



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MAICK MENEGUZZO PRADO

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE BIOFILME
PERIODONTAL MULTIESPÉCIE EM BIORREATOR COM
AGITAÇÃO

Florianópolis – SC
Fevereiro, 2019

MAICK MENEGUZZO PRADO

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE BIOFILME
PERIODONTAL MULTIESPÉCIE EM BIORREATOR COM
AGITAÇÃO

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Engenharia
Química da Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química

Orientador:
Prof. Dr. Luismar Marques Porto

Coorientadora:
Prof^a. Dr^a. Josiane de Almeida Cava da Silveira

Florianópolis – SC
Fevereiro, 2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Prado, Maick Meneguzzo

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE BIOFILME PERIODONTAL MULTIESPÉCIE EM BIORREATOR COM AGITAÇÃO / Maick Meneguzzo Prado ; orientador, Luismar Marques Porto ; coorientadora, Josiane de Almeida Cava da Silveira, Florianópolis, SC, 2019.

112 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Biofilme multiespécie. 3. biorreator com agitação. 4. periodontite. I. Porto, Luismar Marques. II. Da Silveira, Josiane de Almeida Cava. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE BIOFILME
PERIODONTAL MULTIESPÉCIE EM BIORREATOR COM
AGITAÇÃO**

Por

Maick Meneguzzo Prado

Dissertação julgada para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof^ª. Cíntia Soares, Dr^ª.
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof^ª. Josiane de Almeida Cava da Silveira, Dr^ª.
Co-orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Bruno Bueno-Silva, Dr.
Universidade de Guarulhos

Daniela Bresolin, Dr^ª.
Universidade Federal de Santa Catarina

Guilherme Colla, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado a todos que lutam pela ciência neste país.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por mais uma etapa alcançada.

Ao professor Luismar Marques Porto, pela orientação, ensinamentos e busca pela inovação.

À professora Josiane de Almeida Cava da Silveira, pela orientação, ensinamentos, dedicação, carinho e por sempre acreditar e motivar este trabalho.

A todo o grupo do Laboratório Integrado de Engenharia Biológica (LiEB).

Às doutorandas Karla Pollyanna Vieira de Oliveira e Emily Marques dos Reis, obrigado pela ajuda e contribuição para a realização deste trabalho.

Aos pós-doutorandos Karina Cesca e Guilherme Colla, obrigado pelos ensinamentos desde o início do mestrado.

À mestranda Carly Kathleen Pires, meu agradecimento por sempre estar presente e disposta a ajudar.

Aos alunos de iniciação científica Davi Kovalski e o Vinicíus Heidemann pelo auxílio nos experimentos e caracterização de amostras.

À equipe da professora Magda Feres, da Universidade de Guarulhos, pelas bactérias cedidas e pela parceria estabelecida. Em especial ao professor Bruno Bueno Silva, pela disponibilidade, atenção e ajuda prestada.

Ao professor Márcio Rossi, pelo auxílio com equipamentos do biorreator.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC) e ao técnico Gabriel Santana, pela contribuição nas imagens da microscopia eletrônica de varredura.

À amiga Tânia Fantin, pelas conversas que sempre me dão força para lutar e me tornar uma pessoa melhor.

À amiga Luisa Mainardi, pelos abraços e amizade verdadeira que sempre se mostrou presente.

À Gabriela Nayana Pereira e Eloise Cordeiro pela amizade, risadas e parceria.

Ao meu namorado, Paulo Bernardo Dietrichkeit Pereira, pela paciência e colaboração imprescindível.

À família que ganhei nessa ilha, agradeço pelo amor incondicional.

À toda minha família, em especial à minha mãe, Clarice Meneguzzo, pelas orientações e apoio constante que me permitiram crescer como pessoa e a chegar nesse momento.

À CAPES, ao CNPq e à FINEP, pelo apoio financeiro.

Qual é a tarefa mais difícil do mundo? Pensar.
(Ralph Waldo Emerson)

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE BIOFILME PERIODONTAL MULTIESPÉCIE EM BIORREATOR COM AGITAÇÃO

RESUMO

Esforços têm sido destinados ao aprofundamento do conhecimento dos biofilmes orais patogênicos, como forma de permitir o avanço na descoberta de terapias capazes de prevenir sua adesão ou promover sua erradicação, a fim de impulsionar uma melhor qualidade de vida à população. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo de biofilme multiespécie em biorreator com agitação. Discos de dentes bovinos foram adaptados a um biorreator com o cimento da região cervical da raiz exposto a um meio de cultura contendo 31 espécies bacterianas, prevalentes nos casos de periodontite. Após incubação em condições anaeróbias por 3 e 7 dias, os biofilmes formados na superfície do substrato foram coletados para análise. O teste de viabilidade celular, por meio da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), determinou o número total de microrganismos viáveis presentes no biofilme; a análise por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permitiu observar a variedade morfológica das células bacterianas e a arquitetura do biofilme; e o teste de Hibridização DNA-DNA (Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação – DGGE) identificou e quantificou as espécies bacterianas presentes no biofilme. O estudo do crescimento bacteriano, por meio da análise de massa seca e leitura de densidade óptica, também foi realizado. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste *U de Mann-Whitney* ($\alpha = 5\%$) e ANOVA *One Way* considerando um nível de significância de 5%. Os biofilmes coletados dos segmentos radiculares após 3 dias de cultivo continham $1,1 \times 10^9 (\pm 3,3 \times 10^8)$ UFCs por biofilme, sem diferença significativa comparado aos biofilmes coletados após 7 dias, os quais apresentaram $9,2 \times 10^8 (\pm 1,8 \times 10^8)$ UFCs por biofilme ($p > 0,05$). Nas imagens de MEV foram observados biofilmes contendo células bacterianas de morfologia variada recobrando uniformemente a superfície do cimento, tanto nos segmentos submetidos ao período experimental de 3 dias, como no de 7 dias. Das 31 espécies bacterianas inicialmente inoculadas no biorreator, 29 (93,6%) estavam presentes no biofilme de 3 dias e 24 (77,4%), no de 7 dias. Espécies precursoras da periodontite foram identificadas em ambos os biofilmes. A velocidade específica do crescimento bacteriano foi de $1,76 \text{ h}^{-1}$. Um modelo de biofilme subgingival de 3 e 7 dias de cultivo foi desenvolvido por meio do uso do

biorreator com agitação, permitindo reproduzir, *in vitro*, comunidades microbianas complexas. Este modelo pode vir a ser um método auxiliar na mimetização do biofilme clínico periodontal e permitirá o estudo de novos mecanismos de ação e compostos antibiofilme e antimicrobianos, que possam ser aplicados futuramente no combate à periodontite.

Palavras-chave: Biofilme multiespécie; biorreator com agitação; periodontite.

**DEVELOPMENT OF A PERIODONTAL BIOFILM MODEL
MULTISPECIES IN BIOREACTOR WITH SHAKING
ABSTRACT**

Efforts have been made to increase knowledge of pathogenic oral biofilms aiming the discovery of therapies capable of prevent its adhesion or achieving its eradication, and so, promote a better quality of life. The objective of this paper is to develop a multispecies biofilm model using a agitation bioreactor. Bovine tooth discs made from the cementum of the cervical region from the roots were adapted to a bioreactor and exposed to a culture medium containing 31 bacterial species, the ones prevalent in cases of periodontitis. After incubation under anaerobic conditions during 3 and 7 days, the biofilms formed on the surface of the substrate were collected for analysis. The cell viability test, using counts of Colony Forming Units (CFUs), determined the total number of viable microorganisms present in the biofilm; Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis allowed us to observe the morphological variety of bacterial cells and the architecture of the biofilm; for the last DNA-DNA Hybridization test (DGGE) identified and quantified the bacterial species present in the biofilm. Also, it was performed a study of bacterial growth, by dry mass analysis and optical density readings. The data were statistically analyzed by the *Mann-Whitney U test* ($\alpha = 5\%$) and ANOVA *One Way* considering a level of significance of 5%. The biofilms collected from the root segments after 3 days of culture contained $1.1 \times 10^9 (\pm 3.3 \times 10^8)$ CFUs per biofilm, with no significant difference compared to biofilms collected after 7 days, which presented $9.2 \times 10^8 (\pm 1.8 \times 10^8)$ CFUs by biofilm ($p > 0.05$). Scanning Electron Microscopy (SEM) images showed biofilms containing bacterial cells of numerous morphologies covering uniformly the cement surface in both segments submitted to the experimental period of 3 and also 7 days. Of the 31 bacterial species initially inoculated in the bioreactor, 29 (93.6%) were present in the 3-day biofilm and 24 (77.4%) in the 7-day biofilm. Precursor species of periodontitis were identified in both biofilms. The specific rate of bacterial growth was $1,76 \text{ h}^{-1}$. A subgingival biofilm culture model of 3 and 7 days was developed at a agitation bioreactor, allowing to reproduce, in vitro, complex microbial communities. This model may be an auxiliary method to mimic periodontal clinical biofilm and will support studies of new mechanisms of action to combat periodontitis also antibiofilm and antimicrobial compounds.

Keywords: multispecies biofilm; agitation bioreactor; periodontitis.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2 - Revisão bibliográfica

- Figura 1. Etapas de formação do biofilme 30
- Figura 2. Modelo de patogênese da doença periodontal. 33
- Figura 3. Principais configurações dos biorreatores: (a) tanque agitado, (b) coluna de bolhas, (c) air-lift, (d) fluxo pistonado, (e) leito fixo com células imobilizadas, (f) leito fluidizado com células imobilizadas, (g) membrana plana e (h) fibra oca. 38
- Figura 4. Tipos de regimes de escoamento gás-líquido em colunas verticais. (A) regime homogêneo; (B) regime heterogêneo e (C) regime slug 40
- Figura 5. Relação do formato da bolha com o número de Reynolds, Eötvos e Morton. 42
- Figura 6. Diferenças conceituais entre sistemas fechados e abertos. (i) Sistema fechado: queda de nutrientes limitada ao tempo de duração do experimento. (ii) Sistema aberto: permite a adição simultânea e contínua de nutrientes e meio de crescimento, assim como a remoção de resíduos. Quando o sistema atinge um regime estacionário, como observado em um fermentador de filme de profundidade constante, a biomassa permanece constante (a). A biomassa aumenta com o tempo, conforme observado em um sistema de boca artificial (b). 45

Capítulo 3 - Artigo 1 - Desenvolvimento de um modelo de biofilme periodontal multiespécies em biorreator com agitação

- Figura 1. Desenho experimental: reativação das espécies bacterianas, corte do dente, cultivo no biorreator (formação do biofilme) e metodologias de análise do biofilme: UFC, MEV, e DGGE..... 58

Figura 2. Distribuição das células viáveis presentes no biofilme após os períodos de cultivo de 3 e 7 dias.	59
Figura 3. Biofilme recobrando a superfície do cimento radicular após 3 dias (a-b) e 7 dias de cultivo (c-d) (magnificação 2000 e 6000 x).....	60
Figura 4. Número total de bactérias nos biofilmes de 3 e 7 dias, obtido por meio da análise DGGE.	61
Figura 5. Quantificação das espécies bacterianas identificadas nos biofilmes de 3 e 7 dias de cultivo no biorreator. Região pontilhada expandida na parte inferior.	62

Capítulo 4 - Artigo 2 - Cinética de formação e caracterização de um biofilme periodontal multiespécies em biorreator com agitação

Figura 1. Cinética de crescimento nos 3 cultivos realizados (massa seca)	83
Figura 2. Cinética de crescimento microbiano através da densidade óptica.....	84
Figura 3. Correlação entre massa seca e densidade óptica na cinética do processo.....	85
Figura 4. Resultado do teste de viabilidade celular. Distribuição das células viáveis presentes no biofilme após os períodos de cultivo de 3 dias.	86
Figura 5. Biofilme recobrando a superfície do cimento radicular. (magnificação 1000, 2000, 5000 e 6000 x).....	87
Figura 6. Espécies bacterianas identificadas no biofilme após 3 dias de cultivo no biorreator e respectivas quantidades estimadas. No detalhe, área ampliada.....	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação dos biorreatores	37
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

OMS: Organização Mundial da Saúde
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
DNA: Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)
DGGE: Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação
UFC: Unidade Formadora de Colônia (do inglês *Colony-forming unit*)
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
BHI – Infusão de cérebro e coração (do inglês *Brain Heart Infusion*)
DO – Densidade óptica (do inglês *Optical density*)
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*)
PBS – Tampão fosfato-salino (do inglês *phosphate buffered saline*)
pH – Potencial hidrogeniônico
qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real (do inglês *quantitative real-time polymerase chain reaction*)
TRIS – Tris hidroximetil aminometano
UFC/mL – Unidade Formadora de Colônia por mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
1.1	OBJETIVOS	27
1.1.1	Objetivo geral.....	27
1.1.2	Objetivos específicos.....	27
1.2	ESTRUTURA DO TRABALHO	27
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1	BIOFILME MULTIESPÉCIE	29
2.1.1	Biofilme oral multiespécie.....	31
2.1.2	Sistemas de cultivo do biofilme multiespécie	35
2.2	BIORREADORES.....	36
2.2.1	Biorreatores e sua configuração	37
2.2.2	Modo de operação dos biorreatores	39
2.2.3	Parâmetros e comparação dos biorreatores	39
2.3	BIOFILMES E BIORREADORES	43
2.3.1	Cultivo de biofilmes em quimiostato	48
3	DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE BIOFILME PERIODONTAL MULTIESPÉCIE EM BIORREATOR COM AGITAÇÃO	49
3.1	RESUMO	49
3.2	INTRODUÇÃO	50
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.3.1	Espécies bacterianas, inóculo e meio de crescimento	53
3.3.2	Preparo das amostras, biorreator e condições do meio de cultivo ..	53
3.3.3	Inoculação das bactérias.....	54
3.3.4	Períodos experimentais para formação do biofilme.....	54
3.3.5	Teste de viabilidade celular bacteriana	55
3.3.6	Análise da morfologia celular bacteriana e arquitetura do biofilme	55
3.3.7	Hibridização DNA-DNA - Checkerboard	56
3.3.8	Desenho Experimental.....	57
3.3.9	Análise estatística	58
3.4	RESULTADOS.....	59
3.4.1	Viabilidade celular bacteriana	59

3.4.2	Morfologia celular bacteriana e arquitetura do biofilme	59
3.4.3	Hibridização DNA-DNA - Checkerboard.....	60
3.5	DISCUSSÃO	63
3.6	LIMITAÇÕES	65
3.7	DIREÇÕES DO FUTURO DA PESQUISA	65
3.8	CONCLUSÃO	66
4	CINÉTICA DE FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM BIOFILME PERIODONTAL MULTIESPÉCIE EM BIORREATOR COM AGITAÇÃO	75
4.1	DESTAQUES	75
4.2	RESUMO	75
4.3	INTRODUÇÃO	76
4.4	MATERIAIS E MÉTODOS	78
4.4.1	Espécies bacterianas, inóculo e meio de crescimento	78
4.4.2	Preparo das amostras, biorreator e condições do meio de cultivo ..	78
4.4.3	Inoculação das bactérias.....	79
4.4.4	Período experimental para formação do biofilme	79
4.4.5	Crescimento bacteriano e cinética do processo	80
4.4.6	Teste de viabilidade celular bacteriana	80
4.4.7	Análise da morfologia celular bacteriana e arquitetura do biofilme	81
4.4.8	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)	81
4.4.9	Análise estatística.....	82
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.5.1	Crescimento bacteriano	83
4.5.2	Viabilidade celular bacteriana.....	85
4.5.3	Morfologia celular bacteriana e arquitetura do biofilme	86
4.5.4	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante.....	88
4.6	CONCLUSÃO	89
	Agradecimentos	90
5	CONCLUSÕES GERAIS.....	97
6	REFERÊNCIAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) 11% dos brasileiros não possuíam dentes em boca no ano de 2013, correspondendo a aproximadamente 16 milhões de pessoas. Além disso, apesar de possuir o maior número de dentistas no mundo (260 mil profissionais), 55,6% da população não consultou no ano de 2015. (IBGE, 2015).

Segundo levantamentos epidemiológicos da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2003, 60 a 90% da população mundial que vive em países industrializados possuía algum problema bucal, estando a cárie em primeiro lugar (HOBDELL et al., 2003; FRIAS, JUNQUEIRA, 2008) e a periodontite, em segundo (FRIAS, JUNQUEIRA, 2008). Dados provenientes da América do Norte e do Sul mostram que a prevalência de formas graves da doença periodontal em adultos entre 35 e 44 anos é de 20%, e 40% para formas menos graves da doença. Na América do Norte, a prevalência da doença grave parece ser baixa, sugerindo que as formas graves são mais prevalentes na América do Sul (PETERSEN, 2005).

Na doença periodontal, as bactérias desencadeiam um processo inflamatório que aprofunda o sulco gengival e, eventualmente, forma-se uma bolsa periodontal, podendo ocasionar perda do osso alveolar e recessão gengival (MOORE, MOORE, 1994). Os dentes são cobertos por uma placa de glicoproteínas que se liga à hidroxiapatita na superfície do dente. Microrganismos habitam essa película acima e abaixo da margem gengival, caracterizando o biofilme supra e subgengival. Na periodontite, a microflora subgengival passa a ser predominantemente anaeróbica Gram negativa e contém espécies bacterianas como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Selenomonas noxia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* e espiroquetas (MOORE, 1994; PASTER et al., 2001; MOORE et al, 1987.; TANNER et al. 1998).

O tratamento da periodontite apresenta dificuldades, mesmo que a doença responda à remoção mecânica isolada (WALTERS; LAI, 2015). Pacientes com perda de inserção progressiva ou múltiplas bolsas profundas devido à presença de patógenos subgengivais agressivos obtêm resultados positivos com a combinação de antibióticos sistêmicos e terapia mecânica. Contudo, esses patógenos podem se tornar resistentes às medicações e dificultar ainda mais o tratamento da doença (WALTERS; LAI, 2015). Torna-se necessário, portanto, compreender o

processo de formação do biofilme, para então combatê-lo por meio de terapias ou antimicrobianos específicos.

Modelos de biofilme *in vitro* para estudo ainda são limitados, pois contêm poucas espécies bacterianas e são, em sua maioria, realizados em modo estático. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um biofilme periodontal multiespécie reproduzível, inovador e mais representativo da microbiota oral, por meio de um biorreator com agitação, de forma a possibilitar futuros testes de terapias e medicamentos antimicrobianos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver um modelo de biofilme periodontal multiespécie reproduzível em biorreator com agitação.

1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o biofilme periodontal multiespécie de 3 e 7 dias de cultivo por meio da Análise da viabilidade celular, através da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) viáveis no biofilme;
- Caracterizar o biofilme periodontal multiespécie de 3 e 7 dias de cultivo através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), para observação da morfologia celular bacteriana e arquitetura do biofilme;
- Caracterizar o biofilme periodontal multiespécie de 3 e 7 dias de cultivo por meio da Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (DGGE), para a identificação e quantificação das espécies presentes no biofilme.
- Analisar o comportamento de crescimento das bactérias que formam o biofilme multiespécies, por meio da cinética do processo.

1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO

Essa dissertação descreve a formação de um biofilme periodontal multiespécie em biorreator com agitação, e está organizada da seguinte maneira:

- Revisão bibliográfica sobre biofilme multiespécie, seus mecanismos de formação, e biorreatores.
- Artigo 1 - Desenvolvimento de um modelo de biofilme periodontal multiespécie em biorreator com agitação.

- Artigo 2 - Cinética de formação e caracterização de um biofilme periodontal multiespécie em biorreator com agitação.
- Conclusões gerais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOFILME MULTIESPÉCIE

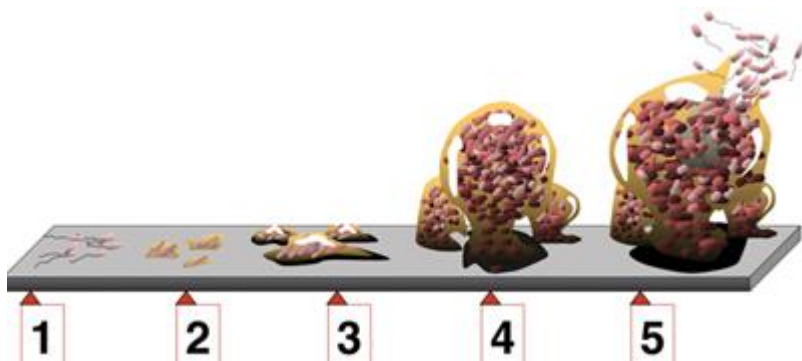
A definição de biofilme vem evoluindo nas últimas décadas. Em 1976, Marshal observou o envolvimento de fibras de polímero extracelular muito finas que ancoravam as bactérias nas superfícies de substratos (MARSHALL, 1976). Em 1978, Costerton et al. observaram que as comunidades bacterianas incorporadas em sistemas aquáticos estavam envolvidas em uma matriz de natureza polissacarídica, que intercedia na adesão (COSTERTON, GEESEY, CHENG, 1978). Nos anos seguintes, Costerton et al. afirmaram que o biofilme consistia de células simples e micro colônias, todas incorporadas em uma matriz exopolimérica altamente hidratada (COSTERTON et al., 1987). Em 1990, Characklis e Marshall descreveram outros aspectos importantes dos biofilmes, como características de heterogeneidade espacial e temporal, além do envolvimento de substâncias inorgânicas ou abióticas mantidas na matriz do biofilme (CHARACKLIS, MARSHALL, 1990). Contudo, atualmente, a definição mais difundida é de que biofilmes são “comunidades estruturadas de células bacterianas enclausuradas em uma matriz extracelular produzida pelas próprias bactérias e aderidas entre si e/ou às superfícies ou interfaces” (COSTERTON et al., 1995).

Costerton e Lappin-Scott relataram que o processo de adesão às superfícies desencadeava a expressão de genes responsáveis pela produção de componentes bacterianos necessários à formação dos biofilmes. Enfatizavam, portanto, que o processo de formação de biofilmes é regulado por genes específicos transcritos durante a ligação celular inicial (COSTERTON, LAPPIN-SCOTT, 1995). Por exemplo, em estudos com *Pseudomonas aeruginosa*, Davies e Geesey mostraram que o gene algC, que controla a fosfomanomutase, envolvido na síntese de alginato (exopolissacarídeo), é regulado logo após poucos minutos da adesão inicial a uma superfície sólida (DAVIES, GEESEY, 1995).

Os estágios de formação do biofilme são apresentados na figura 1. O primeiro passo na formação do biofilme é a adesão das bactérias planctônicas à uma superfície, de forma aleatória (etapa 1 da Fig. 1). Esta primeira adesão é reversível e é mantida por interações físico-químicas não específicas, constituindo o alicerce para o crescimento do biofilme. A segunda fase da adesão consiste na transição

do estágio reversível para o irreversível (etapa 2 da Fig. 1). As bactérias passam a secretar substâncias que serão responsáveis pela manutenção da adesão e da camada que envolve o biofilme. Nesta fase há o início da formação de microcolônias e do desenvolvimento da arquitetura do biofilme maduro (etapas 3 e 4 da Fig. 1). Os biofilmes maduros apresentam estrutura semelhante a cogumelos, envoltos por diversas substâncias, principalmente açúcares, e rodeados por poros e canais de água que funcionam como um sistema de troca de nutrientes, oxigênio e metabólitos que precisam ser secretados para fora do biofilme. A quinta e última fase da formação do biofilme ocorre quando o ambiente não é mais favorável à sua manutenção, e consiste no descolamento do biofilme maduro (etapa 5 da Fig. 1) em forma de agregados celulares ou células planctônicas. Após desprendidas, as bactérias livres podem colonizar novos ambientes, reiniciando a formação de novos biofilmes (MONROE, 2007).

Figura 1. Etapas de formação do biofilme



Fonte: Adaptado de (MONROE, 2007).

Uma nova definição de biofilme deve levar em consideração uma série de fatores. Não apenas características facilmente observáveis, como as células irreversivelmente aderidas à superfície e incorporadas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares com componentes não celulares ou abióticos, mas também atributos fisiológicos desses microrganismos, como a taxa de crescimento alterada e a transcrição de diferentes genes comparados aos microrganismos planctônicos. Sendo assim, a definição mais complexa de biofilme é uma “comunidade sésil

de microrganismos irreversivelmente aderidos a um substrato ou entre si, envoltos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares produzida pelas próprias células, as quais exibem um fenótipo alterado em relação à taxa de crescimento e transcrição de genes” (DONLAN, COSTERTON, 2002).

Sendo assim, em razão dessa complexidade, representada principalmente pela presença de matriz extracelular e pela alteração no genótipo celular bacteriano, que pode variar de 20 a 70% em comparação às células planctônicas, as bactérias organizadas na forma de biofilme são aproximadamente mil vezes mais resistentes ao tratamento com antimicrobianos (TENOVER, 2006; BURMOLLE et al., 2006; KARA, LUPPENS, KATE, 2006; LUPPENS et al., 2008; RAMSEY, WHITELEY, 2009), o que pode dificultar a efetividade das estratégias de controle do biofilme.

2.1.1 Biofilme oral multiespécie

Mais de 700 espécies bacterianas já foram identificadas na cavidade oral (AAS et al., 2005). No entanto, análises baseadas em cultura microbiológica e biologia molecular permitiram determinar que as comunidades microbianas diferem em composição de acordo com o ambiente em que se estabelecem, como a superfície dos dentes, a gengiva e a língua (SIMÓN-SORO, 2013). As superfícies dentárias, por exemplo, apresentam dois habitats diferentes, o ambiente supragengival e o subgengival. As condições ecológicas desses habitats diferem muito entre si, propiciando o desenvolvimento de comunidades microbianas distintas (MARSH, DEVINE, 2011). Ambos habitats são colonizados por microrganismos que se estabelecem como complexos biofilmes multiespécie, chamados em odontologia de "placa dental" ou biofilme microbiano.

Se por um lado a microbiota simbiótica cobre as superfícies dentárias como um biofilme e, assim, impede o estabelecimento de espécies exógenas (e muitas vezes patogênicas) (HAJISHENGALLIS, 2015), por outro, quando o biofilme dental na superfície dos dentes não é removido por meio de higiene oral diária, uma disbiose ocorrerá, resultando em uma reação inflamatória dos tecidos gengivais, conhecida como gengivite. Esta resposta inflamatória ao acúmulo de biofilme dental foi observada em um estudo prévio, no qual pacientes voluntários, periodontalmente saudáveis, deixaram de realizar todas as medidas de

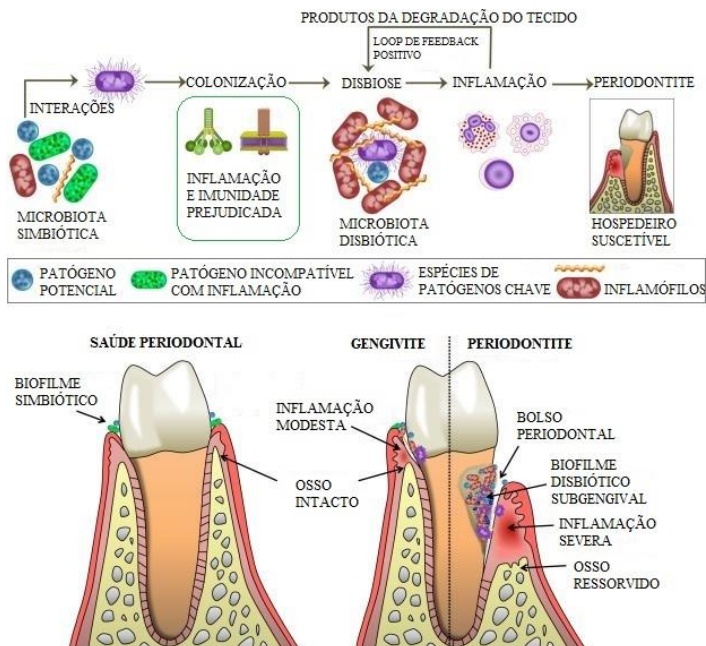
higiene bucal durante 2 a 3 semanas. Tal medida resultou em uma condição descrita como "gingivite experimental" (KISTLER et al., 2013). Em indivíduos susceptíveis, a gingivite pode progredir para um quadro de natureza complexa, a periodontite. Esta doença, de patogênese multifatorial, caracteriza-se como uma ampla inflamação dos tecidos de suporte do dente, na qual já é evidenciada a perda óssea alveolar (KNIGHT et al., 2016).

A resposta inflamatória induzida pela presença de biofilme bacteriano nos tecidos resulta na perda de inserção colágena do dente ao osso, na perda de osso alveolar, e na eventual perda do dente (PINHEIRO et al., 2006). Após a perda de "ligação" entre a gengiva e o dente (migração do epitélio juncional em direção apical), forma-se uma bolsa periodontal patológica que pode apresentar uma profundidade de sondagem de 4 mm ou prolongar-se até o ápice do dente. Esse nicho ambiental da bolsa periodontal é ideal para a colonização e crescimento de espécies microbianas, particularmente anaeróbicas (HUJOEL et al., 2001). Todas as etapas da doença são apresentadas na figura 1.

A extensão da perda de inserção pode variar de 8 a 20 mm², o que representa uma área subgengival considerável a ser colonizada por biofilmes específicos. A prevalência de algumas espécies bacterianas associadas à periodontite (por exemplo, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*) é dependente do grau de profundidade da bolsa (RIEP et al., 2009; GRIFFEN et al., 2012; LI et al., 2014).

Diversos patógenos já foram estabelecidos e relacionados à doença periodontal. No entanto, ao longo dos últimos anos, com os avanços tecnológicos de sequenciamento, várias espécies não-cultiváveis e fastidiosas, até então desconhecidas, foram identificadas e associadas ao início e ao desenvolvimento da periodontite, ampliando o grupo de "suspeitas de agentes patogênicos periodontais" (GRIFFEN et al., 2012; HAJISHENGALLIS, LAMONT, 2012; BIZZARO et al., 2016). Além disso, os métodos moleculares permitiram melhorar a compreensão a respeito das comunidades polimicrobianas da cavidade oral, e mais especificamente, das espécies envolvidas nas doenças periodontais (WADE, 2011; HAJISHENGALLIS, LAMONT, 2012), como apresentado na figura 2. A figura também apresenta um modelo de patogênese da doença periodontal, onde a doença não resulta de patógenos individuais, mas da sinergia e da disbiose microbiana.

Figura 2. Modelo de patogênese da doença periodontal.



Fonte: Adaptado de (HAJISHENGALLIS, 2015).

Métodos de cultura microbiana permitiram a identificação de 40 espécies da microbiota oral, por meio de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) ou hibridização DNA-DNA (RASIAH et al., 2005; LEDDER et al., 2006; FILOCHE et al., 2007).

Até o momento, o papel específico que a maioria desses gêneros e espécies desempenha para a iniciação e/ou progressão da periodontite permanece desconhecido. À luz do crescente conhecimento sobre as comunidades subgengivais, a pesquisa por microcosmos e modelos de biofilmes dinâmicos nesses nichos específicos irá contribuir para a compreensão do microbioma oral humano. Os microcosmos são ecossistemas artificiais, simplificados, usados para simular o comportamento dos ecossistemas naturais sob condições controladas. O

estudo de microcosmos pode ser útil para determinar o papel ecológico das espécies-chave na doença e também para estudar os efeitos de distúrbios promovidos nos biofilmes (EXTERKATE, CRIELAARD, CATE, 2010).

Uma variedade de modelos de biofilme *in vitro* tem sido proposta para investigar as comunidades subgengivais. No entanto, a generalização dos resultados fica prejudicada, pois além dos procedimentos metodológicos diferirem entre si, as espécies bacterianas usadas para formação dos biofilmes são variadas. Durante muito tempo, a maioria dos estudos empregou modelos simplificados com biofilmes de uma única espécie, o que não simula a realidade clínica (BEYTH et al., 2008; FUCIO et al., 2008; GYO et al., 2008; KANTORSKI et al., 2008; BUERGERS et al., 2009; FUCIO et al., 2009). Como alternativa, foram desenvolvidos modelos de biofilme subgengival que empregavam variadas espécies (3 a 6), comensais e patógenos (DEZELIC et al., 2009; RINASTITI et al., 2010; HAYATI et al., 2011). Em um estudo recente, algumas espécies de bactérias da saliva de pacientes foram testadas para a formação do biofilme, com destaque àquelas relacionadas à inflamação periodontal e à destruição tecidual: *Enterobacteria*, *Candida albicans*, *Neisseria spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Olsenella uli*, *Hafnia alvei*, *Serratia marcescens* e *Filifactor alocis* (COLOMBO et al., 2016). De forma geral, a maioria dos modelos de biofilme subgengival limita-se ao uso de espécies pré-selecionadas, variando entre 10 a 40 espécies (GUGGENHEIM et al., 2009; SOARES et al., 2015; EICK et al., 2012). Contudo, levando em consideração a diversidade da flora microbiana subgengival, e os fatores ambientais físicos e químicos, os biofilmes multiespécies desenvolvidos *in vitro* ainda não se caracterizam como representativos da situação encontrada *in vivo* (DEWHIRST et al., 2010).

Os modelos ideais devem permitir a manipulação e a simulação dos diferentes aspectos das condições bucais, como o fluxo de saliva e de carboidratos disponíveis na superfície do biofilme (SISSONS et al., 1991; SISSONS et al., 1995; PRATTEN et al., 1998; PRATTEN et al., 2000; MATHARU et al., 2001; BADAWI et al., 2003; MCBAIN et al., 2005; LEDDER et al., 2006; FILOCHE, SOMA, SISSONS, 2007; SISSONS et al., 2007; CEMCI et al., 2009). Também devem possibilitar o estudo da virulência dos agentes patogênicos envolvidos na periodontite e as interações que ocorrem entre eles, bem como o teste de agentes antimicrobianos (EXTERKATE, CRIELAARD, CATE, 2010; KOOPMAN et al., 2014).

2.1.2 Sistemas de cultivo do biofilme multiespécie

A maior parte do conhecimento sobre biofilmes se origina da observação de sistemas modelo de biofilme *in vitro*, tradicionalmente usados para a análise da formação de biofilmes monoespécie. Entretanto, eles também podem ser aplicados para o estudo de biofilmes multiespécies. Estes sistemas de biofilme podem ser dinâmicos (o meio de cultura circula continuamente sobre o substrato) ou estáticos (não há circulação contínua do meio de cultura), os quais apresentam vantagens e desvantagens (RØDER, SØRENSEN, BURMØLLE, 2016), e serão mais amplamente discutidos no item 2.3, intitulado “biofilmes e reatores”.

O modelo mais antigo de sistema estático é o da placa de ágar, onde a bactéria cresce sobre um meio sólido adequado. Porém, por exigir uma grande área e elevada quantidade de meio de cultura para a formação do biofilme, o sistema estático foi aperfeiçoado (RØDER, SØRENSEN, BURMØLLE, 2016). Permitindo uma análise de alto rendimento, o modelo seguinte, o sistema de placas de microtitulação possibilita a adesão das células e a formação do biofilme multiespécie no fundo dos poços (RØDER, SØRENSEN, BURMØLLE, 2016). Com o intuito de permitir uma melhor distribuição do biofilme e mimetizar a organização das bactérias no ambiente oral, as placas de microtitulação foram combinadas com o dispositivo de biofilme de Calgary, formando um novo modelo. Neste modelo, o biofilme se forma em pinos projetados e aderidos à tampa do aparato, a qual irá se assentar na microplaca e permitir o encaixe dos 96 pinos aos 96 poços. O fundo do poço serve para canalizar o fluxo do meio através dos pinos criando uma força de cisalhamento consistente em todos os pinos, o que resulta na formação de biofilmes equivalentes em cada local do pino (CERI et al., 1999, HARRISON et al., 2010). Este sistema tem sido usado em estudos de biofilmes multiespécie para quantificar a biomassa do biofilme e também para avaliar a composição da comunidade (REN et al., 2013). Embora ainda utilizados, os modelos estáticos não simulam o fluxo dos fluidos presentes no microbioma oral, e acarretam o esgotamento de nutrientes (SIM, DASHPER, REYNOLDS, 2016).

Uma forma de cultivo do biofilme que mimetiza mais consistentemente o microbioma oral consiste nos sistemas de fluxo contínuo, como o quimiostato, o fermentador de filme de profundidade constante, a célula de fluxo e o modelo de biofilme de boca artificial (BUSSCHER; MEI, 2006; BRADSHAW et al., 1996). Alguns desses

sistemas possuem uma câmara para cultivo que pode ser observada diretamente por microscopia (PAMP, S.J. et al., 2009). Outras variações dos sistemas contínuos são o reator de fluxo por gotejamento (GOERES et al., 2009) e os sistemas de fluxo usando um formato de poço padrão composto de canais microfluídicos que permitem uma maior análise de taxa de transferência (BENOIT et al., 2010).

2.2 BIORREATORES

Biorreatores são definidos como reatores nos quais ocorre uma série de reações químicas catalisadas por biocatalizadores, sejam enzimas ou células microbianas (animais ou vegetais), que tenham sua capacidade metabólica mantida. Os mais difundidos são utilizados desde 1940 e empregam células microbianas para a produção industrial de diversos bioprodutos, como enzimas, vitaminas, antibióticos, e ácidos orgânicos. Além disso, podem ser utilizados para o tratamento de resíduos industriais e domésticos (SCHMIDELL, FACCIOTTI, 2001) e também em processos inovadores, como na produção de biofilmes para pesquisas nas diversas áreas do conhecimento humano (SIM, DASHPER, REYNOLDS, 2016).

Os biorreatores têm suas características relacionadas às espécies microbianas usadas e podem ter diferentes efeitos no que se refere aos fenômenos de transporte de massa. Portanto, o comportamento reológico no biorreator será diferente dependendo do microrganismo empregado, por exemplo, bactérias e fungos filamentosos. Também é importante escolher um modelo apropriado ao processo, com ou sem técnicas de imobilização de partículas ou substrato. A importância do modelo se deve ao conhecimento da cinética da reação e do modo de funcionamento de cada reator biológico, como configuração e tamanho do biorreator, condições do processo e modo de operação (SCHMIDELL, FACCIOTTI, 2001).

Dentre os modos de operação, o modo em batelada em tanques agitados é uma escolha barata e flexível em relação a outros biorreatores, e pode ser usado em muitos processos industriais. Na operação contínua, os modelos específicos requerem altos gastos para implantação. Todavia, possuem custos de manutenção reduzidos. Portanto, o tipo de operação deve ser priorizado conforme a necessidade do processo (MAZID, 1993).

Com o intuito de intensificar a produção e aumentar a produtividade, novos modelos têm sido pesquisados. Os biorreatores em

cascata contínua com separação do produto final visam evitar a queda na produtividade pela inibição do produto final. Esse modelo, por exemplo, vêm sendo utilizado na produção de etanol por leveduras (TAYLOR, 1996). A classificação de biorreatores, apresentada no quadro 1, baseia-se no modelo Kleinstreuer, de 1987. Contudo, ainda é a mais empregada atualmente (SCHMIDELL, FACCIOTTI, 2001).

Quadro 1: Classificação dos biorreatores

Classificação Geral dos Biorreatores	
I)	Reatores em fase aquosa (Fermentação submersa)
	(I.1) Células e/ou enzimas livres.
	- reatores agitados mecanicamente (STR)
	- reatores agitados pneumaticamente
	- coluna de bolhas
	- reatores “air-lift”
	- reatores de fluxo pistonado (PFR)
	(I.2) Células e/ou enzimas imobilizadas em suporte
	- reatores com leito fixo
	- reatores com leito fluidizado
	- outros
	(I.3) Células e/ou enzimas confinadas entre membranas
	- reatores com membranas planas
	- reatores de fibra oca
II)	Reatores em fase não-aquosa (Fermentação semi-sólida)
	- reatores estáticos (com bandejas)
	- reatores com agitação (tambor giratório)
	- reatores com leito fixo
	- reatores com leito fluidizado gás-sólido

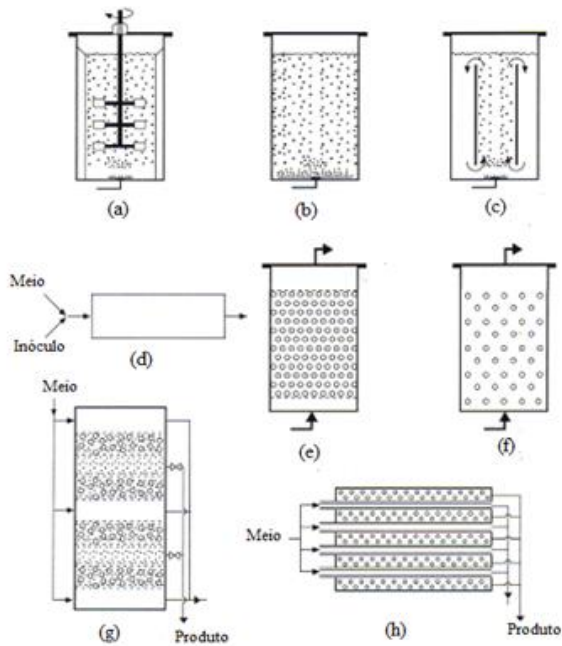
É importante ressaltar que os processos anaeróbios vêm experimentando um desenvolvimento muito significativo nos últimos anos. Consistem em uma tecnologia de baixo custo que pode ter diversas aplicações, como no processo de tratamento de águas residuais com geração de biogás e hidrogênio, além de cultivos específicos para a formação de biofilmes (MAURINA, 2014).

2.2.1 Biorreatores e sua configuração

Nos diversos processos industriais, diferentes configurações de biorreatores são empregadas, sendo que os tanques cilíndricos, com ou

sem agitação, ainda são os mais utilizados. Cabe ressaltar que novos modelos são constantemente desenvolvidos para atender aplicações especiais, como operações com grandes densidades celulares, ou para atender novas formas de biocatalisadores e microrganismos, como tecidos animais e vegetais ou células e enzimas imobilizadas (YANG, 2007). As principais configurações são apresentadas na figura 3.

Figura 3. Principais configurações dos biorreatores: (a) tanque agitado, (b) coluna de bolhas, (c) air-lift, (d) fluxo pistonado, (e) leito fixo com células imobilizadas, (f) leito fluidizado com células imobilizadas, (g) membrana plana e (h) fibra oca.



Fonte: Adaptado de (PRADELLA, 2001).

Em razão da importância da configuração dos biorreatores, diversos modelos têm sido estudados em escala laboratorial, empregando células imobilizadas em processos em batelada ou contínuos, e têm se

mostrado promissores para o escalonamento industrial (KOURKOUTAS et al., 2004).

2.2.2 Modo de operação dos biorreatores

O modo de operação dos biorreatores tem um impacto significativo na configuração do processo, afetando a conversão do substrato, a concentração do produto, a suscetibilidade às contaminações, entre outros parâmetros (YANG, 2007). Existem inúmeros modos de operação para a condução dos processos em biorreatores, dependendo das características do meio de cultivo, dos microrganismos e dos objetivos específicos do processo produtivo. Devido à grande variedade, a abordagem de todos os modos fica dificultada; todavia, é possível destacar dois tipos: batelada (descontínuo simples) e contínuo (SCHMIDELL, FACCIOTTI, 2001).

O modo de processo em batelada pode ser descrito como a utilização de um meio de cultivo adequado, adicionado ao biorreator, juntamente com o inóculo microbiano, permitindo o desenvolvimento e multiplicação dos microrganismos. Forma-se um caldo no reator que, após fermentação, pode ser retirado e o produto recuperado (SCHMIDELL, FACCIOTTI, 2001).

No processo contínuo a alimentação do meio é contínua a uma determinada vazão constante. O volume dentro do reator deve ser mantido constante por meio da retirada do caldo fermentado também a uma vazão constante. Os processos contínuos se caracterizam, principalmente, por serem sistemas que permitem ser operados por longos períodos de tempo em estado estacionário. Portanto, a concentração de células, substrato e produto permanecem constantes ao longo do tempo (CARVALHO, SATO, 2001).

2.2.3 Parâmetros e comparação dos biorreatores

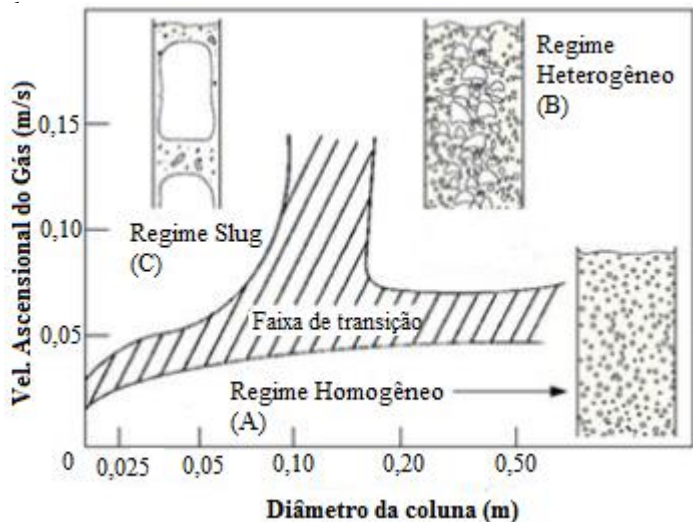
São muitas as variáveis que afetam o desempenho de um biorreator, como agitação, geometria, relação inicial de substrato (S) e microrganismo (M) (S/M), temperatura, pH, dentre outras (NOVAES et al., 2010). Para aplicações em grande escala, a agitação é um parâmetro crítico, pois falhas no processo de mistura podem resultar em uma menor transferência de massa, levando o sistema a um desempenho insuficiente. A agitação também deve promover a solubilização de partículas de

matéria orgânica, aumentando a taxa de consumo de substrato (PINHO et al., 2005).

No interior dos biorreatores a agitação pode ser feita de várias formas, com destaque para a recirculação de biogás produzido na fermentação, recirculação do efluente e agitação mecânica (MICHELAN et al., 2009). Nestes processos a velocidade de agitação deve ser avaliada, pois se esta for muito elevada, poderá reduzir a atividade microbiana devido às altas tensões de cisalhamento, causando a ruptura e morte das células. Conseqüentemente, uma fermentação ineficiente será obtida (BANNARI et al., 2011). O sistema de escoamento nos biorreatores envolve uma mistura gás-líquido e é caracterizado por diferentes regimes, sendo classificados em três tipos principais: homogêneo, heterogêneo e slug. A variação dos regimes de escoamento tem relação direta com a velocidade ascensional da fase dispersa (WANG et al., 2007). Os três tipos são apresentados na figura 4.

Fonte: Adaptado de (KANTARCI et al., 2005).

Figura 4. Tipos de regimes de escoamento gás-líquido em colunas verticais. (A) regime homogêneo; (B) regime heterogêneo e (C) regime



Quando as velocidades ascensionais de gás são baixas, observa-se uma distribuição uniforme no tamanho das bolhas, o que caracteriza o sistema de regime homogêneo. Como as bolhas, determinadas

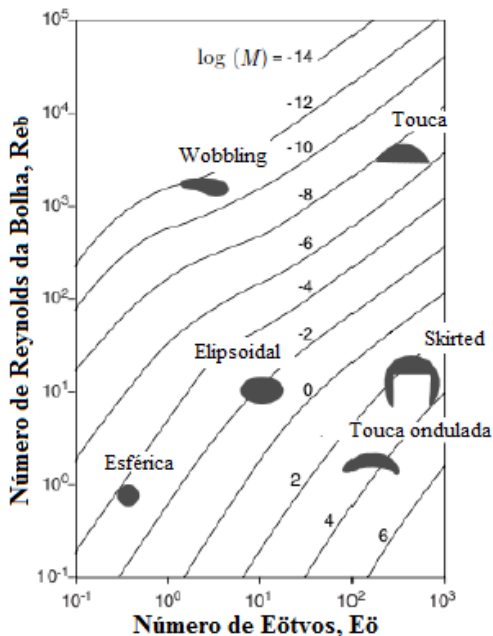
exclusivamente pelas propriedades do sistema distribuidor, ascendem verticalmente com pequenas oscilações transversais e axiais, este regime é determinado como o de menor complexidade (THORAT, JOSHI, 2004).

Com o aumento da velocidade, em torno de 0,10 m/s, a coluna passa por um regime de transição e torna-se um sistema de regime heterogêneo. Neste regime, há variação no tamanho das bolhas, na velocidade do líquido e, por consequência, na energia cinética turbulenta. Na área central da coluna, as bolhas tendem a sofrer a coalescência e quebra (THORAT, JOSHI, 2004).

A formação de bolhas grandes que ocupam um diâmetro próximo ao da coluna caracteriza o regime slug. Ocorre geralmente em colunas de diâmetro menor e operando a velocidades do gás superiores a 0,10 m/s (SHAIK, AL-DAHMAN, 2007).

O regime de escoamento é importante porque afeta o desempenho do sistema. Fatores como hidrodinâmica, transferência de calor e de massa podem ser afetados de forma positiva ou não, e são essenciais para o comportamento da mistura (ZHRADNÍK, FIALOVA, 1996). O formato das bolhas também pode variar, sendo as formas esfera, elipse e touca as mais comuns. Além disso, as bolhas podem ser determinadas por 3 grupos adimensionais, conforme demonstrado na figura 5 (CLIFT, 1978).

Figura 5. Relação do formato da bolha com o número de Reynolds, Eötvos e Morton.



Fonte: Adaptado de (CLIFT et al., 1978).

As características morfológicas das bolhas influenciam o escoamento, pois as forças interfaciais são condicionadas através de parâmetros, como área superficial das bolhas e a distribuição de pressão na superfície das mesmas.

Na operação de biorreatores, a dinâmica das fases gasosa e líquida é afetada pela influência mútua entre as fases, regida pelas forças interfaciais: arraste, sustentação e massa virtual. Uma partícula imersa em um fluido em agitação sofre o efeito de uma força de arraste, causada por dois mecanismos. O primeiro é provocado pelas tensões cisalhantes viscosas em volta da partícula, conhecido como fricção por contato. O outro, é o arraste de forma provocada por uma distribuição de pressão desigual que envolve diretamente a partícula em movimento, associado ao tamanho da bolha e sua forma. Os vórtices que estão na interface entre os fluidos provocam uma ação de empuxo, correspondente à sustentação

ou ascensão (TABIB et al., 2008). Já a força de massa virtual está diretamente relacionada à inércia do movimento relativo entre as fases. O deslocamento das bolhas provoca a aceleração do líquido nas regiões vizinhas. Este conceito pode ser mais bem compreendido pela alteração de energia cinética nas regiões que sofrem aceleração das partículas que se movimentam (JOSHI, 2001).

Essas interações podem ser estimadas por meio de correlações empíricas, podendo variar conforme as forças interfaciais (PANG, WEI, 2011), sendo capazes de gerar alterações nos resultados simulados. Para a obtenção de uma maior precisão, modelos baseados em simulações com fluidodinâmica computacional (CFD) podem ser utilizados (WANG et al., 2010).

Os diferentes tipos de reatores também podem ser comparados por meio de aspectos como a conversão de substrato e a concentração de produtos, desde que tenham tamanhos semelhantes. As características cinéticas dos reatores tubulares de fluxo pistonado (PFR) geralmente são as mesmas dos reatores em batelada. Portanto, o tempo de residência de um biorreator PFR é igual ao tempo de cultivo de um biorreator de tanque agitado operado em batelada. Neste último, a concentração é uniforme em todo volume de trabalho, diferentemente do que ocorre no PFR, no qual há formação de um gradiente ao longo do tubo (YANG, 2007).

As características cinéticas do processo são influenciadas diretamente pelos modelos dos biorreatores ou pelo seu modo de operação. Geralmente, a taxa da reação inicia alta nas culturas em batelada ou na entrada de biorreatores PFR, pois nesses momentos a concentração de substrato é maior. A taxa de reação vai diminuindo gradualmente conforme ocorre o consumo do substrato. Em reatores agitados mecanicamente e operados continuamente, o substrato é diluído rapidamente e a taxa da reação no biorreator é menor (YANG, 2007).

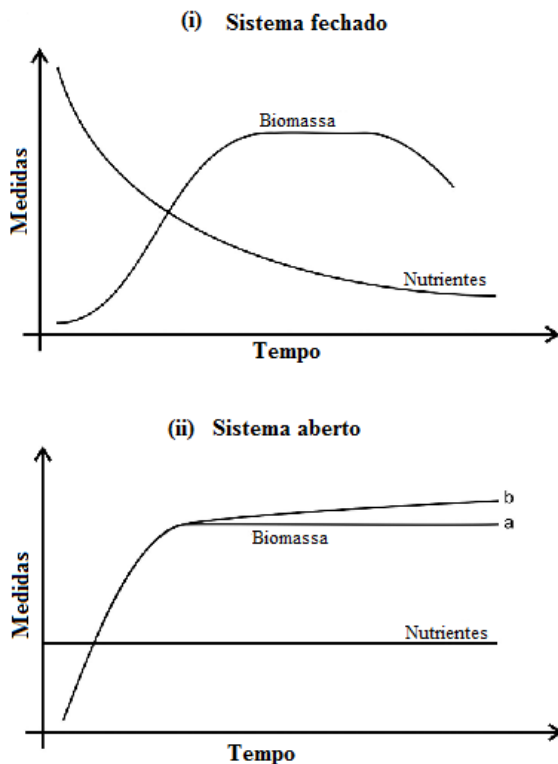
2.3 Biofilmes e biorreatores

Um modelo de biofilme *in vitro* ideal para o teste de estratégias terapêuticas contra a periodontite deve ter as seguintes características: o biofilme deve ser representativo da diversidade natural do microbioma em questão; o meio de crescimento deve ser representativo, e a farmacocinética dos agentes testados deve refletir a ação que ocorre na cavidade oral (GROSS et al., 2012).

Vários modelos de biofilme *in vitro* foram desenvolvidos e variam amplamente em complexidade e utilidade. Monoculturas têm sido usadas para determinar as atividades fisiológicas de espécies bacterianas específicas. Múltiplas espécies previamente definidas são empregadas para o estudo das interações entre elas. O uso de saliva ou de bactérias oriundas da placa bacteriana, embora tenham o objetivo de simular a diversidade natural do biofilme periodontal, dificultam a caracterização e a reprodutibilidade das amostras (ZHANG et al., 2015; FAN et al., 2012).

Em geral, os modelos de biofilme *in vitro* podem ser amplamente classificados em sistemas fechados ou abertos, dependendo da disponibilidade de nutrientes, conforme mostra a figura 6.

Figura 6. Diferenças conceituais entre sistemas fechados e abertos. (i) Sistema fechado: queda de nutrientes limitada ao tempo de duração do experimento. (ii) Sistema aberto: permite a adição simultânea e contínua de nutrientes e meio de crescimento, assim como a remoção de resíduos. Quando o sistema atinge um regime estacionário, como observado em um fermentador de filme de profundidade constante, a biomassa permanece constante (a). A biomassa aumenta com o tempo, conforme observado em um sistema de boca artificial (b).



Fonte: Adaptado de (SIM; DASHPER; REYNOLDS, 2016).

Em relação aos sistemas fechados, o modelo mais simples e antigo de biofilme é o de placa de ágar. O crescimento bacteriano que ocorre se assemelha a um biofilme constituído por células bacterianas inseridas em uma matriz extracelular. O ágar fornece um nutriente sólido

para o desenvolvimento bacteriano. Posteriormente, esta técnica foi refinada e permitiu o crescimento do biofilme bacteriano em filtros de membrana de nitrato de celulose de 0,45 μm , colocados sobre a superfície do ágar. Este modelo foi empregado para determinar a suscetibilidade de bactérias orais a determinados produtos químicos (BURNS; WILSON; PEARSON, 1996; DOBSON, WILSON, 1992; ONEILL; HOPE; WILSON, 2002).

Os biofilmes cultivados em placas de cultura celular de múltiplos poços permitem análises de alto rendimento, e também consistem em uma forma de sistema fechado. Nesse sistema os biofilmes podem conter uma ou diversas espécies (SIM; DASHPER; REYNOLDS, 2016), ou formarem um microcosmo (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007), assim como podem ser cultivados em condições aeróbicas ou anaeróbicas (ROBERTS; WEI; WU, 2002). Os poços, com meio de crescimento estéril, são inoculados com células bacterianas que se aderem às paredes e ao fundo dos poços e iniciam a formação dos biofilmes. Guggenheim et al. (2001) consideram ideal o uso da placa de 24 poços para o desenvolvimento de um modelo de placa supragengival (Zurich Biofilm Model) composta por *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus oralis* e *Veillonella dispar*, permitindo o estudo da fisiologia desses microrganismos e o teste de agentes antimicrobianos.

Entretanto, uma desvantagem do modelo de biofilme de Zurique consiste no cultivo das bactérias em condições anaeróbicas com exposição contínua aos carboidratos, o que não reflete as condições encontradas *in vivo*. Uma variação da placa de múltiplos poços, o *Calgary Biofilm Device*, consiste em pinos (pegs) posicionados na tampa de uma placa de 96 poços. Esses pinos servem como substrato para a formação do biofilme e permitem quantificar a biomassa do biofilme e analisar a viabilidade celular bacteriana. Contudo, sua grande limitação é a incapacidade de variação do substrato para a formação do biofilme (EXTERKATE; CRIELAARD; TEN CATE, 2010).

Um aprimoramento deste modelo, o modelo “*Amsterdam Active Attachment*” ou modelo de Adesão Ativo de Amsterdã (AAA), foi descrito (EXTERKATE; CRIELAARD; TEN CATE, 2010). Neste modelo, uma tampa de aço inoxidável, que se encaixa à placa de cultura de 24 poços, possui grampos, nos quais diferentes tipos de substrato podem ser fixados. Os substratos, portanto, ficam suspensos no inóculo bacteriano e permitem que haja um sistema de adesão ativo das bactérias,

diferentemente do modelo de Zurique, onde há precipitação dos microrganismos no fundo do poço para a formação do biofilme. O modelo AAA permite realizar um teste de elevado rendimento de múltiplos compostos em diferentes concentrações, com diferentes tempos de tratamento, dentro do mesmo experimento. Apesar de não apresentar as características de um modelo de fluxo contínuo, onde as forças de cisalhamento do fluxo de fluido simulam o fluxo de saliva e a pulsação de nutrientes/agentes, o modelo permite a formação de biofilmes reprodutíveis semelhantes à placa bacteriana. Além disso, também permite a simulação das mudanças de pH da placa que ocorrem *in vivo* após o consumo de carboidratos, como observado pela produção da curva de Stephan gerada por biofilmes polimicrobianos, quando expostos à sacarose (HUANG; EXTERKATE; CATE, 2012).

Koopman et al. (2014) mostraram que o modelo AAA possui limitações no que diz respeito à quantidade relativamente pequena de biomassa produzida, ao ambiente estático de exposição contínua à sacarose, e à falta de depuração metabólica. Tais desvantagens tornam o modelo inadequado para um planejamento experimental.

Os sistemas abertos, também denominados de sistemas de deslocamento de fluxo, permitem a adição simultânea e contínua de meio de crescimento e a remoção de nutrientes e produtos residuais do sistema (COENYE, NELIS, 2010). Sistemas com deslocamento de fluxo incluem o quimiostato, o fermentador de filme de profundidade constante, as células de fluxo e o modelo de biofilme de boca artificial (BUSSCHER; MEI, 2006; BRADSHAW et al., 1996). O modelo de sistema aberto permite que as bactérias cresçam na condição de regime estacionário, pois a taxa de crescimento microbiano é mantida constante sob condições experimentais constantes (MARSH, 1995; HERBERT, ELSWORTH, TELLING, 1956), inclusive com densidade bacteriana, substratos e concentrações de produtos metabólicos (LUEDEKING; PIRET, 1959). O conceito de regime estacionário pressupõe um equilíbrio estável das espécies microbianas componentes em uma cultura multiespécies. No entanto, as espécies individuais têm diferentes tempos de geração e exigências nutricionais, e atingem o regime estacionário em diferentes momentos (KINNIMENT et al., 1996). Levando em conta essas particularidades, uma abordagem que pode ser considerada é a avaliação da cultura multiespécie como uma unidade única de atividade na análise (MARSH, 1995).

2.3.1 Cultivo de biofilmes em quimiostato

Um quimiostato é um biorreator em que a vazão do afluente (meio fresco) é igual à vazão do efluente (produtos finais metabólicos, microrganismos e nutrientes remanescentes), de forma a manter o volume da cultura constante. No entanto, quimiostatos convencionais nem sempre são representativos das comunidades de biofilme. Para simular o ambiente da cavidade oral, o sistema modelo de quimiostato pode ser melhorado com substratos suspensos que fornecem superfícies sólidas para a formação de biofilme, permitindo a colonização microbiana com heterogeneidade espacial. Diferentes tipos de substrato já foram usados com o quimiostato, permitindo sua remoção em diferentes momentos do experimento para análise, ou para serem transferidos para outro quimiostato com uma condição ambiental diferente para testes adicionais (BRADSHAW et al., 1996; KEEVIL et al., 1987). Sendo assim, o uso de diferentes substratos pode ser vantajoso e simular melhor as condições desejadas num sistema.

3 DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE BIOFILME PERIODONTAL MULTIESPÉCIE EM BIORREATOR COM AGITAÇÃO

Capítulo formatado conforme as normas da revista “*Journal of Periodontal Research*”

3.1 RESUMO

Objetivo: Desenvolver um modelo de biofilme subgingival reproduzível em biorreator com agitação. **Material e Métodos:** Discos de dentes bovinos foram adaptados a um biorreator com o cimento da região cervical da raiz exposto ao meio de cultura contendo 31 espécies bacterianas, prevalentes nos casos de bolsa periodontal. Após incubação em condições anaeróbias por 3 e 7 dias, os biofilmes formados na superfície do substrato foram coletados para análise. O teste de viabilidade celular, por meio da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), determinou o número total de microrganismos viáveis presentes no biofilme; a análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permitiu observar a variedade morfológica das células bacterianas e a arquitetura do biofilme; e o teste de Hibridização DNA-DNA (Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação – DGGE) identificou e quantificou as espécies bacterianas presentes no biofilme. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste *U de Mann-Whitney* ($\alpha = 5\%$). **Resultados:** O número de UFCs dos biofilmes variou, porém sem diferença significativa entre os períodos de 3 e 7 dias ($P > 0,05$). À análise em MEV, foi observado, em ambos os períodos experimentais, um biofilme uniforme recobrendo a superfície do cimento, contendo bactérias de morfologia variada. Na análise DGGE, 29 espécies bacterianas foram identificadas no biofilme após 3 dias de cultivo, e 24, após 7 dias. Dentre as 31 espécies, *Actinomyces naeslundii* apresentou maior abundância no biofilme de 3 dias, comparado aos 7 dias ($P < 0,05$). **Conclusões:** Um modelo de biofilme subgingival de 3 e 7 dias de cultivo foi desenvolvido por meio do uso do biorreator com agitação, permitindo reproduzir, *in vitro*, comunidades microbianas complexas. Este modelo pode vir a ser um método auxiliar na mimetização do biofilme clínico periodontal.

Palavras-chave: biofilme multiespécies, biorreator com agitação, periodontite, eletroforese em gel de gradiente de desnaturação.

3.2 INTRODUÇÃO

O significado de “*biofilme*” tem se tornado cada vez mais complexo, em razão dos atributos fisiológicos dos microrganismos pertencentes à comunidade, como taxa de crescimento alterada e transcrição de diferentes genes, quando comparados aos dos microrganismos planctônicos. Atualmente, biofilme pode ser definido como uma “comunidade sésil de microrganismos irreversivelmente aderidos a um substrato ou entre si, envoltos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares produzida pelas próprias células, as quais exibem um fenótipo alterado em relação à taxa de crescimento e transcrição de genes” [1].

Na cavidade oral, as diferentes espécies bacterianas, dentre as mais de 700 já identificadas [2], organizam-se na forma de biofilme de acordo com a superfície aonde se estabelecem [3,4]. Na superfície externa dos dentes dois ambientes diferem entre si, o supragengival e o subgengival, ambos colonizados por complexos biofilmes polimicrobianos, também denominados de placa dental [5]. Esta, se não removida constantemente, gera um estado de disbiose, resultando, inicialmente, na gengivite, a qual pode agravar e evoluir para a periodontite [6].

Nos casos de periodontite, em razão da migração apical do epitélio juncional e da perda óssea, forma-se uma bolsa periodontal patológica inicialmente com profundidade de 4 mm, podendo evoluir e alcançar o ápice do dente, envolvendo uma área que varia entre 8 a 20 cm² [7,8]. Quanto maior a profundidade da bolsa periodontal, mais propício será o ambiente para a colonização de bactérias anaeróbicas. Contudo, apenas um seletivo subconjunto dos microrganismos é capaz de colonizar e sobreviver, adquirindo nutrientes, e desenvolvendo estratégias para combater as defesas inatas e adaptativas do hospedeiro [9].

Tendo em vista que a periodontite crônica é uma das principais causas de perda dentária na população e possui uma prevalência de aproximadamente 30% [10,11], variadas estratégias terapêuticas são empregadas na tentativa de eliminar ou reduzir os complexos biofilmes bacterianos associados à doença [12,13]. Torna-se imprescindível, portanto, obter um maior conhecimento sobre o processo de formação e

desenvolvimento dos biofilmes, e sobre as interações entre os microrganismos dentro das comunidades, a fim de permitir a elaboração de novas drogas ativas contra a doença periodontal [9].

Variados modelos *in vitro* têm sido propostos para investigar as comunidades bacterianas [14-19]. No entanto, a generalização dos resultados fica prejudicada, pois as espécies usadas para a formação dos biofilmes são variadas. Durante muito tempo, a maioria dos estudos empregou modelos simplificados com biofilmes de uma única espécie, o que não simula a realidade clínica [14-19]. Como alternativa, foram desenvolvidos modelos de biofilme que empregam um número maior espécies (entre 3 a 6), incluindo comensais e patógenos [20-22], porém pouco representativos da microbiota da bolsa periodontal.

Além das dificuldades relacionadas às espécies utilizadas, os modelos *in vitro* empregados para a simulação do biofilme periodontal também apresentam inconvenientes. A maioria deles emprega o modo estático [29-38], desconsiderando as condições da cavidade oral. Um modelo ideal deve permitir a manipulação e a simulação dos diferentes aspectos das condições bucais, como fluxo de saliva, tensão de oxigênio, pH e substratos disponíveis na superfície do biofilme [23-32].

Como alternativa para a simulação do ambiente oral, biorreatores podem ser utilizados. Os biorreatores têm sido comumente empregados na engenharia química desde 1940. Neles, ocorre uma série de reações químicas catalisadas por biocatalizadores, como por exemplo, as células microbianas, as quais têm sua capacidade metabólica mantida para a produção de diversos bioprodutos, como enzimas, vitaminas, antibióticos, e ácidos orgânicos [33]. O uso do biorreator para a concepção de um modelo de biofilme tem se mostrado viável [34], visto que as condições de cultivo como pH, agitação/fluxo, temperatura e condições atmosféricas podem ser controladas, mimetizando o ambiente subgingival, nos casos de periodontite [35].

Uma vez controlado o ambiente, empregados os patógenos associados à doença [36] e à luz do crescente conhecimento sobre as comunidades subgingivais [37], tem-se a oportunidade de desenvolver um modelo de estudo de biofilme *in vitro*, com potencial para futuros testes de antimicrobianos e terapias antibiofilme. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi desenvolver, por meio do uso de um biorreator com agitação, um modelo de biofilme periodontal reproduzível.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Espécies bacterianas, inóculo e meio de crescimento

Trinta e uma espécies bacterianas associadas à doença periodontal foram utilizadas: *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556); *Streptococcus gordonii* (ATCC 10558), *Actinomyces naeslundii I* (ATCC 12104), *Actinomyces israelii* (ATCC 12102), *Actinomyces naeslundii II (oris)* (ATCC 43146), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans b* (ATCC 29523), *Fusobacterium nucleatum ss polymorphum* (ATCC 10953), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175); *Streptococcus arginosus* (ATCC 33397), *Streptococcus constellatus* (ATCC 27823), *Veillonella parvula* (ATCC 10790), *Eikenella corrodens* (ATCC 23834), *Eubacterium nodatum* (ATCC 33099), *Gemella morbillorum* (ATCC 27824), *Parvimonas micra* (ATCC 33270), *Pronibacterium acnes I* (ATCC 11827), *Streptococcus intermedius* (ATCC 27335), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Campylobacter showae* (ATCC 51146), *Capnocytophaga gingivalis* (ATCC 33624), *Capnocytophaga ochracea* (ATCC 33596), *Capnocytophaga sputigena* (ATCC 33612), *Fusobacterium nucleatum ss vincenti* (ATCC 49256), *Fusobacterium periodonticum* (ATCC 33693), *Actinomyces gerencseriae* (ATCC 23860), *Actinomyces odontolyticus* (ATCC 17929), *Streptococcus oralis* (ATCC 35037), *Selenomonas noxia* (ATCC 43541), *Tannerella forsythia* (ATCC 43037). Todas as espécies foram mantidas a -80°C e reativadas, individualmente, a 5%, com caldo Brain Heart Infusion (BHI) (37 g/L) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Os inóculos foram mantidos a 37°C, em jarra de anaerobiose com gerador de atmosfera anaeróbia (PROBAC, São Paulo, Brasil), por 48 h, previamente ao início do experimento.

3.3.2 Preparo das amostras, biorreator e condições do meio de cultivo

Vinte dentes bovinos tiveram suas coroas e o terço apical e médio das raízes removidos com o auxílio de um disco diamantado dupla-face, sob refrigeração constante, de forma a se obter tubos correspondentes ao terço cervical radicular. Em seguida, de cada tubo, foram obtidos segmentos radiculares estandardizados (4 mm

comprimento x 4 mm largura x 2 mm espessura), os quais serviram de substrato para a formação do biofilme. Previamente ao início do experimento, os dentes foram autoclavados, por 15 minutos, a 121°C e 1 bar.

Inicialmente, o biorreator foi desinfetado com álcool 70% em água destilada (m/m). Após, os segmentos radiculares foram posicionados no interior da cuba, de forma que a superfície radicular externa (cimento) ficasse exposta e em contato com o meio de cultivo suplementado. O meio de cultivo (1 L) foi composto de 37g/L BHI (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 1,25g/L mucina de estômago de porco, 1 g/L L-cisteína, 1mg/L ácido glutâmico (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e 2 g/L bicarbonato de sódio P.A. ACS (Vetec, Duque de Caxias, Brasil). Após esterilização em autoclave (15 min, 1 bar, 121°C), foram adicionados ao meio 1 mg/L menadiona e 5 mg/L de hemina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) [38]. Após, as sondas de pH e de temperatura do equipamento foram calibradas e os parâmetros do biorreator ajustados, conforme segue: pH 7,4, temperatura 37°C, agitação 200 rpm, atmosfera 85% N₂, 5% CO₂, 10% H₂ a um fluxo constante de entrada de gás de $5,5 \times 10^{-8}$ m³/s. O biorreator operou durante uma hora sem bactérias para manter a estabilidade nos parâmetros mencionados [38].

3.3.3 Inoculação das bactérias

Após 48h de incubação dos inóculos, a densidade óptica (DO) de cada espécie bacteriana foi ajustada (DO 600 nm \approx 1,0). Em seguida, foram inoculadas a 10% no biorreator a uma quantidade de 3,2 mL por bactéria, totalizando aproximadamente 100 mL do total de meio do biorreator.

3.3.4 Períodos experimentais para formação do biofilme

Imediatamente após a inoculação das bactérias ao meio de cultura foi iniciada a contagem dos períodos de formação do biofilme – 3 e 7 dias. Cem mililitros de meio de cultivo foram renovados diariamente.

Após os períodos experimentais, o meio de cultura do biorreator foi removido e os segmentos radiculares cuidadosamente retirados da cuba, de forma a manter o biofilme aderido, permitindo a

realização das diferentes análises, conforme descrito a seguir. O experimento foi realizado em triplicata.

3.3.5 Teste de viabilidade celular bacteriana

O número total de células bacterianas viáveis do biofilme aderidas ao cimento de seis segmentos radiculares foi analisado por meio de plaqueamento e contagem de UFCs. Imediatamente após a remoção dos segmentos radiculares da cuba do biorreator, o biofilme foi removido com auxílio de uma ponta ultrassônica e ressuspenso em 900 uL de solução salina estéril (0,9% v/v) [39]. Após, esta suspensão bacteriana foi sonicada novamente e submetida às diluições decimais sucessivas. Cem microlitros das suspensões bacterianas correspondentes às diluições 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} foram plaqueados, em triplicata, em BHI ágar. As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose com atmosfera anaeróbia a 37°C por 48 h a 72 h. Após esse período, o número de UFCs/mL foi determinado.

3.3.6 Análise da morfologia celular bacteriana e arquitetura do biofilme

A morfologia das células bacterianas e a arquitetura do biofilme foram analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (modelo JEOL JSM-6390LV Scanning Electron Microscope). Imediatamente após a remoção dos segmentos radiculares ($n = 3$) do biorreator, os biofilmes foram fixados durante 12 h a 4°C em glutaraldeído (2,5% v/v), lavados com tampão fosfato 0,2 M durante 1 h, com duas trocas, seguido de lavagem breve com água deionizada. Em seguida, foi realizada a desidratação com concentrações ascendentes de álcool etílico (25% - 20 minutos, 50% - 20 min, 75% - 20 min, 95% - 20 min, e 100% - 1 hora) [40]. Por fim, os segmentos radiculares com o biofilme aderido foram posicionados em stubs e recobertos com ouro, e então submetidos à análise. Diferentes áreas ao longo da superfície de cimento recoberta pelo biofilme foram analisadas e fotomicrografias das áreas representativas foram obtidas, com aumentos entre 1.000 e 7.000 x.

3.3.7 Hibridização DNA-DNA - Checkerboard

A determinação da diversidade de espécies bacterianas que se aderiram ao biofilme, dentre as 31 inicialmente inoculadas, e sua quantificação, foram realizadas por meio do método semi-quantitativo de hibridização DNA-DNA (checkerboard) (DGGE) [26,39].

O biofilme de três segmentos radiculares foi removido conforme mencionado anteriormente, e ressuspensão em tubos Eppendorfs contendo 150 μ L de Tris EDTA (TE) [10mM de Tris-HCl ultrapuro e 1mM de EDTA ultrapuro, [pH 7,6] (Invitrogen, Carlsbad, Estado Unidos)]. Logo após, 100 μ L de solução de NaOH 0,5 M (Lafan, Várzea Paulista, Brasil) foram adicionados, e os tubos agitados por 30 segundos [36].

As amostras coletadas foram fervidas por 10 minutos para promover a lise e desnaturação celular, e neutralizadas com 0,8 mL de acetato de amônio 5 M. Em seguida, foram analisadas individualmente para a determinação da presença e quantidade de cada espécie bacteriana ao biofilme, por meio da hibridização DNA-DNA. O DNA liberado foi fixado em linhas individuais de uma membrana de nylon carregada positivamente (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Estados Unidos), utilizando um dispositivo de checkerboard (Minislot 30, Immunetics, Cambridge, Estados Unidos). Quarenta sondas de DNA genômico inteiro, marcadas com digoxigenina (Roche Applied Science, Indianapolis, Estados Unidos) foram construídas e hibridizadas perpendicularmente às linhas das amostras usando um aparelho Miniblotter 45 (Immunetics), e foram detectadas usando anticorpo conjugado com fosfatase para digoxigenina (Roche Applied Science, Indianapolis, Estados Unidos) [36].

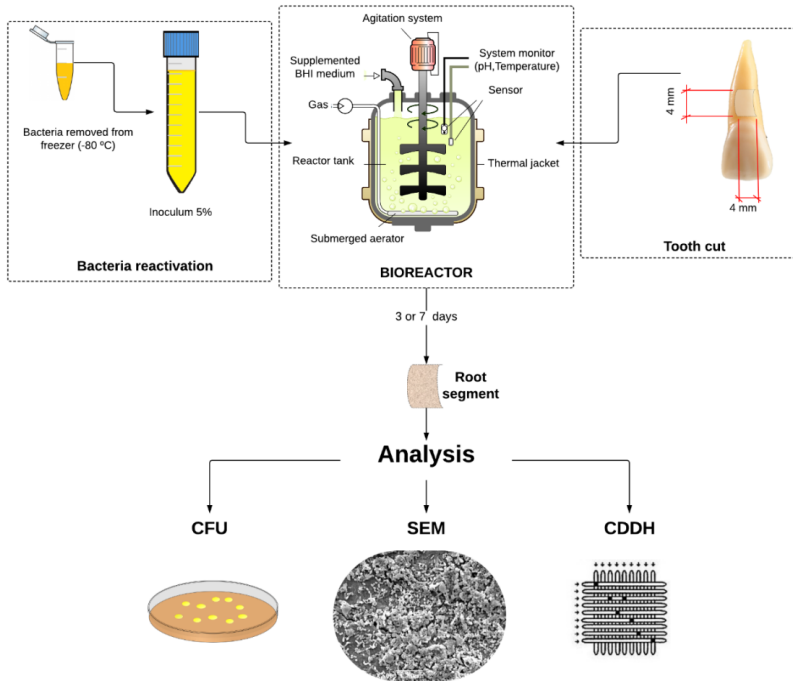
Os resultados obtidos foram detectados usando o substrato CDP Star / Amersham Life Sciences. Após a incubação em solução contendo o substrato CDP-Star (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra), as membranas foram colocadas em um cassete de autorradiografia sob um filme radiográfico (X-Omat; Kodak, Rochester, Estados Unidos), desenvolvido para detecção de sinal de quimioluminescência. Os sinais foram avaliados visualmente comparados aos padrões de 10^5 e 10^6 células bacterianas de espécies testadas nas últimas duas linhas da mesma membrana. Este forneceu o número aproximado de células bacterianas por amostra para cada cepa avaliada. A falha em detectar um sinal foi registrada como zero. A

sensibilidade deste ensaio foi escolhida para permitir a detecção de aproximadamente 10^4 células de uma espécie bacteriana, ajustando a concentração de cada sonda de DNA. Este procedimento foi realizado para fornecer a mesma sensibilidade de detecção para todas as espécies (as concentrações foram ajustadas para que todas as sondas tivessem uma intensidade de sinal semelhante). As contagens abaixo do limite de detecção do método (10^4) foram consideradas como zero, para o cálculo das contagens médias da respectiva espécie bacteriana. Para facilitar a análise semi-quantitativa de sinais de quimioluminescência para cada microrganismo em cada amostra, a intensidade de contaminação pelas diferentes espécies bacterianas foi avaliada nos seguintes níveis: 10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 e 10^7 .

3.3.8 Desenho Experimental

O processo, contendo todas as etapas envolvidas, é apresentado a seguir na figura 1.

Figura 1. Desenho experimental: reativação das espécies bacterianas, corte do dente, cultivo no biorreator (formação do biofilme) e metodologias de análise do biofilme: UFC, MEV, e DGGE.



3.3.9 Análise estatística

Os valores médios de UFC/mL obtidos no teste de viabilidade celular foram determinados e os dados normalizados a partir da transformação em \log_{10} . O teste *U de Mann-Whitney* foi aplicado para a comparação total de UFCs viáveis do biofilme entre os períodos de 3 e 7 dias de cultivo, independentemente da espécie. Os valores de contagem de cada espécie bacteriana, obtidos por meio de hibridização DNA-DNA, também foram comparados pelo teste *U de Mann-Whitney*, assim como os valores da contagem bacteriana total para cada período. Todas as análises consideraram um nível de significância de 5% e foram realizadas com o auxílio do software SPSS 21.0 (IBM, Armonk, NY, USA). A

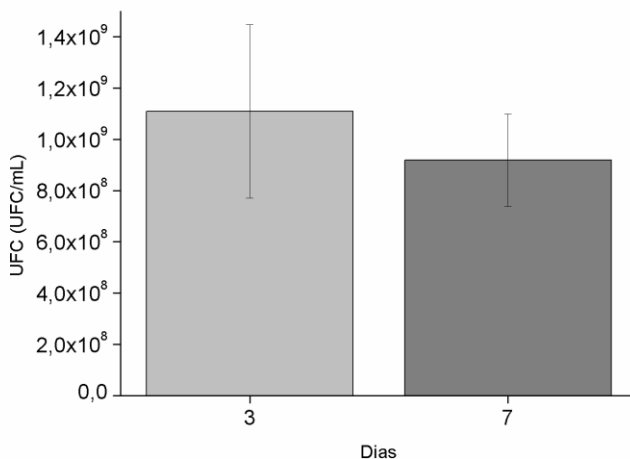
morfologia celular e a arquitetura do biofilme foram descritas baseadas em uma análise visual.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Viabilidade celular bacteriana

Na figura 2 são mostrados os valores médios de células bacterianas viáveis do biofilme (UFC/mL). Os biofilmes coletados dos segmentos radiculares após 3 dias de cultivo continham $1,1 \times 10^9$ ($\pm 3,3 \times 10^8$) UFCs por biofilme, sem diferença significativa comparado aos biofilmes coletados após 7 dias, os quais apresentaram $9,2 \times 10^8$ ($\pm 1,8 \times 10^8$) UFCs por biofilme ($p > 0,05$).

Figura 2. Distribuição das células viáveis presentes no biofilme após os períodos de cultivo de 3 e 7 dias.

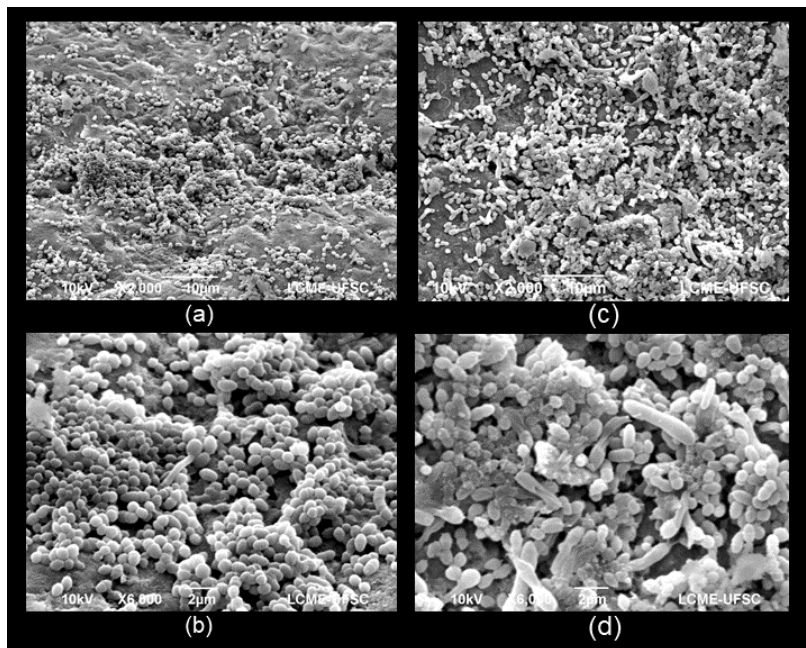


3.4.2 Morfologia celular bacteriana e arquitetura do biofilme

Na análise em MEV foram observados biofilmes contendo células bacterianas de morfologia variada recobrando uniformemente a superfície do cimento, tanto nos segmentos submetidos ao período

experimental de 3 dias, como no de 7 dias (Fig. 3). Em ambos os biofilmes a morfologia celular predominante foi cocóide. No entanto, aos 7 dias, foi observada uma presença maior de células do tipo bastonete.

Figura 3. Biofilme recobrendo a superfície do cimento radicular após 3 dias (a-b) e 7 dias de cultivo (c-d) (magnificação 2000 e 6000 x).

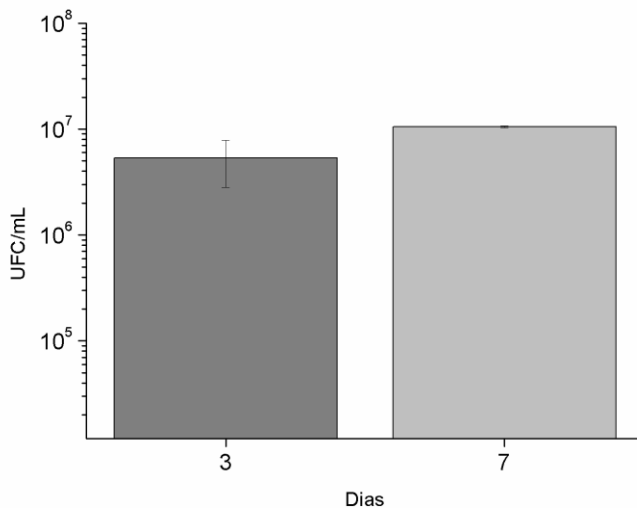


3.4.3 Hibridização DNA-DNA - Checkerboard

Das 31 espécies bacterianas inicialmente inoculadas no biorreator, 29 (93,6%) estavam presentes no biofilme de 3 dias e 24 (77,4%), no de 7 dias. Espécies precursoras da periodontite, como *S. sanguinis*, *S. mitis*, e *A. actinomycetemcomitans* foram identificadas em ambos os biofilmes.

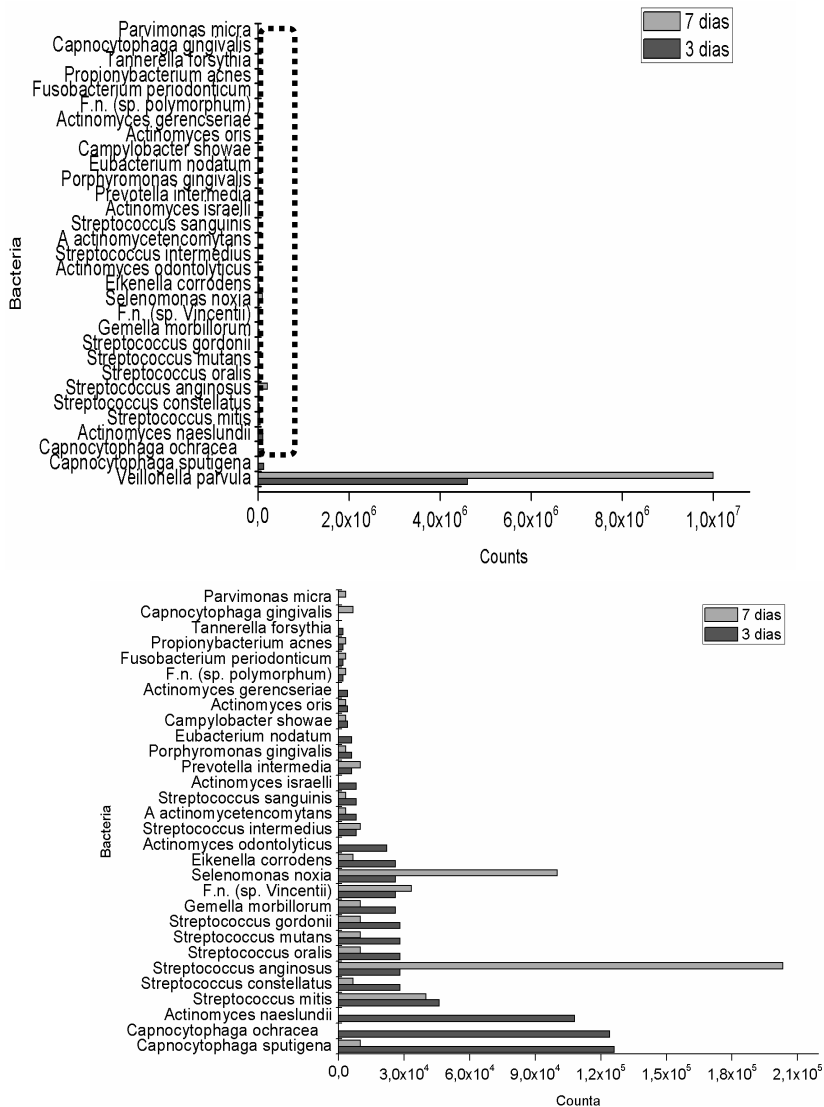
Apesar da diferença no número de espécies identificadas, quando realizada a quantificação das bactérias, independentemente da espécie, não foi evidenciada diferença significativa entre os biofilmes de 3 e 7 dias ($p > 0,05$) (Fig. 4).

Figura 4. Número total de bactérias nos biofilmes de 3 e 7 dias, obtido por meio da análise DGGE.



A espécie que apresentou maior abundância, nos dois períodos de análise, foi *V. parvula* ($\approx 10^7$ UFC/mL). *A. naeslundii* foi a única espécie com significativamente maior quantidade no biofilme de 3 dias, comparado ao de 7 dias ($p < 0,05$). Na figura 5 são apresentadas todas as espécies identificadas e presentes nos biofilmes de 3 e 7 dias, com suas respectivas quantidades estimadas.

Figura 5. Quantificação das espécies bacterianas identificadas nos biofilmes de 3 e 7 dias de cultivo no biorreator. Região pontilhada expandida na parte inferior.



3.5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo de desenvolver um modelo de biofilme subgingival reproduzível em biorreator com agitação.

As diferentes espécies bacterianas foram capazes de se estabelecer na forma biofilme, por meio de adesão e colonização da superfície do cimento radicular, mantendo-se viáveis, independentemente do período experimental analisado. De maneira geral, um valor médio de 10^9 UFCs viáveis foi observado, tanto no biofilme novo/inicial (3 dias), quanto no biofilme maduro (7 dias). Estes resultados corroboram os valores de UFCs viáveis obtidos em outras investigações, quando espécies bacterianas provenientes da cavidade oral foram cultivadas individualmente [41], em pequenos grupos de espécies, ou em grande diversidade, a partir da saliva humana [42].

A análise em MEV permitiu determinar, por meio da observação da morfologia celular, que em ambos os períodos experimentais, espécies bacterianas variadas estavam aderidas e colonizando a superfície do cimento radicular, estabelecendo-se na forma de biofilme. Em um estudo prévio, em que o biofilme periodontal foi reproduzido com um número limitado de seis espécies bacterianas e em modo estático, também foram observadas bactérias aderidas ao substrato após dois dias de cultivo [43]. Foi observado um predomínio de bactérias de morfologia cocóide, recobrando a maior parte do cimento, principalmente no biofilme de 3 dias. Este achado corrobora com resultados de estudos prévios, os quais relatam que colonizadores do gênero *Streptococcus* são os precursores do biofilme dental, chegando a 80% do número total de bactérias aderidas [44, 45, 46]. No biofilme de 7 dias foi possível detectar uma mudança na morfologia, com o aparecimento de estruturas em formato de bastonetes. À medida que a população bacteriana aumenta no biofilme pela adição de mais camadas, o ambiente se torna ainda mais adequado para a colonização de espécies anaeróbias levando à proliferação dos colonizadores secundários, principalmente bastonetes gram-negativos e organismos filamentosos [44, 47]. Dentre estes bastonetes, destacam-se as fusobactérias, consideradas pontes entre os colonizadores iniciais e os outros colonizadores, pois são singularmente capazes de se co-agregar com todas as outras espécies dentro do biofilme [48].

Por meio da análise DGGE, foi constatado que, das 31 espécies bacterianas inoculadas, 29 estavam presentes no biofilme de 3 dias, e 24, no de 7 dias. No início do cultivo, os microrganismos presentes no interior da estrutura dos biofilmes estão menos expostos às carências nutricionais, mudanças de pH, radicais de gases, entre outros fatores. Conseqüentemente, o número de espécies bacterianas tende a ser maior em cultivos onde as bactérias possuam fácil acesso aos nutrientes do meio e não estejam situadas profundamente no interior do biofilme [49]. Tendo em vista que os padrões temperatura, pH, volume do gás fornecido ao meio e agitação foram constantes ao longo dos dois períodos experimentais, o único fator limitante para o crescimento e adesão das bactérias no período experimental de 7 dias foi a diminuição dos nutrientes presentes no sistema [50]. Além disso, a baixa reatividade das células do biofilme à introdução de nutrientes frescos pode ser uma estratégia de sobrevivência empregada pelos microrganismos [51].

Dentre as 29 espécies bacterianas identificadas no biofilme de 3 dias, algumas destacam-se pela sua importância no processo da doença periodontal [52, 53]. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi recentemente associado como um patógeno predominante na periodontite agressiva [32, 33, 34], além de ser um patógeno oral putativo [43]; *T. forsythia* mostrou-se predominante na periodontite [33]; *S. mitis*, *S. oralis*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *E. corrodens* e *P. intermedia* foram consideradas comensais “verdadeiras” [54-58]; e *P. gingivalis* e *S. mutans* caracterizam-se como patógenos orais putativos [59].

Uma vez que a maioria das espécies bacterianas associadas aos casos de periodontite foi capaz de se aderir à superfície radicular, com destaque para os principais agentes etiológicos da doença - *P. gingivalis*, *T. forsythia*, e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [60] - e se desenvolver na forma de biofilme, é possível afirmar que o modelo de biofilme subgingival desenvolvido no presente estudo é reproduzível em biorreator com agitação.

P. gingivalis não foi observada no biofilme de 3 dias de cultivo. Apesar de possuir o formato cocóide, esta espécie somente foi observada no biofilme de 7 dias. Esse achado demonstra a necessidade de interações com outras bactérias colonizadoras primárias, e a partir dessas interações, *P. gingivalis* consegue agregar-se ao biofilme [61]. Já *C. gingivalis* não possui formato cocóide e, portanto, apresenta maior dificuldade em se aderir ao biofilme, o que justifica sua ausência em 3 dias de cultivo, e sua presença em 7.

Uma das espécies fundamentais para o desenvolvimento e manutenção da periodontite, *A. naeslundii*, foi observada em número significativamente maior no biofilme de três dias, reforçando seu papel como colonizadora inicial [44,47].

É provável que os fluxos simulados no biorreator e o maior número de espécies utilizadas na presente investigação tenham mimetizado de forma mais fidedigna a realidade clínica, permitindo a formação de um biofilme próximo ao encontrado clinicamente [62].

3.6 LIMITAÇÕES

Ainda são necessários experimentos com algumas variações, no que diz respeito, por exemplo, à quantidade de nutrientes a ser suplementada ao meio de cultivo, a velocidade de agitação do biorreator, impelidores e espécies bacterianas empregadas, a fim de garantir um refinamento no modelo apresentado.

Outro importante fator que influencia a formação dos biofilmes e aumenta sua resistência é a presença de matrizes adesivas, predominantemente compostas por exopolissacarídeos [47], que não foram empregadas neste trabalho.

3.7 DIREÇÕES DO FUTURO DA PESQUISA

O presente modelo de biofilme subgingival é inovador, porém ainda apresenta limitações e não simula 100% das condições encontradas clinicamente. Das aproximadamente 400 espécies bacterianas já detectadas em bolsas subgingivais, cerca de 70 predominam [63], número que se pretende alcançar em estudos futuros.

Amostras de biofilme também foram coletadas e armazenadas para futura quantificação das espécies bacterianas, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), a fim de comprovar com maior especificidade, os resultados já obtidos.

O modelo de biofilme *in vitro* desenvolvido neste estudo pode vir a ser usado para avaliação e comparações de terapias e atividade de antimicrobianos, não necessitando de doadores de material biológicos para tais testes.

Outra aplicação futura pode ser associada ao desenvolvimento de modelos de biofilmes patogênicos de outras regiões da cavidade oral.

O modelo de biofilme subgingival proposto tem potencial para auxiliar no estudo do comportamento e das interações que ocorrem entre os microrganismos, individualmente ou como membros de grupos, assim como avaliar suas propriedades patogênicas. Futuros trabalhos nessa direção podem levar ao refinamento das estratégias antimicrobianas na terapia periodontal.

3.8 CONCLUSÃO

O modelo de biofilme subgingival, de 3 e 7 dias de cultivo, foi desenvolvido por meio do uso do biorreator com agitação, permitindo reproduzir, *in vitro*, comunidades microbianas subgingivais complexas, com possível aplicação para testes em medicamentos e terapias antimicrobianas. Os modelos apresentaram resultados semelhantes em relação à viabilidade, por meio das unidades formadoras de colônias. Foram observados biofilmes uniformes na superfície do cimento em ambos os períodos experimentais. No entanto, a morfologia das bactérias presentes foi diferente, assim como a quantidade de espécies bacterianas presentes avaliada através da análise de DGGE.

Agradecimentos

Somos gratos ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina por colaborar com as imagens do MEV, aos órgãos de financiamento CAPES e CNPq, ao Laboratório de Engenharia Biológica (LiEB-UFSC) pela estrutura, e à Universidade de Guarulhos (UnG), pela colaboração no desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- [1] Donlan, R. M.; Costerton, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clinical Microbiology Reviews*; 2002, v. 15, n. 2, p. 167-193.
- [2] Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, v. 43, p. 5721-5732.

- [3] Rossoni RD, Velloso MS, Barros PP, et al. Inhibitory effect of probiotic *Lactobacillus* supernatants from the oral cavity on *Streptococcus mutans* biofilms. *Microbial Pathogenesis*, 2018, v. 123, p.361-367.
- [4] Simon-Soro A, Tomas I, Cabrera-Rubio R, Catalan MD, Nyvad B, Mira A. Microbial geography of the oral cavity. *J Dent Res*. 2013, v.92, p. 616 - 621.
- [5] Knight ET, Liu J, Seymour GJ, Faggion CM Jr, Cullinan MP. Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2016, v. 71, p. 22 – 51.
- [6] Kelly H, Deasy P, Ziaka E, Claffey, N. Formulation and preliminary in vivo dog studies of a novel drug delivery system for the treatment of periodontitis. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, v. 274, p. 167 - 183.
- [7] Matuliene U, Brägger BE, Pjetursson GE. Influence of residual pockets on progression of periodontitis and tooth loss: Results after 11 years of maintenance. *J. Clin. Periodontol*, 2008, v. 35, p. 685 – 695.
- [8] Hernandez M, Abusleme L, Garcia-Sesnich J et al. Host-Pathogen Interactions in Progressive Chronic Periodontitis *J. Dent. Res*, 2011, v. 90, p. 1164 – 1170.
- [9] Spolidorio DMP, Duque C. **Microbiologia e Imunologia Geral e Odontológica**. 2013, São Paulo: Artes Médicas, 144 p.
- [10] Domisch H, Kebschull M Chronic periodontitis. Carranza's clinical periodontology, 12th ed. Elsevier health sciences; 2014. p. 309
- [11] Burt B. Research. Science and therapy committee of the american academy of periodontology. position paper: epidemiology of periodontal diseases. *J Periodontol*, 2005, v. 76, p.1406 - 1419.
- [12] Griffen AL, Beall JC, Campbell JH et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *The ISME Journal*, 2011, v. 6, p.1176-1185.

- [13] Van der Weijden FA, Van der Sluijs E, Ciancio SG, Slot DE. Can chemical mouthwash agents achieve plaque/gingivitis control?, *Dent Clin N Am*, 2015, v.59, p. 799 - 829.
- [14] Beyth N, Bahir R, Matalon S, Domb AJ, Weiss EI. Streptococcus mutans biofilm changes surface-topography of resin composites. *Dent Mater*, 2008, v. 24, 732 - 736.
- [15] Fucio, SB, Carvalho, FG, Sobrinho, LC, Sinhoreti, MA, Puppini-Rontani, RM, Fucio, SBP. The influence of 30-day-old Streptococcus mutans biofilm on the surface of esthetic restorative materials—an in vitro study. *J Dent*. 2008, v. 36, p. 833 - 839.
- [16] Gyo M, Nikaido T, Okada K, Yamauchi J, Tagami J, Matin K. Surface response of fluorine polymer-incorporated resin composites to cariogenic biofilm adherence. *Appl Environ Microbiol*, 2008, v. 74, p. 1428 - 1435.
- [17] Kantorski KZ, Scotti R, Valandro LF, Bottino MA, Koga-Ito CY, Jorge AO. Adherence of Streptococcus mutans to uncoated and saliva-coated glass ceramics and composites. *Gen Dent*, 2008, v. 56, p. 740 – 747.
- [18] Buegers R, Schneider-Brachert W, Hahnel S, Rosentritt M, Handel G. Streptococcal adhesion to novel low-shrink silorane-based restorative. *Dent Mater*, 2009, v. 25, p. 269 - 275.
- [19] Fucio SB, Puppini-Rontani RM, De Carvalho FG, Mattos-Graner Rde O, Corrêa-Sobrinho L, Garcia-Godoy F. Analyses of biofilms accumulated on dental restorative materials. *Am J Dent*, 2009, v. 22, p. 131 - 136.
- [20] Dezelic T, Guggenheim B, Schmidlin PR. Multi-species biofilm formation on dental materials and an adhesive patch. *Oral Health Prev Dent*, 2009, v. 7, p. 47 - 53.
- [21] Rinastiti M, Ozcan M, Siswomihardjo W, Busscher HJ, Van Der Mei H.C. Effect of biofilm on the repair bond strengths of composites. *J Dent Res* 2010, v. 89, 1476 - 1481.

- [22] Hayati F, Okada A, Kitasako Y, Tagami J, Matin, K. An artificial biofilm induced secondary caries model for in vitro studies. *Aust Dent J*, 2011, v. 56, p. 40 - 47.
- [23] Sissons CH, Cutress TW, Hoffman MP, Wakefield JS. A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, pH, and mineralization. *J Dent Res*, 1991, v. 70, p. 1409 - 1416.
- [24] Sissons CH, Wong L, Cutress TW. Patterns and rates of growth of microcosm dental plaque biofilms. *Oral Microbiol Immunol*, 1995, v. 10, p. 160 - 167.
- [25] Pratten J, Smith AW, Wilson M. Response of single 717 species biofilms and microcosm dental plaques to pulsing with chlorhexidine. *J Antimicrob Chemother*, 1998, v. 42, p. 453 - 459.
- [26] Pratten J, Andrews CS, Craig DQ, Wilson M. Structural studies of microcosm dental plaques grown under different nutritional conditions. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, v. 189, p. 215 - 218.
- [27] Matharu S, Spratt DA, Pratten J, et al. A new in vitro model for the study of microbial microleakage around dental restorations: a preliminary qualitative evaluation. *Int Endod J*, 2001, v. 34, p. 547 - 553.
- [28] Badawi H, Evans RD, Wilson M, Ready D, Noar JH, Pratten, J. The effect of orthodontic bonding materials on dental plaque accumulation and composition in vitro. *Biomaterials*, 2003, v. 24, p. 3345 - 3350.
- [29] Mcbain AJ, Sissons C, Ledder RG, Sreenivasan PK, De Vizio W, Gilbert P. Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. *J Appl Microbiol*, 2005, v. 98, p. 624 - 634.
- [30] Ledder RG, Gilbert P, Pluen A, Sreenivasan PK, De Vizio W, Mcbain A. Individual microflora beget unique oral microcosms, 2006, *J Appl Microbiol*, v. 100, p. 1123–1131.

[31] Filoche SK, Soma KJ, Sissons CH. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiol Immunol*, 2007, v. 22, p.73 -79.

[32] Cenci MS, Pereira-Cenci T, Cury JA, Ten Cate JM. Relationship between gap size and dentine secondary caries formation assessed in a microcosm biofilm model. *Caries Res*, 2009, v. 43, p. 97 - 102.

[33] Schmidell W, Facciotti MCR. Biorreatores e processos fermentativos. *Engenharia Bioquímica (Biotecnologia Industrial)*, Blucher, 2001, v. 2.

[34] Sim CPC, Dashper SG, Reynolds EC. Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents. *Journal Of Dentistry*, 2016, v. 50, p. 1 - 11.

[35] Mathes, SH, Wohlwend G , Uebersax G et al. A bioreactor test system to mimic the biological and mechanical environment of oral soft tissues and to evaluate substitutes for connective tissue grafts. *Biotechnology And Bioengineering* ,2010, v. 107, p.1029 – 1039.

[36] Feres M, Teles F, Teles R, Figueiredo LC, Faveri M. The subgingival periodontal microbiota of the aging mouth. *Periodontology* 2000, 2016, v. 72, p. 30 - 53.

[37] Exterkate RA, Crielaard W, Ten Cate JM. Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. *Caries Res*. 2010, v. 44, p. 372 - 379.

[38] Álvarez G, González H, Isabal S, Blanc V, Leon R. Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with propidium monoazide. *Amb Express*, 2013, v. 3, n. 1.

[39] Mendes LCN, Marques LC, Bechara GH, Peiró JR. Experimental peritonitis in horses: peritoneal fluid composition. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 1999, v. 51, p.217 – 222.

[40] de Almeida J, Cechella BC, Bernardi AV, de Lima Pimenta A, Felipe WT. Effectiveness of nanoparticles solutions and conventional

endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Indian J Dent Res*, 2018, v. 29, p. 347-51.

[41] He J, Bao Y, Li J, Qiu Z, Liu Y, Zhang X. Nanocomplexes of carboxymethyl chitosan/amorphous calcium phosphate reduce oral bacteria adherence and biofilm formation on human enamel surface. *Journal Of Dentistry*, 2019, v. 80, p.15 – 22.

[42] HUANG X, Zhang K, Deng M, et al. Effect of arginine on the growth and biofilm formation of oral bacteria. *Archives Of Oral Biology*, 2017, v. 82, p. 256 -262.

[43] Wang D, Haapasalo M, Gao Y, Ma J, Shen Y. Antibiofilm peptides against biofilms on titanium and hydroxyapatite surfaces. *Bioactive Materials*, 2018, v. 3, n. 4, p.418 - 425.

[44] Teughels W, Quirynen M, Jakubovics N. Periodontal microbiology Newman HH, Takei MG, Klokkevold PR, *et al.* (Eds.), Carranza's clinical periodontology (11th edition), Elsevier, 2012, p. 232 - 270.

[45] Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial ecology. Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson HF (Eds.), *Oral microbiology and immunology* (2nd edition), 2014, ASM Press, Washington, DC, p. 97-102.

[46] Krom BP, Kidwai S, Ten Cate JM. *Candida* and Other Fungal Species: Forgotten Players of Healthy Oral Microbiota, *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2014, v.93, p. 445 – 451.

[47] Scannapieco FA. The oral environment. Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson HF (Eds.), *Oral microbiology and immunology* (2nd edition), ASM Press, 2014, Washington, DC, p. 57 – 62.

[48] Hajishengallis G, Kawai T. Immunopathogenic mechanisms in periodontal disease. Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson HF (Eds.), *Oral microbiology and immunology* (2nd edition), 2014, ASM Press, Washington, DC p. 287.

- [49] Fujise S, Chen W, Rico S, Chen C. Clonal Diversity and Stability of Subgingival *Eikenella corrodens*. J Clin Microbiol, 2004, v. 42, p. 2036 - 2042.
- [50] Hohwy J, Reinholdt J, Kilian M. (2001) Population dynamics of *Streptococcus mitis* in its natural habitat. Infect Immun, 2001, v. 69, p. 6055 – 6063.
- [51] Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol, 2001, v. 183, p. 3770 - 3783.
- [52] Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000, 1994, v. 5, p. 66 – 77.
- [53] Carrizales-Sepúlveda EF, Ordaz-Farías U, Vera-Pineda R, Flores-Ramirez R. Periodontal Disease, Systemic Inflammation and the Risk of Cardiovascular Disease. Heart, Lung And Circulation, 2018, v. 27, p.1327 - 1334.
- [54] Bowden GHW, Nolette N, Ryding H, Cleghorn BM. Evidence for recombination between a sialidase (nanH) of *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces oris*, previously named ‘*Actinomyces naeslundii* genospecies 1 and 2’. J Dent Res, 1999, v. 78, p. 1800 - 1809.
- [55] Chen C, Ashimoto Uma. Clonal diversity of oral *Eikenella corrodens* within individual subjects by arbitrarily primed PCR. J Clin Microbiol, 1996, v. 34, p. 1837 – 1839.
- [56] Paddick JS, Brailsford SR, Kidd EA, et al. Effect of the environment on genotypic diversity of *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus oralis* in the oral biofilm. Appl. Environ. Microbiol, 2003, v. 69, p. 6475 - 6480.
- [57] Teanpaisan R, Douglas CW, Eley AR, Walsh TF. Clonality of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolated from periodontally diseased and healthy sites. J Periodontal Res. 1996, v. 31, p. 423 - 432.
- [58] Conrads L, Herrler Um, Moonen I, Lampert F, Schnitzler N. Flow cytometry to monitor phagocytosis and oxidative burst of anaerobic

periodontopathogenic bacteria by human polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res*, 1999, v. 34, p. 136 - 144.

[59] Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza: *Periodontia Clínica*. 12. ed. Los Angeles: Elsevier, 2016. 856 p.

[60] Ezzo PJ, Cutler CW. Risk Factors for Periodontitis. *Periodontol* 2000, 2003, v. 32, p. 24 - 35.

[61] Jakubovics, Nicholas S.. Intermicrobial Interactions as a Driver for Community Composition and Stratification of Oral Biofilms. *Journal Of Molecular Biology*, [s.l.], v. 427, n. 23, p.3662-3675, nov. 2015.

[62] Sánchez MC, Toledano Osorio M, Bueno J, et al. Antibacterial effects of polymeric PolymP-n Active nanoparticles. An in vitro biofilm study. *Dental Materials*, 2019, v. 35, p.156 – 168.

[63] Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology* 2000, 2006, v. 42, p.80 - 87.

4 CINÉTICA DE FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM BIOFILME PERIODONTAL MULTIESPÉCIES EM BIORREATOR COM AGITAÇÃO

Capítulo formatado conforme artigos da revista Science Chemical Engineering.

4.1 DESTAQUES

- A cinética do cultivo permitiu validar um modelo de biofilme periodontal de 3 dias, por meio do uso do biorreator com agitação, reproduzindo, *in vitro*, comunidades microbianas subgingivais complexas.
- 93,5% das espécies inoculadas estavam presentes no biofilme após 3 dias de cultivo.
- O novo modelo de biofilme recebe destaque devido ao grande número de espécies bacterianas aderidas e à simulação de fluxos, por meio da agitação do biorreator.

4.2 RESUMO

O objetivo deste estudo foi validar, através da caracterização e avaliação da cinética de formação, um modelo de biofilme periodontal *in vitro*, com comunidades microbianas subgingivais complexas por meio do uso do biorreator com agitação. Discos de dentes bovinos foram adaptados a um biorreator com o cimento da região cervical da raiz exposto ao meio de cultura contendo 31 espécies bacterianas prevalentes nos casos de periodontite. Após incubação em condições anaeróbias por 3 dias, os biofilmes formados na superfície do substrato foram coletados para análise. Durante o cultivo foi analisado o crescimento bacteriano, por meio da leitura de densidade óptica e massa seca. O teste de viabilidade celular permitiu comparar, por meio da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), o número total de microrganismos viáveis presentes no biofilme em cada período; a análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permitiu observar a variedade morfológica das células bacterianas e a arquitetura do biofilme; e o teste

de Hibridização DNA-DNA (Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação – DGGE) identificou as espécies bacterianas presentes no biofilme. Os dados da velocidade específica e da viabilidade celular foram analisados estatisticamente pelos testes ANOVA e *post hoc* Tukey ($\alpha = 5\%$). As análises em MEV e DGGE foram feitas de forma descritiva. A velocidade específica foi estimada na fase exponencial em $1,76 \text{ h}^{-1}$ e um rendimento de 0,038g de biofilme para cada 1 grama de nutriente, sem diferença significativa entre os cultivos ($p > 0,05$). O número de UFCs dos biofilmes variou, porém sem diferença significativa entre os três cultivos realizados ($p > 0,05$). À análise de MEV, foi observada uma arquitetura de biofilme semelhante nos três momentos do experimento, recobrando uniformemente a superfície do cimento e contendo células bacterianas de morfologia predominantemente cocóide. Na análise DGGE, 29 espécies bacterianas foram identificadas no biofilme. Um modelo de biofilme subgingival de 3 dias de cultivo foi desenvolvido por meio do uso do biorreator com agitação, permitindo reproduzir, *in vitro*, comunidades microbianas complexas.

Palavras chave: biorreator com agitação, biofilme multiespécies, cinética microbiana.

4.3 INTRODUÇÃO

Na cavidade oral, as diferentes espécies bacterianas, dentre as mais de 700 já identificadas [1], organizam-se na forma de biofilme de acordo com a superfície aonde se estabelecem [2,3]. Na superfície externa dos dentes dois ambientes diferem entre si, o supragengival e o subgingival, ambos colonizados por complexos biofilmes polimicrobianos, também denominados de placa dental [4]. Esta, se não removida constantemente, gera um estado de disbiose, resultando, inicialmente, na gengivite, a qual pode agravar e evoluir para a periodontite [5].

A prevalência de periodontite crônica na população geral é de, aproximadamente, 30% [6,7]. Embora ainda ineficazes, estratégias terapêuticas são empregadas na tentativa de reduzir os complexos biofilmes bacterianos associados à doença [8,9]. Torna-se necessário, portanto, obter um maior conhecimento sobre o mecanismo de formação e desenvolvimento dos biofilmes a fim de permitir a elaboração de novas drogas realmente ativas contra a doença periodontal [10].

Variados modelos *in vitro* têm sido propostos para investigar as comunidades bacterianas [11-16]. No entanto, a generalização dos resultados fica prejudicada, pois as espécies usadas para a formação dos biofilmes são variadas. Durante muito tempo, a maioria dos estudos empregou modelos simplificados com biofilmes de uma única espécie, o que não simula a realidade clínica [11-16]. Como alternativa, foram desenvolvidos modelos de biofilme que empregam um número maior espécies (entre 3 a 6), incluindo comensais e patógenos [17-19], porém pouco representativos da microbiota da bolsa periodontal.

Além disso, a maioria dos modelos funciona de forma estática e não permite o controle e simulação dos diferentes aspectos das condições bucais, como o fluxo do sangue e da saliva, tensão de gases, pH, e substratos disponíveis na superfície do biofilme [17-27]. Uma forma de cultivo do biofilme que mimetiza mais consistentemente o microbioma oral consiste nos sistemas de fluxo contínuo, como o quimiostato, o fermentador de filme de profundidade constante, a célula de fluxo e o modelo de biofilme de boca artificial [28,29].

Para a obtenção de ambientes completamente controláveis e cuidadosamente monitorados, biorreatores vêm sendo empregados [5]. Esses reatores, nos quais ocorre uma série de reações químicas catalisadas por biocatalisadores, como as células microbianas, podem ser utilizados na produção de biofilmes [30]. De forma geral, eles têm um impacto notável na biologia celular e impõem as condições para a funcionalização da célula e/ou formação de tecidos [7].

Os biorreatores têm suas características relacionadas às espécies microbianas usadas e podem ter diferentes efeitos no que se refere aos fenômenos de transporte de massa [31]. Portanto, o comportamento reológico no biorreator será diferente dependendo do microrganismo empregado. Também é importante escolher um modelo apropriado ao processo, com ou sem técnicas de imobilização de partículas ou substrato. A importância do modelo se deve ao conhecimento da cinética da reação e do modo de funcionamento de cada reator biológico, como configuração e tamanho do biorreator, condições do processo e modo de operação [31].

Uma vez controlado o ambiente e empregados os patógenos específicos associados à periodontite, tem-se a oportunidade de desenvolver um modelo de biofilme para estudo de comportamento e interação bacteriana, e para o teste de medicamentos e terapias antimicrobianas e antibiofilme [32]. Com base no exposto, o objetivo do

presente estudo foi caracterizar e avaliar a cinética de formação de um biofilme periodontal multiespécie em biorreator com agitação.

4.4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.4.1 Espécies bacterianas, inóculo e meio de crescimento

Trinta e uma espécies bacterianas associadas à doença periodontal foram utilizadas: *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556); *Streptococcus gordonii* (ATCC 10558), *Actinomyces naeslundii I* (ATCC 12104), *Actinomyces israelii* (ATCC 12102), *Actinomyces naeslundii II (oris)* (ATCC 43146), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans b* (ATCC 29523), *Fusobacterium nucleatum polymorphum* (ATCC 10953), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175); *Streptococcus arginosus* (ATCC 33397), *Streptococcus constellatus* (ATCC 27823), *Veillonella parvula* (ATCC 10790), *Eikenella corrodens* (ATCC 23834), *Eubacterium nodatum* (ATCC 33099), *Gemella morbillorum* (ATCC 27824), *Parvimonas micra* (ATCC 33270), *Pronibacterium acnes I* (ATCC 11827), *Streptococcus intermedius* (ATCC 27335), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Campylobacter showae* (ATCC 51146), *Capnocytophaga gingivalis* (ATCC 33624), *Capnocytophaga ochracea* (ATCC 33596), *Capnocytophaga sputigena* (ATCC 33612), *Fusobacterium nucleatum vincenti* (ATCC 49256), *Fusobacterium periodonticum* (ATCC 33693), *Actinomyces gerencseriae* (ATCC 23860), *Actinomyces odontolyticus* (ATCC 17929), *Streptococcus oralis* (ATCC 35037), *Selenomonas noxia* (ATCC 43541), *Tannerella forsythia* (ATCC 43037). Todas as espécies foram mantidas a -80°C e reativadas, individualmente, a 5%, com caldo Brain Heart Infusion (BHI) (37 g/L) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Os inóculos foram mantidos a 37°C, em jarra de anaerobiose com gerador de atmosfera anaeróbia (PROBAC, São Paulo, Brasil), por 48 h, previamente ao início do experimento.

4.4.2 Preparo das amostras, biorreator e condições do meio de cultivo

Vinte dentes bovinos tiveram suas coroas e o terço apical e médio das raízes removidos com o auxílio de um disco diamantado dupla-

face, sob refrigeração constante, de forma a se obter tubos correspondentes ao terço cervical radicular. Em seguida, de cada tubo, foram obtidos segmentos radiculares padronizados (4 mm comprimento x 4 mm largura x 2 mm espessura), os quais serviram de substrato para a formação do biofilme. Previamente ao início do experimento, os dentes foram autoclavados, por 15 minutos, a 121°C e 1 bar.

Inicialmente, o biorreator foi desinfetado com álcool 70% em água destilada (v/v). Após, os segmentos radiculares foram posicionados no interior da cuba, de forma que a superfície radicular externa (cimento) ficasse exposta e em contato com o meio de cultivo suplementado. O meio de cultivo (1 L) foi composto de 37 g/L BHI (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 1,25 g/L mucina de estômago de porco, 1 g/L L-cisteína, 1mg/L ácido glutâmico (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e 2 g/L bicarbonato de sódio P.A. ACS (Vetec, Duque de Caxias, Brasil). Após esterilização em autoclave (15 min, 1 bar, 121°C), foram adicionados ao meio 1 mg/L menadiona e 5 mg/L de hemina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) [33]. Após, as sondas de pH e de temperatura do equipamento foram calibradas e os parâmetros do biorreator ajustados, conforme segue: pH 7,4, temperatura 37°C, agitação 200 rpm, atmosfera 85% N₂, 5% CO₂, 10% H₂ a um fluxo constante de entrada de gás de 5,5 × 10⁻⁸ m³/s. O biorreator operou durante uma hora sem bactérias para manter a estabilidade nos parâmetros mencionados [33].

4.4.3 Inoculação das bactérias

Após 48 h de incubação dos inóculos, a densidade óptica (DO) de cada espécie bacteriana foi ajustada (DO 600nm ≈ 1,0). Em seguida, foram inoculadas a 10% no biorreator a uma quantidade de 3,2 mL por bactéria, totalizando aproximadamente 100 mL do total de meio do biorreator.

4.4.4 Período experimental para formação do biofilme

Após a inoculação das bactérias ao meio de cultura, foi iniciada a contagem do período de formação do biofilme (3 dias). Cem mililitros de meio de cultivo foram renovados após 48 h de cultivo. O experimento foi realizado em triplicata.

4.4.5 Crescimento bacteriano e cinética do processo

Durante o cultivo uma alíquota de 15 mL foi retirada a cada 2 horas para a realização de análises. O crescimento das bactérias no biorreator foi avaliado por meio de dois métodos: I) Densidade óptica (DO) no comprimento de onda de 600 nm. Para tal, 2 mL foram colocados em 3 cubetas de vidro e as leituras foram realizadas de 2 em 2 horas, em triplicata, no espectrofotômetro SP 1105 (BEL Photonics do Brasil), até 26 h de cultivo; II) Análise de massa seca. Previamente à realização do procedimento, Eppendorfs foram colocados em estufa a 100°C por 24 h, para eliminação da umidade, e então foram pesados. Para a análise de massa seca, uma alíquota de 1 mL foi coletada do biorreator e colocada em um tubo Eppendorf, o qual foi vortizado por 3 min [34]. O meio sobrenadante foi eliminado e o volume completado com 1 mL de água destilada, para lavagem da amostra. Esta foi novamente vortexizada, por 3 min, e o líquido sobrenadante foi novamente eliminado. Após, o Eppendorf foi colocado em estufa por 24 h a 100°C [35]. Passado esse período, o Eppendorf foi pesado em balança analítica, e da massa final do Eppendorf diminuiu-se a massa inicial. A diferença foi a biomassa produzida no cultivo a cada período. Os valores de massa seca foram utilizados para a construção do gráfico de crescimento bacteriano, e a partir da fase exponencial desse gráfico, a velocidade específica de crescimento foi calculada, bem como o rendimento em biomassa [34].

Após o período experimental, o meio de cultura do biorreator foi removido e os segmentos radiculares cuidadosamente retirados da cuba, de forma a manter o biofilme aderido, permitindo a realização das diferentes análises, conforme descrito a seguir.

4.4.6 Teste de viabilidade celular bacteriana

O número total de células bacterianas viáveis do biofilme aderido ao cimento de 6 segmentos radiculares foi analisado por meio de plaqueamento e contagem de UFCs. Imediatamente após a remoção dos segmentos radiculares da cuba do biorreator, o biofilme foi removido com auxílio de uma ponta ultrassônica e ressuspenso em 900 μ L de solução salina estéril (0,9% v/v) [36]. Após, esta suspensão bacteriana foi sonicada novamente e submetida às diluições decimais sucessivas. Cem microlitros das suspensões bacterianas correspondentes às diluições 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} foram plaqueados, em triplicata, em BHI ágar. As placas

foram incubadas em jarra de anaerobiose com atmosfera anaeróbia a 37°C por 48 h a 72 h. Após esse período, o número de UFCs/mL foi determinado.

4.4.7 Análise da morfologia celular bacteriana e arquitetura do biofilme

Após a remoção dos segmentos radiculares ($n = 3$) do biorreator, os biofilmes foram fixados imediatamente a 4°C, durante 12 h, em glutaraldeído (2,5% v/v), lavados com tampão fosfato 0,2 M durante 1 h, com duas trocas, seguido de lavagem breve com água deionizada. Em seguida, foi realizada a desidratação com concentrações ascendentes de álcool etílico por períodos de 20 minutos (25% a 95%) e 1 hora na concentração de 100%. [37]. Em seguida, os segmentos radiculares com o biofilme aderido foram posicionados em stubs e recobertos com ouro, e submetidos à análise. A morfologia das células bacterianas e a arquitetura do biofilme foram analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (modelo JEOL JSM-6390LV Scanning Electron Microscope). Diferentes áreas ao longo da superfície de cimento recoberta pelo biofilme foram analisadas e fotomicrografias das áreas representativas foram obtidas, com aumentos entre 1.000 e 7.000 x.

4.4.8 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

A determinação da diversidade de espécies bacterianas que se aderiram ao biofilme, dentre as 31 inicialmente inoculadas, e sua quantificação, foram realizadas por meio do método semi-quantitativo de hibridização DNA-DNA (checkerboard) (DGGE) [23,36].

O biofilme de 3 segmentos radiculares foi removido conforme mencionado anteriormente, e ressuspensão em tubos Eppendorfs contendo 150 μ L de Tris EDTA (TE) [10 mM de Tris-HCl ultrapuro e 1 mM de EDTA ultrapuro, [pH 7,6] (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos)]. Logo após, 100 μ L de solução de NaOH 0,5 M (Lafan, Várzea Paulista, Brasil) foram adicionados, e os tubos agitados por 30 segundos.

As amostras coletadas foram fervidas por 10 minutos para promover a lise e desnaturação celular, e neutralizadas com 0,8 mL de acetato de amônio 5M. Em seguida, foram analisadas individualmente para a determinação da presença e quantidade de cada espécie bacteriana

ao biofilme, por meio da hibridização DNA-DNA. O DNA liberado foi fixado em linhas individuais de uma membrana de nylon carregada positivamente (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Estados Unidos), utilizando um dispositivo de checkerboard (Minislot 30, Immunetics, Cambridge, Estados Unidos). Quarenta sondas de DNA genômico inteiro, marcadas com digoxigenina (Roche Applied Science, Indianapolis, Estados Unidos) foram construídas e hibridizadas perpendicularmente às linhas das amostras usando um aparelho Miniblotter 45 (Immunetics), e foram detectadas usando anticorpo conjugado com fosfatase para digoxigenina (Roche Applied Science, Indianapolis, Estados Unidos).

Os resultados obtidos foram detectados usando o substrato CDP Star / Amersham Life Sciences. Após a incubação em solução contendo o substrato CDP-Star (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra), as membranas foram colocadas em um cassete de autorradiografia sob um filme radiográfico (X-Omat; Kodak, Rochester, Estados Unidos), desenvolvido para detecção de sinal de quimiluminescência. Os sinais foram avaliados visualmente comparado aos padrões de 10^5 e 10^6 células bacterianas de espécies testadas nas últimas 2 linhas da mesma membrana. Este forneceu o número aproximado de células bacterianas por amostra para cada cepa avaliada. A falha em detectar um sinal foi registrada como zero. A sensibilidade deste ensaio foi escolhida para permitir a detecção de 10^4 células de uma espécie bacteriana, ajustando a concentração de cada sonda de DNA. Este procedimento foi realizado para fornecer a mesma sensibilidade de detecção para todas as espécies (as concentrações foram ajustadas para que todas as sondas tivessem uma intensidade de sinal semelhante). Médias foram calculadas para cada espécie bacteriana. Para facilitar a análise semi-quantitativa de sinais de quimioluminescência para cada microrganismo em cada amostra, a intensidade de contaminação pelas diferentes espécies bacterianas foi avaliada nos seguintes níveis: 10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 e 10^7 .

4.4.9 Análise estatística

Os valores médios de UFC/mL obtidos no teste de viabilidade celular e os dados cinéticos, de cada replicata, foram comparados pelo teste ANOVA *One Way*. A morfologia celular e a arquitetura do biofilme foram descritas baseadas em uma análise observacional. Todas as análises consideraram um nível de significância de 5% e foram realizadas com o

auxílio do software OriginPro 8 (OriginLab, Northampton, Massachusetts, EUA).

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Crescimento bacteriano

Na figura 1 e 2 são mostrados os valores obtidos após as leituras da densidade óptica e da massa seca. É possível observar que a multiplicação bacteriana (aumento da densidade óptica) ocorreu de forma simultânea ao aumento da massa, sem diferença significativa para ambas as análises (DO e massa seca), quando comparados os três cultivos ($P > 0,05$). A fase estacionária foi atingida após 6 horas de cultivo. Esses resultados demonstram a reprodutibilidade do modelo de biofilme.

Figura 1. Cinética de crescimento nos 3 cultivos realizados (massa seca)

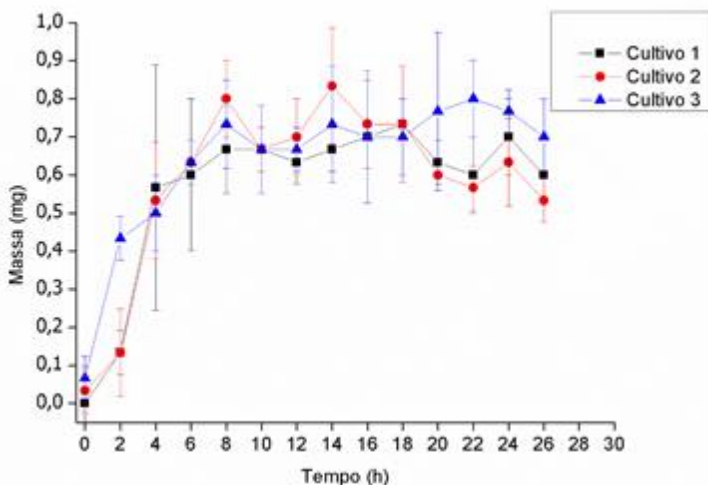
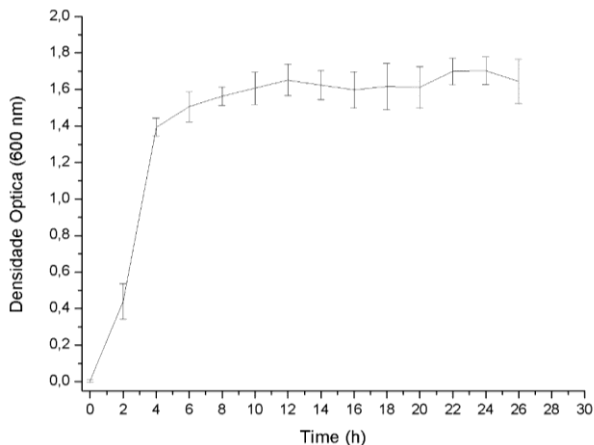


Figura 2. Cinética de crescimento microbiano através da densidade óptica.



Para avaliação dos resultados, um modelo matemático generalista sobre o crescimento microbiano foi empregado. Sua construção foi baseada em um bloco elementar que descreve a evolução do crescimento da população através de uma equação diferencial de primeira ordem [39], conforme apresentado na Equação (1.1):

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu(t, N, cond)N(t) \quad (1.1)$$

Sendo que $N(t)$ é a contagem da população no instante t , e $\mu(t)$ é a velocidade específica de crescimento da população, que depende do conjunto de condições ambientais ($cond$) em que a população é submetida, além de fatores intrínsecos à própria população [39].

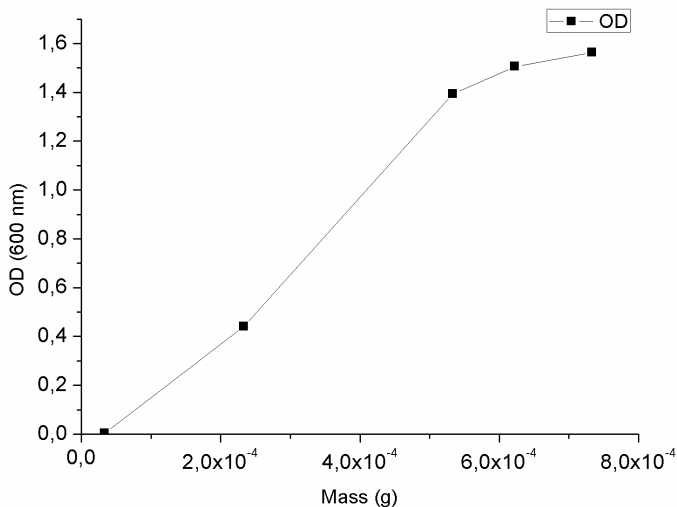
Malthus (1798) foi o primeiro autor a propor um modelo para descrever a dinâmica populacional. A construção do modelo é baseada na resolução da Equação (1.1), considerando que a velocidade específica de crescimento ($\mu(t, N, cond)$) é constante (r), conforme a Equação (1.2).

$$\frac{dN(t)}{dt} = rN(t) \quad (1.2)$$

A maioria dos modelos matemáticos microbianos se baseia nessas duas equações. Neste trabalho, a fase exponencial dos dados de massa seca foi linearizada e a equação (1.3) obtida. Foi perceptível que a fase *lag* no processo de formação do biofilme foi inexistente, e que os pontos iniciais já correspondem à fase exponencial (6 h), havendo diferença significativa entre cada ponto $P < 0,05$, e $R^2=0,9$.

A velocidade específica de crescimento μ foi estimada em $1,76 \text{ h}^{-1}$, enquanto que o rendimento global foi $Y^{(X/s)} = 0,038 \text{ g}$ de biofilme para cada 1 g de substrato utilizado. Através dos dados cinéticos, também foi possível estabelecer uma correlação entre os dados de massa e de densidade óptica para avaliar o comportamento do crescimento bacteriano no cultivo. Esses dados são pioneiros no estudo de crescimento de bactérias da cavidade oral, e podem ser observados na figura 3.

Figura 3. Correlação entre massa seca e densidade óptica na cinética do processo.



4.5.2 Viabilidade celular bacteriana

Na figura 4 são mostrados os valores médios de células bacterianas viáveis do biofilme (UFC/mL), para cada momento do experimento.

Os biofilmes coletados dos segmentos radiculares continham $9,79 \times 10^8 (\pm 7,5 \times 10^8)$ UFCs por biofilme no primeiro cultivo, $2,12 \times$

$10^8 (\pm 2,18 \times 10^8)$ UFCs no segundo cultivo, e $8,15 \times 10^8 (\pm 5,8 \times 10^8)$ UFCs no terceiro cultivo, sem diferença significativa entre eles ($P > 0,05$). A presença de um número constante de UFCs em todos os momentos do estudo reforça a reprodutibilidade do presente modelo de biofilme periodontal.

A média de UFCs/mL dos três cultivos foi de $6,68 \times 10^8$, semelhante aos resultados de valores de UFCs viáveis obtidos em outras investigações, quando espécies bacterianas provenientes da cavidade oral foram cultivadas individualmente [39], em pequenos grupos de espécies, ou em grande diversidade, a partir da saliva humana [40].

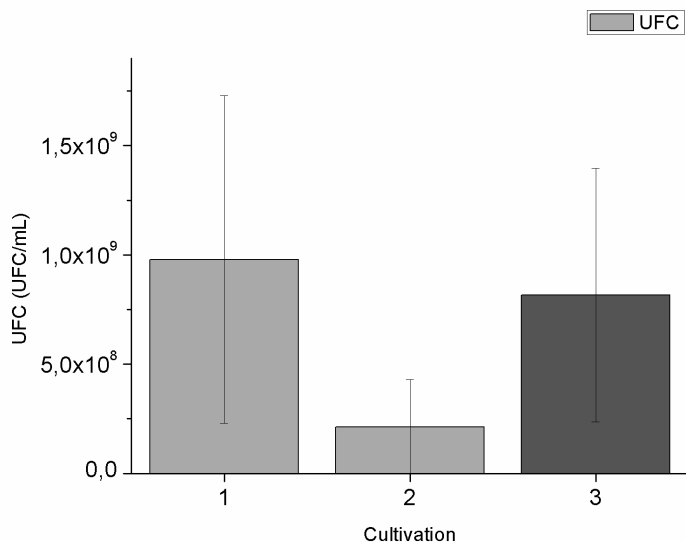


Figura 4. Resultado do teste de viabilidade celular. Distribuição das células viáveis presentes no biofilme após os períodos de cultivo de 3 dias.

4.5.3 Morfologia celular bacteriana e arquitetura do biofilme

As análises realizadas por meio de MEV revelaram uma arquitetura de biofilme semelhante nos três momentos do experimento, recobrando uniformemente a superfície do cimento e contendo células bacterianas de morfologia variada, porém predominantemente cocóide

(Fig. 5). Em um estudo prévio, em que o biofilme periodontal foi reproduzido com um número limitado de seis espécies bacterianas e em modo estático, também foram observadas bactérias aderidas ao substrato após 2 dias de cultivo [41]. O predomínio de bactérias de morfologia cocóide, recobrando a maior parte do cimento, em todos os cultivos, corrobora resultados de estudos prévios, os quais relatam que colonizadores do gênero estreptococcus são os precursores do biofilme dental, chegando a 80% do número total de bactérias aderidas [42, 43, 44].

Também foi possível observar que os biofilmes desenvolvidos provaram-se resistentes às forças físicas decorrentes da agitação do biorreator (200 rpm). A agitação constante no biorreator tem por objetivo mimetizar fluxos que ocorrem na cavidade oral, como forças produzidas pela circulação e a ação da saliva na boca [36].

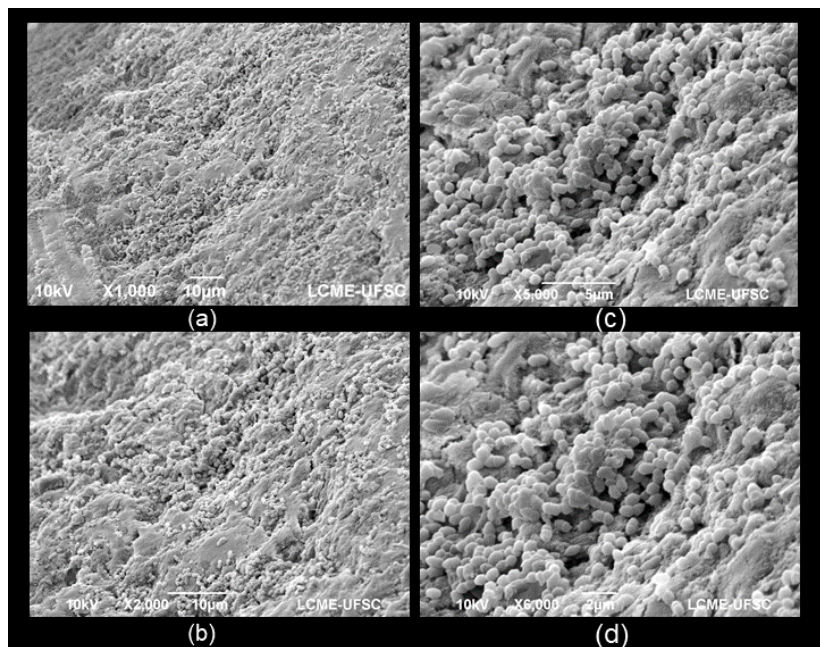


Figura 5. Biofilme recobrando a superfície do cimento radicular. (magnificação 1000, 2000, 5000 e 6000 x).

4.5.4 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante

Por meio da análise DGGE [23,45,30] foi constatado que, das 31 espécies bacterianas inoculadas, 29 (93,5%) estavam presentes no biofilme.

As espécies identificadas com a respectiva quantidade média estimada são apresentadas na figura 4.6.

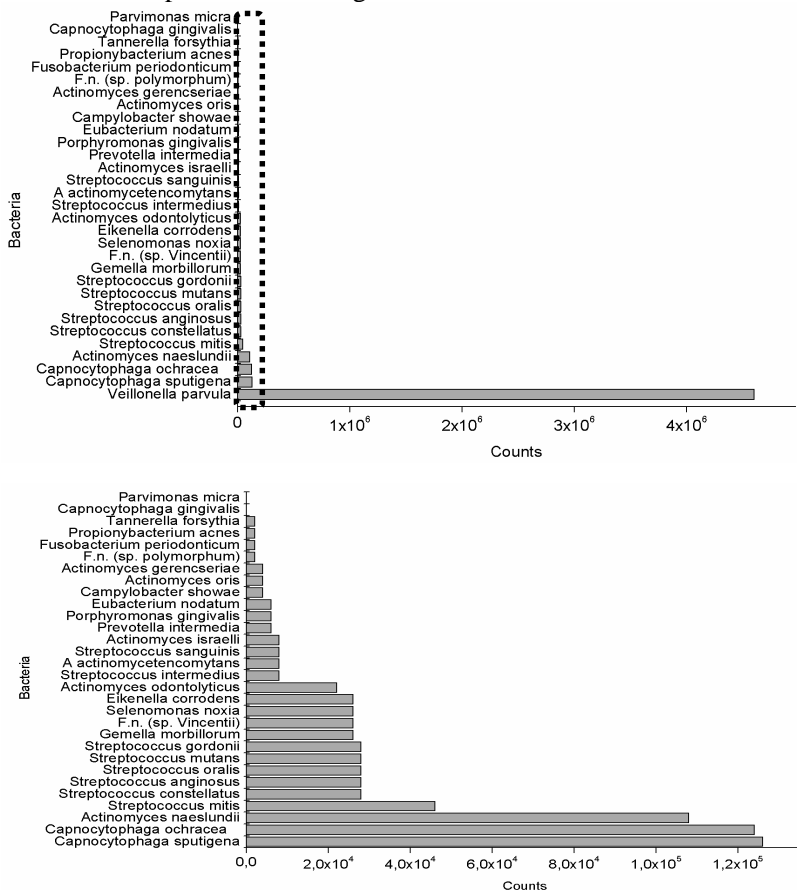


Figura 6. Espécies bacterianas identificadas no biofilme após 3 dias de cultivo no biorreator e respectivas quantidades estimadas. No detalhe, área ampliada.

Dentre as 29 espécies bacterianas identificadas no biofilme, algumas se destacam pela importância no processo de formação da doença periodontal [46,47]. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi recentemente associado como um patógeno predominante na periodontite agressiva [48,49,50], além de ser um patógeno oral putativo [41]; *T. forsythia* mostrou-se predominante na periodontite [49]; *S. mitis*, *S. oralis*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *E. corrodens* e *P. intermedia* foram consideradas comensais “verdadeiras” [51-55]; e *P. gingivalis* e *S. mutans* caracterizam-se como patógenos orais putativos [56].

Uma vez que a maioria das espécies bacterianas associadas aos casos de periodontite foi capaz de se aderir à superfície radicular, com destaque para os principais agentes etiológicos da doença - *P. gingivalis*, *T. forsythia*, e *A. actinomycetemcomitans* [57] - e se desenvolver na forma de biofilme, é possível afirmar que o modelo de biofilme subgingival desenvolvido no presente estudo é reproduzível em biorreator com agitação.

Salienta-se ainda, que por ser um biofilme jovem, os microrganismos presentes no interior da estrutura dos biofilmes estão menos expostos às carências nutricionais, mudanças de pH, radicais de gases, entre outros fatores. Portanto, o fácil acesso aos nutrientes do meio e as constantes trocas metabólicas podem ser uma explicação para o número elevado de espécies bacterianas presentes [58].

É provável que os fluxos simulados no biorreator e o maior número de espécies utilizadas na presente investigação tenham mimetizado de forma mais fidedigna a realidade clínica, permitindo a formação de um biofilme mais próximo ao encontrado clinicamente [59].

4.6 CONCLUSÃO

Com base nas análises de caracterização e cinética, foi possível validar um modelo de biofilme periodontal *in vitro*, com comunidades microbianas subgingivais complexas, por meio do uso do biorreator com agitação.

A partir do resultado obtido com os dados cinéticos de crescimento bacteriano durante a formação do biofilme, destacam-se as variáveis calculadas (μ e $Y^{(X/s)}$), que ajudam a elucidar como ocorreu o crescimento do biofilme em função do tempo. Como os dados de substrato ao longo do tempo não foram quantificados, principalmente pela grande quantidade de compostos, o modelo ainda não foi aplicado a um

modelo matemático específico de crescimento microbiano, e segue como perspectiva futura para trabalhos seguintes.

O modelo de biofilme periodontal *in vitro* pode vir a auxiliar no estudo da interação e crescimento de organismos, individualmente ou em grupos, assim como no entendimento de suas propriedades patogênicas em biofilmes subgengivais. Além disso, pode ser usado como teste para comparação e avaliação de terapias antimicrobianas. Futuros trabalhos nessa direção podem levar ao refinamento das estratégias antimicrobianas na terapia periodontal.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos ao Laboratório de Engenharia Biológica da Universidade Federal de Santa Catarina (LiEB-UFSC) onde este trabalho foi realizado, ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME-UFSC) por colaborar com as imagens do SEM utilizadas ao longo do trabalho, aos órgãos de financiamento CAPES e CNPq e ao Laboratório de Odontologia II da Universidade de Guarulhos por ceder as cepas e colaborar nas análises de eletroforese em gel com gradiente desnaturante.

Referências

- [1] Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, v. 43, p. 5721-5732.
- [2] Rossoni RD, Velloso MS, Barros PP, et al. Inhibitory effect of probiotic *Lactobacillus* supernatants from the oral cavity on *Streptococcus mutans* biofilms. *Microbial Pathogenesis*, 2018, v. 123, p.361-367.
- [3] Simon-Soro A, Tomas I, Cabrera-Rubio R, Catalan MD, Nyvad B, Mira A. Microbial geography of the oral cavity. *J Dent Res*. 2013, v.92, p. 616 - 621.
- [4] Knight ET, Liu J, Seymour GJ, Faggion CM Jr, Cullinan MP. Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2016, v. 71, p. 22 – 51.

- [5] Kelly H, Deasy P, Ziaka E, Claffey, N. Formulation and preliminary in vivo dog studies of a novel drug delivery system for the treatment of periodontitis. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, v. 274, p. 167 - 183.
- [6] Meyer, U., Szulczewski, H.D., Moller, K., Heide, H., Jones, D.B., 1993. Attachment kinetics and differentiation of osteoblasts on different biomaterials. *Cells Mater.* 3, 129140.
- [7] Amrollahi, P., Moghadam, F., & Tayebi, L. (2017). Bioreactor design for oral and dental tissue engineering. *Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering*, 193-204. doi: 10.1016 / b978-0-08-100961-1.00012-8
- [10] Spolidorio DMP, Duque C. *Microbiologia e Imunologia Geral e Odontológica*. 2013, São Paulo: Artes Médicas, 144 p.
- [11] Beyth N, Bahir R, Matalon S, Domb AJ, Weiss EI. Streptococcus mutans biofilm changes surface-topography of resin composites. *Dent Mater*, 2008, v. 24, 732 - 736.
- [12] Fucio, SB, Carvalho, FG, Sobrinho, LC, Sinhoreti, MA, Puppini-Rontani, RM, Fucio, SBP. The influence of 30-day-old Streptococcus mutans biofilm on the surface of esthetic restorative materials—an in vitro study. *J Dent*. 2008, v. 36, p. 833 - 839.
- [13] Gyo M, Nikaido T, Okada K, Yamauchi J, Tagami J, Matin K. Surface response of fluorine polymer-incorporated resin composites to cariogenic biofilm adherence. *Appl Environ Microbiol*, 2008, v. 74, p. 1428 - 1435.
- [14] Kantorski KZ, Scotti R, Valandro LF, Bottino MA, Koga-Ito CY, Jorge AO. Adherence of Streptococcus mutans to uncoated and saliva-coated glass ceramics and composites. *Gen Dent*, 2008, v. 56, p. 740 – 747.
- [15] Buegers R, Schneider-Brachert W, Hahnel S, Rosentritt M, Handel G. Streptococcal adhesion to novel low-shrink silorane-based restorative. *Dent Mater*, 2009, v. 25, p. 269 - 275.
- [16] Fucio SB, Puppini-Rontani RM, De Carvalho FG, Mattos-Graner Rde O, Correr-Sobrinho L, Garcia-Godoy F. Analyses of biofilms

accumulated on dental restorative materials. *Am J Dent*, 2009, v. 22, p. 131 - 136.

[17] Dezelic T, Guggenheim B, Schmidlin PR. Multi-species biofilm formation on dental materials and an adhesive patch. *Oral Health Prev Dent*, 2009, v. 7, p. 47 - 53.

[18] Rinastiti M, Ozcan M, Siswomihardjo W, Busscher HJ, Van Der Mei H.C. Effect of biofilm on the repair bond strengths of composites. *J Dent Res* 2010, v. 89, 1476 - 1481.

[19] Hayati F, Okada A, Kitasako Y, Tagami J, Matin, K. An artificial biofilm induced secondary caries model for in vitro studies. *Aust Dent J*, 2011, v. 56, p. 40 - 47.

[20] Sissons CH, Cutress TW, Hoffman MP, Wakefield JS. A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, pH, and mineralization. *J Dent Res*, 1991, v. 70, p. 1409 - 1416.

[21] Sissons CH, Wong L, Cutress TW. Patterns and rates of growth of microcosm dental plaque biofilms. *Oral Microbiol Immunol*, 1995, v. 10, p. 160 - 167.

[22] Pratten J, Smith AW, Wilson M. Response of single 717 species biofilms and microcosm dental plaques to pulsing with chlorhexidine. *J Antimicrob Chemother*, 1998, v. 42, p. 453 - 459.

[23] Pratten J, Andrews CS, Craig DQ, Wilson M. Structural studies of microcosm dental plaques grown under different nutritional conditions. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, v. 189, p. 215 - 218.

[24] Matharu S, Spratt DA, Pratten J, et al. A new in vitro model for the study of microbial microleakage around dental restorations: a preliminary qualitative evaluation. *Int Endod J*, 2001, v. 34, p. 547 - 553.

[25] Badawi H, Evans RD, Wilson M, Ready D, Noar JH, Pratten, J. The effect of orthodontic bonding materials on dental plaque accumulation and composition in vitro. *Biomaterials*, 2003, v. 24, p. 3345 - 3350.

- [26] McBain AJ, Sissons C, Ledder RG, Sreenivasan PK, De Vizio W, Gilbert P. Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. *J Appl Microbiol*, 2005, v. 98, p. 624 - 634.
- [27] Maske, TT. Estabelecimento e validação de um modelo de biofilme complexo em um dispositivo multifuncional simulador de cavidade bucal. 2015. 122f.. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.
- [28] BUSSCHER, H. J.; MEI, H. C. V. D. Microbial Adhesion in Flow Displacement Systems. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 1, p. 127-141, 2006.
- [29] BRADSHAW, D.J. et al. A modified chemostat system to study the ecology of oral biofilms. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 80, n. 2, p. 124-130, 1996.
- [30] Filoche SK, Soma KJ, Sissons CH. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiol Immunol*, 2007, v. 22, p.73 -79.
- [31] Schmidell W, Facciotti MCR. Biorreatores e processos fermentativos. *Engenharia Bioquímica (Biotecnologia Industrial)*, Blucher, 2001, v. 2.
- [32] ALMEIDA, Renato Mendes et al. Uso de antimicrobianos sistêmicos e locais no tratamento da Periodontite Agressiva. *Oral Sci.*, Jan/Jun. 2014, vol. 6, n. 1, p. 4-9.
- [33] Álvarez G, González H, Isabal S, Blanc V, Leon R. Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with propidium monoazide. *Amb Express*, 2013, v. 3, n. 1.
- [34] Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Prentice Hall, 2004.
- [35] Scheufele, FB., Diório A., Módenes, AN. Avaliação de cinética e equilíbrio da secagem do bagaço de cana de açúcar para aplicação como adsorvente, 2014.

- [36] Feres M, Teles F, Teles R, Figueiredo LC, Faveri M. The subgingival periodontal microbiota of the aging mouth. *Periodontology* 2000, 2016, v. 72, p. 30 - 53.
- [37] de Almeida J, Cechella BC, Bernardi AV, de Lima Pimenta A, Felipe WT. Effectiveness of nanoparticles solutions and conventional endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Indian J Dent Res*, 2018, v. 29, p. 347-51.
- [38] Bernaerts, K. et al. Modeling Microbial Dinamics under TimeVarying Conditions. In: (Ed.). *Modelling microbial responses in food*. Washington D.C.: CRC Press, 2004. p.255-273.
- [39] He J, Bao Y, Li J, Qiu Z, Liu Y, Zhang X. Nanocomplexes of carboxymethyl chitosan/amorphous calcium phosphate reduce oral bacteria adherence and biofilm formation on human enamel surface. *Journal Of Dentistry*, 2019, v. 80, p.15 – 22.
- [40] HUANG X, Zhang K, Deng M, et al. Effect of arginine on the growth and biofilm formation of oral bacteria. *Archives Of Oral Biology*, 2017, v. 82, p. 256 -262.
- [41] Wang D, Haapasalo M, Gao Y, Ma J, Shen Y. Antibiofilm peptides against biofilms on titanium and hydroxyapatite surfaces. *Bioactive Materials*, 2018, v. 3, n. 4, p.418 - 425.
- [42] Teughels W, Quirynen M, Jakubovics N. Periodontal microbiology Newman HH, Takei MG, Klokkevold PR, et al. (Eds.), *Carranza's clinical periodontology* (11th edition), Elsevier, 2012, p. 232 - 270.
- [43] Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial ecology. Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson HF (Eds.), *Oral microbiology and immunology* (2nd edition), 2014, ASM Press, Washington, DC, p. 97-102.
- [44] Krom BP, Kidwai S, Ten Cate JM. *Candida* and Other Fungal Species: Forgotten Players of Healthy Oral Microbiota, *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2014, v.93, p. 445 – 451.
- [45] Ledder RG, Gilbert P, Pluen A, Sreenivasan PK, De Vizio W, McBain A. Individual microflora beget unique oral microcosms, 2006, *J Appl Microbiol*, v. 100, p. 1123–1131.

- [46] Moore WEC , Moore LVH . The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000, 1994, v. 5, p. 66 – 77.
- [47] Carrizales-Sepúlveda EF, Ordaz-Farías U, Vera-Pineda R, Flores-Ramirez R. Periodontal Disease, Systemic Inflammation and the Risk of Cardiovascular Disease. *Heart, Lung And Circulation*, 2018, v. 27, p.1327 - 1334.
- [48] Cenci MS, Pereira-Cenci T, Cury JA, Ten Cate JM. Relationship between gap size and dentine secondary caries formation assessed in a microcosm biofilm model. *Caries Res*, 2009, v. 43, p. 97 - 102.
- [49] Schmidell W, Facciotti MCR. Biorreatores e processos fermentativos. *Engenharia Bioquímica (Biotecnologia Industrial)*, Blucher, 2001, v. 2.
- [50] Sim CPC, Dashper SG, Reynolds EC. Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents. *Journal Of Dentistry*, 2016, v. 50, p. 1 - 11.
- [51] Bowden GHW, Nolette N, Ryding H, Cleghorn BM . Evidence for recombination between a sialidase (nanH) of *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces oris*, previously named ‘*Actinomyces naeslundii* genospecies 1 and 2’. *J Dent Res*, 1999, v. 78, p. 1800 - 1809.
- [52] Chen C, Ashimoto Uma. Clonal diversity of oral *Eikenella corrodens* within individual subjects by arbitrarily primed PCR. *J Clin Microbiol*, 1996, v. 34, p. 1837 – 1839.
- [53] Paddick JS, Brailsford SR, Kidd EA, et al. Effect of the environment on genotypic diversity of *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus oralis* in the oral biofilm. *Appl. Environ. Microbiol*, 2003, v. 69, p. 6475 - 6480.
- [54] Teanpaisan R, Douglas CW, Eley AR, Walsh TF. Clonality of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolated from periodontally diseased and healthy sites. *J Periodontal Res*. 1996, v. 31, p. 423 - 432.
- [55] Conrads L, Herrler Um, Moonen I, Lampert F, Schnitzler N. Flow cytometry to monitor phagocytosis and oxidative burst of anaerobic

periodontopathogenic bacteria by human polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res*, 1999, v. 34, p. 136 - 144.

[56] Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza: *Periodontia Clínica*. 12. ed. Los Angeles: Elsevier, 2016. 856 p.

[57] Ezzo PJ, Cutler CW. Risk Factors for Periodontitis. *Periodontol* 2000, 2003, v. 32, p. 24 - 35.

[58] Fujise S, Chen W, Rico S, Chen C. Clonal Diversity and Stability of Subgingival *Eikenella corrodens*. *J Clin Microbiol*, 2004, v. 42, p. 2036 - 2042.

[59] Sánchez MC, Toledano Osorio M, Bueno J, et al. Antibacterial effects of polymeric PolymP-n Active nanoparticles. An in vitro biofilm study. *Dental Materials*, 2019, v. 35, p.156 – 168.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Com base nas análises de caracterização e cinética, um modelo de biofilme periodontal multiespécies de 3 e 7 dias de cultivo foi desenvolvido, por meio do uso do biorreator com agitação, permitindo reproduzir, *in vitro*, comunidades microbianas subgengivais complexas.

O presente modelo de biofilme pode ser potencialmente utilizado para superar as limitações das plataformas atuais em testes de triagem de terapias e medicamentos antimicrobianos contra a doença periodontal. Além disso, os dados de crescimento bacteriano podem ser utilizados como plataformas de estudo do comportamento bacteriano.

6 REFERÊNCIAS

AAS, J.A. et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 5721-5732, 2005.

BADAWI H., et al. The effect of orthodontic bonding materials on dental plaque accumulation and composition in vitro. *Biomater*, v. 24, p. 3345-3350, 2003.

BENOIT, M. R. et al. New Device for High-Throughput Viability Screening of Flow Biofilms. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 76, n. 13, p. 4136-4142, 2010.

BEYTH, N. et al. Streptococcus mutans biofilm changes surface-topography of resin composites. *Dental Materials*, v. 24, n. 6, p. 732-736, 2008.

BOBETSIS, Y.; BARROS, S.; OFFENBACHER, S. Exploring the relationship between periodontal disease and pregnancy complications.

BRADSHAW, D.J. et al. A modified chemostat system to study the ecology of oral biofilms. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 80, n. 2, p. 124-130, 1996.

BUERGERS, R. et al. Streptococcal adhesion to novel low-shrink silorane-based restorative. *Dental Materials*, v. 25, n. 2, p. 269-275, 2009.

BURMOLE, M. et al. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*; v. 72, p. 3916-3923, 2006

BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G. J.. Mechanism of killing of streptococcus mutans by light-activated drugs. Photochemotherapy: Photodynamic Therapy and Other Modalities, p. 288-297, 1996.

BUSSCHER, H. J.; MEI, H. C. V. D. Microbial Adhesion in Flow Displacement Systems. Clinical Microbiology Reviews, v. 19, n. 1, p. 127-141, 2006.

BUSSCHER, H.J. et al. Biofilm Formation on Dental Restorative and Implant Materials. Journal Of Dental Research , v. 89, n. 7, p. 657-665, 2010.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua. Cap. 9 in W. SCHMIDELL, W.; LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, Engenharia Bioquímica: Biotecnologia Industrial, Ed. Edgard Blucher Ltda, v. 2, São Paulo, 2001.

CERI et al. The Calgary Biofilm Device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. Journal of Clinical Microbiology, v. 37, n. 6, p. 1771-1776, 1999.

CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach, p. 3–15., 1990.

CLIFT, R.; GRACE, J. R.; WEBER, M. E. Bubbles, Drops, and Particles. Academic Press, San Diego, CA, USA, 1978.

COENYE, T.; NELIS, H. J. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. Journal of Microbiological Methods, v. 83, n. 2, p. 89-105, 2010.

COLOMBO, A. P. V. et al. Comparisons of Subgingival Microbial Profiles of Refractory Periodontitis, Severe Periodontitis, and Periodontal Health Using the Human Oral Microbe Identification Microarray. Journal Of Periodontology, v. 80, n. 9, p. 1421-1432, 2009.

COLOMBO, A. P. V. et al. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microbial Pathogenesis*, v. 94, p. 27-34, 2016.

COSTERTON, J. W et al. Microbial biofilms. *Annual Review Microbiology*; v. 49, p. 711–745 , 1995.

COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review Microbiology*; v.41, p.435-464, 1987.

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, G. K. How bacteria stick. *Scientific American*; v. 238, p. 86-95, 1978.

COSTERTON, J. W.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Introduction to microbial biofilms, *Microbial biofilms*; p. 1-11, 1995.

DAVIES, D. G.; GEESEY, G. G. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*; v. 61, p. 860-867, 1995.

DEWHIRST, F. E. et al. The Human Oral Microbiome. *Journal Of Bacteriology*, v. 192, n. 19, p. 5002-5017, 2010.

DEZELIC T. et al., Multi-species biofilm formation on dental materials and an adhesive patch. *Oral Health & Preventive Dentistry*, v. 7, p. 47-53, 2009.

DOBSON , J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch. Oral Biol.*, v. 37, p. 883-887, 1992.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clinical Microbiology Reviews*; v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

- DOPHEIDE, Andrew et al. Preferential Feeding by the Ciliates *Chilodonella* and *Tetrahymena* spp. and Effects of These Protozoa on Bacterial Biofilm Structure and Composition. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 77, n. 13, p. 4564-4572, 2011.
- EICK S. et al. Efficacy of taurolidine against periodontopathic species in an *in vitro* study. *Clinical Oral Investigation*, v. 16, p. 735-744, 2012.
- EXTERKATE, R.A.M.; CRIELAARD, W.; CATE, J.M. T. Different Response to Amine Fluoride by *Streptococcus mutans* and Polymicrobial Biofilms in a Novel High-Throughput Active Attachment Model. *Caries Research*, v. 44, n. 4, p. 372-379, 2010.
- EXTERKATE, R.A.M.; CRIELAARD, W.; CATE, J.M. T. Different Response to Amine Fluoride by *Streptococcus mutans* and Polymicrobial Biofilms in a Novel High-Throughput Active Attachment Model. *Caries Research*, v. 44, n. 4, p. 372-379, 2010.
- FAN, Y. et al. Novel amelogenin-releasing hydrogel for remineralization of enamel artificial caries. *Journal Of Bioactive And Compatible Polymers*, v. 27, n. 6, p. 585-603, 2012.
- FILOCHE, S. K.; SOMA, K. J.; SISSONS, C. H.. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiology And Immunology*, v. 22, n. 2, p.73-79, 2007.
- FILOCHE, S. K.; SOMA, K. J.; SISSONS, C. H.. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiology And Immunology*, v. 22, n. 2, p. 73-79, 2007.
- FRIAS A.C., JUNQUEIRA,S.R. *Saúde Bucal Coletiva*, p. 39-47, 2008.
- FUCIO S.B. et al. Analyses of biofilms accumulated on dental restorative materials. *American Journal of Dentistry*, v.22, p. 131-136, 2009.

- FUCIO, S. B. P. et al. The influence of 30-day-old *Streptococcus mutans* biofilm on the surface of esthetic restorative materials - An in vitro study. *Journal Of Dentistry*, v. 36, n. 10, p. 833-839, 2008.
- GOERES, D. M. et al. A method for growing a biofilm under low shear at the air-liquid interface using the drip flow biofilm reactor. *Nature Protocols*, v. 4, n. 5, p. 783-788, 2009.
- GROSS, Erin L. et al. Beyond *Streptococcus mutans*: Dental Caries Onset Linked to Multiple Species by 16S rRNA Community Analysis. *Plos One*, v. 7, n. 10, 2012.
- GUGGENHEIM, B. et al. In vitro modeling of host-parasite interactions: the 'subgingival' biofilm challenge of primary human epithelial cells. *Bmc Microbiology*, v. 9, n. 1, p. 280-289, 2009.
- GUGGENHEIM, B. et al. Validation of an in vitro Biofilm Model of Supragingival Plaque. *Journal Of Dental Research*, v. 80, n. 1, p. 363-370, 2001.
- GYO, M. et al. Surface Response of Fluorine Polymer-Incorporated Resin Composites to Cariogenic Biofilm Adherence. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 74, n. 5, p. 1428-1435, 2008.
- HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 15, n. 1, p. 30-44, 2015.
- HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R.J.. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular Oral Microbiology*, v. 27, n. 6, p.409-419, 2012.
- HARRISON, J. J. et al. Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nature Protocols*, v. 5, n. 7, p. 1236-1254, 2010.

HAYATI, F. et al. An artificial biofilm induced secondary caries model for in vitro studies. *Australian Dental Journal*, v. 56, n. 1, p. 40-47, 2011.

HERBERT, D.; ELSWORTH, R.; TELLING, R. C. The Continuous Culture of Bacteria; a Theoretical and Experimental Study. *Journal of General Microbiology*, v. 14, n. 3, p. 601-622, 1956.

HOBDELL, M. et al. Global goals oral health 2020. *International Dental Journal*, n.53, p. 285-288, 2003.

HOPE, C.K.; WILSON, M.. Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque. *Journal Of Microbiological Methods* , v. 66, n. 3, p. 390-398, 2006.

HUANG, X.; EXTERKATE, R.A.M.; CATE, J.M. Ten. Factors Associated with Alkali Production from Arginine in Dental Biofilms. *Journal of Dental Research*, v. 91, n. 12, p. 1130-1134, 2012.

HUJOEL, P. P. et al. The dentogingival epithelial surface area revisited. *Journal Periodontal Research*, v. 36, p. 48-55, 2001.

IBGE. Pesquisa nacional de saúde: 2013: acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. IBGE, p. 62–66, 2015.

JOSHI, J. B. Computational flow modelling and design of bubble column reactors. *Chemical Engineering Science*, v. 56, p. 5893-5933, 2001.

KANTARCI, N.; BORAK, F.; ULGEN, K. O. Bubble column review. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2263-2283, 2005.

KANTORSKI K. Z. et al. Adherence of *Streptococcus mutans* to uncoated and saliva-coated glass-ceramics and composites. *General Dentistry*, v. 56, p. 740-747, 2008.

KARA, D.; LUPPENS, S. B. I.; CATE, J. M.. Differences between single- and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula* in growth, acidogenicity and susceptibility to chlorhexidine. *European Journal Of Oral Sciences*, v. 114, n. 1, p.58-63, 2006.

KEEVIL, C. W. et al. Microbial film formation: dental plaque deposition on acrylic tiles using continuous culture techniques. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 62, n. 2, p. 129-138, 1987.

KINNIMENT, S. L. et al. Development of a Steady-State Oral Microbial Biofilm Community using the Constant-Depth Film Fermenter. *Microbiology*, v. 142, n. 3, p. 631-638, 1996.

KISTLER, J. O. et al. Bacterial community development in experimental gingivitis. *Plos One*, v.14, n.8, 2013.

KNIGHT, E. T. et al. Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontology 2000*, v. 71, n. 1, p.22-51, 2016.

KOO, H. et al. Apigenin and tt-Farnesol with Fluoride Effects on *S. mutans* Biofilms and Dental Caries. *Journal of Dental Research*, v. 84, n. 11, p. 1016-1020, 2005.

KOOPMAN, J. E. et al. Stability and Resilience of Oral Microcosms Toward Acidification and *Candida* Outgrowth by Arginine Supplementation. *Microbial Ecology*, v. 69, n. 2, p. 422-433, 2014.

KOOPMAN, J. E. et al. Stability and Resilience of Oral Microcosms Toward Acidification and *Candida* Outgrowth by Arginine Supplementation. *Microbial Ecology*, v. 69, n. 2, p. 422-433, 2014.

KOURKOUTAS, Y. et al. Immobilizations technologies and supports materials suitable in alcohol beverages production. *Food Microbiology*, v. 21, p. 377-397, 2004.

LEDDER, R. G. et al. An in vitro evaluation of hydrolytic enzymes as dental plaque control agents. *Journal of Medical Microbiology*, v. 58, n. 4, p. 482-491, 2009.

LEDDER, R. G. et al. Individual microflora beget unique oral microcosms. *Journal Of Applied Microbiology*, v. 100, n. 5, p. 1123-1131, 2006.

LI, Y. et al. Phylogenetic and functional gene structure shifts of the oral microbiome in periodontitis patients. *The ISME Journal*, v. 8, p. 1879-1891, 2014.

LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. Transient and steady states in continuous fermentation. Theory and experiment. *Journal of Biochemical And Microbiological Technology And Engineering*, v. 1, n. 4, p. 431-459, 1959.

LUPPENS, S. B. I. et al. Effect of *Veillonella parvula* on the antimicrobial resistance and gene expression of *Streptococcus mutans* grown in a dual-species biofilm. *Oral Microbiology And Immunology*, v. 23, n. 3, p.183-189, 2008.

MARSH, P. D. The role of continuous culture in modelling the human microflora. *Journal of Chemical Technology And Biotechnology*, v. 64, n. 1, p. 1-9, 1995.

MARSH, P. D.; DEVINE, D. A. How is the development of dental biofilms influenced by the host? *Journal Of Clinical Periodontology*, v. 38, p. 28-35, 2011.

MARSHALL, K. C. Interfaces in microbial ecology. *Harvard University Pres.*; Cambridge, p. 44-47, 1976.

MAURINA, G. Z. Análise fluidodinâmica de biorreator destinado à produção de hidrogênio utilizando CFD. 2014. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia de Processos e

Tecnologias, Centro Tecnológico, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2014.

MAZID, M. A. Biocatalysts and immobilized enzyme/cell bioreactors. *Biotechnology*, v.11, p. 690-695, 1993.

MCBAIN, A.J. et al. Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. *Journal Of Applied Microbiology*, v. 98, n. 3, p. 624-634, 2005.

MEALEY, B. Periodontal disease and diabetes: A two-way street. *The Journal of the American Dental Association*; v.137, p. 26-31, 2006.

MICHELAN, R. et al. Effect of impeller type and mechanical agitation on the mass transfer and power consumption aspects of ASBR operation treating synthetic wastewater. *Journal of Environmental Management*, v. 90, p. 1357-1364, 2009.

MONROE, Don. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *Plos Biology*, v. 5, n. 11, 13 nov. 2007.

MOORE, L.v.h. et al. Bacteriology of Human Gingivitis. *Journal Of Dental Research*, [s.l.], v. 66, n. 5, p.989-995, maio 1987. SAGE Publications.

MOORE, W. E. C.; MOORE, Lillian V. H.. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology 2000*, [s.l.], v. 5, n. 1, p.66-77, jun. 1994.

NOVAES, L. F. et al. Effect of impeller type and agitation on the performance of pilot scale ASBR and AnSBR applied to sanitary wastewater treatment. *Journal of Environmental Management*, v. 91, p. 1647-1656, 2010.

O'NEILL, J. F.; HOPE, C. K.; WILSON, M. Oral bacteria in multispecies biofilms can be killed by red light in the presence of

- toluidine blue. *Lasers In Surgery And Medicine*, v. 31, n. 2, p. 86-90, 2002.
- PAMP, S.J. et al. Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *Cytometry Part A*, v. 75, p. 90-103, 2009.
- PANG, M.; WEI, J. Analysis of drag and lift coefficient expressions of bubbly flow system for low to medium Reynolds number. *Nuclear Engineering and Design*, v. 241, p. 2204-2213, 2011.
- PASTER, B. J. et al. Bacterial Diversity in Human Subgingival Plaque. *Journal Of Bacteriology*, [s.l.], v. 183, n. 12, p.3770-3783, 15 jun. 2001.
- PETERSEN, Poul Erik; OGAWA, Hiroshi. Strengthening the Prevention of Periodontal Disease: The WHO Approach. *Journal Of Periodontology*, [s.l.], v. 76, n. 12, p.2187-2193, dez. 2005.
- PINHEIRO, A. C. C. et al. Tratamento Periodontal e Bem-estar: Um Estudo Qualitativo. *Revista Brasileira em Promoção da Saúde*, v. 19, n. 2, p. 68-73, 2006.
- PINHO, S. C. et al. M.Feasibility of treating partially soluble wastewater in an aerobic sequencing batch biofilmreactor (AnSBBR) with mechanical stirring. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 517-519, 2005.
- PRADELLA, J. G. C. Reatores com células imobilizadas. Cap. 16 in W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANII. *Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica*. Ed. Edgard Blucher Ltda, v. 2, São Paulo, 2001.
- PRATTEN J. et al. Structural studies of microcosm dental plaques grown under different nutritional conditions. *FEMS Microbiology Letters*, v. 189, p. 215-218, 2000.

PRATTEN J., et al. Response of single species biofilms and microcosm dental plaques to pulsing with chlorhexidine. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 42, p. 453-459, 1998.

RAMSEY, M. M.; WHITELEY, M.. Polymicrobial interactions stimulate resistance to host innate immunity through metabolite perception. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, v. 106, n. 5, p.1578-1583, 2009.

RASIAH, I. A. et al. Variation in bacterial DGGE patterns from human saliva: over time, between individuals and in corresponding dental plaque microcosms. *Archives Of Oral Biology*, v. 50, n. 9, p. 779-787, 2005.

REN, D. et al. High-Throughput Screening of Multispecies Biofilm Formation and Quantitative PCR-Based Assessment of Individual Species Proportions, Useful for Exploring Interspecific Bacterial Interactions. *Microbial Ecology*, v. 68, n. 1, p. 146-154, 2013.

RIEP, B. et al. Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 6, p.1705-1711, 22 abr. 2009.

RINASTITI, M. et al. Effect of Biofilm on the Repair Bond Strengths of Composites. *Journal Of Dental Research*, v. 89, n. 12, p. 1476-1481, 2010.

ROBERTS, S.K.; WEI, G.X.; WU, C.D. Evaluating biofilm growth of two oral pathogens. *Letters In Applied Microbiology*, v. 35, n. 6, p. 552-556, 2002.

RØDER, H. L., SØRENSEN, S. J., BURMØLLE, M. Studying Bacterial Multispecies Biofilms: Where to Start? *Trends In Microbiology*, v. 24, n. 6, p. 503-513, 2016.

SCANNAPIECO F. Pneumonia in non ambulatory patients: The role of oral bacteria and oral hygiene. *Journal of the American Dental Association*; v.137, p. 21-25, 2006.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e processos fermentativos. Cap. 8 in; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.; AQUARONE, A.; BORZANI, E. *Engenharia Bioquímica (Biotecnologia Industrial)*, Blucher, v. 2, 2001.

SHADDOX, L.M. et al. Perpetuation of subgingival biofilms in an in vitro model. *Molecular Oral Microbiology*, v. 25, n. 1, p. 81-87, 2010.

SHAIKH, A.; AL-DAHMAN, M. H. A review on flow regime transition in bubble columns. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, v. 5, p. 1-68, 2007.

SIM, C. P.; DASHPER, S. G.; REYNOLDS, E. C. Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents. *Journal Of Dentistry*, v. 50, p. 1-11, 2016.

SIM, C. P.C.; DASHPER, S. G.; REYNOLDS, E. C.. Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents. *Journal Of Dentistry*, v. 50, p. 1-11, 2016.

SIM, C. P.C.; DASHPER, S. G.; REYNOLDS, E. C.. Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents. *Journal Of Dentistry*, v. 50, p.1-11, 2016.

SIMOES, L. C.; SIMOES, M.; VIEIRA, M. J.. Biofilm Interactions between Distinct Bacterial Genera Isolated from Drinking Water. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 73, n. 19, p. 6192-6200, 2007.

SIMÓN-SORO, Á. et al. Microbial Geography of the Oral Cavity. *Journal Of Dental Research*, v. 92, n. 7, p. 616-621, 2013.

SISSONS C. H. et al. Patterns and rates of growth of microcosm dental plaque biofilms. *Oral Microbiology Immunology*, v. 10, p. 160-167, 1995.

SISSONS, C.h. et al. A Multi-station Dental Plaque Microcosm (Artificial Mouth) for the Study of Plaque Growth, Metabolism, pH, and Mineralization. *Journal Of Dental Research*, v. 70, n. 11, p.1409-1416, 1991.

SISSONS, C.H. et al. Microbiota of Plaque Microcosm Biofilms: Effect of Three Times Daily Sucrose Pulses in Different Simulated Oral Environments. *Caries Research*, v. 41, n. 5, p. 413-422, 2007.

SOARES, G. M. S. et al. Effects of Azithromycin, Metronidazole, Amoxicillin, and Metronidazole plus Amoxicillin on an In Vitro Polymicrobial Subgingival Biofilm Model. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 59, n. 5, p. 2791-2798, 2015.

STANDAR, K. et al. Setup of an In Vitro Test System for Basic Studies on Biofilm Behavior of Mixed-Species Cultures with Dental and Periodontal Pathogens. *Plos One*, v. 5, n. 10, p. 131-135, 2010.

TABIB, M. V.; ROY, S. A.; JOSHI, J. B. CFD simulation of bubble column-An analysis of interphase forces and turbulence models. *Chemical Engineering Journal*, v. 139, p. 589-614, 2008.

TAYLOR, F. et al. Control of packed collum fouling in the continuous fermentation and stripping of ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 51, p. 33-39, 1996.

TENOVER, F.C. Mechanisms of anti-microbial resistance in bacteria. *American Journal Infect Control*; v. 34, p. 64-73, 2006.

The Journal of the American Dental Association; v.137, p. 7-13, 2006.

THOMPSON, H. et al. In Vitro Culture of Previously Uncultured Oral Bacterial Phylotypes. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 81, n. 24, p. 8307-8314, 2015.

THORAT, B.; JOSHI, J. Regime transition in bubble columns: experimental and predictions. *Experimental Thermal and Fluid Science*, v. 28, p. 423-430, 2004.

WADE, W. G. Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease? *Journal Of Clinical Periodontology*, v. 38, p. 7-16, 2011.

WALKER, C.; SEDLACEK, M. J.. An in vitro biofilm model of subgingival plaque. *Oral Microbiology And Immunology*, v. 22, n. 3, p. 152-161, 2007.

WALTERS, John; LAI, Pin-chuang. Should Antibiotics Be Prescribed to Treat Chronic Periodontitis? *Dental Clinics Of North America*, [s.l.], v. 59, n. 4, p.919-933, out. 2015.

WANG, X. et al. Scale-up and optimization of biohydrogen production reactor from laboratory-scale to industrial-scale on the basis of computational fluid dynamics simulation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 10960-10966, 2010.

YANG, Shang-tian (Ed.). *Bioprocessing for value-added products from renewable resources: New Technologies and applications*. Amsterdam: Elsevier, 669 p., 2007.

ZHANG, M. et al. Biofilm Layers Affect the Treatment Outcomes of NaF and Nano-hydroxyapatite. *Journal Of Dental Research*, v. 94, n. 4, p. 602-607, 2015.