

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

Biofilm formation profile of Streptococcus mutans isolated from the oral cavity on toothbrushes

Maria José Barbaresco

Universidade Estadual de Goiás

Justino Carlos Baptista

Universidade Estadual de Goiás

João Salviano Simões Chagas da Silva

Universidade Estadual de Goiás

Reuber Mendes Rocha

Universidade Estadual de Goiás

Luciana Rebelo Guilherme

Universidade Estadual de Goiás

Plínio Lázaro Faleiro Nunes

Universidade Estadual de Goiás

RESUMO

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

Palavras-chaves: Microbioma oral; Placa bacteriana; Cárie dentária.

ABSTRACT

Streptococcus mutans are found in saliva, colonize the surfaces of the oral cavity and form biofilms. These bacteria are the main etiological agents of

dental caries and are classified according to their biochemical and genetic properties. Toothbrush hygiene is one of the main measures for maintaining the health of the oral cavity, but contaminated toothbrushes can serve as a reservoir for the inoculation of pathogenic microorganisms. In this context, the present study evaluates the biofilm formation pattern of *S. mutans* isolated from human volunteers by detecting the total biomass of bacterial biofilms on polystyrene microplates and counting the viable bacteria associated with biofilms on toothbrushes. All the isolates were able to form biofilms and were classified as strong biofilm producers. The isolates with the highest counts of viable cells adhered to the brush bristles were Sm10 (8.47×10^7), Sm7 (7.23×10^7) and Sm6 (7.18×10^7) CFU mL⁻¹. On the other hand, *S. mutans* ATCC 700610 had the lowest count (5.25×10^6). Thus, the results show that *Streptococcus mutans* are capable of adhering to and forming biofilms on toothbrushes and that the behavior and relationships associated with *S. mutans* are essential for controlling these bacteria and dental caries.

Keywords: Oral microbiome; Bacterial plaque; Dental caries.

INTRODUÇÃO

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

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

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

Fatores como higiene, hábitos alimentares, colonização bacteriana, composição da saliva, dentre outros influenciam o metabolismo das bactérias sobre os dentes e podem modular a atividade microbiana no processo carioso (Leites, Pinto e Sousa, 2006). A disponibilidade de açúcares estimula a microbiota bucal acidogênica residente a proliferar e secretar ácido lático que, por sua vez, induz à dissolução dos tecidos dentários duros, o que é conhecido como cárie (Almeida *et al.*, 2017).

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

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

relacionado ao *S. mutans* como a ingestão e metabolismo de carboidratos, aciduricidade e acidogenicidade (Lemos *et al.*, 2018).

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

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

MATERIAL E MÉTODOS

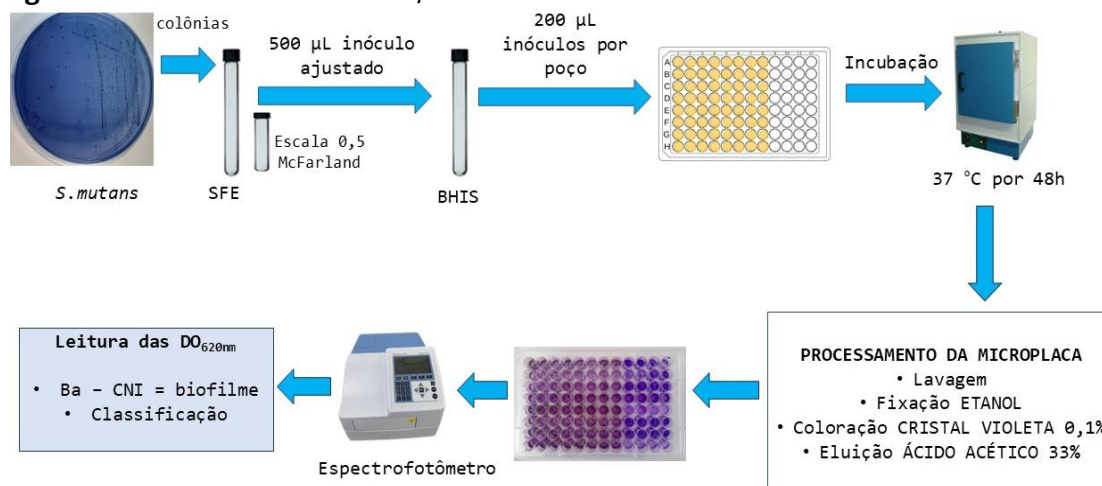
Oito estreptococos isolados de voluntários, mais a cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 700610 pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório de Bioensaios (Comitê de Ética em Pesquisa da UEG, parecer nº3.604.978) foram reativados em placas com Ágar Mitis Salivarius Bacitracina (AMSB) (AMS,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

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

Para a determinação da biomassa total dos biofilmes, as bactérias foram reativadas em ágar ChromID CPS (bioMérieux®, Rio de Janeiro) e após a incubação, colônias típicas foram dissolvidas em solução fisiológica estéril (SFE) e a densidade foi ajustada com a escala 0,5 de MacFarland. Em seguida, 500 µL da solução bacteriana foram transferidos para 4500 µL de caldo BHI com 2 % de sacarose (BHIS) (Kasvi, Espanha). Posteriormente, 200 µL dos inóculos foram transferidos para microplacas de poliestireno de fundo chato e estas foram incubadas a 35,5 °C por 48 horas.

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

Figura 1 - Ensaio de formação de biofilme

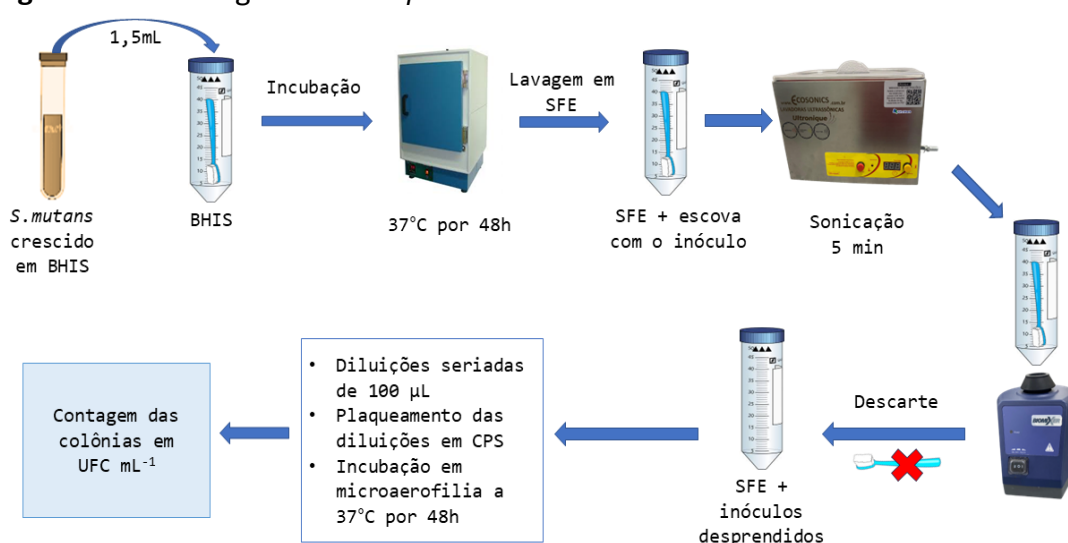


Legenda: Ba: Bactérias aderidas; CNI: Controle não inoculado

Fonte: os autores.

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

Após a incubação, as escovas foram transferidas para outros tubos Falcon com 15 mL de SFE para lavagem e desprendimento das bactérias não aderidas, em seguida as escovas foram transferidas para outro Falcon com SFE para sonicação por 5 minutos e agitação em vortex por 30 segundos para desprendimento dos micro-organismos associados ao biofilme. Após agitação, a escova foi descartada e a SFE foi diluída e plaqueada para a contagem e determinação das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC mL⁻¹). (Figura 2)

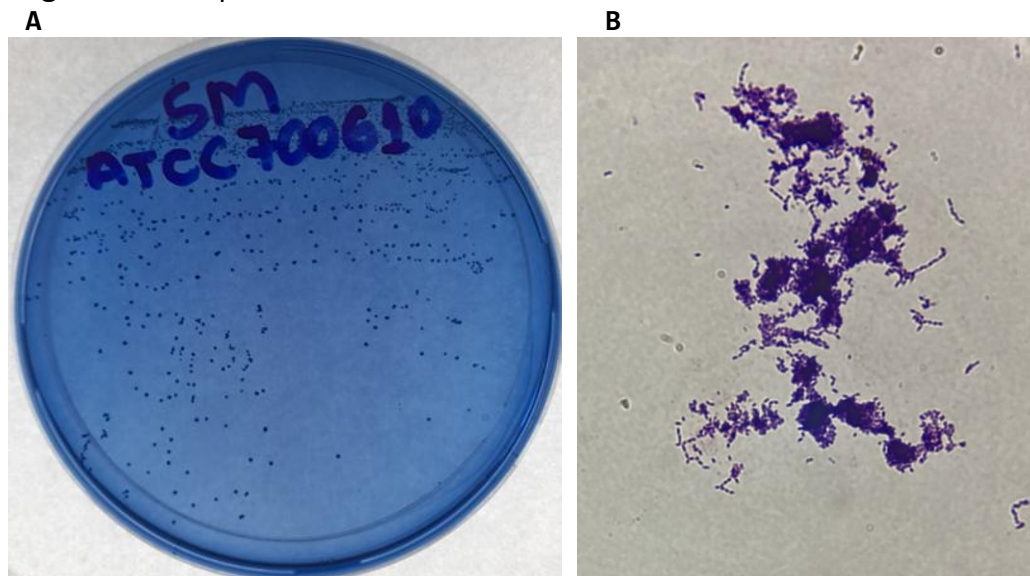
Figura 2 - Contagem de *Streptococcus mutans* viáveis aderidos nas escovas

Fonte: os autores.

RESULTADOS

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

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



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

Fonte: os autores.

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

Tabela 1 - Formação de biofilme de *Streptococcus mutans*

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

<i>S. mutans</i> Sm7	3,094 ± 0,384	Forte
<i>S. mutans</i> Sm10	3,106 ± 0,380	Forte
<i>S. mutans</i> Sm11	2,734 ± 0,445	Forte
<i>S. mutans</i> Sm12	3,234 ± 0,432	Forte
<i>S. mutans</i> ATCC 700610	1,721 ± 0,125	Forte
CNI	0,112 ± 0,007	-

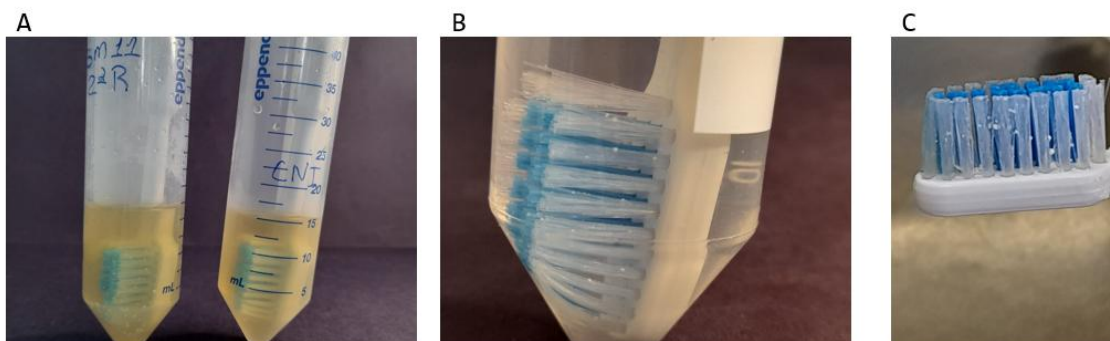
Legenda: DO_{620nm}: Densidade óptica de 620 nm; DP: Desvio padrão; CNI: Controle não inoculado; ATCC: *American Type Culture Collection*.

Fonte: os autores

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

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

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



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

Fonte: os autores.

Após o processamento das escovas, os isolados Sm10 ($8,47 \times 10^7$), Sm7 ($7,23 \times 10^7$) e Sm6 ($7,18 \times 10^7$) apresentaram os maiores valores de contagem de bactérias. As menores contagens bacterianas foram observadas para a cepa SmATCC 700610 ($5,25 \times 10^6$). Os isolados com as menores contagens foram Sm11 ($1,45 \times 10^7$) e Sm12 ($2,03 \times 10^7$). (Tabela 2)

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

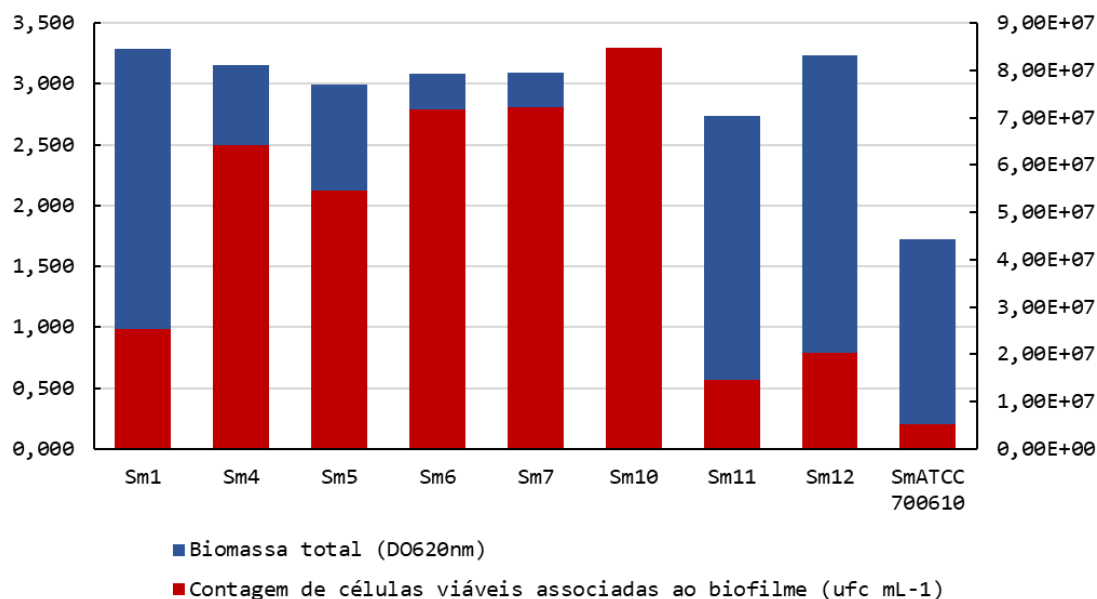
Bactérias	Nº de bactérias associadas ao biofilme (UFC mL ⁻¹)	
	Média	± DP
<i>S. mutans</i> Sm1	2,54x10 ⁷	± 6,60x10 ⁶
<i>S. mutans</i> Sm4	6,43x10 ⁷	± 1,73x10 ⁷
<i>S. mutans</i> Sm5	5,46x10 ⁷	± 5,22x10 ⁷
<i>S. mutans</i> Sm6	7,18x10 ⁷	± 5,85x10 ⁷
<i>S. mutans</i> Sm7	7,23x10 ⁷	± 2,17x10 ⁷
<i>S. mutans</i> Sm10	8,47x10 ⁷	± 4,68x10 ⁷
<i>S. mutans</i> Sm11	1,45x10 ⁷	± 1,07x10 ⁷
<i>S. mutans</i> Sm12	2,03x10 ⁷	± 7,02x10 ⁶
<i>S. mutans</i> ATCC 700610	5,25x10 ⁶	± 2,05x10 ⁶
CNI	NHC -	

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

Fonte: os autores.

A comparação entre os resultados de ambas técnicas demonstrou correlação entre elas para a maioria dos isolados. A cepa Sm ATCC 700610 apresentou uma menor contagem de bactérias e uma menor biomassa total. Entretanto, para os isolados Sm11, Sm12 foi observada uma menor contagem de bactérias sem que fosse observado o mesmo grau de diminuição da biomassa total. (Figura 5)

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



Fonte: os autores.

DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

Trabalhos prévios constataram que os *S. mutans* na cavidade oral formam biofilmes aderentes às superfícies dos dentes (Melok *et al.*, 2018). Em nosso estudo, detectamos o predomínio do perfil de formação forte de biofilme pelos *S. mutans*, sugerindo o quão aderente esses

micro-organismos são em superfícies sólidas diferentes das dos dentes, como foram as cerdas das escovas.

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

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

As escovas dentais mantêm micro-organismos viáveis em suas cerdas, como predomínio de cocos Gram-positivos que podem causar periodontopatias aos seus usuários (Pinto, Paiva E Pimenta, 1997).

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

CONCLUSÕES

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

DUNNE JR, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 155-166, abr. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.15.2.155-166.2002>. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/cmr.15.2.155-166.2002?casa_token=zLGZM9W_Q9sAAAAA%3Ab3civfZwt5SIeJ9ufEWcV1MXH1YTewoBONfRSI2Pg45mUn8uoR9hxe3pLF1Ns9ulB65G_fVo2-fbTQ. Acesso em: 26 mar. 2024.

KHAN, S. A. *et al.* An updated systematic review on toothbrush contamination: An overlooked oral health concern among general population. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 22, n. 1, p. 95-105, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/idh.12740>. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/idh.12740?casa_token=NHWZ2dk6QqQAAAAA%3AJi1bWFpt780oLXx0lLT_vnXZvKthnHlroK3RF0ErJGAANZyhtFW8ScR7uKMevordIg6fYNmyl8xf0w. Acesso em: 30 abr. 2024.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

Contato dos autores:

Autora: Maria José Barbaresco
E-mail: mariajbarbaresco@gmail.com

Autor: Justino Carlos Baptista
E-mail: justinobaptista95@gmail.com

Autor: João Salviano Simões Chagas da Silva
E-mail: joaosalviano14@gmail.com

Autor: Reuber Mendes Rocha
E-mail: reuber.mr@gmail.com

Autora: Luciana Rebelo Guilherme
E-mail: luciana.guilherme@ueg.br

Autor: Plínio Lázaro Faleiro Naves
E-mail: plinionaves@ueg.br

Manuscrito aprovado para publicação em: 10/12/2024