradshaw propuseram uma nova teoria, chamada de “Teoria da Placa Ecológica”. Nela, havia a hipótese de que a cárie dentária não teria uma etiologia específica, ou seja, um só microrganismo seria responsável pelo seu desenvolvimento, mas para o seu aparecimento, ocorria uma seleção de bactérias patogênicas decorrentes de mudanças no meio ambiente bucal. Neste caso, qualquer espécie com características semelhantes poderia influenciar no processo de doença. Com isso, eles idealizaram estratégias de prevenção para o surgimento da doença cárie, sendo elas: inibição do ácido da placa, evitar alimentos e bebidas com açúcares fermentáveis, optando por consumir os não fermentáveis, e estimular o fluxo salivar após refeições (MARSH 2003).

Os modelos laboratoriais de cultivo de biofilme foram essenciais para o surgimento e na proposição de teorias que suportam o que sabemos sobre o desenvolvimento de lesões de cárie atualmente. Esses modelos de simulação artificial de lesões de cáries foram sendo idealizados e melhorados ao longo do tempo para a

melhor compreensão do fenômeno estudado. Magiot e Miller foram os primeiros a desenvolver modelos que simulavam condições da cavidade oral. Eles adicionavam dentes extraídos em meios de cultivo bacteriológicos os quais permitiam iniciar o processo de desmineralização dentária. Em 1890, Miller realizou a inoculação de dentes humanos extraídos em uma mistura de pão e saliva em um frasco cônico, controlando as variações de temperatura, fontes de nutriente por aproximadamente três meses. A partir das análises desses pesquisadores, em diferentes sistemas de cultivos, foi possível observar em microscópio o processo de formação das lesões de cárie dentária, e tais achados tornaram-se fontes de inspiração para novos pesquisadores e suas pesquisas na área da cariologia (TANG et al., 2003).

Assim, os estudos pioneiros tornaram-se base para o surgimento de diversos modelos de biofilmes laboratoriais, buscando entender a complexidade e a heterogeneidade do biofilme que era formado sobre os elementos dentários humanos (MCBAIN, 2009). Sabe-se que 90% da biomassa do biofilme é composta por matriz extracelular, sendo o restante de microrganismos (10%). Esta matriz possui como característica a heterogeneidade, contendo 97% de conteúdo aquoso e os outros 3% de polissacarídeos, proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e DNA extracelular (e-DNA) em sua composição. Desempenhando um papel importante, como: proteção contra ressecamento, estabilidade mecânica, retenção enzimática, elevada capacidade de captura de nutrientes, proteção contra sistema imune do hospedeiro, tolerância e resistência dos antimicrobianos (ARTHUR et al 2022).

Para melhor compreensão sobre o biofilme, alguns pesquisadores passaram a desenvolver modelos de simulação de lesões de cárie dentária com biofilmes puros (monocultura), ou seja, biofilmes de um microrganismo único; biofilmes de consórcio definido (dois ou mais organismos combinados) e biofilmes de microcosmos. O cultivo de biofilmes de monocultura, normalmente é utilizado para estudos fisiológicos, onde é monitorada a resposta do organismo específico frente a diferentes variáveis (temperatura, atmosfera, entre outros). O consórcio definido de microrganismos, por sua vez, é utilizado para investigar fenômenos ecológicos entre microrganismos específicos, como por exemplo, sinergismo ou antagonismo. Já os modelos de biofilmes de microcosmos tentam replicar as condições físico-químicas, microbiológicas e nutricionais do biofilme complexo que é formado na cavidade bucal, e são normalmente formados a partir do ambiente desejado, por exemplo, saliva ou placa dentária (MASKE et al. 2017; ARTHUR et al. 2022). Dessa forma, o biofilme de

microcosmos, mantêm a complexidade e heterogeneidade da amostra original, permitindo que a dinâmica da comunidade bacteriana original seja mimetizada e manipulada em laboratório (MAC BAIN et al 2005; MAC BAIN 2009; PRATTEN 1998).

Além da complexidade do inóculo microbiano, os modelos de simulação de lesões de cárie dentária podem variar quanto ao sistema de cultivo do biofilme, podendo ser estático ou dinâmico. A principal diferença se dá pela oferta de nutrientes (fluxo) e pela remoção de metabólitos durante o cultivo. Os modelos estáticos contam com uma limitada disponibilidade de nutrientes, onde os biofilmes são cultivados em substratos alocados em um sistema fechado como as placas de micropoços. Nestes modelos, os nutrientes são fornecidos em períodos específicos pelo pesquisador, e há ausência de simulação de fluxo salivar (apenas uma lavagem em solução fisiológica para remoção das células superficiais) e são necessárias frequentes trocas do meio de cultivo seguindo um protocolo pré-determinado durante o crescimento do biofilme. Os modelos estáticos destacam-se pelas altas taxas de crescimento microbiano em menor tempo, facilidade de uso e rapidez de obtenção de resultados quando comparadas aos modelos dinâmicos ou de cultura contínua.

Os modelos dinâmicos, são aqueles que contam com presença de fluxo contínuo durante o cultivo do biofilme. Normalmente com auxílio de um computador, ocorre a programação de ciclos de exposição aos nutrientes e ao fluxo salivar. Nesses casos, é possível o controle adequado das variações de pH semelhantes às que ocorrem na cavidade bucal durante a rotina alimentar humana (ARTHUR 2022). Dos modelos de cultura contínua, destacam-se os de gotejamento como: fermentador de biofilme de profundidade constante (CDFF) que permite a geração em grandes quantidades de biofilmes replicados, e a padronização de parâmetros físico-químicos, adequados para estudos de biofilmes maduros, efeitos antimicrobianos e diferentes substratos de crescimento, possibilitando a cultura contínua da placa dentária e controle de biomassa. Já o modelo de reator de biofilme de fluxo de gotejamento, é utilizado para crescimento de biofilme em lâminas alimentadas por gotejamento. Outro exemplo é o modelo de “boca artificial”, representada por uma ou mais câmaras de cultivo e de fluxo, onde o meio de cultivo é perfundido por sistemas de tubulações e controlado por bombas peristálticas via computador (MAC BAIN et al, 2009; WILSON 1999; ARTHUR 2022).

Quando levamos em consideração modelos complexos como os de cultura dinâmica e a formação de biofilmes de microcosmos, estamos tentando simular mais

de perto o que acontece na cavidade bucal, isso porque os microcosmos são inóculos que representam o ecossistema bucal, e a cultura dinâmica representa o ambiente bucal (fluxo salivar, dieta intermitente, atmosfera e temperatura controlada). Para esses tipos de modelos complexos, é importante que meios de cultivos também sejam semelhantes aos fluídos orais e que permitam o crescimento dos microrganismos com características semelhantes às aquelas encontradas na cavidade bucal.

Para o cultivo de biofilmes de microcosmos, tem sido utilizados meios baseados em mucina, como por exemplo os meios DMM, BMM e McBain. Em geral, estes meios possuem em sua composição mucina gástrica, proteose peptona, extrato de levedura, menadiona, ureia e arginina, entre outros reagentes e fatores de crescimento. No BMM, alguns peptídeos de sua composição são desconhecidos, enquanto o DMM possui aminoácidos, íons, vitaminas e fatores de crescimento proporcionados e conhecidos em sua composição.

O DMM tem se mostrado um meio de crescimento e virulência para microrganismos orais complexos (MAC BAIN 2009; WONG e SISSONS 2001). Em um modelo de biofilme de microcosmos de cultura contínua (Multiplaque Artificial Mouth / MAM), o DMM mais adequado para culturas de larga-escala uma vez que mostrou taxas de crescimento realísticas de biofilme semelhantes ao BMM, e ainda permitindo a investigação de variáveis nutricionais (WONG e SISSONS 2001). Quando pensamos em modelos de cultura contínua, existe a necessidade de confeccionar um meio de cultivo que será produzido e utilizado em larga escala, e portanto, este meio não pode ser tão oneroso e demorado de ser confeccionado. Assim, tendo em vista que o DMM é preconizado para uso em modelos de cultura contínua para crescimento de biofilmes de microcosmos, estratégias de facilitar a sua preparação, ou a possibilidade de substituí-lo por meios mais simplificados e com características de crescimento microbiano semelhantes poderiam ser úteis para facilitar o manejo de modelos deste tipo.

Dessa forma, esta dissertação de mestrado tem por objetivo avaliar diferentes meios de cultivo para o crescimento de biofilmes de microcosmos quanto aos seus padrões de resposta mineral e microbiológica para o desenvolvimento de lesões de cáries artificiais, em esmalte e dentina radicular, utilizando um modelo de cultura contínua do tipo boca-artificial.

## **2. Proposição**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a influência de meios de cultivo definidos e indefinidos quimicamente na perda mineral induzida em esmalte e dentina e na composição microbiológica dos biofilmes de microcosmos cultivados em modelo do tipo boca-artificial.

### **2.2 Objetivo Específicos**

- Avaliar a desmineralização proporcionada pelos diferentes meios de cultivo avaliados;
- Avaliar a composição microbiológica dos biofilmes de microcosmos formados a partir dos seguintes meios de cultivo: Caldo de infusão de coração e cérebro (BHI), meio definido de mucina (DMM), meio definido de mucina com modificação (DMM mod), e meio McBain;
- Comparar a composição microbiológica dos biofilmes formados e a desmineralização dos substratos a partir dos diferentes meios de cultivo testados;
- Definir um meio de cultivo que permita a adequada simulação de lesões artificiais, crescimento de biofilme cariogênico, e que possa ser utilizado em um modelo do tipo boca-artificial;

## **3. Hipótese**

- Não haverá diferença na capacidade de desmineralização e na composição microbiológica dos biofilmes formados sob exposição à diferentes meios de cultivo.

#### **4. Artigo**

**Título: Cariogenicidade de biofilmes de microcosmos cultivados a partir de meios de cultivo definidos e indefinidos quimicamente**

Marques, G.A<sup>1\*</sup>, Kremer, B<sup>1</sup>; Dalongaro, B.F<sup>1</sup>; Arthur, R.A<sup>1</sup>, Maske, TT<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

**\*Autor Correspondente:**

Glenda Ávila Marques  
glenda\_a.marques@hotmail.com  
Rua Ramiro Barcelos, 2492  
Bom Fim  
Porto Alegre - RS  
Brasil 90035-003



## RESUMO

Este estudo experimental *in vitro* objetivou avaliar a influência de meios cultivo definidos e meios indefinidos quimicamente na perda mineral induzida em esmalte e dentina durante 4 dias, e avaliando sua composição microbiológica, utilizando um modelo de cultura contínua do tipo boca-artificial. Biofilmes de microcosmos foram cultivados a partir de saliva humana por 4 dias empregando diferentes meios de cultura microbiológica: a) dois meios quimicamente definidos – meio definido e enriquecido de mucina (DMM) e DMM quimicamente modificado (DMMmod); b) dois meios quimicamente indefinidos – caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e meio McBain. As variáveis de desfecho incluíram a porcentagem de perda de dureza superficial (%PDS) do substrato dentário e o perfil microbiológico dos biofilmes formados. A análise estatística revelou que ambos os meios de cultura facilitaram o desenvolvimento de lesões de cárie em esmalte e dentina. A dentina apresentou uma perda de dureza superficial de 75%, enquanto o esmalte mostrou uma variação de 50-75%. A dentina não apresentou diferença significativa nos valores de %PDS entre os diferentes meios de cultura. O meio DMM demonstrou a menor perda de dureza superficial no esmalte, diferindo significativamente do DMMmod e BHI. O meio McBain mostrou resultados intermediários, semelhantes ao DMM, DMMmod e BHI. Não foram observadas diferenças significativas no crescimento total de acidúricos entre DMM, DMMmod e McBain, enquanto o BHI apresentou contagens significativamente mais altas de acidúricos totais que o DMM modificado. Adicionalmente, não foram encontradas diferenças significativas na seleção de microorganismos cariogênicos entre os meios testados. Conclui-se que tanto os meios de cultura quimicamente definidos quanto os indefinidos suportam o desenvolvimento de lesões de cárie em dentina e esmalte e podem selecionar microorganismos cariogênicos, sendo que os meios quimicamente definidos demonstraram uma capacidade superior para estimular o crescimento de fungos.

**Palavras-chave:** microcosmos; biofilme dental; cárie dentária; desmineralização

## 1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é considerada uma doença crônica, multifatorial, biofilme-açúcar dependente e não transmissível (Hall-Stoodley et al., 2004; Mathur, 2018; Machiulskiene et al., 2019). Quando queremos estudá-la, em laboratório, é necessário que os modelos de estudo repliquem as condições físico-químicas, microbiológicas, nutricionais e atmosféricas envolvidas em seu desenvolvimento.

Tendo em vista a complexidade desses fatores, inúmeros modelos de biofilmes para o estudo da cárie dentária têm sido desenvolvidos com o objetivo de mimetizar as diversas condições encontradas na cavidade oral. Dentre os modelos disponíveis na literatura, destacam-se os simuladores de cavidade oral do tipo bocas artificiais, que se classificam como modelos de cultura contínua de biofilme. Neste caso, os biofilmes são crescidos na presença de fluxo contínuo ou intermitente de nutrientes fornecidos pelo meio de cultivo, e mimetizam, portanto, os ciclos de escassez e fartura de nutrientes presentes na cavidade bucal, além da constante remoção de metabólitos que também é realizada pela ação da saliva oral. Estes modelos também permitem que biofilmes sejam cultivados na presença de estresse mecânico que remove as porções mais superficiais dos biofilmes em decorrência do deslocamento dos fluídos sobre a superfície do biofilme. Além disso, nestes modelos existe a possibilidade de reproduzir o crescimento do biofilme e as lesões de cárie utilizando inóculos baseados em microcosmos, provenientes de placa dentária ou saliva, o que os tornam modelos ainda mais realísticos e próximos ao ambiente oral uma vez que também mantém a heterogeneidade e complexidade do inóculo (Mc Bain et al., 2005; Mc Bain, 2009; Pratten, 1998).

Devido a complexidade do inóculo, modelos que utilizam microcosmos precisam de meios capazes de reproduzir as diferentes nuances dos fluídos orais que são a fonte de nutrientes para o inóculo utilizado (Mash e Martin 1999). Uma revisão sistemática avaliando modelos de biofilmes para simulação de cárie dentária, identificou que os meios de cultivo para microcosmos variam entre aqueles com aminoácidos quimicamente definidos e acrescidos de mucina, vitaminas e fatores de crescimento, como o DMM, e aqueles quimicamente indefinidos contendo mucina, extrato de levedura e peptona em sua composição, como por exemplo o BMM e o McBain (Maske et al. 2017). Os meios DMM e McBain, têm sido amplamente utilizados em modelos de cultura estática (Viana et al. 2021; Signori et al. 2021;

Vertuan et al. 2021), mas poucos estudos fazem a comparação dos diferentes meios de cultivo para culturas de larga escalas como o que ocorre nos simuladores de boca artificial. Wong e Sissons (2001) comparam o meio DMM com o BMM para formação de biofilmes em um modelo de cultura contínua, e perceberam que quanto mais próximo da composição da saliva natural, mais realista é a taxa de crescimento do biofilme. Meios mais complexos, por sua vez, demandam mais tempo de preparo, e quando utilizados em modelos contínuos demandam que sua produção seja feita de forma rápida e em larga escala. Dessa forma, a comparação de diferentes meios de cultivo para modelos de cultura contínua se faz interessante para diminuir tempo laboratorial e melhor o manejo destes modelos.

Recentemente um simulador multifuncional de cavidade oral – MOCS foi desenvolvido como modelo para cultivo de biofilme de microcosmos em cultura dinâmica (Maske et al. 2024 - dados ainda não publicados). No entanto, ainda não se sabe, qual seria o papel desempenhado pelos diferentes meios de cultivo na cariogenicidade e na composição microbiológica dos biofilmes de microcosmos a serem formados neste simulador. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de meios de cultura definidos e indefinidos quimicamente no desenvolvimento de lesões artificiais de cárie e na composição microbiológica do biofilme formado em esmalte e dentina radicular, utilizando o MOCS. A hipótese do estudo é que não haverá diferença na capacidade de desmineralização e na composição microbiológica dos biofilmes formados sob exposição à diferentes meios de cultivo.

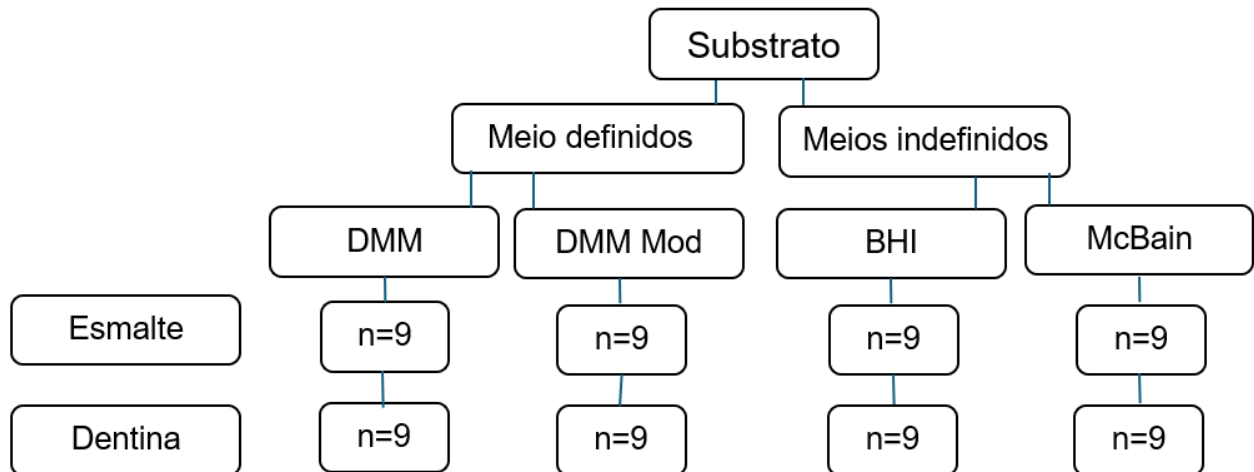
## **MATERIAIS E MÉTODOS**

A aprovação ética foi concedida pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos local (Universidade Federal do Rio Grande do Sul – CEP UFRGS) sob protocolo número CAAE 69918823.6.0000.5347.

### **Delineamento experimental**

Este foi um estudo experimental in vitro no qual biofilmes de microcosmos foram cultivados a partir de saliva humana por 4 dias, em amostras de esmalte e dentina radicular bovina, utilizando um modelo de cultura contínua do tipo boca artificial e meios de cultivo microbiológicos: a) quimicamente definidos: meio definido e

enriquecido de mucina (DMM) e DMM com modificação química (DMMmod) e b) quimicamente indefinidos: caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e o meio McBain. A porcentagem de perda de dureza superficial (%PDS) do substrato dentário (esmalte ou dentina) foram consideradas como desfecho primário, e o perfil microbiológico dos biofilmes (UFC/mg) foram considerados como desfecho secundário (Figura 1).



**Figura 1.** Delineamento experimental de acordo com os grupos de meios de cultura a serem avaliados (n=9).

### Cálculo amostral

O cálculo amostral (n) foi realizado no site Statulator (<https://statulator.com/SampleSize/ss2M.html>) considerando as médias de porcentagem de perda de dureza superficial (%PDS) de testes pilotos utilizando o modelo de biofilme de cultura contínua e diferentes meios de cultura (BHI e DMM). A diferença de médias de %PDS entre os meios BHI e DMM foi de  $53,08 \pm 35,00$ . Considerando estes dados (médias independentes), 80% de poder, nível de significância de 5%, e ainda, estimando-se 20% de eventuais perdas, calculou-se a necessidade de 9 amostras por grupo de comparação.

### Confecção das amostras

Trinta e seis discos de esmalte e 36 amostras de dentina radicular (6mm de diâmetro e 1,7mm de espessura) foram obtidas a partir de dentes bovinos irrompidos

e livres de falhas. A confecção se deu através de um furadeira industrial de bancada e broca diamantada de 8mm (tipo trefina) sob refrigeração com água. Ambas as amostras foram niveladas de forma a estarem plano-paralelas com constante resfriamento com água, com lixa de granulação #80 na superfície pulpar e polimento através de granulações crescente da superfície vestibular com lixas de granulação # 220, 600, 1200 e 2000 para as amostras de esmalte, e com lixas #600, 1200 e 2000 para as amostras de dentina. Subsequentemente, todas as amostras passaram por polimento em disco de feltro. A base e as laterais dos discos foram isolados com esmalte para unhas, deixando apenas a superfície vestibular do esmalte ou da dentina radicular exposta. Por fim, as amostras foram esterilizadas com óxido de etileno (MIC Esteriliza, Porto Alegre, RS, Brasil) (THOMAZ, 2007).

### **Descrição dos meios de cultura**

Todos os meios de cultivo foram submetidos ao processo de esterilização em autoclave a 121°C, por 15 minutos (CENCI et al. 2009).

O BHI foi confeccionado seguindo as orientações do fabricante (Kasvi, Curitiba-PR, Brasil), em que foram suspendidas 37g de pó em 1 litro de água destilada.

Para a confecção do meio McBain utilizou-se o protocolo descrito por McBain et al. (2005): g/l: mucina (tipo II, suína, gástrica), 2,5; peptona bacteriológica, 2,0; triptona, 2,0; extrato de levedura, 1,0; NaCl, 0,35; KCl, 0,2; CaCl<sub>2</sub>, 0,2; cloridrato de cisteína, 0,1; hemin, 0,001; vitamina K1, 0,0002).

O DMM foi confeccionado de acordo com Wong e Sissons 2001, contendo mucina gástrica suína (2,5g/l), ureia (1,0 mmol/l), sais (em mmol/l: CaCl<sub>2</sub>, 1,0; MgCl<sub>2</sub>, 0,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5; NaCl, 10,0; KCl, 15,0; NH<sub>4</sub> Cl, 2,0), uma mistura basal de aminoácidos à base 21 aminoácidos livres, 17 vitaminas e fatores de crescimento e aminoácidos equivalentes a 'proteína / peptídeo' para modelar as proteínas na saliva, construídas para serem equivalentes a 5,0 g/l de caseína [Wong e Sissons, 2001]. As concentrações da 'proteína/ os aminoácidos equivalentes do peptídeo foram (em mmol/l): alanina 1,95, arginina 1,30, asparagina 1,73, ácido aspártico 1,52, cisteína 0,05, ácido glutâmico 5,41, glutamina 3,03, glicina 1,95, histidina 1,08, isoleucina 2,38, leucina 3,68, lisina 3,03, metionina 1,08, fenilalanina 1,73, prolina 3,68, serina 3,46, treonina 1,08, triptofano 0,43, tirosina 2,17, valina 2,38. Durante a confecção do DMM, alguns aminoácidos (asparagina, cisteína, glutamina e triptofano) são pesados e dissolvidos em 20 ml de água destilada e misturados a 10,7

ml da solução basal de aminoácidos, 1 ml da solução contendo fatores de crescimento e vitaminas, 1 ml de CaCl<sub>2</sub> e solução de ácido ascórbico. Após ajuste do pH (6.8) esta mistura é adicionada ao restante do meio já autoclavado utilizando um filtro de esterilização (0.22mm).

Para a confecção do DMM modificado (DMM1), houve uma simplificação da última etapa proposta por Wong e Sissons (2001). Ao invés da última etapa ser adicionada por filtração após esterilização do meio em autoclave, todos os produtos da composição do meio foram adicionados na etapa anterior. Após o ajuste do pH (6,8), o meio completo foi submetido ao ciclo de 15 min de autoclave a 121°C.

### **Determinação da dureza de superficial - Baseline.**

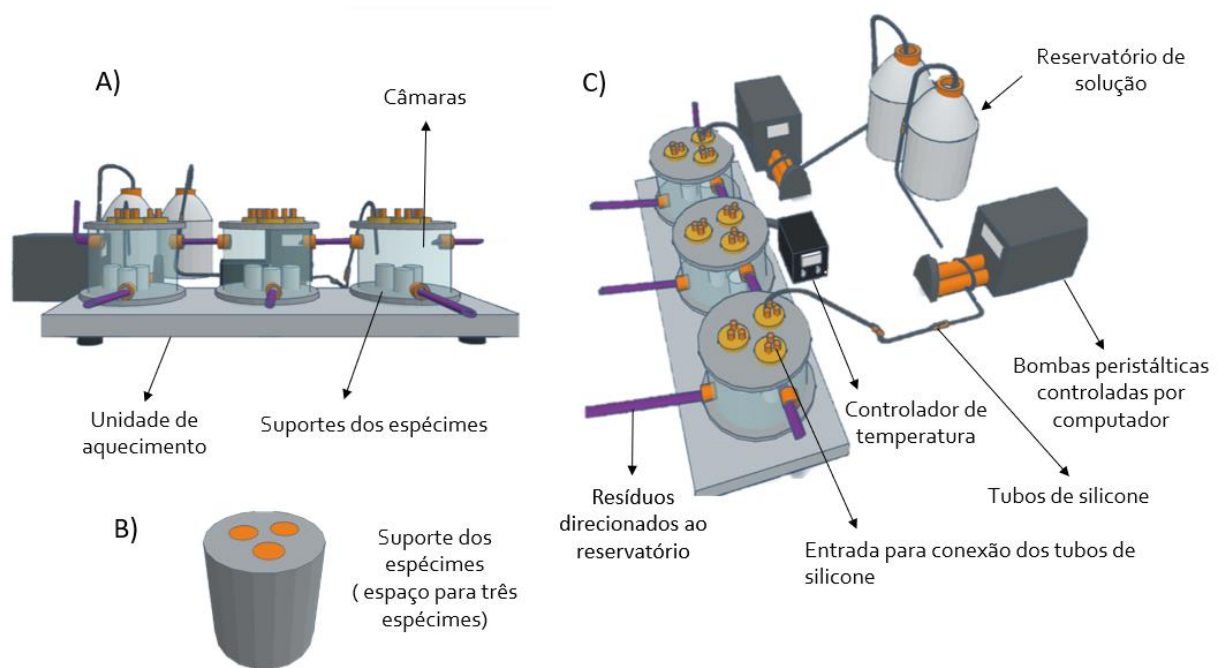
Visando a padronização das amostras de esmalte e dentina foi realizada uma avaliação das médias de dureza inicial superficial. Através de um microdurometro cada amostra foi submetida a 3 indentações espaçadas em 100 µm cada uma, realizadas no centro do bloco, com cargas de 50 gramas (g) para o esmalte e 25g para a dentina, ambas por 5 segundos. Foram selecionadas aquelas amostras com média de 51,49±3,83 para dentina e 303,68±30,63 para esmalte (Dureza Knoop kgf/mm<sup>2</sup>).

### **Descrição do modelo de biofilme de fluxo contínuo**

O modelo de boca artificial (MOCs) consiste em um sistema de 3 câmaras cilíndricas em uma base de aquecimento (37±2°C), com três entradas individuais de onde chegam tubulações ao sistema. Abaixo de cada uma das entradas localizam-se unidades de suporte para os espécimes experimentais. Em cada uma dessas unidades de suporte, permite-se que até 3 espécimes sejam acoplados. Através das tubulações e com auxílio de uma bomba peristáltica, as amostras inseridas em cada unidade de suporte foram perfundidas por meio de cultivo específico e sacarose (Figura 2). O dispositivo simulou o ambiente controlado de oxigênio através de uma tubulação com suplementação de gás de anaerobiose (10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub> e 80% N<sub>2</sub>).

As tubulações de silicone partem de reservatórios específicos (solução de sacarose e meio de cultivo) passam pelo sistema de infusão composto por duas bombas peristálticas de 10 canais (FC 100, ChaoChuing, China) e chegam as respectivas entradas. Um computador é acoplado às bombas peristálticas para

controle do sistema de fluxo (Daxta, Pelotas, RS). Os fluxos provenientes dos reservatórios chegam até as câmaras e aos suportes de amostras e são direcionados a um reservatório de resíduos localizado na parte inferior do simulador.



**Figura 2.** Simulador Multifuncional da Cavidade Oral (MOCS). A) Vista frontal do sistema mostrando as câmaras cilíndricas e suportes internos. B) Suportes de amostra em vista detalhada. C) Visão lateral/superior mostrando os inlets de entrada de líquidos (fluxo, inóculo e/ou tratamento) e bombas peristálticas controladas por um computador e conectadas aos tubos de silicone dos reservatórios e suas conexões para o reservatório de descarte. Fonte: autores.

## Coleta de saliva

Para a coleta da saliva, uma voluntária (35 anos) foi convidada a participar do estudo. A participante apresentava boa saúde geral, e tinha um fluxo salivar normal (estimulado  $>1$  ml/min e não estimulado  $>0.3$  ml/min), e não apresentava gengivite ou periodontite e não fazia uso de antimicrobianos nos últimos 3 meses. A participante foi instruída a suspender a higiene oral por 24 horas e a alimentação por 2 horas antes da coleta de saliva. Procedeu-se a coleta de 20 mL de saliva estimulada mecanicamente por parafina, durante um período de 10 minutos (Parafilm "M", American National Can TM, Chicago, Ill., EUA) em tubo falcon estéril.

## **Inoculação e crescimento de biofilmes**

Os 20 ml de saliva coletada previamente foram homogeneizados através de um agitador de vórtex (30 segundos), e 5 ml dessa saliva foram adicionados a 50 ml dos respectivos meios de cultura a serem avaliados (DMM, DMM1, BHI e Mc Bain) para formar a solução de inóculo microbiano. A mistura de saliva e dos meios de cultivo foi agitada, e 3 ml desta solução foi perfundida através do *inlet* de inoculação sobre as amostras localizadas nos suportes. O inóculo (meio + saliva) permaneceu sobre as amostras de esmalte e/ou dentina radicular por 1 hora, para a formação de película adquirida, e após esse período, o respectivo meio de cultivo foi perfundido em uma velocidade média de 0,06 ml/min. O desafio cariogênico foi simulado através de um fluxo intermitente de 6 minutos de sacarose (5%), aplicado 3 vezes ao dia, com um intervalo de 2 horas entre as aplicações, em uma velocidade média de fluxo de 0,25 ml/min (Maske et al., 2016). Os biofilmes foram formados sobre as amostras em condições de anaerobiose (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 10% H<sub>2</sub>), as quais foram fornecidas através de um fluxo médio de gás aplicado a 0,006 N/mm<sup>2</sup> durante 1 minuto, 2 vezes ao dia durante o período experimental de 4 dias. Em decorrência da configuração do simulador que permite que 27 espécimes sejam testados por rodada experimental, foram realizadas 3 rodadas experimentais para que todos os grupos / substratos fossem expostos ao crescimento do biofilme. Assim, os substratos e os meios de cultura foram randomizados de acordo com os suportes e câmaras cilíndricas. Foram realizadas 3 rodadas, sendo a primeira e segunda com 27 espécimes e a terceira com 18 espécimes variando entre suportes com dentina ou esmalte.

## **Análise microbiana: formação do biofilme**

Após o crescimento do biofilme sobre os discos de esmalte e em dentina radicular por 4 dias, os suportes contendo as amostras foram removidos de cada câmara de crescimento. Parte do biofilme de cada disco de esmalte e dentina radicular foi coletado através de alça de inoculação estéril e adicionado em um microtubo pré-pesado. O peso úmido de cada biofilme coletado foi determinado (mg) e 1 ml de solução salina foi adicionado. A solução contendo biofilme foi processada em sonicador (30 segundos, 20W) e sequencialmente diluída em solução salina (concentrações de 1<sup>0</sup>-10<sup>-6</sup>) e imediatamente inoculadas em duplicata (20 µl) nos seguintes meios de cultura: Ágar mitis salivarius com 0,2 unidades de bacitracina/mL



e telúrio (MSB), para quantificação de estreptococos do grupo mutans (GOLD; JORDAN; VAN HOUTE, 1973); Ágar Rogosa SL para lactobacilos; Ágar Sabouraud dextrose para quantificação das leveduras totais; e BHI com pH ajustado a 4,7 para quantificação de microorganismos totais acidúricos, e BHI para microorganismos totais. Com exceção das placas de Ágar Sabouraud que foram incubadas a 37°C por 48 horas, as demais placas foram incubadas em condição de anaerobiose (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 10% H<sub>2</sub>), a 37°C por 96 horas. As unidades formadoras de colônia foram contadas e os resultados expressos em UFC/mg de biofilme (peso úmido).

### **Determinação da Perda de Dureza Superficial (%PDS)**

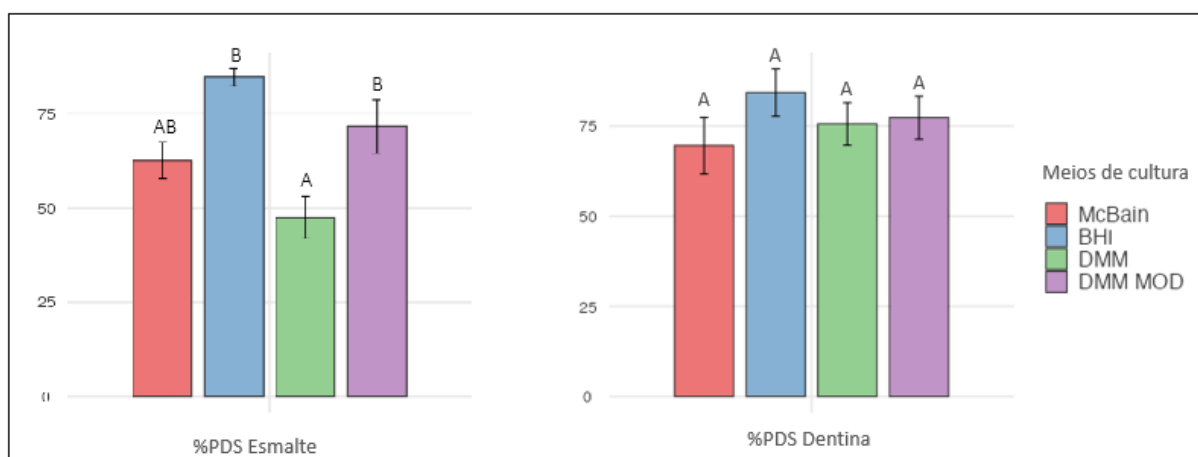
Após a coleta do biofilme, os discos de esmalte e dentina foram limpos com água destilada e novamente levados para o microdurometro e três indentações (SH2) espaçadas em 100 µm à esquerda/direita das indentações iniciais foram realizadas utilizando os mesmos parâmetros descritos anteriormente. A mudança percentual de dureza superficial (%PDS) foi calculada como:  $\%PDS = 100 (SH2 - SH1) / SH1$  (Cury et al., 2000), onde SH1 refere-se às leituras da superfície antes do crescimento do biofilme e SH2 às leituras após o experimento.

### **Análise estatística**

De posse dos resultados experimentais dos dados microbiológicos e de porcentagem de perda de superfície (%PDS), o método estatístico para a análise dos dados foi escolhido com base na aderência de um modelo de distribuição normal e igualdade de variância. Quando as variáveis não preencheram essas suposições, os dados de estreptococos do grupo mutans, microorganismos totais, acidúricos, lactobacilos e fungos totais foram transformados em rank para cumprir tais pressupostos (Box et al., 1978). Em seguida, os dados de %PDS e contagem de microorganismos foram analisados por ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey, utilizando o programa JAMOVI® (version 2.3.24).

## RESULTADOS

Os valores de %PDS de acordo com os meios de cultura testados nos diferentes substratos estão apresentados na Figura 3. Ambos os meios de cultura testados, definidos e indefinidos quimicamente, permitiram o desenvolvimento de lesões de cárie em esmalte e dentina. A dentina apresentou 75% de perda de dureza superficial enquanto o esmalte teve uma variação de aproximadamente 50-75%. Na dentina, observou-se que não houve diferença significativa para os valores de %PDS considerando o uso dos diferentes meios de cultura ( $p > 0.05$ ). Já para esmalte, o meio DMM apresentou o menor valor de perda de dureza superficial, sendo estatisticamente diferente dos meios DMM modificado e do BHI ( $p < 0.05$ ). O meio McBain apresentou valores de perda de dureza superficial intermediária, sendo semelhante aos meios DMM, DMM modificado e ao BHI ( $p > 0.05$ ).



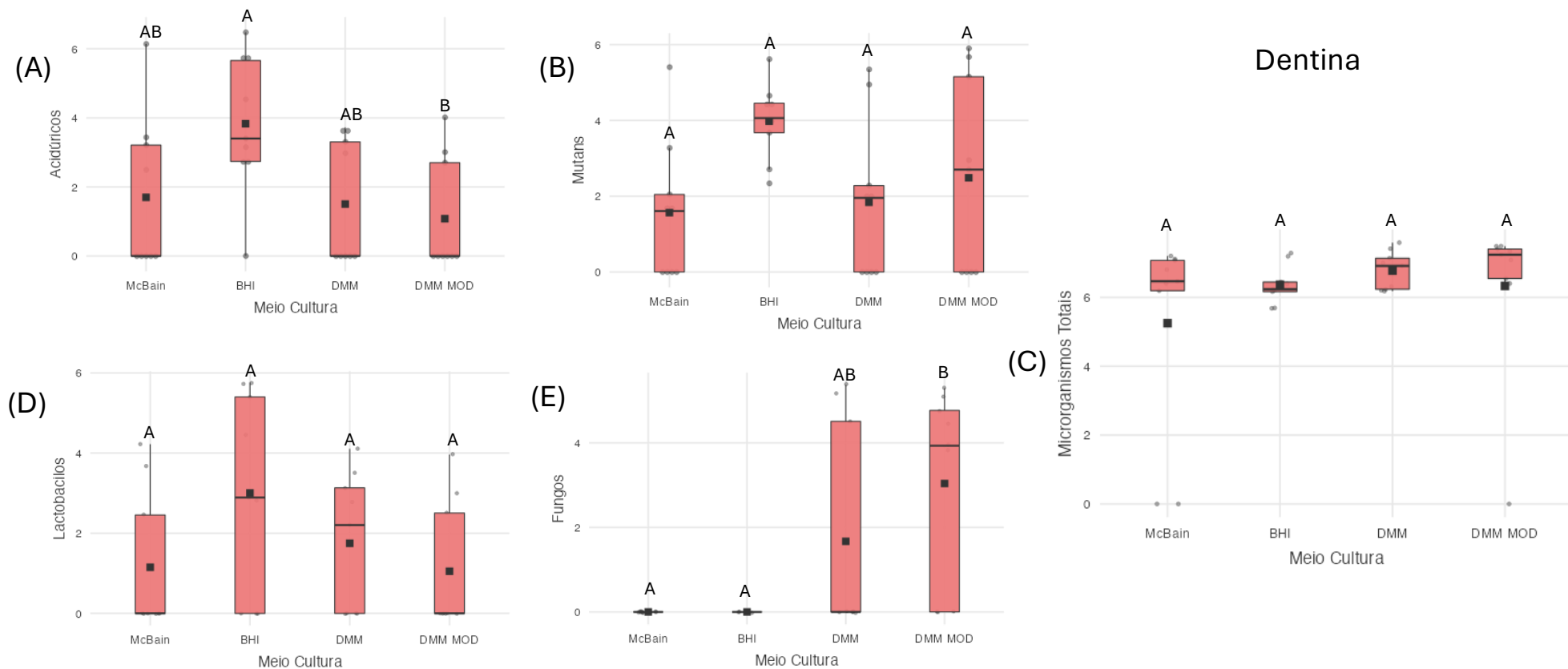
**Figura 3.** Dados de %PDS de acordo com os meios de cultura testados em esmalte e dentina radicular. Em cada substrato, letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos experimentais (Anova seguido de Tukey,  $p < 0.05$ )

Os dados microbiológicos coletados a partir dos biofilmes formados em dentina e esmalte estão mostrados nas Figuras 4 e 5. De forma geral, observou-se que todos os meios de cultura avaliados permitiram a viabilidade dos microrganismos e permitiram a seleção de microrganismos cariogênicos, com pequenas diferenças entre os meios quimicamente definidos e indefinidos em relação a contagem de fungos e acidúricos totais.

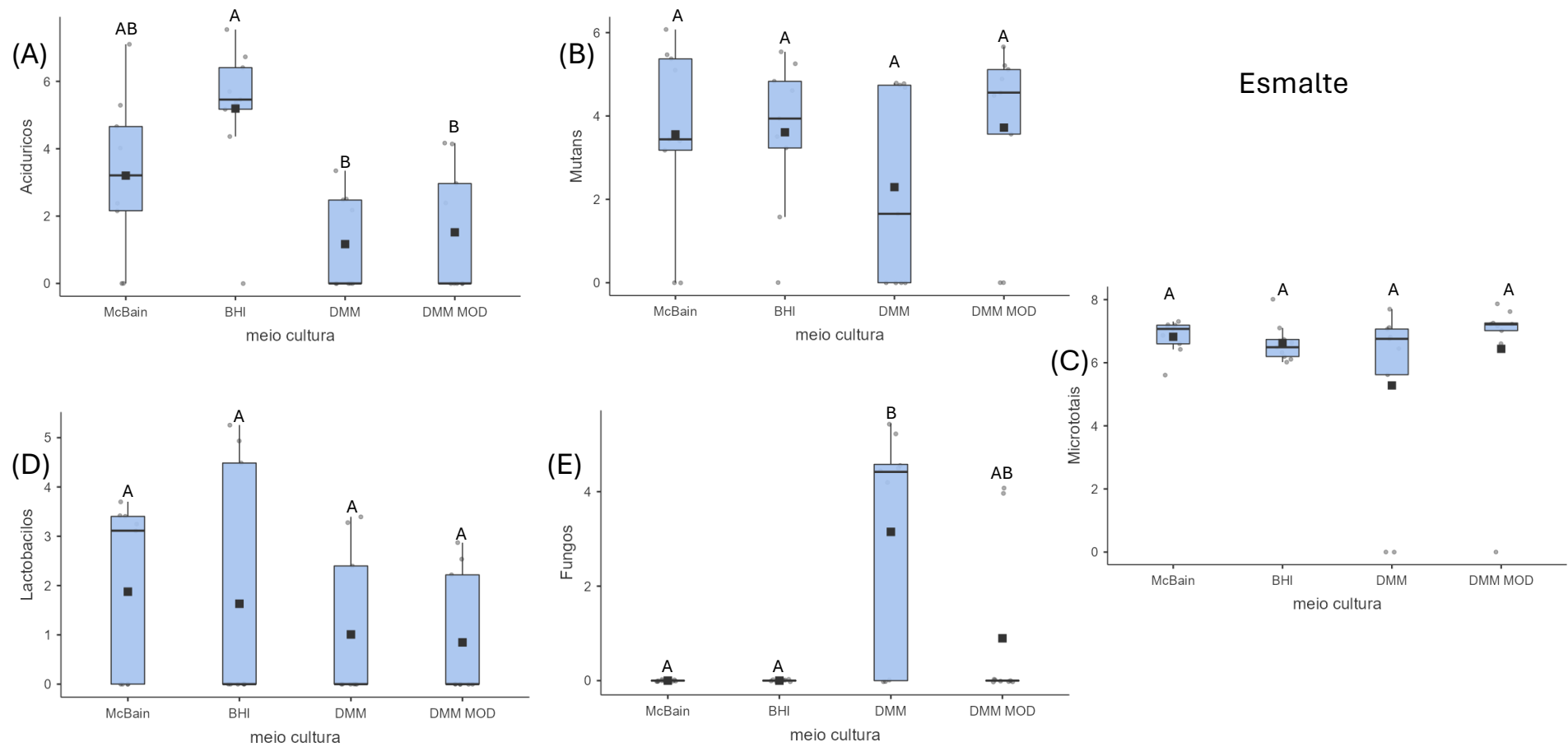
A Figura 4 apresenta os diferentes grupos de microrganismos avaliados de acordo com o biofilme formado sobre as amostras de dentina pelos diferentes meios de cultivo. DMM, DMM modificado e McBain não diferiram em relação ao crescimento

de acidúricos totais ( $p > 0,05$ ). BHI apresentou significativa maior contagem de acidúricos totais quando comparado ao DMMmod ( $p < 0,05$ ). Para os estreptococos do grupo mutans, microrganismos totais e lactobacilos não foram encontradas diferenças significativas em relação aos diferentes meios testados ( $p > 0,05$ ). Maiores contagens de fungos totais foram encontradas na cultura a partir dos meios DMM e na sua modificação. O cultivo com DMMmod permitiu uma maior contagem desses microrganismos em relação aos meios McBain e BHI.

Os dados microbiológicos dos biofilmes formados sobre as amostras de esmalte estão descritos na Figura 5. Assim como nos dados de dentina, para os dados microbiológicos de esmalte não foram encontradas diferenças significativas para as contagens de estreptococos do grupo mutans, microrganismos totais e lactobacilos em relação aos diferentes meios testados ( $p > 0,05$ ). DMM, DMM mod e McBain não diferiram em relação ao crescimento de acidúricos totais ( $p > 0,05$ ). BHI apresentou significativa maior contagem de acidúricos totais quando comparado ao DMM e a sua modificação ( $p < 0,05$ ). DMM e DMMmod sua modificação permitiram maior contagem de fungos totais, sem diferença significativa entre eles ( $p > 0,05$ ). No entanto, o DMMmod apresentou maior contagem desses microrganismos em relação aos meios McBain e BHI ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.** Dados de crescimento microbiano em dentina de microrganismos acidúricos (A), estreptococos do grupo mutans (B), microrganismos totais (C), lactobacilos totais (D) e fungos totais (E). Em cada substrato, letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos experimentais (Anova seguido de Tukey,  $p < 0.05$ )



**Figura 5.** Dados de crescimento microbiano em esmalte de microorganismos acidúricos (A), estreptococos do grupo mutans (B), microrganismos totais (C), lactobacilos totais (D) e fungos totais (E). Em cada substrato, letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos experimentais (Anova seguido de Tukey,  $p < 0.05$ )

## **Discussão**

Este estudo demonstrou que as respostas microbiológicas e minerais de biofilmes de microcosmos cultivados a partir de diferentes meios de cultivo em um modelo de cultura contínua foram diferentes. Ambos os meios de cultivo, quimicamente definidos ou indefinidos, permitiram o desenvolvimento de lesões de cárie em dentina e esmalte, mas com variações na intensidade de perda mineral para lesões de esmalte. Além disso, ambos permitiram a seleção de microorganismos cariogênicos (estreptococos do grupo mutans, lactobacilos e acidúricos totais), no entanto, os meios quimicamente definidos (DMM e a sua variação) permitiram uma melhor resposta ao crescimento dos fungos dentro do biofilme formado. Dessa forma, os meios de cultivo quimicamente definidos e indefinidos permitiram crescimento de biofilmes de microcosmos com respostas diferentes, sendo a hipótese deste estudo rejeitada.

Dois substratos para o crescimento dos biofilmes de microcosmos foram avaliados. Tanto a dentina quanto o esmalte demonstraram alterações minerais ocasionadas pelo efeito metabólico do biofilme cariogênico crescido em suas superfícies. A dentina apresentou aproximadamente 75% de perda de dureza superficial enquanto o esmalte teve variação de aproximadamente 50-75%, dependendo do meio de cultivo utilizado. Esse padrão de diferença entre os substratos pode ser explicado pela diferença de composição dos substratos. A dentina, apresenta uma quantidade significativa de matriz orgânica e uma menor quantidade de minerais em sua composição (Maltz et al., 2016). Isto acaba por facilitar o processo de desmineralização. Por outro lado, o esmalte, que é composto principalmente por minerais, tende a apresentar um processo de desmineralização mais dificultado, levando a presença de uma maior quantidade de ácido para chegar ao seu ponto de subsaturação (pH 5,5). Essa característica do esmalte também pode estar relacionada as variações de %PDS que ocorreram em relação aos diferentes meios de cultivo utilizados para o crescimento dos biofilmes neste substrato. Os dados microbiológicos demonstram que os meios quimicamente indefinidos (McBain e BHI), embora não diferentes significativamente dos definidos quimicamente, apresentaram um maior crescimento de acidúricos e lactobacilos totais, o que estaria relacionado a uma maior produção de ácido e a uma conseqüentemente maior desmineralização frente a estes meios. Achados semelhantes também são

encontrados no estudo de Peralta et al. (2015) quando se compara a resposta de crescimento de lactobacilos e acidúricos totais frente o uso de BHI (quimicamente indefinido) vs. DMM (quimicamente definido). É importante destacar, que neste trabalho, o desfecho primário considerado foi a %PDS e o tamanho amostral foi calculado com base nesse desfecho. Os dados microbiológicos foram usados como desfecho secundário, e houve uma capacidade limitada de detectar um efeito significativo entre os grupos de meio cultivo (poder calculado em aproximadamente 23%), portanto, os dados microbiológicos devem ser interpretados com precaução. Mais estudos, considerando, os desfechos microbiológicos com desfecho primário precisam ser realizados para que conclusões assertivas possam ser evidenciadas nesse desfecho.

Ambos os meios quimicamente indefinidos (BHI e McBain) apresentam sua composição baseada em triptona, peptona e extrato de levedura, as quais possuem porções significativas de aminoácidos de cadeias curtas ou longas (Maske et al.2017; McBain et al. 2005). Além disso, o BHI apresenta em sua composição, uma fonte de dextrose (glicose 20%,). Essa composição genérica e em associação a uma fonte de glicose, pode permitir uma maior nutrição de certos microrganismos cariogênicos e conseqüentemente uma maior perda mineral no substrato. Ao mesmo tempo que este tipo de meio permite o crescimento de diversos microrganismos, ele também não parece ser capaz de selecionar ou modular o crescimento de tipos específicos de microrganismos, como por exemplo, o crescimento dos fungos. Meios quimicamente definidos (DMM e a sua variação) apresentam em sua composição quantidades definidas de aminoácidos livres, eletrólitos, carboidratos de baixo peso molecular, os quais parecem permitir o crescimento de microrganismos com necessidades nutricionais específicas e diferenciadas (Wong et al. 2001). A perda mineral ocorrida em esmalte, a partir de biofilmes crescidos através de DMM e sua modificação, demonstram essa modulação na seleção dos microrganismos e num padrão menos agressivo da desmineralização dentária em esmalte. Neste estudo, a perda mineral em esmalte foi de aproximadamente 50% frente ao DMM em associação a três aplicações diárias de 5% sacarose (0,25m/ min por 3 min). Este achado também é encontrado no estudo de Maske et al. (2016) no qual utilizou-se o mesmo protocolo de aplicação de sacarose e com mesmo fluxo de

DMM. Tais achados demonstram o comportamento similar deste meio em modelos de cultura contínua de microcosmos.

Neste trabalho optou-se pela realização de uma variação na forma de confeccionar o DMM. A confecção do meio em duas etapas demanda maior trabalho laboratorial e está passível de gerar erros e contaminação no meio já estéril. Assim, facilitar a confecção deste meio seria reduzir tempo e custos laboratoriais em decorrência de erros nesta etapa. O que foi visto é que ambos os meios DMM e sua modificação permitem o desenvolvimento de lesões de cárie em esmalte e dentina, e são capazes de selecionar microrganismos cariogênicos incluindo fungos. No entanto, percebeu-se que a esta modificação desencadeou uma maior perda mineral, em esmalte, quando comparado ao DMM tradicional. Conforme a confecção original deste meio, ocorre a adição de alguns aminoácidos e vitaminas no meio autoclavado através de uma membrana de filtração. Na modificação deste preparo, todos os componentes foram adicionados juntos e autoclavados a fim de facilitar o modo de preparo. Suspeita-se que o processo de autoclavagem possa ter causado a degradação de alguns componentes adicionados somente na segunda etapa do preparo. No entanto, estudos mais aprofundados considerando cada um dos componentes, antes/após o processo de autoclavagem, ainda precisam ser realizados. A degradação destes componentes poderia explicar alterações nas taxas de desmineralização alcançadas pelo DMM modificado.

O meio de cultivo McBain tem sido frequentemente usado em modelos de biofilme de microcosmos para estudos da cárie dentária de cultura estática (Vertuan et al. 2021, Braga et al. 2023, Levy et al. 2022). Um estudo comparou a sua utilização em cultura semi-dinâmica demonstrando que assim como em culturas estáticas, ele foi capaz de desenvolver lesões de cárie em dentina e promover o crescimento de um biofilme cariogênico (Santos et al. 2019). No entanto, a desmineralização promovida por este meio de cultivo foi mais branda do que quando em regime estático. Segundo os autores, isto foi decorrente das características do modelo que permite a remoção de metabólitos pelo uso de um fluxo-intermitente. Na presente dissertação, o meio de cultivo McBain permitiu o desenvolvimento de desmineralização em ambos os substratos e modulou a seleção de grupos de microrganismos cariogênicos. No entanto, exibiu uma taxa de desmineralização em esmalte intermediária quando comparado aos meios



quimicamente definidos (DMM e DMM mod) e não permitiu um melhor crescimento dos fungos. Essa característica pode ser atribuída à sua composição simples, composta por mucina (tipo II, suína, gástrica), peptona bacteriológica, triptona, extrato de levedura, NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, cloridrato de cisteína, hemina e vitamina K1 (McBain et al. 2005). Essa composição mais simplificada parece ter proporcionado um ambiente rico em aminoácidos e vitaminas, o que, por sua vez, limitaria o desenvolvimento de certos microrganismos e a formação de um biofilme complexo (McBain et al. 2003).

Os achados encontrados neste trabalho apresentam como limitação a ausência de uma metodologia que permita a identificação molecular dos diferentes microrganismos presentes no biofilme formado. A identificação de outros microrganismos poderia explicar melhor os achados encontrados neste trabalho. Além disso, a predição metabólica (funcional) dos biofilmes provenientes de estudos moleculares também poderia auxiliar no melhor entendimento dos achados encontrados. Assim, trabalhos futuros considerando metodologias moleculares ainda precisam ser realizados a fim de contribuir com este campo de pesquisa.

## **CONCLUSÃO**

Diante do exposto, conclui-se que ambos os meios de cultivos quimicamente definidos ou indefinidos permitem o desenvolvimento de lesões de cárie em dentina e esmalte, mas com variações nas nuances de perda mineral em esmalte. Além disso, ambos meios de cultivo são capazes de selecionar microrganismos cariogênicos, no entanto, os meios quimicamente definidos apresentam uma melhor capacidade de estimular o crescimento de fungos neste modelo de cultura contínua.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – (FAPERGS; ARD 10/2020) – Brasil-RS pelo apoio financeiro para a realização deste estudo. Os autores agradecem a laboratorista Luisa Mercado pelo auxílio durante a execução dos experimentos.

## **CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES**

Delineamento do estudo: GAM, TTM, RAA.

Execução laboratorial: GAM, BK, BFD, TTM.

Análise dos dados: GAM, TTM.

Rascunho do artigo: GAM, TMM.

Revisão crítica do artigo: GAM, TTM, RAA.

## **CONFLITO DE INTERESSES**

Os autores declaram conflito de interesses em relação a utilização do Simulador Multifuncional de Cavidade oral (MOCS) para os achados desta pesquisa. O Simulador vem sendo desenvolvido como um modelo de biofilme de microcosmos de cultura contínua por TTM, RAA, GAM, BK e BDF em associação a empresa ODEME Research (Luzerna-SC, Brasil). Todos os autores fazem parte da Iniciativa MOCS (<https://www.ufrgs.br/labim/mocs/>).

## REFERÊNCIAS

- Braga AS, Rafaela Ricci K, Magalhães AC. Effect of anaerobic or/and microaerophilic atmosphere on microcosm biofilm formation and tooth demineralization. *J Appl Oral Sci.* 2023 Jun 1;31:e20220445. doi: 10.1590/1678-7757-2022-0445. PMID: 37283356; PMCID: PMC10317001.
- Faul, F., Erdfelder, E., Buchner, A., & Lang, A.-G. (2009). Análises de poder estatístico usando G\*Power 3.1: Testes para análises de correlação e regressão. *Métodos de Pesquisa Comportamental*, 41, 1149-1160.
- Gold OG, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 1973 Nov;18(11):1357-64. doi: 10.1016/0003-9969(73)90109-x. PMID: 4518755.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Biofilmes bacterianos: do ambiente natural às doenças infecciosas. *Nat Rev Microbiol.* Fevereiro de 2004;2(2):95–108.
- Levy FM, Braga AS, Pelá VT, Lavender S, Zhang D, Pilch S, Malheiros Z, Stewart B, Magalhães AC, Buzalaf MAR. Characterization of white spot lesions formed on human enamel under microcosm biofilm for different experimental periods. *J Appl Oral Sci.* 2022 Apr 1;30:e20210560. doi: 10.1590/1678-7757-2021-0560. PMID: 35384988; PMCID: PMC8983036.
- M.S. Cenci, T. Pereira-Cenci, J.A. Cury, J.M. ten Cate; Relationship between Gap Size and Dentine Secondary Caries Formation Assessed in a Microcosm Biofilm Model. *Caries Res* 1 April 2009; 43 (2): 97–102. <https://doi.org/10.1159/000209341>
- Machiulskiene, V., Campus, G., Carvalho, J. C., Dige, I., Ekstrand, K. R., Jablonski-Momeni, A., ... Nyvad, B. (2019). *Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR.* *Caries Research*, 1–8. doi:10.1159/000503309.
- MALTZ, Marisa; TENUTA, Livia Maria Andaló; CURY, Jaime Aparecido. *Cariologia: conceitos básicos, diagnóstico e tratamento não restaurador.* São Paulo, SP: Artes Médicas, 2016. 144 p., il. (ABENO: Odontologia essencial). ISBN 9788536702629 (broch.). Marsh, P.D., Martin, M.V., 1999. *Oral Microbiology.* Chapman & Hall, London.
- Maske TT, Arthur RA, Patzlaff R, Initiative MOCS, Hashizume LN, Maltz M, Cenci MS. Presenting a new multifunctional oral cavity simulator: “The MOCS” Submitted Brazilian Oral Research. 2024
- Maske TT, Brauner KV, Nakanishi L, Arthur RA, van de Sande FH, Cenci MS. An in vitro dynamic microcosm biofilm model for caries lesion development and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling.* 2016;32(3):339-48. doi: 10.1080/08927014.2015.1130824. PMID: 26905384.

- Maske, T. T., van de Sande, F. H., Arthur, R. A., Huysmans, M. C. D. N. J. M., & Cenci, M. S. (2017). *In vitro biofilm models to study dental caries: a systematic review*. *Biofouling*, 33(8), 661–675. doi:10.1080/08927014.2017.1354248
- Mathur VP, Dhillon JK. Dental Caries: A Disease Which Needs Attention. *Indian J Pediatr*. 2018 Mar;85(3):202-206. doi: 10.1007/s12098-017-2381-6. Epub 2017 Jun 23. PMID: 28643162
- McBain AJ. Chapter 4: In vitro biofilm models: an overview. *Adv Appl Microbiol*. 2009; 69:99-132. doi: 10.1016/S0065-2164(09)69004-3. PMID: 19729092.
- McBain, A. J., Sissons, C., Ledger, R. G., Sreenivasan, P. K., De Vizio, W., and Gilbert, P. (2005). Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. *J. Appl. Microbiol*. 98, 624–634.
- Peralta, SS. L., Leles, S. B., Dutra, A. L., Cocco, A. R., Radaelli, M. T. B., & Lund, R. G. (2015). Comparison of growth of viable oral bacteria and *Streptococcus mutans* in biofilm models using three different culture media. *African Journal of Microbiology Research*, 9(6), 388-393.
- Pratten, J., Barnett, P., and Wilson, M. (1998). Composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms of oral bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*. 64, 3515–3519.
- Santos DMSD, Pires JG, Braga AS, Salomão PMA, Magalhães AC. Comparison between static and semi-dynamic models for microcosm biofilm formation on dentin. *J Appl Oral Sci*. 2019 Jan 7;27:e20180163. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0163. PMID: 30624468; PMCID: PMC6322641.
- Signori C, Maske TT, Digmayer Romero VH, Cenci MS. Influence of biofilm removal from the tooth-restoration interface on the progression of secondary caries lesions: a preliminary *in vitro* model study. *Biofouling*. 2020 Nov;36(10):1272-1283. doi: 10.1080/08927014.2020.1870219. Epub 2021 Jan 5. PMID: 33401970..
- T.T. Maske, K.V. Brauner, L. Nakanishi, R.A. Arthur, F.H. van de Sande & M.S. Cenci (2016) An in vitro dynamic microcosm biofilm model for caries lesion development and antimicrobial dose-response studies, *Biofouling*, 32:3, 339-348, DOI:10.1080/08927014.2015.1130824
- Tavares, J.T.Q; Silva, C.L; Carvalho, L.A; Silva, M.A.; Santos, C.M.G. Estabilidade do ácido ascórbico em suco de laranja submetido a diferentes tratamentos. *Magistra*, Cruz das Almas-BA, v.12,n. ½, 2000.
- The jamovi project (2022). *jamovi*. (Version 2.3) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

- Thomas RZ, Ruben JL, ten Bosch JJ, Huysmans MC. (2007b). Efeito da esterilização com óxido de etileno na desmineralização do esmalte e da dentina in vitro . J Dent 35 :547-551.
- Vertuan M, Machado PF, de Souza BM, Braga AS, Magalhães AC. Effect of TiF<sub>4</sub>/NaF and chitosan solutions on the development of enamel caries under a microcosm biofilm model. J Dent. 2021 Aug;111:103732. doi: 10.1016/j.jdent.2021.103732. Epub 2021 Jun 24. PMID: 34174348.
- Viana CS, Maske TT, Signori C, VAN DE Sande FH, Oliveira EF, Cenci MS. Influence of caries activity and number of saliva donors: mineral and microbiological responses in a microcosm biofilm model. J Appl Oral Sci. 2021 Sep 3;29:e20200778. doi: 10.1590/1678-7757-2020-0778. PMID: 34495103; PMCID: PMC8425900
- Wong L, Sissons C. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. Arch Oral Biol. 2001 Jun;46(6):477-86. doi: 10.1016/s0003-9969(01)00016-4. Erratum in: Arch Oral Biol 2001 Aug;46(8):779. Sissions CH [corrected to Sissons C]. PMID: 11311195.

## Lista de legendas

**Figura 1.** Delineamento experimental de acordo com os grupos de meios de cultura a serem avaliados (n=9).

**Figura 2.** Simulador Multifuncional da Cavidade Oral (MOCS). A) Vista frontal do sistema mostrando as câmaras cilíndricas e suportes internos. B) Suportes de amostra em vista detalhada. C) Visão lateral/superior mostrando os inlets de entrada de líquidos (fluxo, inóculo e/ou tratamento) e bombas peristálticas controladas por um computador e conectadas aos tubos de silicone dos reservatórios e suas conexões para o reservatório de descarte.

**Figura 3.** Dados de %PDS de acordo com os meios de cultura testados em esmalte e dentina radicular. Em cada substrato, letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos experimentais (Anova seguido de Tukey,  $p < 0.05$ )

**Figura 4.** Dados de crescimento microbiano em dentina de acidúricos totais (A), estreptococos do grupo mutans (B), microrganismos totais (C), lactobacilos totais (D) e fungos totais (E). Em cada substrato, letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos experimentais (Anova seguido de Tukey,  $p < 0.05$ )

**Figura 5.** Dados de crescimento microbiano em esmalte de acidúricos totais (A), estreptococos do grupo mutans (B), microrganismos totais (C), lactobacilos totais (D) e fungos totais (E). Em cada substrato, letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos experimentais (Anova seguido de Tukey,  $p < 0.05$ )

## **5. Considerações finais**

A partir dos achados dessa dissertação, pode-se concluir que tanto os meios quimicamente definidos (DMM e sua modificação) quanto quimicamente indefinidos (BHI e McBain) podem ser utilizados para simulação de lesões de cárie a partir de microcosmos e em um modelo de cultura contínua. No entanto, é interessante pensar que a escolha por um ou outro deveria estar relacionado ao desfecho que se quer estudar. Se a pergunta de pesquisa for direcionada a resposta mineral, a utilização de meios quimicamente indefinidos poderia ser adequada. No entanto, se a pergunta for relacionada ao desfecho microbiológico e o foco principal as interações microbianas, seria interessante a utilização de um meio de cultivo quimicamente indefinido.

A preparação de meios de cultivo do tipo BHI e McBain é facilitada quando comparada a preparação dos meios quimicamente definidos. Assim, se o desfecho da pergunta de pesquisa for mineral e as nuances de desmineralização, estes meios de cultivo por serem mais fáceis e mais baratos poderiam ser indicados como escolha para o modelo de cultura contínua. Por outro lado, se o desfecho for microbiológico, meios quimicamente definidos, embora mais trabalhosos na sua preparação e mais caros devido aos diversos componentes que possuem, deveriam ser preferidos para este modelo de biofilme de microcosmos.

## Referências

- Arthur, RA; Negrini, TC; Montagner, F. Microbiologia bucal: microbioma e sua relação com saúde e doença. 1. ed. - Barueri [SP]: Manole, 2022, Cap 4.
- Braga AS, Rafaela Ricci K, Magalhães AC. Effect of anaerobic or/and microaerophilic atmosphere on microcosm biofilm formation and tooth demineralization. *J Appl Oral Sci.* 2023 Jun 1;31:e20220445. doi: 10.1590/1678-7757-2022-0445. PMID: 37283356; PMCID: PMC10317001.
- Faul, F., Erdfelder, E., Buchner, A., & Lang, A.-G. (2009). Análises de poder estatístico usando G\*Power 3.1: Testes para análises de correlação e regressão. *Métodos de Pesquisa Comportamental*, 41, 1149-1160.
- Gold OG, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 1973 Nov;18(11):1357-64. doi: 10.1016/0003-9969(73)90109-x. PMID: 4518755.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Biofilmes bacterianos: do ambiente natural às doenças infecciosas. *Nat Rev Microbiol.* Fevereiro de 2004;2(2):95–108.
- Levy FM, Braga AS, Pelá VT, Lavender S, Zhang D, Pilch S, Malheiros Z, Stewart B, Magalhães AC, Buzalaf MAR. Characterization of white spot lesions formed on human enamel under microcosm biofilm for different experimental periods. *J Appl Oral Sci.* 2022 Apr 1;30:e20210560. doi: 10.1590/1678-7757-2021-0560. PMID: 35384988; PMCID: PMC8983036.
- M.S. Cenci, T. Pereira-Cenci, J.A. Cury, J.M. ten Cate; Relationship between Gap Size and Dentine Secondary Caries Formation Assessed in a Microcosm Biofilm Model. *Caries Res* 1 April 2009; 43 (2): 97–102. <https://doi.org/10.1159/000209341>
- Machiulskiene, V., Campus, G., Carvalho, J. C., Dige, I., Ekstrand, K. R., Jablonski-Momeni, A., ... Nyvad, B. (2019). *Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. Caries Research*, 1–8. doi:10.1159/000503309.
- MALTZ, Marisa; TENUTA, Livia Maria Andaló; CURY, Jaime Aparecido. *Cariologia: conceitos básicos, diagnóstico e tratamento não restaurador*. São Paulo, SP: Artes Médicas, 2016. 144 p., il. (ABENO: Odontologia essencial). ISBN 9788536702629 (broch.). Marsh, P.D., Martin, M.V., 1999. *Oral Microbiology*. Chapman & Hall, London.
- Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology (Reading)*. 2003 Feb;149(Pt 2):279-294. doi: 10.1099/mic.0.26082-0. PMID: 12624191.



- Marsh PD. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am.* 2010 Jul;54(3):441-54. doi: 10.1016/j.cden.2010.03.002. PMID: 20630188.
- Maske TT, Arthur RA, Patzlaff R, Initiative MOCS, Hashizume LN, Maltz M, Cenci MS. Presenting a new multifunctional oral cavity simulator: "The MOCS" Submitted Brazilian Oral Research. 2024
- Maske TT, Brauner KV, Nakanishi L, Arthur RA, van de Sande FH, Cenci MS. An in vitro dynamic microcosm biofilm model for caries lesion development and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling.* 2016;32(3):339-48. doi: 10.1080/08927014.2015.1130824. PMID: 26905384.
- Maske, T. T., van de Sande, F. H., Arthur, R. A., Huysmans, M. C. D. N. J. M., & Cenci, M. S. (2017). *In vitro biofilm models to study dental caries: a systematic review.* *Biofouling*, 33(8), 661–675. doi:10.1080/08927014.2017.1354248
- Mathur VP, Dhillon JK. Dental Caries: A Disease Which Needs Attention. *Indian J Pediatr.* 2018 Mar;85(3):202-206. doi: 10.1007/s12098-017-2381-6. Epub 2017 Jun 23. PMID: 28643162
- McBain AJ. Chapter 4: In vitro biofilm models: an overview. *Adv Appl Microbiol.* 2009; 69:99-132. doi: 10.1016/S0065-2164(09)69004-3. PMID: 19729092.
- McBain, A. J., Sissons, C., Ledger, R. G., Sreenivasan, P. K., De Vizio, W., and Gilbert, P. (2005). Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. *J. Appl. Microbiol.* 98, 624–634.
- Peralta, SS. L., Leles, S. B., Dutra, A. L., Cocco, A. R., Radaelli, M. T. B., & Lund, R. G. (2015). Comparison of growth of viable oral bacteria and *Streptococcus mutans* in biofilm models using three different culture media. *African Journal of Microbiology Research*, 9(6), 388-393.
- Pratten, J., Barnett, P., and Wilson, M. (1998). Composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms of oral bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3515–3519.
- Pratten, J., Wills, K., Barnett, P., and Wilson, M. (1998). In vitro studies of the effect of antiseptic-containing mouthwashes on the formation and viability of *Streptococcus sanguis* biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 84, 1149–1155.
- Santos DMSD, Pires JG, Braga AS, Salomão PMA, Magalhães AC. Comparison between static and semi-dynamic models for microcosm biofilm formation on dentin. *J Appl Oral Sci.* 2019 Jan 7;27:e20180163. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0163. PMID: 30624468; PMCID: PMC6322641.
- Signori C, Maske TT, Digmayer Romero VH, Cenci MS. Influence of biofilm removal from the tooth-restoration interface on the progression of secondary caries lesions: a preliminary *in vitro* model study. *Biofouling.*

2020 Nov;36(10):1272-1283. doi: 10.1080/08927014.2020.1870219. Epub 2021 Jan 5. PMID: 33401970..

T.T. Maske, K.V. Brauner, L. Nakanishi, R.A. Arthur, F.H. van de Sande & M.S. Cenci (2016) An in vitro dynamic microcosm biofilm model for caries lesion development and antimicrobial dose-response studies, *Biofouling*, 32:3, 339-348, DOI:10.1080/08927014.2015.1130824

Tang G, Yip HK, Cutress TW, Samaranayake LP. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. *J Dent*. 2003 Mar;31(3):161-71. doi: 10.1016/s0300-5712(03)00009-5. PMID: 12726700.

Tavares, J.T.Q; Silva, C.L; Carvalho, L.A; Silva, M.A.; Santos, C.M.G. Estabilidade do ácido ascórbico em suco de laranja submetido a diferentes tratamentos. *Magistra*, Cruz das Almas-BA, v.12,n. ½, 2000.

The jamovi project (2022). *jamovi*. (Version 2.3) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

Thomas RZ, Ruben JL, ten Bosch JJ, Huysmans MC. (2007b). Efeito da esterilização com óxido de etileno na desmineralização do esmalte e da dentina in vitro . *J Dent* 35 :547-551.

Vertuan M, Machado PF, de Souza BM, Braga AS, Magalhães AC. Effect of TiF<sub>4</sub>/NaF and chitosan solutions on the development of enamel caries under a microcosm biofilm model. *J Dent*. 2021 Aug;111:103732. doi: 10.1016/j.jdent.2021.103732. Epub 2021 Jun 24. PMID: 34174348.

Viana CS, Maske TT, Signori C, VAN DE Sande FH, Oliveira EF, Cenci MS. Influence of caries activity and number of saliva donors: mineral and microbiological responses in a microcosm biofilm model. *J Appl Oral Sci*. 2021 Sep 3;29:e20200778. doi: 10.1590/1678-7757-2020-0778. PMID: 34495103; PMCID: PMC8425900

Wilson, M. (1999). Uso de fermentador de filme de profundidade constante em estudos de biofilmes de bactérias orais. *Métodos Enzimol.*310,264-279.