



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

**JEISA ZIELLE DE SOUZA RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE**  
***Lactobacillus fermentum* TcUESC01 SOBRE *Streptococcus mutans***

Vitória da Conquista, BA

2018

**JEISA ZIELLE DE SOUZA RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
*Lactobacillus fermentum* TcUESC01 SOBRE *Streptococcus mutans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regiane Yatsuda  
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Trovatti Uetanabaro  
Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC

Vitória da Conquista, BA

2018

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

Rodrigues, Jeisa Zielle de Souza Rodrigues

Avaliação da atividade antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 sobre *Streptococcus mutans* / Jeisa Zielle de Souza Rodrigues.- 2018.

69 f.: il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regiane Yatsuda.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Trovatti Uetanabaro.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2018.

1. Cárie. 2. Probióticos. 3. Farmacoepidemiologia. 4. *Lactobacillus fermentum*. I. Universidade Federal da Bahia. II. Instituto Multidisciplinar em Saúde. III. Yatsuda, Regiane. IV. Uetanabaro, Ana Paula Trovatti. V. Título.

CDU: 616.314-002

**JEISA ZIELLE DE SOUZA RODRIGUES**


**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE**  
***Lactobacillus fermentum* TcUESC01 SOBRE *Streptococcus mutans***

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia. Vitória da Conquista – BA,



Prof.ª Dr.ª Regiane Yatsuda (Orientadora)

Universidade Federal da Bahia



Prof. Dr. Lucas Miranda Marques (Examinador)

Universidade Federal da Bahia



Prof. Dr. Guilherme Barreto Campos (Examinador)

Universidade Federal da Bahia

Dedico este trabalho aos meus pais Josino e Zuleide por serem minha maior referência de dedicação e amor a vida e ao trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter pelo o que e por quem agradecer. Agradeço pela minha vida, fé, saúde, amigos, erros e acertos cometidos principalmente durante esse dois anos que os tornaram, até então, os mais desafiadores da minha vida.

À minha orientadora Regiane, pela orientação que vai desde o PET Biotecnologia, TCC até essa dissertação. Admiro e agradeço pelos ensinamentos e paciência comigo. Sou muito grata também pelas broncas que sem dúvida foram necessárias para meu crescimento.

Aos meus pais Josino e Zuleide, por todo amor e confiança, sempre me apoiando e confiando em mim e no meu trabalho. À eles devo tudo o que sou e o que tenho.

Aos meus irmãos Jean e Zaqueu que são meu ponto de paz e equilíbrio, agradeço por todo amor e amizade.

À meu noivo Felipe, por confiar em mim mais do que eu mesma. Pelo amor, amizade, cumplicidade e incentivo em sempre me fazer melhor e me sentir melhor.

Aos professores da UFBA pelo conhecimento compartilhado, e à banca (Lucas e Guilherme) por aceitarem o convite e por enriquecer ainda mais esse trabalho.

À minhas amigas Aracely, Cláudia e Qeren, pelos bons e maus momentos compartilhados durante esses dois anos, dentro ou fora do laboratório.

À meus companheiros e amigos de laboratório, Thiago e Daniela pelos momentos e ensinamentos vivenciados.

À Manuela, eu agradeço por tudo. Esse trabalho não seria possível sem sua contribuição e amizade. Pelas caronas, ensinamentos, positividade e energia contagiante.

A Nayara e Brenda, pela amizade, trabalho e experiência compartilhados.

E por fim, a todo grupo "mutans": Rafael, Louise, Patrick, Iago, Paulo, Jamile, Mariane, Nayara, Brenda e Manu. É indiscutível que eu não teria conseguido sem a ajuda de vocês. Agradeço pelo compromisso e pelos momentos de descontração que tornaram esse trabalho ainda mais amado.

*"Take your pleasure seriously" Charles Eames*

## RESUMO

RODRIGUES, JEISA. **Avaliação da atividade antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 sobre *Streptococcus mutans* UA159.** 2018. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2018.

A cárie dentária é uma doença crônico-infecciosa de caráter multifatorial que se inicia com a formação do biofilme bacteriano causado principalmente pelo *Streptococcus mutans*. Além da higienização diária que é inerente ao indivíduo, existem poucos métodos preventivos para combater a cárie. Os probióticos vêm apresentando inúmeros benefícios a saúde, inclusive no combate a doenças orais. Cepas de *Lactobacillus fermentum* já apresentaram potencial probiótico contra *S. mutans*, mas ainda é pouco estudada. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do inóculo e dos metabólitos produzidos pelo *L. fermentum* TcUESC01 contra *S. mutans* UA159. Para isso, foi realizada uma curva de crescimento de *L. fermentum* e tanto o inóculo como os metabólitos formados na fermentação foram testados contra o crescimento de *S. mutans* nos testes de difusão em ágar, e apenas seus metabólitos nos testes de concentração inibitória mínima, concentração bactericida mínima e inibição da aderência celular. A inibição da formação de biofilmes, queda de pH e permeabilidade à prótons também foram testadas com os metabólitos. A zona de inibição começou a ser formada às 14 horas e continuou até as 16 horas. O inóculo contendo *L. fermentum* também apresentou zona de inibição. A CIM para os metabólitos foi de 1280 mg/mL e o CBM foi obtido com a concentração maior ao do CIM (5120 mg/mL). Metade da concentração de CIM (640 mg/mL) foi necessária para inibir a adesão de *S. mutans* à superfície das microplacas. Nas análises dos biofilmes, o tratamento com os metabólitos, na concentração testada, não foi capaz de reduzir a biomassa, glucanos insolúveis e solúvel em álcali em comparação com o biofilme do controle ( $p > 0.05$ ). Os metabólitos também não afetaram a produção de ácido e a tolerância ácida das células de *S. mutans* em biofilmes comparado ao grupo salina ( $p > 0.05$ ). Os resultados demonstram uma possível concentração-dependência dos metabólitos na eficácia em combater *S. mutans* como já mostrado em estudos anteriores. Desta forma, nosso trabalho mostrou que os metabólitos produzidos pelo *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 têm grande potencial para serem utilizados como agente antimicrobiano contra *S. mutans* por apresentarem atividade antiaderente e atividade bactericida em células planctônicas. Entretanto, mais pesquisas devem ser feitas para



caracterizar esses metabólitos e, assim, concentrá-los para obter melhores resultados nos testes de biofilmes.

**Palavras-chave:** *Streptococcus mutans*; Probióticos; *Lactobacillus*; Cárie.

## ABSTRACT

RODRIGUES, JEISA. **Antimicrobial activity of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 against *Streptococcus mutans* UA159.** 2018. Master's Dissertation – Multidisciplinary Institute of Health, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2018

Dental caries is a multifactorial chronic-infection disease, which starts with a bacterial biofilm formation caused mainly by *Streptococcus mutans*. Besides the daily hygiene that is inherent to the individual, there are few preventive methods to combat dental caries. The use of probiotics has shown numerous health benefits, including in the fight against oral diseases. Strains of *Lactobacillus fermentum* have already shown probiotic potential against *S. mutans*, but there are still few studies. Thus, the aim of our study was to evaluate the antimicrobial activity of the inoculum and metabolites produced by *L. fermentum* TcUESC01 against *S. mutans* UA159. For this, a growth curve of *L. fermentum* was performed and both the inoculum and the metabolites formed in the fermentation were tested against the growth of *S. mutans* UA159 in agar diffusion tests, and only its metabolites were tested to determine the minimum inhibitory concentration, minimal bactericidal concentration and inhibition of cell adhesion. Inhibition of biofilm formation, pH drop and proton permeability were also tested with the metabolites. The zone of inhibition began to be formed at 14 hours and continued until 16 hours. The inoculum containing *L. fermentum* also showed zone of inhibition. The MIC for the metabolites was 1280 mg/mL and the MBC was obtained with a concentration higher than the MIC equal to 5120 mg/mL. Half of the MIC concentration (640 mg/mL) was required to inhibit *S. mutans* adhesion to the surface of the microplates. In the biofilm analyzes, the treatment with the metabolites in the tested concentration was not able to reduce biomass ( $17.40 \pm 9.79$  mg/biofilm), insoluble glucans ( $11.24 \pm 0.78$  mg/biofilm) and alkali soluble ( $1.74 \pm 0.52a$  mg/biofilm) compared to the control biofilm ( $p > 0.05$ ). The metabolites also did not affect acid production and acid tolerance of *S. mutans* cells in biofilms compared to saline group ( $p > 0.05$ ). The results explain the concentration-dependence of the metabolites in the efficacy in fighting *S. mutans* how previous studies have already shown. Thus, our work showed that the metabolites produced by the *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 have a great potential to be used as an antimicrobial agent against *S. mutans* for presenting anti-adherence activity and bactericidal activity in planktonic cells. However, more researches should be done in order to characterize these metabolites and thus, concentrate them to obtain better results in the biofilms tests.

**Keywords:** *Streptococcus mutans*; Probiotics; *Lactobacillus*; Caries

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - Sequência da confecção dos corpos de prova.....	18
<b>FIGURA 2</b> - Representação das fases do ensaio de formação, <i>in vitro</i> , do biofilme por <i>S. mutans</i> .....	19
<b>GRAPHIC 1</b> - Growth curve of <i>Lactobacillus fermentum</i> TcUESC01 in MRS broth medium until 16 hours.....	41
<b>TABLE 1</b> - Plate microdiffusion test using metabolites of <i>Lactobacillus fermentum</i> TcUESC01 produced at different times on the growth curve against <i>Streptococcus mutans</i> UA159.....	42
<b>TABLE 2</b> -. Values of Minimal Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Inhibitory Concentration of Cell Adhesion (MICA) of the metabolites of <i>Lactobacillus fermentum</i> TcUESC01 against <i>Streptococcus mutans</i> UA159.....	43
<b>TABLE 3</b> - Effects of the metabolites of the <i>Lactobacillus fermentum</i> TcUESC01 on viability of <i>Streptococcus mutans</i> UA159 in Biofilms.....	44
<b>GRAPHIC 2</b> - Influence of metabolites of <i>Lactobacillus fermentum</i> TcUESC01 on glycolytic pH-drop in <i>Streptococcus mutans</i> UA159 in Biofilms.....	45
<b>GRAPHIC 3</b> - Influence of the metabolites of the <i>Lactobacillus fermentum</i> TcUESC01 on proton permeabilities of <i>Streptococcus mutans</i> UA159 in Biofilms.....	46
<b>TABLE 4</b> - Effects of the metabolites of the <i>Lactobacillus fermentum</i> TcUESC01 on the composition of <i>Streptococcus mutans</i> UA159 in Biofilms.....	47

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>4</b>
2.1	A microbiota oral e <i>Streptococcus mutans</i>	4
2.2	A cárie dentária	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.3	Probióticos	8
2.3.1	Probióticos e a cárie dentária	9
2.4	<i>Lactobacillus</i>	10
2.4.1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	12
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
3.1	Objetivos Gerais	14
3.2	Objetivos específicos	14
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>15</b>
4.1	<i>Micro-organismos e cultivo</i>	15
4.2	Produção e obtenção da substância antimicrobiana	15
4.3	Avaliação antimicrobiana de <i>Lactobacillus fermentum</i> TcUESC01 por microdifusão em placa	15
4.4	Liofilização	16
4.5	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	16
4.6	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	17
4.7	Inibição da aderência celular (CIMA)	17
4.8	Confecção dos discos para realização do biofilme	17
4.9	Ensaio de Biofilme	18
4.9.1	Biomassa (peso seco)	20
4.9.2	Viabilidade bacteriana (Contagem de UFC)	20
4.9.3	Quantidade de polissacarídeos (solúveis em água, insolúveis e solúveis em alcáli)	20
4.10	Queda de pH (via glicolítica)	20
4.11	Permeabilidade das células dos biofilmes a prótons	21
4.12	Análises estatísticas	22
	<b>CAPÍTULO</b>	<b>30</b>

<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>55</b>
----------	-----------------------------------	-----------

## 1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença crônica-infecciosa, de caráter multifatorial e de alta prevalência em toda população, sendo frequentemente citada como a doença infecciosa mais prevalente em crianças (HEILMANN; TSAKOS; WATT, 2015). Ela é considerada irreversível, uma vez que leva a cavitação do dente devido a desmineralização das substâncias inorgânicas e destruição das substâncias orgânicas dos tecidos dentários (SHARMA et al., 2016).

O início da formação da cárie dentária resulta de um desbalanço da microbiota oral que pode estar envolvido com a baixa imunidade e idade do paciente, mas principalmente por fatores externos como a ingestão contínua de açúcares e a falta de higiene bucal que vão levar a progressão da cavidade cariosa, selecionando bactérias cariogênicas que vão fermentar os carboidratos oriundos da dieta formando ácidos orgânicos responsáveis pela desmineralização dos dentes (LEITES; PINTO; SOUZA, 2005; BARBIERI et al., 2007; MARCOTTE; LAVOIE, 1998)

As principais bactérias envolvidas na formação das cáries são os estreptococos do grupo mutans. Dentre esse grupo, *Streptococcus mutans* é frequentemente citada como a principal espécie envolvida no início da formação da cárie em humanos, contudo, há relatos da presença de outros microrganismos como os lactobacilos, embora acredita-se que eles estejam envolvidos mais na progressão da doença do que no seu início (GIBBONS; COHEN; HAY, 1986; SHETTY et al., 2016).

*S. mutans* são bactérias gram-positivas, consideradas como a principal espécie envolvida na formação da cárie devido a sua capacidade de produzir ácido pela fermentação dos açúcares da dieta e de sobreviverem nesse meio ácido, tornando-as tanto acidogênicas como acidúricas (GALRÃO; PROENÇA; BARROSO, 2011). Além dessas características, a virulência dessas bactérias está intimamente relacionada a sua capacidade de se aderir ao dente pela síntese de polissacarídeos extracelulares (PEC), tais como os glucanos que são sintetizados na presença de sacarose pela ação de exoenzimas chamadas de glicosiltransferases (Gtfs) e assim, formarem um biofilme bacteriano, também conhecido como placa bacteriana, na superfície do dente (KOO et al., 2006; LEMOS; ABRANCHES; BURNE, 2016).

Embora a higienização diária com a escovação dos dentes e uso do fio dental possam remover parte do biofilme dental, a placa residual pode permanecer aderida ao dente (JIANG et al., 2016). Um vez formada a cavidade cariosa, o seu controle está principalmente focado nas restaurações em detrimento do uso de estratégias preventivas viáveis e eficientes (MAHESWARI et al., 2015). Além disso, esse tratamento mecânico é considerado dispendioso e demorado, causando um efeito negativo no paciente (HEILMANN; TSAKOS; WATT, 2015). Como mostrado pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2003), o tratamento para cáries é o quarto mais caro entre as doenças infecciosas, com um gasto em torno de 5-10% do total das despesas direcionadas a saúde.

Dessa forma, além da atual preocupação da comunidade científica no uso indiscriminado de antibióticos que está gerando uma forte resistência microbiana, há uma crescente demanda da população por métodos mais ecológicos para o tratamento de infecções como as cáries. Uma estratégia que se tem mostrado promissora é o uso dos probióticos, os quais vêm apresentando bons resultados com inúmeros benefícios à saúde através de várias pesquisas realizadas nos últimos anos (OLIVEIRA-SEQUEIRA; RIBEIRO; GOMES, 2008).

De acordo com a OMS (2006), os probióticos são definidos como "organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro". Os microrganismos probióticos são oriundos principalmente do isolamento do trato gastrointestinal (TGI) onde está concentrado a maior parte dos microrganismos comensais do corpo (MUKHOPADHYAY; GANGULY, 2014; GUPTA; GARG, 2009).

Há centenas de diferentes espécies de bactérias no TGI que contribuem com diferentes mecanismos de proteção ao corpo, estimulando o sistema imune, contribuindo para a digestão e protegendo o intestino contra bactérias invasoras (MUKHOPADHYAY; GANGULY, 2014). Os probióticos são constituídos principalmente por bactérias produtoras de ácido lático (BAL), como os lactobacilos, lactococos, enterococos, estreptococos, bifidobacterias, mas, além delas outras espécies também têm sido estudadas com potencial probiótico como os *Bacillus spp.* e os fungos *Saccharomyces spp.* e *Aspergillus spp.* (CHANDOK et al., 2013).

Embora o melhor benefício estabelecido dos probióticos à saúde esteja envolvido na melhoria do desempenho intestinal e do sistema imunológico, a emergência da resistência aos antibióticos e a busca por novos tratamentos e métodos preventivos, trouxeram a sua aplicabilidade também nas doenças orais, sendo que alguns estudos corroboram com a ideia de que os probióticos podem prevenir ou reduzir a incidência de cáries dentárias, além de outras doenças orais como as periodontites, halitoses e também a candidíase (SHI et al, 2016; PRADEEP; KUTTAPA; PRASSANA, 2012).



Nase et al. (2001), demonstraram o benefício do *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG) ao reduzir a incidência de cáries dentárias e da contagem de células do *S. mutans* após o consumo de laticínios contendo LGG, especialmente entre crianças. Em outro estudo realizado por Soderling et al. (2010), a eficácia dos probióticos foi demonstrada pela redução do biofilme bacteriano dos *Streptococcus mutans* por cepas de *Lactobacillus*.

Ainda são poucos os estudos que relatam a atividade dos *Lactobacillus fermentum* contra bactérias cariogênicas. Contudo, no estudo de Chen, et al. (2012), *L. fermentum* assim como seu produto fermentado mostraram ter propriedade antagônica contra *S. mutans* e outras bactérias orais patogênicas.

*L. fermentum* TcUESC01 é uma cepa isolada da fermentação da poupa do cacau, um meio rico para o crescimento microbiano, que já apresentou características probióticas em estudos preliminares (SAITO et al., 2014; MELO et al., 2017). Contudo, não há relatos de estudos do seu efeito contra bactérias patogênicas orais.

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi analisar o potencial antimicrobiano dos metabólitos sintetizados pelo *L. fermentum* TcUESC01 contra *S. mutans*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 1 - Microbiota oral e *Streptococcus mutans*

Nossa cavidade oral é um cenário propício a colonização de microrganismos, uma vez que é constituído por tecidos moles e duros, no qual encontra-se um ambiente quente e úmido, que estão conectados ao meio externo, trato respiratório e digestivo, tornando-o ideal para o crescimento de uma ampla diversidade de microrganismos, incluindo diferentes espécies de bactérias, fungos, vírus e protozoários (JAKUBOVICS et al., 2014; JIA et al., 2018).

As diferentes estruturas da cavidade oral, tais como os dentes, língua, gengiva, palato duro, palato mole e bochecha, são colonizadas por microrganismos distintos, contudo, a maioria é constituída principalmente por estreptococos e bastonetes gram-positivos (HAMADA; SLADE, 1980). Ainda que seja comum a todos os indivíduos algumas espécies da microbiota oral, há uma variedade predominante graças as diferenças no estilo de vida (alimentação, uso do cigarro, status socioeconômico), e também pelas diferenças genéticas características de cada um (JIA et al., 2018).

Dentre essa diversidade microbiana, estima-se que haja aproximadamente 700 espécies de bactérias existentes na nossa cavidade oral, embora apenas cerca de 280 tenham sido adequadamente cultivadas e nomeadas (JIA et al., 2018; DEWHIRST et al., 2010). Alguns dos principais gêneros da microbiota oral identificados e caracterizados são os *Streptococcus*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, entre outras (AVILA; OJCIUS; YILMAZ, 2009). Análises recentes com metagenômica e metatranscriptômica mostram que os estreptococos é o gênero de bactéria mais predominante na saliva, representando cerca de 25% de toda leitura de DNA presente (BELSTROM et al., 2017).

Os estreptococos orais são divididos em diferentes grupos: Mutans, Salivarius, Anginosus, Sanguinis e Mitis (KRETH; MERRITT, 2009). Pertencentes ao grupo Mutans, duas espécies possuem maior interesse clínico para o ser humano, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, ambas envolvidas na formação da cárie dentária (DZIEDZIC; WOJTYCZKA; KUBINA, 2015; OKADA, et al., 2005). Essas duas espécies são consideradas agentes causadores primários na formação da cárie dentária em humanos, e embora existam outras bactérias envolvidas na lesão cariiosa, o *S. mutans* é frequentemente isolado em um maior número de casos do que outras espécies tais como o *S. sobrinus*. Sendo

assim, *S. mutans* é considerado a espécie de maior relevância cariogênica para os seres humanos (KAWABATA; HAMADA, 1999; CONRADS, 2014).

A cariogenicidade de *S. mutans* se dá pela sua propriedade virulenta de formar biofilmes na superfície dos dentes (MARSH, 2006). Tais biofilmes também são conhecidos como placa dentária, e a formação da placa é o passo inicial para a progressão da cárie, assim como para a aquisição de outras doenças periodontais (HAMADA; SLADE, 1980). São conhecidas algumas características virulentas da bactéria que explicam sua capacidade de formar biofilme e, conseqüentemente, de originar a lesão cariosa, embora outros fatores externos e individuais devam ser também levados em consideração até a formação de uma cárie dentária. Desse modo, para a formação do biofilme, *S. mutans* possui características que lhes permitem aderir ao dente, atrelado a isso, ainda são capazes de produzir ácidos (acidogênicos) e de sobreviverem em um meio ácido (acidúricos), tornando-as assim ácido-tolerantes (MARSH, 2006).

Para conseguirem aderir ao dente, *S. mutans* produz polissacarídeos extracelulares como os glucanos, que medeiam a sua aderência ao dente, a partir da metabolização de açúcares da dieta (sacarose) pelas glicosiltransferases (GTFs). *S. mutans* produz 3 diferentes tipos de GTFs: as GTFB, GTFC e GTFD. A cooperação entre essas enzimas é essencial para a aderência eficaz das bactérias, uma vez que elas sintetizam produtos diferentes. As GTFB e as GTFC, codificadas pelos genes *gtfB* e *gtfC* e presentes na superfície celular bacteriana, sintetizam principalmente glucanos insolúveis em água que são ricos em ligações  $\alpha$ -1,3-glicosídicas. Por outro lado, as GTFD, codificadas pelo gene *gtfD* e detectadas em sobrenadante da cultura bacteriana, sintetizam glucanos hidrossolúveis ricos em ligações  $\alpha$ -1,6-glicosídicas (OOSHIMA, 2001; AOKI, 1986; HANADA, 1988).

Para o estabelecimento de um biofilme de alta densidade, é necessário a formação de uma matriz que aumente a integração das células bacterianas e a aderência das mesmas a superfície dental (MATSUMOTO-NAKANO, 2018). Para que isso ocorra, é necessário a síntese simultânea de glucanos pelas GTFB e GTFC, além da cooperação das GTFD de outros estreptococos como os *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus gordonii*, que na presença de sacarose participam ativamente da formação do biofilme, uma vez que podem aumentar a capacidade sintética dos glucanos (MATSUMOTO-NAKANO, 2018; TAMESADA, 2004).

Além de suas características aderentes, na presença de uma dieta rica em sacarose, *S. mutans* consegue fermentar esses carboidratos e produzir ácidos, o que o torna capaz também de sobreviver em um meio ácido, gerando um ambiente ideal para a desmineralização do dente (CHU; ZHANG; HE, 2016). *S. mutans* não possui uma cadeia respiratória, por isso, produz energia em forma de ATP pela glicólise, e em condições onde há excesso de açúcar, o principal produto final desse metabolismo é o ácido lático (DASHPER; REYNOLDS, 1996). Em condições de anaerobiose, o ATP produzido é hidrolisado pela enzima  $F_1F_0$ -ATPase que possui importante papel na manutenção do pH intracelular (HASHIMOTO; YOSHIDA; TAGAWA, 1990). O  $F_1F_0$ -ATPase consiste em duas partes principais: um local transportador de partículas hidrofílicas  $F_1$  ( $F_1$ -ATPase) e uma parte hidrofóbica  $F_0$ , que está envolvida na translocação de prótons (HASHIMOTO; YOSHIDA; TAGAWA, 1990). Dessa forma,  $F_1F_0$ -ATPase gera um gradiente eletrogênico adequado pela hidrólise do ATP até a extrusão de prótons, reduzindo o pH do meio e mantendo o pH citoplasmático da célula (SUZUKI; TAGAMI; HANADA, 2000).

Como as alterações do pH são dependentes da presença ou não de açúcares no meio, o microrganismo necessita de mecanismos que o mantenha vivo em meio ácido e que o torne capaz de sobreviver às alterações drásticas do pH, caso contrário, a sua produção de ácido seria suicida (HAMILTON; BUCKLEY, 1991; MATSUI; CVITKOVITCH, 2010). A tolerância do *S. mutans* ao ácido é composta por vários fatores e mecanismos diferentes que podem ser constitutivos, como a redução da fluidez da membrana lipídica e um sistema energizado de translocação de íons, como também pode ser parte de uma resistência adquirida diante da necessidade de sobreviver em meio ácido, também referida como ácido adaptação ou como "acid tolerance response" (ATR), que possui como exemplo de mecanismo uma via de reparo de DNA (BURNE, 1998).

## **2 - A cárie dentária**

O consumo de açúcar refinado em detrimento do uso do mel ocorreu durante a revolução industrial, e essa mudança coincide com o rápido aumento de cáries na população (ANDERSON et al., 2009). Dessa forma, o alto consumo de açúcar associado a uma má higiene, tornam grandiosos o risco e incidência da cárie (KÖNIG, 2004). A cárie, além de causar dor e desconforto, gera um problema financeiro, uma vez que o tratamento pode ser bastante dispendioso (INGLE et al., 2014). O risco da cárie está então associado a iniciativas

preventivas, o que leva a busca contínua dos cientistas por melhores formas de diagnóstico, tratamento e prevenção (KONIC, 2004; INGLE et al., 2014).

A cárie dentária poderia ser definida basicamente como "o produto da solubilização irreversível dos minerais do dente pela produção de ácidos por bactérias que se aderem a superfície dentária em comunidades bacterianas chamadas de placa dental" (LOESCHE, 1996). Contudo, essa definição se torna insatisfatória uma vez que a cárie é uma doença de caráter multifatorial e ocorre quando há um desbalanço na microbiota oral, sendo que essas mudanças podem ocorrer por fatores biológicos e ambientais (GRIGALUSKIENĖ; SLABŠINSKIENĖ; VASILIAUSKIENĖ, 2015).

Portanto, existe uma susceptibilidade do indivíduo à cárie, e essa susceptibilidade pode ser determinada por fatores extrínsecos como por exemplo, as condições sociais, as quais determinam o grau de conhecimento sobre a doença e sobre a prevenção da mesma. Outro fator extrínseco é a dieta do indivíduo, ou seja, a ingestão contínua de açúcares que vai favorecer a formação da placa dentária (LIMA, 2007; KUTSCH, 2014). A susceptibilidade também pode ser definida por fatores intrínsecos que são aqueles inerentes ao indivíduo, sendo difíceis de serem controlados. São eles, o fluxo e a composição da saliva, a capacidade tampão da mesma, além dos fatores hereditários e imunológicos (LIMA, 2007). Dessa forma, todos esses fatores podem interferir na formação da cárie dentária, contudo, os fatores microbiológicos são a principal causa dessa doença (SEMINARIO-AMEZ et al., 2017)

*S. mutans* foi uma das primeiras bactérias a ser isolada na lesão cariosa, e ainda é frequentemente isolada, além disso, possui características patogênicas que faz dela a principal bactéria envolvida na cárie (TAKAHASHI, 2011). Contudo, estudos vêm provando a existência de outras espécies microbianas envolvidas na lesão cariosa como por exemplo, espécies pertencentes aos gêneros *Rothia*, *Leptotrichia* e *Veillonella* presentes nas cáries no esmalte do dente e *S. sanguinis*, *Schlegelella*, *Atopobium*, *Pseudoramibacter*, e *Lactobacillus* nas cáries na dentina (SIMON-SORO; MIRA, 2015).

O envolvimento de outras espécies na origem e/ou progressão da cárie ainda vem sendo elucidado, mas muito já se sabe, como por exemplo, que a associação entre *S. mutans* e *Veillonella* no processo da cárie, aumentam a produção de ácido lático, assim como UFC (Unidade Formadoras de Colônias), apresentando um maior crescimento em placas inoculadas com ambas bactérias (NOORDA, 1988). Outro exemplo é o risco aumentado de cárie radicular na presença de lactocobilos e leveduras. Embora a relação entre cáries e a

contagem de lactobacilos já esteja bem definida, o risco de surgir novas cáries em um período fixo, ou seja, o risco de cárie decorrente dessa relação *Lactobacillus*/cáries ainda é questionável (BADET; THEBAUD, 2008).

O esmalte do dente, composto por 96% de material inorgânico e 4% de material orgânico e água, é considerado o tecido mais mineralizado do corpo humano (GUTIÉRREZ-SALAZAR; REYES-GASGA, 2003). Os principais compostos minerais constituintes do tecido dentário são o fosfato de cálcio e a hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot 2(\text{OH})$ ) (GUTIÉRREZ-SALAZAR; REYES-GASGA, 2003). Esse tecido mineralizado é continuamente sujeito às mudanças de remineralização e desmineralização, graças a difusão dos ácidos produzidos pela fermentação de carboidratos por microrganismos da placa dentária através dos poros da dentina e do esmalte do dente (AOBA, 2004; FEATHERSTONE, 2008). Assim, diante de uma condição ácida ocorre a dissolução do tecido da superfície do dente e os constituintes iônicos liberados difundem para a cavidade oral, contudo, os mesmos tendem a precipitar novamente graças ao equilíbrio proporcionado pela propriedade tampão da saliva (MORENO; ZAHRADNIK, 1974). Porém, se a taxa de dissolução for maior que a de precipitação, a cavidade será irreversivelmente formada, dando origem a cárie dental (MORENO; ZAHRADNIK, 1974; AOBA, 2004).

### **3 - Probióticos**

Muitas doenças são causadas por microrganismos patogênicos, e muitos destes se tornaram resistentes às drogas atuais, o que leva a um problema ainda maior em caso de infecção. Contudo, existem muitas espécies de microrganismos benéficos que vivem no nosso corpo, e algumas dessas espécies já são utilizados com a finalidade de beneficiar o hospedeiro, que são aqueles que se enquadram como os chamados probióticos (FIJAN, 2014).

A OMS (2001) define probióticos como "organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro". Há centenas de anos que as pessoas notaram os benefícios da ingestão de alimentos fermentados por microrganismos. Hoje os produtos probióticos contêm uma gama de espécies de fungos e bactérias consumidos em diferentes tipos de preparações (GOGINENI, 2013).

Nem todo microrganismo benéfico é considerado um probiótico. Para que seja, estudos são realizados e algumas exigências mínimas, criadas pela FAO/WHO em 2002,

devem ser confirmadas, como por exemplo: resistência a acidez gástrica, ao ácido biliar e às enzimas digestivas, atividade antimicrobiana contra cepas patogênicas, avaliação da segurança para sua administração e confirmação dos seus efeitos benéficos no hospedeiro (VANDENPLAS, 2015). As espécies mais comuns encontradas em alimentos probióticos são do gênero lactobacilos e bifidobacteria, porém outras espécies como *Enterococcus*, *Bacillus*, *Escherichia coli* e *Saccharomyces boulardii* também são comumente encontrados em preparações probióticas (SAXELI, 2008).

Vários mecanismos diferentes de atuação dos probióticos têm sido estudados. Eles podem inibir a colonização de microrganismos patogênicos pela inibição competitiva por sítios de adesão, pela produção de substâncias antimicrobianas como ácidos orgânicos, amônia, ácidos graxos livres, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas e pelo estímulo do sistema imune do hospedeiro (ALVAREZ-OLMOS; OBERHELMAN, 2001).

Os probióticos são conhecidos há muitos anos principalmente por suas contribuições na melhoria e tratamento de várias desordens gastrointestinais. Atualmente, outras linhas de pesquisa vêm mostrando suas contribuições em outras áreas como no tratamento de alergias, infecções no trato urogenital, infecções respiratórias, vaginose bacteriana e na prevenção de cáries dentárias (VERNA; LUCAK, 2010).

### **3.1 - Probióticos e a cárie dental**

A prevenção da cárie envolve o controle mecânico da placa dentária, com a finalidade de conservar a homeostase microbiana. Alguns antimicrobianos e antiplacas são produtos que complementam o controle mecânico da placa dentária. Contudo, há um surgimento crescente de resistência microbiana aos antimicrobianos e também uma necessidade por parte da população por tratamentos mais naturais (ALLAKER; DOUGLAS, 2015).

É importante manter o equilíbrio do ambiente oral para que os patógenos não ganhem vantagem competitiva e predisponham a cavidade oral a qualquer tipo de doença. Diante da busca por novos tratamentos para a cárie dentária, uma alternativa promissora é o combate de microrganismos patogênicos com o uso de bactérias inofensivas que consigam deslocar aquelas que são patogênicas, alternativa conhecida como bacterioterapia como o uso dos probióticos (CAGLAR; KARGUL; TANBOGA, 2005).

O mecanismo da ação dos probióticos na cavidade oral se assemelha aos seus mecanismos no intestino. Ou seja, eles competem com outras bactérias por sítios de adesão, formam agregados, competem por nutrientes e fatores de crescimento, produzem substâncias antimicrobianas, e aumentam a resposta do sistema imune (HAUKIOJA, 2010).

A grande maioria dos produtos probióticos possuem em sua composição espécies do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* que são bactérias ácido lácticas, portanto, inimigas da saúde oral uma vez que na fermentação do açúcar produzem ácido e reduzem o pH oral, assim como estreptococos do grupo mutans (MEURMAN, 2005). Contudo, muitos dos produtos probióticos são consumidos em produtos lácteos que são considerados o veículo ideal para os probióticos, e quando as bactérias ácido lácticas são consumidas em laticínios a acidez é influenciada pela capacidade tampão do leite (VINDEROLA et al., 2011). Além disso, o estudo realizado por Schiipbachl et al. (1996), demonstrou que alguns peptídeos do leite são capazes de se incorporar a película salivar e reduzir a aderência do *S. mutans*. Embora haja diferentes composições de lactobacilos na cavidade oral, algumas espécies são mais específicas na contribuição da formação da cárie dentária como é o caso de determinadas cepas de *Lactobacillus salivarius* (SHIMADA et al., 2015).

Sendo assim, dado a importância de *S. mutans* na formação da cárie, muitos estudos com probióticos buscam reduzir sua contagem na cavidade oral ou interferir na sua patogenicidade. Algumas pesquisas já mostram o potencial anticariogênico dos probióticos, como no estudo realizado por Cogulo et al. (2010), onde foi observado uma redução na contagem de *S. mutans* na saliva de pacientes que ingeriram o probiótico Kefir diariamente durante três semanas. Em outro estudo realizado por Soderling et al. (2011), o uso de quatro cepas diferentes de *Lactobacillus* foram capazes de inibir a formação do biofilme do *S. mutans* e ainda apresentaram capacidade antimicrobiana, reduzindo o número na contagem de células de *S. mutans*.

#### **4 - *Lactobacillus***

As bactérias ácido lácticas (BAL) que são tipicamente envolvidas na fermentação espontânea de alimentos, são classificadas como bactérias gram-positivas, catalase negativas, que crescem sob condições microaerófilas, anaeróbicas estritas e não formadoras de esporos (STILES; HOLZAPFEL, 1997). Diferentes gêneros compõem o grupo das BAL, e os



principais gêneros conhecidos são os *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, e *Bifidobacterium* (KLEIN, 1998).

O gênero *Lactobacillus* é o maior entre os gêneros que constituem as BAL, com aproximadamente 100 diferentes espécies descritas (CLAESSON; SINDEREN; TOOLE, 2007). Elas estão entre as BAL mais comuns envolvidas na produção de alimentos fermentados e na conservação de alimentos. O seu crescimento ótimo está entre 30-40°C e em uma faixa de pH entre 5,5-6,2, podendo crescer em pH entre 3 e 8 (SALVETTI; TORRIANE; FELIS, 2012). O principal produto final do metabolismo de açúcares dos *Lactobacillus* é o ácido láctico, porém algumas variações no produto e nos metabólitos podem existir, por exemplo, as homofermentativas produzem mais que 85% de ácido láctico, enquanto as heterofermentativas produzem ácido láctico, etanol e CO<sub>2</sub> (HAMMES; VOGEL, 1995).

Por causa dos seus diferentes produtos metabólicos, a classificação dos *Lactobacillus* pela associação da sua filogenia com seu fenótipo se torna difícil. Através do sequenciamento do gene do rRNA da subunidade 16S ribossômica é possível agrupar as espécies por características próximas, porém, não é possível a definição de espécies (FELIS; DELLAGLIO, 2015). Assim, baseado no sequenciamento do gene do rRNA 16S o gênero pode ser dividido em aproximadamente 7 ou 8 diferentes grupos (CLAESSON; SINDEREN; TOOLE, 2007).

A diversidade metabólica dos lactobacilos tornar mais difícil sua taxonomia e classificação, porém, é graças a essa diversidade que lhes é permitido colonizar uma grande variedade de habitats. Os lactobacilos têm sido utilizados durante décadas na conservação de alimentos graças a sua preservação por acidificação e ganho de sabor, textura e nutrição. A acidificação ocorre pela fermentação de açúcares e produção de ácido láctico, e sua capacidade de preservação também ocorre pela produção de bacteriocinas e exopolissacarídeos que inibem o crescimento de bactérias patogênicas e melhoram a textura do alimento, respectivamente (GIRAFFA; CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010).

Devido aos seus potenciais atributos terapêuticos e profiláticos, os lactobacilos também foram propostos como probióticos, sendo considerados como um dos mais importantes membros das bactérias desse grupo (ROCHA-RAMIREZ, 2017). Por exemplo, estudos mostram o potencial dos lactobacilos na redução da duração e severidade de quadros de diarreia, além disso eles promovem a secreção de imunoglobulina IgA, produzem bacteriocinas que são capazes de inibir microrganismos intestinais patogênicos, competem

por nutrientes e previnem a adesão celular de espécies patogênicas orais (NIXON, 2012; ROCHA-RAMIREZ, 2017; GILLOR; ETZION; RILEY, 2008; PUJIA et al., 2017).

#### 4.1 - *Lactobacillus fermentum*

Muitas espécies de *Lactobacillus* vêm sendo utilizadas industrialmente, embora muitas outras espécies com potencial probiótico podem ser encontrados em diferentes produtos fermentados (TULUMOĞLU; KAYA; ŞİMŞEK, 2014). Diferentes cepas de *Lactobacillus fermentum* já são utilizadas na preservação e fermentação de alimentos e também exibem características probióticas para o uso em doenças que acometem o intestino, vagina e a cavidade oral (SWAIN, 2014; TULUMOĞLU; KAYA; ŞİMŞEK, 2014; KAUR et al., 2013; CHE et al., 2012). Em estudo realizado por El-Ghaish, et al. (2011) foi demonstrado que o isolado *Lactobacillus fermentum* IFO3956 apresentou atividade proteolítica contra a caseína do leite, o que leva a crer no seu possível uso como antialérgico por pacientes com alergia ao leite. Já o isolado *L. fermentum* SM7 reduziu o colesterol em 66.8% tanto em testes *in vivo* como em testes *in vitro* como mostrado no trabalho realizado por Pan, et al. (2010).

Os lactobacilos também estão presentes na cavidade oral, e *L. fermentum* assim como *Lactobacillus gasseri* foram as espécies de *Lactobacillus* mais frequentes presentes na saliva de indivíduos saudáveis no estudo realizado por Köll-Klais, et al. (2005). *L. fermentum* também foi encontrado nas cáries tanto de adultos como de crianças, contudo, acredita-se que os lactobacilos são encontrados na cárie porque a lesão cariiosa constitui um ambiente propício que retém a sua presença, uma vez que possui um nicho retentivo que permite a sua acumulação, um ambiente anaeróbico e de baixo pH, além de ser uma fonte de carboidratos (CAUFIELD, 2015).

A cepa *L. fermentum* SG-A95, assim como seu produto fermentado apresentaram potencial probiótico com atividade antagonista contra bactérias patogênicas da cavidade oral (CHE et al., 2012). *L. fermentum* 20.4 também apresentou potencial probiótico, reduzindo significativamente a formação do biofilme de *S. mutans* (ROSSONI et al., 2018). Dessa forma, embora cepas de *L. fermentum* vêm apresentando bons resultados contra *S. mutans*, sabe-se que as cepas probióticas possuem características únicas, ou seja, cepas do mesmo gênero ou espécies podem ter resultados completamente diferentes no hospedeiro (COLLADO, 2012).

*L. fermentum* TcUESC01 é um probiótico isolado da fermentação do cacau que já apresentou características probióticas em estudos preliminares (SAITO, et al., 2014; MELO, et al., 2017). O seu sobrenadante reduziu significativamente o biofilme formado por *Staphylococcus aureus* no trabalho realizado por Melo et al. (2016), porém, não há relatos dos seus efeitos contra *S. mutans*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos Gerais

Avaliar o potencial antimicrobiano dos metabólitos da cepa *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 produzidos em sua fermentação contra *Streptococcus mutans* UA159.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Obter metabólitos a partir da fermentação de *L. fermentum* TcUESC01;
- Determinar a concentração inibitória mínima e bactericida mínima dos metabólitos de *L. fermentum* TcUESC01 sobre *S. mutans* UA159;
- Avaliar a ação dos metabólitos de *L. fermentum* TcUESC01 sobre a inibição da aderência celular de *S. mutans* UA159;
- Avaliar a inibição da formação de biofilme de *S. mutans* UA159 pelos metabólitos de *L. fermentum* TcUESC01;
- Avaliar a ação dos metabólitos de *L. fermentum* TcUESC01 sobre fatores de virulência de *S. mutans* UA159 em modelo de biofilme;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismos e cultivo

As cepas utilizadas para os testes *in vitro* foram *S. mutans* UA159 e *L. fermentum* TcUESC01. *L. fermentum* TcUESC01 foi isolado a partir da fermentação espontânea do cacau originário da região de Ilhéus-Itabuna/BA, identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA - Número de acesso GenBank KU244478 (Melo et al., 2017) e doadas pelo Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahia (UESC). A cepa foi cultivada em caldo MRS (Kasvi) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas e armazenada a -80°C.

A cepa de *S. mutans* UA159 utilizada foi proveniente do Departamento de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia, UNICAMP (Universidade de Campinas, Piracicaba, São Paulo). A cepa foi descongelada (-80°C), incubado durante 24 horas, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em caldo BHI e armazenado a -80°C para posterior reativação e realização dos experimentos.

### 4.2 Produção e obtenção da substância antimicrobiana

Uma curva de crescimento de *L. fermentum* foi realizada em sistema fechado com incubação em meio caldo MRS (Kasvi), com inóculo de  $1,5 \times 10^7$ , incubado à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A curva de crescimento microbiano foi determinada por espectrofotometria (Bel-photonics UV- VIS SPECTROPHOTOMETER UV- M51), sendo feita a leitura a cada hora (em absorbância a 630 nm) e feita uma contagem de células viáveis determinada por diluições seriadas e plaqueamento em meio ágar MRS de hora em hora.

Durante a curva de crescimento, alíquotas do meio foram coletadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos (a cada hora) e centrifugadas a 14000 rpm durante 15 minutos para obtenção do sobrenadante contendo os compostos produzidos durante o crescimento das bactérias.

### 4.3 Avaliação antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 por microdifusão em ágar

O inóculo de *S. mutans* UA159 foi realizado com uma concentração bacteriana final em torno de  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL (escala de 0,5 McFarland). Em seguida, o inóculo foi diluído em meio caldo BHI na proporção de 1:1000. Após a homogeneização, adicionou-se um volume de 300 µL do inóculo em 50 mL de ágar BHI. Posteriormente, esta suspensão foi

adicionada em placa de Petri e, após a solidificação, foram colocados cilindros de PVC (proporção 2 mm). Nos cilindros foram adicionados 100 µL do sobrenadante removido dos diferentes tempos de crescimento de *L. fermentum* (0 às 16 horas) ou o inoculo (leitura feita por espectrofotometria de 0,135 em 630 nm) contendo 100 µL de *L. fermentum* em meio MRS, ou ainda o meio MRS após 18 horas incubadas sob as mesmas condições como um controle. As placas foram incubadas durante 18 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, seguido de medição dos halos de inibição com o paquímetro (milímetros).

#### 4.4 Liofilização

Os produtos da fermentação da curva de crescimento de *L. fermentum* que apresentaram melhores resultados na inibição do crescimento de *S. mutans* pelo teste de microdifusão em ágar seguiram para testes posteriores. Deste modo, várias curvas de crescimento foram realizadas para coleta dos metabólitos do tempo que obteve maiores halos de inibição. Para uso em testes posteriores, todo o material foi liofilizado e armazenado a -80°C (aparelho labconco FreeZone 6) formando o produto da fermentação de *L. fermentum* liofilizado (PFL). O PFL foi posteriormente diluído em água estéril até a concentração desejada para cada teste.

#### 4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada pela técnica de microdiluição em microplacas de 96 poços. O inóculo de *S. mutans* UA159 foi realizado com uma concentração bacteriana final em torno de  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL (escala de 0,5 McFarland). Em seguida, o inóculo foi diluído em meio caldo de infusão de coração- cérebro (BHI) (kasvi) na proporção de 1:1000. Nas microplacas, foram adicionados em cada poço 190 µL do meio com inóculo (concentração final  $1-2 \times 10^5$  CFU/mL) e 10 µL PFL 16h, tempo que houve melhor inibição do crescimento de *S. mutans* no teste de microdifusão em placa. O PFL foi submetido à diluição seriada de ordem dois (5120 - 160 mg/mL). As placas foram incubadas durante 24 horas, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, foi realizada a leitura visualmente para avaliação do crescimento, por meio da observação de turvação do meio e/ou presença de colônias no fundo dos poços. Nos poços em que não houve crescimento visual foi adicionado 20 µL do corante resazurina (Sigma®). A resazurina a 0,01%, um indicador de óxido-redução, apresenta a cor azul e é oxidada na presença de células viáveis a resofurina, substância de coloração róseo-avermelhada. Após 20 minutos de incubação com resazurina a presença de cor azul indicou ausência de crescimento,

a cor rosa, presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002). Foi determinada a CIM a menor concentração que não houve crescimento bacteriano.

#### **4.6 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

Poços que indicaram ausência de crescimento no CIM foram utilizados para determinações da CBM. Uma alíquota de 10 µL dos poços sem crescimento bacteriano foi inoculada em placas com BHI ágar. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, sendo feita a seguir a leitura visual das mesmas. A CBM foi considerada como sendo a menor concentração do sobrenadante que causou 99,9% de morte de *S. mutans*, ou seja, ausência de crescimento bacteriano visível na superfície do ágar (YATSUDA et al., 2005).

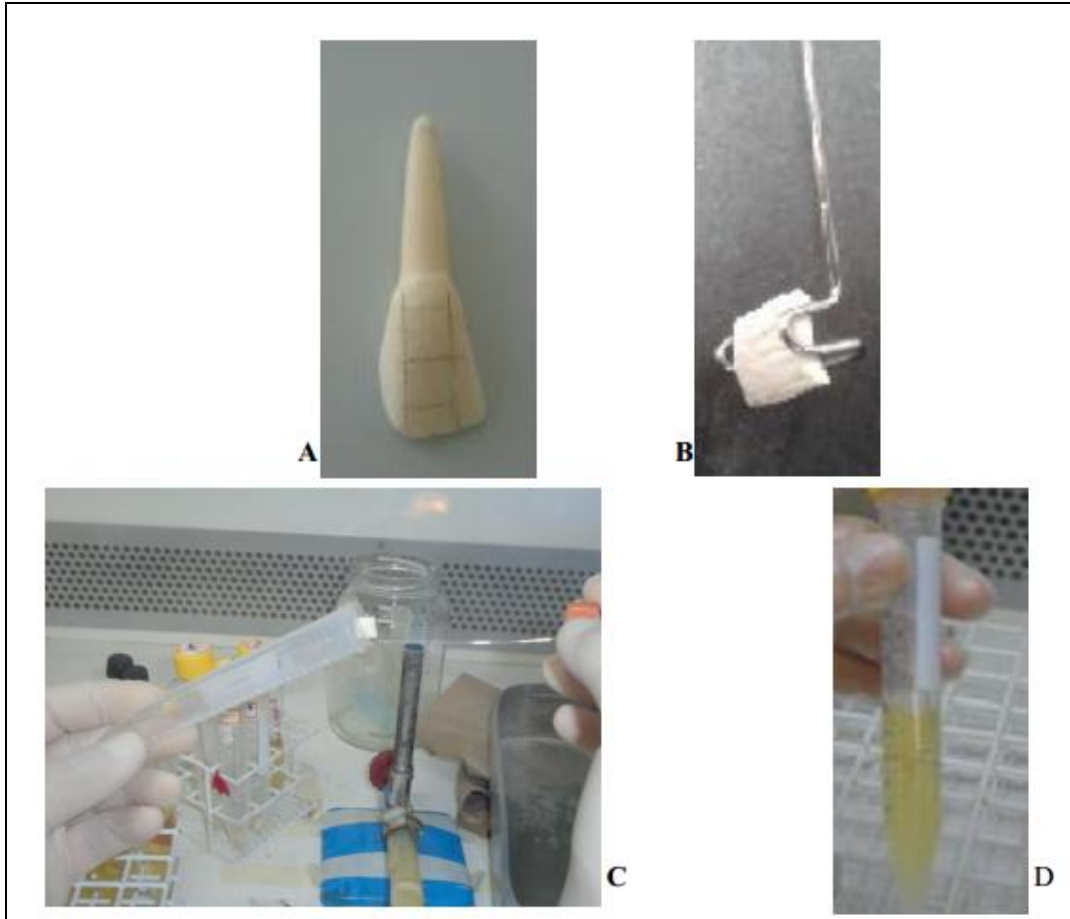
#### **4.7 Inibição da aderência celular (CIMA)**

O inóculo de *S. mutans* UA159 foi realizado com uma concentração bacteriana final em torno de  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL (escala de 0,5 McFarland). Em seguida, o inóculo foi diluído na proporção de 1:1000 em meio caldo BHI suplementado com sacarose (concentração final de 1%). Em cada poço de uma microplaca foram adicionados 190 µL da suspensão bacteriana ( $1-2 \times 10^5$  UFC/mL) e em seguida foram adicionados 10 µL do PFL 16h, cuja concentração foi sub-CIM, em diluição seriada de razão de 2 (1280 - 160mg/mL). Como controle negativo a diluição seriada foi realizada com 10 µL de água estéril. O controle positivo consistiu no uso de clorexidina a 0,12%. Todos os tratamentos foram incubados a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 18 horas. Após incubação o meio dos poços foi descartado em local apropriado e a placa foi, cuidadosamente, lavada três vezes com água destilada. Após a secagem foi adicionado 200 µL de cristal de violeta 0,1 % e incubada por 25 minutos (temperatura ambiente), após a remoção do corante, foi feita a leitura visual da placa, sempre comparando os tratamentos com os controles. A CIMA foi definida como a menor concentração em que não houve adesão celular visível na superfície da placa (DUARTE et al., 2003; KOO, et al., 2002).

#### **4.8 Confecção dos discos para realização do biofilme**

Foram utilizados pequenos blocos de esmalte dentário bovino, removidos da superfície vestibular de incisivos inferiores permanentes e hígidos, extraídos de animais recém-abatidos em frigoríficos. O tamanho dos blocos de esmalte (7x7 mm) foi demarcado e cortado com o auxílio de discos de aço diamantados dupla-face montados em madril para ponta reta

odontológica, sendo os blocos de esmalte posteriormente fixados com fio ortodôntico (LIMA, 2012). O fio ortodôntico com os fragmentos foi então fixado nas tampas dos tubos falcons de 15 mL, colocados nos respectivos tubos e esterilizados (Figura 1).



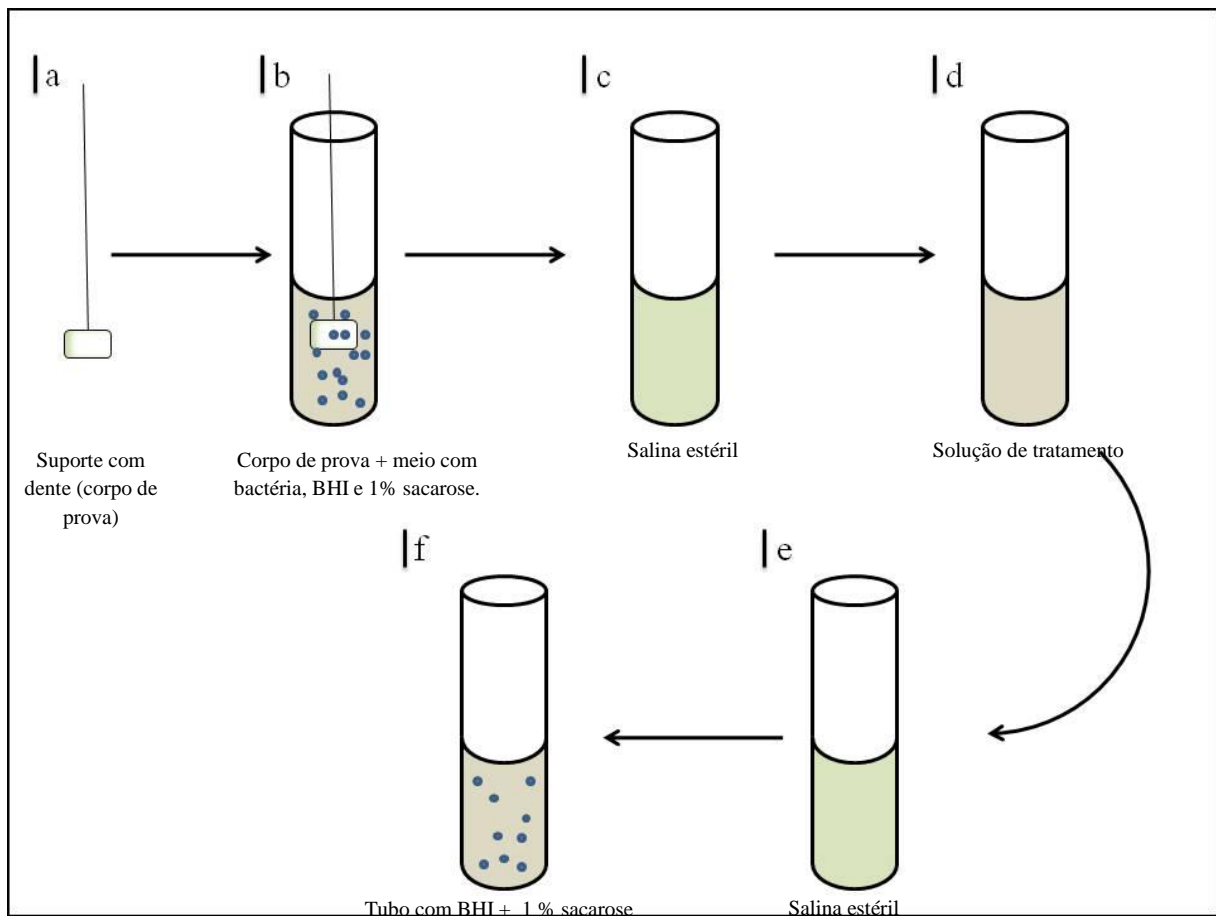
**FIGURA 1: Sequência da confecção dos corpos de prova:** A- incisivo inferior permanente bovino hígido com a demarcação do tamanho dos blocos de esmalte; B- fragmento dentário no aparato confeccionados com fios ortodôntico; C- superfície sólida para formação do biofilme no tubo Falcon; D- tubo com bloco de dente inserido no caldo BHI com sacarose a 1% e inóculo bacteriano.

#### 4.9 Ensaio de Biofilme

O inóculo de *S. mutans* UA159 foi preparado da mesma forma que descrita anteriormente. Para formação do biofilme, nos tubos esterilizados contendo o fragmento de dente bovino foi adicionado o inóculo de *S. mutans* na proporção de 1:1000 em meio caldo BHI suplementado com sacarose (concentração final 1%). Os tubos foram colocados em posição vertical e incubados a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> como descrito por Koo et al. (2006) e Duarte et al. (2008). O inóculo foi cultivado durante 24 horas sem perturbações para permitir a formação inicial do biofilme. Após incubação, os biofilmes foram tratados duas vezes por



dia, às 10h00min e 16h00min, do segundo dia até o quinto dia do período experimental (biofilme de 120 horas) com PFL 3 vezes o resultado do CBM (15g/mL), veículo controle (água estéril - controle negativo, 4 mL) ou clorexidina 0,12% (controle positivo – 4 mL). O biofilme foi exposto aos tratamentos durante 1 minuto, enxaguados por duas vezes em solução salina estéril e transferidos para novo meio de cultura fresco (Figura 2). O biofilme foi exposto aos respectivos tratamentos num total de oito vezes e os testes foram realizados em triplicata no número total de três experimentos (n = 9).



**FIGURA 2: Representação das fases do ensaio de formação, *in vitro*, do biofilme por *S. mutans*:** A- Corpo de prova; B - Corpo de prova já com biofilme; C- Lavagem em salina a 0,9%; D- Inserção da superfície sólida nas soluções de tratamento por duas vezes (por tempo de 30 segundos); E- lavagem em salina; F- Inserção no tubo de origem (contendo caldo BHI e sacarose). Os tratamentos foram realizados duas vezes ao dia.

Os biofilmes tratados foram analisados quanto à biomassa (peso seco), viabilidade bacteriana (Contagem de UFC) e a quantidade de polissacarídeos (solúvel e insolúvel em água, solúveis em álcali)

#### **4.9.1 Biomassa (peso seco)**

Após o biofilme formado os aparatos e disco de esmalte foram devidamente raspados com espátula odontológica estéril, o material obtido da raspagem foi colocado em tubos de vidro contendo 2 ml de salina estéril. Foi então levado ao sonicador (Banho ultrassônico - Eco-sonics) para a dissolução do biofilme e então centrifugado a 14000 rpm por 10 min. Retirou-se o sobrenadante e levou ao dissecador para a secagem por completa do biofilme. Após secagem foi feita a pesagem da biomassa presente em ependorf pré pesados para a determinação do peso seco.

#### **4.9.2 Viabilidade bacteriana (Contagem de UFC)**

Foi feita a raspagem dos discos e aparatos como descrito anteriormente no item 4.9.1. Após a raspagem e dissolução em sonicador os biofilmes formados foram diluídos seriadamente em salina estéril de 1 até 10 e posteriormente plaqueados 20 µL do biofilme diluído em placas contendo BHI ágar. As placas foram incubadas durante 24 horas, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, foi realizada a leitura visualmente para avaliação do crescimento, por meio da observação e contagem das colônias.

#### **4.9.3 Quantidade de polissacarídeos (solúvel em água, insolúveis, e solúveis em álcali)**

Após a raspagem e sonicação como descrito no item 4.9.1, foi feita à separação dos polissacarídeos solúveis e insolúveis em água e solúveis em álcali. Para tanto foi separação dos solúveis e insolúveis em água através centrifugação em 3800 rpm por 10 min 4°C. O sobrenadante (solúvel) foi transferido para novo tudo e adicionado etanol gelado e o pellet formado (insolúvel) foi adicionado 2ml de água destilada. O solúvel em álcali foi obtido apartir da retirada de 1,5 mL do tubo contendo o insolúvel, está amostra foi centrifugada a 14000 rpm por 10 min e a 4° C, após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi levado ao dissecador para a secagem por completo da amostra. A quantidade de polissacarídeos (solúvel em água, insolúveis, e solúveis em álcali) foi determinada por ensaios colorimétricos conforme detalhado por Koo et al. (2003).

#### **4.10 Queda de pH (via glicolítica)**

Os biofilmes de *S. mutans* UA159 formados e tratados como descrito anteriormente receberam o último tratamento no quinto dia de crescimento. Após esse tratamento, os biofilmes foram lavados em tampão fosfato por três vezes, posteriormente incubados em salt solution (pH 7,0) por 1 hora (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>). Após a incubação, os excessos de biomassa formados nos aparatos foram retirados ficando somente os biofilmes aderidos ao disco de esmalte. Os biofilmes foram então colocados em becker com 10,8 mL de salt solution e o pH corrigido para 7,2 com KOH (0,5 Molar). Quando o pH estabilizou (pH=7,2), foram adicionados 1,2 mL de glicose a 10% seguido de medição do pH nos tempos de 15, 30, 45 minutos, 1 e 2 horas (BELLI et al., 1995).

#### **4.11 Permeabilidade das células dos biofilmes a prótons**

Após o último tratamento (quinto dia), os biofilmes foram incubados em tampão fosfato (pH 7,2) por 1 hora. Após a incubação, os excessos de biomassa formados nos aparatos foram retirados ficando somente os biofilmes aderidos ao disco de esmalte dentário. Os biofilmes foram então colocados em becker com 10 mL de salt solution e o pH corrigido para 4,2 com solução de 100 mM HCl mais 50 mM KCl ou 100 mM KOH mais 50 mM KCl. O pH foi estabilizado em 4,2 e medido em intervalos de 10 minutos. No intervalo de 80 minutos foram adicionados 1,2 mL de l-Butanol para ruptura da membrana celular sendo pH aferido novamente nos intervalos de 82 e 120 minutos (MARQUIS et al., 2004).

#### **4.12 Análises estatísticas**

As comparações estatísticas entre os grupos foram feitas com análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Todos os testes foram realizados em triplicata em três momentos diferentes (n = 9).

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, C. A. Sucrose and dental caries: a review of the evidence. **Obesity reviews**, p. 41-54, 2009.
- ALLAKER, R. P.; DOUGLAS, C. W. I. Non-conventional therapeutics for oral infections. **Virulence**, v. 6, n. 3, p. 196–207, 2015.
- ALVAREZ-OLMOS, M. I.; OBERHELMAN, R. A. Probiotic Agents and Infectious Diseases : A Modern Perspective on a Traditional Therapy. **Clinical Infectious Diseases.**, v. 32, p. 1567–1576, 2001.
- AOBA, T. Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries. **Oral Dis.**, p. 249-257, 2004.
- AOKI, H. et al. Cloning of a *Streptococcus mutans* Glucosyltransferase Gene Coding for Insoluble Glucan Synthesis. **Infection and Immunity**, v. 53, n. 3, p. 587–594, 1986.
- AVILA, M.; OJCIUS, D. M.; YILMAZ, O. The oral microbiota: Living with a permanent guest. **DNA and cell biology**, v. 28, p. 405-411, 2009.
- BADET, C.; THEBAUD, N. B. Ecology of Lactobacilli in the Oral Cavity: A Review of Literature. **The Open Microbiology Journal**, p. 38–48, 2008.
- BARBIERID. S. V. et al. Análise da aderência *in vitro* de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, 2007.
- BELLI, W., D.; BUCKLEY, R.; MARQUIS "Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5." **Canadian journal of microbiology**, p. 785-791, 1995.
- BELSTROM, D. et al. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of saliva reveals disease-associated microbiota in patients with periodontitis and dental caries. **NPJ Biofilms Microbiomes**, v. 3, 2017.
- BURNE, R. A. Oral Streptococci ... Products of Their Environment. **J. Dent. Res.**, p. 445–452, 1998.
- CAGLAR, E.; KARGUL, B.; TANBOGA, I. Bacteriotherapy and probiotics' role on oral health. **Oral disease**, p. 131–137, 2005.
- CAUFIELD, P. W. Oral Lactobacilli and Dental Caries: A Model for Niche Adaptation in Humans. **JDR Clinical Research Supplement**, v. 94, p. 110-118, 2015.
- CHANDOK, H. et al. Screening, Isolation and Identification of Probiotic Producing *Lactobacillus acidophilus* Strains EMBS081 & EMBS082 by 16S rRNA Gene Sequencing. **Interdiscip Sci Comput Life**, 2015.

CHE, L. J. et al. *In Vitro* Antagonistic Growth Effects of *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus salivarius* and their Fermentative Broth on Periodontal Pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1376-1384, 2012.

CHU, J.; ZHANG, T.; HE, K. Cariogenicity features of *Streptococcus mutans* in presence of rufusoside. **BMC Oral Health**, p. 4–9, 2016.

CLAESSON, M. J.; SINDEREN, D. VAN; TOOLE, P. W. O. The genus *Lactobacillus* - a genomic basis for understanding its diversity. **FEMS Microbiol Lett**, v. 269, n. July, p. 22–28, 2007.

COGULU, D. et al. Potential effects of a multistrain probiotic-kefir on salivary *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus spp.* **Journal of Dental Sciences**, v. 5, n. 3, p. 144–149, 2010.

COLLADO, M. C.; BAUERL, C.; PÉREZ-MARTINEZ, G. Defining microbiota for developing new probiotics. **Microb Ecol Health**, 2012.

CONRADS, G. et al. Comparing the cariogenic species *Streptococcus sobrinus* and *S. mutans* on whole genome level. **Journal of oral microbiology**, v. 1, p. 1–13, 2014.

DASHPER, S. G.; REYNOLDS, E. C. Lactic acid excretion by *Streptococcus mutans*. **Microbiology**, v. 142, p. 33–39, 1996.

DEWHIRST, F. E. et al. The human oral microbiome. **Journal of Bacteriology**, v. 182 p. 5002-5017, 2010.

DUARTE, S. et al. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological and pharmaceutical bulletin**, v. 26, n. 4, p. 527-531, 2003.

DZIEDZIC, A.; WOJTYCZKA, R. D.; KUBINA, R. Inhibition of Oral Streptococci Growth Induced by the Complementary Action of Berberine Chloride and Antibacterial Compounds. **Mic**, p. 13705–13724, 2015.

EL-GHAISH, S. et al. Proteolysis by *Lactobacillus fermentum* IFO3956 isolated from Egyptian milk products decreases immuno-reactivity of  $\alpha$ S1-casein. **Journal of Dairy Research**, v. 78, p. 203–210, 2011.

FAO/WHO, 2001 - Food and Agriculture Organization (FAO). World Health Organization (WHO). Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, em: [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf). Acesso em: 02 jul. 2018

FAO/WHO, 2002. Food and Agriculture Organization (FAO). World Health Organization (WHO). Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. Acesso em: 02 jul. 2018.

FEATHERSTONE, J. D. B. Dental caries: A dynamic disease process. **Australian Dental**

**Journal**, v. 53, p. 286–291, 2008.

FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria Further Reading. **Curr. Issues Intestinal Microbiol**, p. 44–61, 2015.

FIJAN, S. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, p. 4745–4767, 2014.

GALRÃO, J.; PROENÇA, L.; BARROSO, H. Prevalência da cárie dentária e presença de bactérias cariogénicas no dorso lingual – Estudo seccional cruzado. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, p. 11-16, 2012.

GIBBONS, R. J.; COHEN, L.; HAY, D. I. Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* Attach to Different Pellicle Receptors. **Infection and Immunity**, v. 52, n. 2, p. 555-561, 1986.

GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. **Appl. Microbial Biotechnol.**, p 591-606, 2008.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, p. 480–487, 2010.

GOGINENI, V. K. et al. Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies Probiotics: History and Evolution. **Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies**, v. 1, n. 2, p. 1–7, 2013.

GRIGALAIUSKIENĖ, R.; SLABŠINSKIENĖ, E.; VASILIAUSKIENĖ, I. Biological approach of dental caries management. **Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal**, v. 17, n. 4, p. 107–112, 2015.

GUPTA, V.; GARG, R. Probiotics. **Department of Microbiology, GMCH**, v. 27, n. 3, p. 202-209, 2009.

GUTIÉRREZ-SALAZAR, P.; REYES-GASGA, J. Microhardness and Chemical Composition of Human Tooth. **Materials research**, v. 6, n. 3, p. 367–373, 2003.

HAMADA, G.; SLADE, H. H. Biology, Immunology, and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiological reviews**, v. 44 p. 331-384, 1980.

HAMILTON, I. R.; BUCKLEY, N. D. Adaptation by *Streptococcus mutans* to acid tolerance. **Oral Microbiol Immunol**, v. 6, p. 65–71, 1991.

HAMMES, W. P.; VOGEL, R. F. The genus *Lactobacillus*. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**, p. 19-54, 1995.

HANADA, N.; KURAMITSU, H. K. Isolation and Characterization of the *Streptococcus mutans* gtfC Gene Coding for Synthesis of Both Soluble and Insoluble Glucans. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 8, p. 1999–2005, 1988.

HASHIMOTO, T.; YOSHIDA, Y.; TAGAWA, K. Regulatory Proteins of F1F0-ATPase:

- Role of ATPase Inhibitor. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 22, n. 1, p. 27–38, 1990.
- HAUKIOJA, A. Probiotics and Oral Health. **European journal od dentistry**, v. 4, p. 348–355, 2010.
- HEILMANN, A.; TSAKOS, G.; WATT, R. G. Oral Health Over the Life Course. In: JEANGROS, B. C. et al. *A Life Course Perspective on Health Trajectories and Transitions*, Londres, 2015, v. 4, cap.3, p. 39-59.
- INGLE, N. A. et al. Prevalence of dental caries among school children of Bharatpur city, India. **J Int Soc Prev Community Dent**, p. 52–55, 2014.
- JAKUBOVICS, N. S.; YASSIN, S. A.; RICKARD, A. H. Community Interactions of Oral Streptococci. In: **Advances in Applied Microbiology**. 1. ed. Elsevier Inc., v. 87, p. 43–110, 2014
- JIA, G. et al. The oral microbiota – a mechanistic role for systemic diseases. [s.d.]. **British Dental Journal**. In vitro. v. 224 p. 447–445, 2018.
- JIANG, Q. et al. Interactions between *Lactobacillus rhamnosus GG* and oral micro-organisms in an in vitro biofilm model. **BMC Microbiology**, p.02-11, 2016.
- KAUR, B. et al. Purification and Physicochemical Characterization of Anti-*Gardnerella vaginalis* bacteriocin HV6b Produced by *Lactobacillus fermentum* Isolate from Human Vaginal Ecosystem. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, p. 91-100, 2013.
- KAWABATA, S.; HAMADA, S. Studying biofilm formation of mutans streptococci. **Methods Enzymol.** p. 513-523, 1999.
- KLEIN, G. et al. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 103–125, 1998.
- KOLL-KLAIS, P. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health : species composition and antimicrobial activity. **Oral Microbiology Immunology**, p. 354–361, 2005.
- KÖNIG, K. G. Clinical Manifestations and Treatment of Caries from 1953 to Global Changes in the 20th Century. **Caries research**, p. 168–172, 2004.
- KOO, H. et al. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 5, p. 1302-1309, 2002.
- KOO, H. et al. Influence of apigenin on gtf gene expression in *Streptococcus mutans* UA159. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 2, p. 542-6, Feb 2006.
- KRETH, J.; MERRITT, J.; QI, F. Bacterial and Host Interactions of Oral Streptococci. **DNA and cell biology**, v. 28, n. 8, p. 397–403, 2009.

- KUTSCH, V. K. Dental caries: An updated medical model of risk assessment. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 111, n. 4, p. 280–285, 2014.
- LEITES, A. C. B. R.; PINTO, M. B.; SOUSA, E. R. S. Aspectos microbiológicos da cárie dental. **Salusvita**, Bauru, v. 25, n. 2, p. 239- 252, 2005.
- LEMOS, J. A. C.; ABRANCHES, J.; BURNE, R. A. Responses of Cariogenic Streptococci to Environmental Stresses. **Current Issues in Molecular Biology**, p. 95-108, 2005.
- LIMA, J. E. O. Cárie dentária: um novo conceito. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**, v. 12, p. 119–130, 2007.
- LOESCHE, W. J. Microbiology of Dental Decay and Periodontal Disease. **Medical Microbiology**, 1996
- MAHESWARI, S. U. et al. Caries management by risk assessment: A review on current strategies for caries prevention and management. **J Pharm Bioallied Sci.**, p. 320-324, 2015.
- MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin A. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 71-109, 1998.
- MARSH, P. D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. **BMC oral health**, v. 7, p. 1–7, 2006.
- MATSUI, R.; CVITKOVITCH, D. Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. **Future Microbiol**, p. 403–417, 2010.
- MATSUMOTO-NAKANO, M. Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. **Japanese Dental Science Review**, v. 54, n. 1, p. 22–29, 2018.
- MELO, et al. Functional Profile Evaluation of *Lactobacillus fermentum* TCUESC01: A New Potential Probiotic Strain Isolated during Cocoa Fermentation. **Hindawi BioMed Research International**, 2017.
- MELO, et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa. **BMC microbiology**, 2016.
- MEURMAN, J. H. Probiotics : do they have a role in oral medicine and dentistry? **European Journal of Oral Sciences**, p. 188–196, 2005.
- MORENO, E. C.; ZAHRADNIK, R. T. Chemistry of Enamel Subsurface Demineralization In Vitro. **J. Dent. Res. Supplement**, v. 53, p. 226–235, 1974.
- MUKHOPADHYAY, B.; GANGULY, N. K.; The Unexplored Role of Probiotics on the Parasitic Pathogens. **Scientific Research**, v. 5, p. 2177-2184, 2014.
- NASE, L. et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. **Caries Research**, p. 412–420, 2011.



- NIXON, A. F. The Effect of Lactobacillus GG (LGG) on Acute Diarrheal Illness in the Pediatric Emergency Department (PED). **Pediatr Emerg Care.**, v. 28, p. 1048–1051, 2012.
- NOORDA, W. D. et al. Monobacterial and mixed bacterial plaques of *Streptococcus mutans* and *Veillonella alcalescens* in an artificial mouth: development, metabolism, and effect on human dental enamel. **Caries Res.**, p. 342-347, 1988.
- OKADA, M. et al. Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children. **Journal of Medical Microbiology**, p. 661–665, 2005.
- OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; RIBEIRO, C. M.; GOMES, M. I. F. V. Potencial bioterapêutico dos probióticos nas parasitoses intestinais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2670-2679, 2008.
- OOSHIMA, T. et al. Contributions of Three Glucosyltransferases to Sucrose-dependent Adherence of *Streptococcus mutans*. **Journal of dental research**, v. 8, p. 1672-1677, 2001.
- PALOMINO, J.-C. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.
- PAN, D. D.; ZENG, X. Q.; YAN, Y. T. Characterization of *Lactobacillus fermentum* SM-7 isolated from koumiss, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. **J Sci Food Agric.**, v. 91, p. 512-518, 2011.
- PRADEEP, K.; KUTTAPA, M. A.; PRASSANA, R. Probiotics and oral health: an update. **Biological and Biomedical Reports**, P. 246-252, 2012.
- PUJIA, A. M. et al. The probiotics in dentistry: a narrative review. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, p. 1405–1412, 2017.
- ROCHA-RAMIREZ, L. M. et al. Probiotic Lactobacillus Strains Stimulate the Inflammatory Response and Activate Human Macrophages. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, 2017.
- ROSSONI, R. D. et al. Inhibitory effect of probiotic *Lactobacillus* supernatants from the oral cavity on *Streptococcus mutans* biofilms. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, p. 361-367, 2018.
- SAITO, et al. Viability and Resistance of Lactobacilli Isolated from Cocoa Fermentation to Simulated Gastrointestinal Digestive Steps in Soy Yogurt. **Journal of food science**, v. 79, n. 2, 2014.
- SALVETTI, E.; TORRIANE, S.; FELIS, G. The Genus Lactobacillus : A Taxonomic Update The Genus Lactobacillus : A Taxonomic Update. **Probiotics & Antimicro. Prot.**, 2012.
- SAXELI, M. Probiotic Formulations and Applications, the Current Probiotics Market, and Changes in the Marketplace: A European Perspective. **Clinical Infectious Diseases.**, v. 46, p. 76-79, 2008.

SCHIIPBACHL, P. et al. Incorporation of Caseinoglycomacropeptide and Caseinophosphopeptide into the Salivary Pellicle Inhibits Adherence of Mutans Streptococci. **J Dent Res**, v. 75, n. 10, p. 1779–1788, 1996.

SEMINARIO-AMEZ, M. et al. Probiotics and oral health: A systematic review. **Medicina oral, Patología oral y Cirugía bucal**, v. 22, p. 282-288, 2017.

SHARMA, M. et al. Evaluation of antibacterial activity of *Calotropis gigantea* against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*: An *in vitro* comparative study. **J ConservDent**. p. 457-460, 2015.

SHETTY, S. B. et al. Antimicrobial effects of *Citrus sinensis* peel extracts against dental caries bacteria: An *in vitro* study. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, p. 70-77, 2016.

SHI, L. H. et al. Beneficial Properties of Probiotics. **Tropical Life Science Research**, p. 73-90, 2016.

SHIMADA, A. et al. Oral lactic acid bacteria related to the occurrence and / or progression of dental caries in Japanese preschool children. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v. 34, n. 2, p. 29–36, 2015.

SIMON-SORO, A.; MIRA, A. Solving the etiology of dental caries. **Trends Microbiol**. p. 76-82, 2015.

SODERLING, E, M.; MARTTINEN, A, M.; HAUKIOJA, A, L. Probiotic Lactobacilli Interfere with *Streptococcus mutans* Biofilm Formation In Vitro. **CurrMicrobiol**, p. 618-622, 2011.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, 1997.

SUZUKI, T.; TAGAMI, J.; HANADA, N. Role of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase in the growth of *Streptococcus mutans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 555–562, 2000.

SWAIN, M. R. et al. Fermented Fruits and Vegetables of Asia: A Potential Source of Probiotics. **Biotechnology Research International**, v. 2014, 2014.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. **J Dent Res**, p. 294-303, 2011.

TAMESADA, M. et al. Synergistic Effects of Streptococcal Glucosyltransferases on Adhesive Biofilm Formation. **Journal of Dental Research**, p. 874-879, 2004.

TULUMOĞLU, Ş.; KAYA, Hİ.; ŞİMŞEK, Ö. Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese. **Anaerobe**, 2014.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics : an update. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 1, p. 6–21, 2015.

VINDEROLA, G. et al.; Cell Viability and Functionality of Probiotic Bacteria in Dairy Products. **Front. Microbiol**, v. 2, 2011.

VERNA, E. C.; LUCAK, S. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? **Therapeutic Advances in Gastroenterology Review**, p.307–319, 2010.

YATSUDA, R. et al. Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of *mutans streptococci*. **J Ethnopharmacol**, v. 97, n. 2, p. 183-9, Feb 28 2005.

## **CAPÍTULO I**

**Antimicrobial activity of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01  
against *Streptococcus mutans* UA159**

## Antimicrobial activity of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 against *Streptococcus mutans* UA159

Jeisa Zielle de Souza Rodrigues<sup>a\*</sup>, Nayara Silva de Macêdo Neres<sup>a</sup>, Manuela Ribeiro Passos<sup>b</sup>, Brenda Oliveira Lima<sup>a</sup>, Louise Soares Pita<sup>a</sup>, Rafael Silva Almeida<sup>a</sup>, Patrick D'Orleans Farias Marinho<sup>a</sup>, Iago Almeida Santos<sup>a</sup>, Jamile Pinheiro da Silva<sup>a</sup>, Paulo Henrique Santana Silveira<sup>a</sup>, Mariane Mares Reis<sup>a</sup>, Isabella Porto Santos<sup>a</sup>, Luccas de Oliveira Negrão Ricardo<sup>a</sup>, Mariana Araújo Moura<sup>a</sup>, Stela Mares Brasileiro Pessoa<sup>a</sup>, Marlon Mário Leles Silva<sup>a</sup>, Leonardo Oliveira Silva Bastos Andrade<sup>a</sup>, Ananda Brito Soares<sup>a</sup>, Milena Cardoso Oliveira<sup>a</sup>, Ana Paula Trovatti Uetanabaro<sup>b</sup>, Regiane Yatsuda<sup>a, b\*</sup>

<sup>a</sup> Multidisciplinary Health Institute, Federal University of Bahia, 58 Hormindo Barros Street, Vitória da Conquista - Bahia BA CEP: 45029-094, Brazil.

<sup>b</sup> University of Santa Cruz (UESC), Soane Nazaré de Andrade Campus, Jorge Amado Highway, 16 km, Salobrinho, Ilhéus - Bahia BA CEP 45662-900, Brazil.

\* Corresponding author: [jeisa\\_cba@hotmail.com](mailto:jeisa_cba@hotmail.com) (Rodrigues, J. Z. S.)  
[reyatsuda@yahoo.com](mailto:reyatsuda@yahoo.com) (Yatsuda, R.)

### ABSTRACT

Dental caries is a multifactorial chronic-infection disease, which starts with a bacterial biofilm formation caused mainly by *Streptococcus mutans*. The use of probiotics has shown numerous health benefits, including in the fight against oral diseases. Strains of *Lactobacillus fermentum* have already shown probiotic potential against *S. mutans*, but there are still few studies. Thus, the aim of our study was to evaluate the antimicrobial activity of the inoculum and metabolites produced by *L. fermentum* TcUESC01 against *S. mutans* UA159. For this, a growth curve of *L. fermentum* was performed and both the inoculum and the metabolites formed in the fermentation were tested against the growth of *S. mutans* UA159 in agar diffusion tests, and only its metabolites were tested to determine the minimum inhibitory concentration, minimal bactericidal concentration and inhibition of cell adhesion. Inhibition of biofilm formation, pH drop and proton permeability were also tested with the metabolites. The zone of inhibition began to be formed at 14 hours and continued until 16 hours. The inoculum containing *L. fermentum* also showed zone of inhibition. The MIC for the metabolites was 1280 mg/mL and the MBC was obtained with a concentration higher than the

MIC equal to 5120 mg/mL. Half of the MIC concentration (640 mg/mL) was required to inhibit *S. mutans* adhesion to the surface of the microplates. In the biofilm analyzes, the treatment with the metabolites in the tested concentration was not able to reduce biomass, insoluble glucans and alkali soluble compared to the control biofilm ( $p > 0.05$ ). The metabolites also did not affect acid production and acid tolerance of *S. mutans* cells in biofilms compared to saline group ( $p > 0.05$ ). Our results showed that the metabolites produced by the *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 have a potential to be used as an antimicrobial agent against *S. mutans* for presented good results on anti-adherence activity and bactericidal activity tests in planktonic cells. Nonetheless, more researches should be done in order to characterize these metabolites and thus, concentrate them to obtain better results in the biofilms tests.

**Keywords:** *Streptococcus mutans*; Probiotics; Antimicrobial; *Lactobacillus fermentum*; Dental caries; Metabolites.

## 1. Introduction

Among the oral diseases, dental caries and periodontal disease have historically the greatest impact on the oral health, wherein dental caries is the major health problem in industrialized countries affecting children and adults [1]. The main bacteria commonly involved on dental caries formation is *Streptococcus mutans* [2]. This endogenous bacteria in the biofilm produce acid, mainly acid lactic, by their metabolism of dietary carbohydrates leading to the teeth dissolution [3, 4]. Because the medium pH will decrease, the acid tolerance of *S. mutans* is an important virulence factor. Moreover, other virulence factor relevant to its cariogenicity is the ability of these bacteria to firmly adhere to the tooth surface using adhesive glucans produced by glucosyltransferases (GTFs) from refined sugar [5].

Preventive strategies against dental caries are focused in reducing the risk of tooth demineralization process, and interrupt this process before irreversible damage is done to teeth [6, 7, 8]. Therefore, searching for new strategies of caries prevention can bring effective results. Bacteriotherapy consist in using harmless bacteria to combat pathogenic bacteria, and the application of this old approach has grown considerably in the last years [9]. Probiotics are one of these harmless bacteria which are widely used for their therapeutic action. They are defined as living microorganisms, which when administered in adequate amounts, confer a health benefit to the host [10]. Thus, the central use of probiotics is to rebalance or to maintain the normal microbiota avoiding the growing of pathogen microorganisms [11]. They act in different ways, since inhibiting pathogenic bacteria growth by secreting antibacterial peptides, reducing the pH by acid production, disputing for nutrients, competing for adhesion sites on the mucosa, until stimulating the host immune system [12, 13, 10].

Lactic acid bacteria are the most commonly microorganisms found in probiotic preparations, and species from *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genders are the main ones found to treat intestinal dysfunctions [12, 14]. In dentistry, researches show that probiotic strains may play a role as antagonistic agent on cariogenic bacteria reducing *S. mutans* count in saliva or plaque, however, the results about probiotics in dentistry are still controversies. [11, 15, 16, 17].

One of these *Lactobacillus* gender, *Lactobacillus fermentum*, have already presented antimicrobial effect against *S. mutans* [18]. However, there are still few studies relating the

probiotic activity of this species against *S. mutans* and caries formation. *L. fermentum* TcUESC01 is isolated from cocoa fermentation, a rich medium to bacterial growth, which had already shown probiotics characteristics in preliminary studies [19, 20]. But, there are no study reports of its effects against oral pathogenic bacteria.

Thus, based on the studies with probiotics as a new preventive method for preventing dental caries and its current controversies in literature, the aim of this study was to evaluate the effects of the fermented product of the probiotic *L. fermentum* TcUESC01 on the viability and in the virulence factors of *S. mutans* UA159 in planktonic and biofilm model.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Microorganisms**

The strains used for the *in vitro* tests were *S. mutans* UA159 and *L. fermentum* TcUESC01. *L. fermentum* TcUESC01 were isolated from originate spontaneous cocoa fermentations from the region of Ilhéus-Itabuna/BA, Brazil and identified by 16SrRNA gene sequencing (GenBank access no. KU244478) [20] and donated by Collection of Lactic Bacteria from the Biotechnology Laboratory from the State University of Santa Cruz, Bahia (UESC). The strain was grown in DeMan, Rogosa and Sharpe broth (MRS broth, KASVI) at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 24h and stored at - 80°C. *Streptococcus mutans* UA159 was used in the antimicrobial test as the cariogenic bacteria. *S. mutans* was incubated for 24 hours, at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in Brain Heart Infusion broth (BHI broth, KASVI) and stored at - 80°C.

### **2.2 Production of the metabolites of *L. fermentum*TcUESC01**

A growth curve of *L. fermentum* was performed in a closed system with incubation in MRS broth medium, with inoculum of  $1,5 \times 10^7$ , at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The microbial growth curve was determined by spectrophotometry with absorbance at 630 nm (Bel Photonics Spectrophotometer UV-VIS M51) and the viable cells count was determined by serial dilutions and seeding on MRS agar medium (KASVI) every hour.

During the growth curve, aliquots of the broth were collected at pre-established time intervals (at each hour, T0 to T16h), and centrifuged at 14000 rpm for 15 minutes to obtain the supernatant containing the compounds produced by the bacteria. Other curves were performed in order to obtain larger amounts of supernatant that were then lyophilized (Labconco FreeZone) for the tests after diffusion in agar test.



### **2.3 Antimicrobial evaluation of *L. fermentum* TcUESC01 and its metabolites by diffusion agar test**

Bacterial suspensions of *S. mutans* UA159 were inoculated in a 1:1000 ratio in the BHI broth medium to obtain a bacterial concentration of about  $1-2 \times 10^8$  colony-forming units (CFU/mL). After homogenization, a volume of 300  $\mu$ L of the inoculum of *S. mutans* was added in 50 mL of BHI agar. Subsequently, this suspension was placed in a petri dish and after solidification, it was placed PVC cylinders (ratio 2 mm) up to the agar, and then add 100  $\mu$ L of the metabolites of *L. fermentum* TcUESC01, collected before at the different times of *L. fermentum* curve growth (T0 to T16h), or the inoculum containing *L. fermentum* in MRS medium (100  $\mu$ L,  $-1 \times 10^7$  CFU/mL), or only the culture medium MRS as a control (100  $\mu$ L after incubated for 18 hours at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>). The plates were incubated for 18 hours at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, followed by measurement of the zone inhibition or halos with the pachymeter (millimeters). Tests were conducted in triplicate at three different times (n = 9).

### **2.4 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC)**

The antimicrobial activity was determined by minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Then, serial dilution was carried out with the metabolites of *L. fermentum* TcUESC01 in the concentration of metabolites ranging from 5120 to 160 mg/mL. For MIC determination, the starting inoculum was  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL. This test was performed in 96 wells microplates, in which each well was filled with 190  $\mu$ L BHI with inoculum (inoculation 1:1000), except the negative control wells. The plates were incubated for 24 hours, at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. MIC was defined as the lowest concentration of metabolities that inhibit the visible growth of a microorganism (no visible growth).

For the determination of MBC, an aliquot (20  $\mu$ L) of suspensions from the wells that there were no bacterial growth were inoculated in plates with BHI agar and incubated for 24 hours, 5% CO<sub>2</sub>, at 37°C. The MBC was defined as the lowest concentration that enables no growth on the agar (99.9% kill). Tests were conducted in triplicate at three different times (n = 9).

## 2.5 Minimum Inhibitory Concentration of Cell Adhesion (MICA)

To determine the MICA, the same procedure of MIC was followed; however, the medium was supplemented with 1% of sucrose, and the metabolites of *L. fermentum* TcUESC01 were tested with sub-MIC concentrations (ranging from 1280 to 160 mg/mL). After the incubation for 24 hours, 5% CO<sub>2</sub>, at 37°C, the plates were washed three times with saline solution and stained with 0.1% crystal violet, and followed by another washing with saline solution for removing dye excess. The visual reading of stained was done by comparison to the controls. MICA was defined as the lowest concentration that allowed no visible cell adherence on the surface. Tests were conducted in triplicate at three different times (n = 9).

## 2.6 Biofilm assays

Biofilms of *S. mutans* UA159 were formed on fragments of bovine tooth placed in a vertical position in BHI culture with 1% of sucrose at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 5 days, as described by Koo et al. [21] and Duarte et al. [22]. The biofilms were grown undisturbed for 24 h to allow initial biofilm formation. At this point (24 h old), the biofilms were treated twice daily (10 a.m. and 4 p.m.) until the fifth day of the experimental period (120 h old biofilm) with the metabolites of *L. fermentum* TcUESC01 (15 g/mL), or vehicle control (sterile water – negative control) or chlorhexidine 0.12% (positive control). The biofilms were exposed to the treatments for 1 min, double-dip rinsed in a sterile saline solution and transferred to fresh culture medium. The culture medium was replaced daily. Each biofilm was exposed to the respective treatments in a total of eight times.

The treated biofilms were analyzed for biomass formation (dry weight), bacterial viability and the composition of polysaccharides (soluble, soluble in alkali, and insoluble) determined by colorimetric assays as detailed by Koo et al. [21] The effects of the metabolites of *L. fermentum* TcUESC01 on glycolysis were measured by standard pH drop with dense cell suspensions as previously described by Belli et al. [23]. The test Proton Permeability was also done. *S. mutans* biofilms were initially washed with salt solution (50 mmol·L<sup>-1</sup> KCl plus 1 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>). Subsequently, they were incubated in salt solution at a constant pH value of approximately 4.6. The subsequent rise in pH associated with movements of protons across the cell membrane into the cytoplasm was monitored with a glass electrode. The initial rate of proton entry was also estimated because changes in initial rates of proton uptake give the best

measure of disruptive effects. The proton entry rate was calculated using the pH changes of 0–0.5 min (planktonic cells) or 0–10 min (biofilms) incubation period. Butanol (final concentration: 10%, V/V) was added to the suspensions at 25 (planktonic cells) or 80 min (biofilms) to damage the cell membrane [24]. Tests were conducted in sixuplicate at three different times (n = 18).

## 2.7 Statistical Analysis

All variables were tested for normal distribution and homogeneous variance. For the data with non-parametric distribution, the statistical comparisons between groups were made using Kruskal-Wallis test, and for parametric distribution, analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test were used. The level of significance was set at 5%.

## 3. Results

Bacterial growth and its dynamics involved can be studied by plotting the cell growth (absorbance) versus the incubation time (Graphic 1). The Lag phase of *L. fermentum* TcUESC01 was in the period from 0 to 3h. *L. fermentum* TcUESC01 start the exponential or logarithmic (log) phase at 4h until 9h, and the stationary phase was reached at 10h and stay until 16h.

All analyses were performed using the supernatant collected on the growth curve, which is the result of the production of metabolites during the fermentation of *L. fermentum* TcUESC01 on the MRS medium. The inhibition of *S. mutans* growth by contact with the metabolites started at 7 hours of growth until 13 hours (Table 1). The zone of inhibition began to be formed at 14 hours ( $1.80 \pm 0.53$  mm), and continued at 15h ( $1.75 \pm 0.70$  mm) and at 16h ( $1.50 \pm 0.33$  mm) with a little difference of zone of inhibition formed between them. These results indicated that the metabolites produced in the stationary period of bacterial growth were responsible for the achievement of the zones of inhibitions. The positive control used was chlorhexidine 0.12%, which presented the highest zones of inhibition with  $8.00 \pm 0.57$  millimeters. When the inoculum containing *L. fermentum* TcUESC01 was used (Table 1), the volume tested (100  $\mu$ L) showed inhibition of  $1.50 \pm 0.33$  millimeters. The volume of MRS medium (100  $\mu$ L) incubated at 14, 15 and 16 hours were not able to inhibit *S. mutans*.

Values of Minimal Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Inhibitory Concentration of Cell Adhesion (MICA) of

the metabolites of *L. fermentum* TcUESC01 against *S. mutans* UA159 are shown in Table 2. The metabolites formed at 15 h ( $1.85 \times 10^7$  UCF/mL) were chosen for the antimicrobial tests because there is a little difference in the zone of inhibition formed between the times 14, 15 and 16 hours in the diffusion agar test, and 15 h is the intermediate time between 14 and 16h. Then, after the liofilization, the metabolites were used in following tests. The MIC for the metabolites was 1280 mg/mL and MBC was 5120 mg/mL. The concentration of 160 mg/mL was the minimal concentration necessary to inhibit the *S. mutans* adhesion to the surface of the microplates.

After the determination of the antimicrobial activity of the metabolites of the *L. fermentum* TcUESC01 on planktonic cells of *S. mutans*, the metabolites were tested in a biofilm model. The effects of the metabolites on the viability of *S. mutans* UA159 cells was described in Table 3. The biofilm treated with the metabolites of *L. fermentum* TcUESC01 at 15 g/mL were not able to reduced the *S. mutans* viable cells in biofilms ( $7.94 \times 10^7 \pm 1.72 \times 10^8$  CFU/mL) in the tested concentration when compared to the saline treatment ( $6.76 \times 10^7 \pm 1.29 \times 10^8$  CFU/mL) ( $p > 0.05$ ). Chlorhexidine 0.12% biofilms showed lower viable cells in biofilms ( $3.75 \times 10^3 \pm 3.88 \times 10^3$  CFU mL<sup>-1</sup>) than the saline group, demonstrating antimicrobial activity against *S. mutans* biofilm ( $p < 0.05$ ).

Acid production by *S. mutans* in biofilms was also not reduced by the metabolites of *L. fermentum*, any time of the curve (15 min to 120 min), as determined by glycolytic pH-drop test in the presence of excess of glucose (Graphic 2). The final pH value at 120 min was 4.34 for saline group and 4.17 for the metabolites of *L. fermentum* ( $p > 0.05$ ). The chlorhexidine biofilm showed statistically reduction in the production of acids when compared to the metabolites and saline group, in the period of 15 min to 120 min ( $p < 0.05$ ). Similarly, the permeability of *S. mutans* cells membrane to protons was not affected by the metabolites of *L. fermentum* (Graphic 3) compared to control group ( $p > 0.05$ ). The metabolites were not able to reduce the acid tolerance of the *S. mutans* on biofilms when compared to saline group or chlorhexidine ( $p < 0.05$ ). The final pH value at 120 min was 4.56 for saline group and 4.53 for the metabolites of *L. fermentum* ( $p > 0.05$ ), and 5.33 for chlorhexidine ( $p < 0.05$ ). The chlorhexidine reduce the acid tolerance from 10 min to 120 min comparing to the metabolites and saline control ( $p < 0.05$ ).

Interference in the production of polysaccharides by *S. mutans* was not showed by the *L. fermentum* metabolites in the tested concentration. The dry weight was determined, the biomass of biofilm formed (Table 4). In the treatment with chlorhexidine 0.12%, the total of

biomass of biofilm was  $14.33 \pm 6.14$  mg per biofilm, lower ( $p < 0.05$ ) than the dry weight of the metabolites that was  $17.40 \pm 9.79$  mg per biofilm, and the biomass of saline control that was  $25.90 \pm 14.13$  mg per biofilm. There is no difference between saline and metabolites dry weight ( $p > 0.05$ ). The soluble glucans and the soluble glucans in alkali from the biofilms treated with metabolites of *L. fermentum* TcUESC01 and chlorhexidine did not differ from the concentrations in the biofilm treated with saline ( $p > 0.05$ ). Chlorhexidine were only able to reduce the production of insoluble glucans ( $5.53 \pm 0.55$ ) with statistical difference compared to saline ( $13.41 \pm 0.71$ ) and metabolites ( $11.24 \pm 0.78$ ) biofilm ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

Dental diseases, such as dental caries, can cause pain and several others problems like discomfort in eating, in communicating, mainly if the teeth was lost [1]. Dental caries is a chronic-infection disease that occurs in a dynamic process of alternates periods of tooth demineralization and remineralization, in which, if the demineralization time prevails, the carious cavity will be formed [7]. The teeth demineralization is a result of a biofilm formed on the teeth surface by the gram-positive *Streptococcus mutans* who, by fermentation of dietary sugar, will produce acid leading to a pH drop in the oral cavity [25]. In an attempt to prevent dental caries, probiotic use arises as a promising alternative, and, in studies with probiotics in oral health, the application of bacteria supernatant is safer than using living microorganisms because some *Lactobacillus* also metabolize sucrose and are fluoride tolerant [19, 26, 27]. In our study, we analyzed the antimicrobial potential of the metabolites present in the supernatant produced by *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 against *Streptococcus mutans* UA159.

It is already known that when there is a lack of nutrients, the microorganisms change from the log phase to the stationary phase, and, in a competition for nutrients they synthesize secondary metabolites, antibiotics and toxins [28]. Our results of the agar diffusion test showed the influence of the stationary phase in the metabolites production. The zone of inhibition only began to form in the stationary phase at 14 hours and continued at 15 and 16 hours. In the metabolic process of lactic acid bacteria, the antimicrobial compounds produced are mainly organic acids (mainly lactic and acetic), hydrogen peroxide, ethanol, several enzymes and bacteriocins peptide [29]. Since *S. mutans* is an acid tolerant bacteria, the pH reduction by the organic acids produced by *Lactobacillus* does not apply to be an antimicrobial factor within this context. The bactericidal property of hydrogen peroxide

depends on the concentrations applied and on physical factors such as pH and temperature, moreover, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by *Lactobacillus* have shown to be ineffective in combat pathogens directly [29, 30]. The bacteriocins action consist in pores formation at the cytoplasmic membrane of sensitive gram-positives which will result in a energy lost or, they can alter the activity of important enzymes of the target bacteria [31]. Bacteriocin-producing *L. fermentum* have already demonstrated a broad spectrum of antimicrobial activity against gram-positive bacteria, what make them the mainly possible antimicrobial substance against *S. mutans* [32]. *L. fermentum* also produce biosurfactants at the stationary phase which have already demonstrated an interference in the adhesion and biofilm formation of *S. mutans* [33]. In this study, the identification of the metabolites produced was not performed, therefore, further studies should be carried out in order to better understand the antimicrobial activity of *L. fermentum* TCUESC01.

In order to better evaluate the antimicrobial activity of *L. fermentum* metabolites, minimal inhibitory and minimal bactericidal concentration were determinated. MIC was obtained with 1280 mg/mL, which is a high concentration compared to the MIC that is obtained by other antimicrobials. However, in the supernatant broth there were all subproducts of fermentation and culture medium because it was not filtered, consequently, the supernatant broth did not have only the concentrate of bacteriocins. The bactericidal activity was obtained with MBC at 5120 mg/mL, a higher value than MIC, which is already expected since it represents not only the microbial growth inhibition but also the microbial death. Our results are in accordance with ROSSONI et al. [18], where *L. fermentum* supernatant showed significantly antimicrobial activity against *S. mutans* in planktonic cultures, reducing the number of CFU/mL of *S. mutans* after incubation with 250 µL of *Lactobacillus* supernatant mixed with 250 µL of *S. mutans* suspension and BHI broth.

The adherence is one of its major virulence factor of *S. mutans*. The begin of the dental caries formation starts with a dental plaque adhered at the tooth surface. This is mediated via sucrose-independent and sucrose-dependent means. Sucrose-independent adhesion to salivary components within the acquired enamel pellicle may initiate the attachment process, but sucrose-dependent adhesion may be primarily responsible for establishing colonization to the tooth surface. In this case, the action of glucosyltransferases (GTFs) in the synthesis of glucans is the major mechanism behind it [34]. Adhesion to pre-formed glucan on the tooth surface may also facilitate bacteria colonization and probiotic may affect the oral ecology by specifically preventing the adherence of other bacteria, competing for adhesion sites, or by modifying the protein composition of salivary pellicle [35]. Our

result showed that the *L. fermentum* supernatant was able to inhibit the *S. mutans* adherence in the minimal concentration of 640 mg/mL. Other studies have also pointed out that *Lactobacillus* supernatants were able to significantly reduce *S. mutans* adherence as demonstrated by WASFI et al. [16], where *Lactobacillus salivarius* supernatant decreased *S. mutans* adherence in 87% due to GTFs expression reduction.

As dental plaque is a biofilm, the analysis of antimicrobial interference on its formation is a very important paramount since there are many variables involved on its growth rate, gene expression, and quorum sensing, including adhesion, nutrient flow, and coaggregation, which differ from life in a planktonic environment [36]. Besides the biofilms formation and the abilities of the bacteria to adhere to the tooth surface, two others factors are known to be critical in the development of dental caries by oral bacteria: carbohydrates metabolization, and tolerance to environment fluctuations, especially with regard to pH [37]. In our study we evaluated the antimicrobial effect of *L. fermentum* metabolites in *S. mutans* biofilm formation in tooth bovine model, evaluating viable cell count, the acid tolerance and production were evaluated by proton permeability and pH drop test, and determination of polysaccharides synthesised. Although satisfactory results were expected for the biofilm tests, since a minimal inhibitory concentration was found with the planktonic cells, none of the biofilms tested with *L.fermentum* TcUESC01 metabolites, in the tested concentration, were able to present antimicrobial effect or inhibition of virulence factors of *S. mutans*.

One of the challenges of understanding biofilm tolerance is the large number of factors that influence the susceptibility in a particular biofilm. The extent of antimicrobial penetration into a biofilm is expected to depend on biofilm thickness, effective diffusivity of the agent in the biofilm, reactivity of the agent in the biofilm, the sorptive capacity of the biofilm for the agent, the dose concentration and dose duration, and external mass transfer properties [38]. Furthermore, some of the factors that could be important are antimicrobial chemistry, substratum material, areal cell density or thickness, biofilm age, microbial speciation, and medium composition [39]. As presented by CHEN et al. [40], *L. fermentum* fermentative broth showed to be capable to inhibit *S. mutans*, the higher concentration of the fermentation broth tested showed a greater inhibitory effects, showing a dependence of the concentration for better results. Metabolites from *L. fermentum* fermentative broth are able to show bactericidal effect against *S. mutans* planktonic cells, and not to biofilm cells. This must occurred due to the low concentration of the supernatant used, because concentration and duration of contact are closed related to the extend of antimicrobial capacity to penetre in the biofilm [38]. Furthermore, the expousure time was probably not enough to the metabolites act

in the biofilm. Probably, to obtain positive results of inhibition of biofilm formation, a higher concentration or a higher time of treatment with the metabolites should be done.

## **5. Conclusion**

Our work showed that the metabolites produced by the *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 have a great potential to be used as an antimicrobial agent against *S. mutans* for presenting anti-adherence activity and bactericidal activity in planktonic cells. However, more researches should be done in order to characterize these metabolites and thus, concentrate them to obtain better results in the biofilms tests.

## **Conflicts of interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

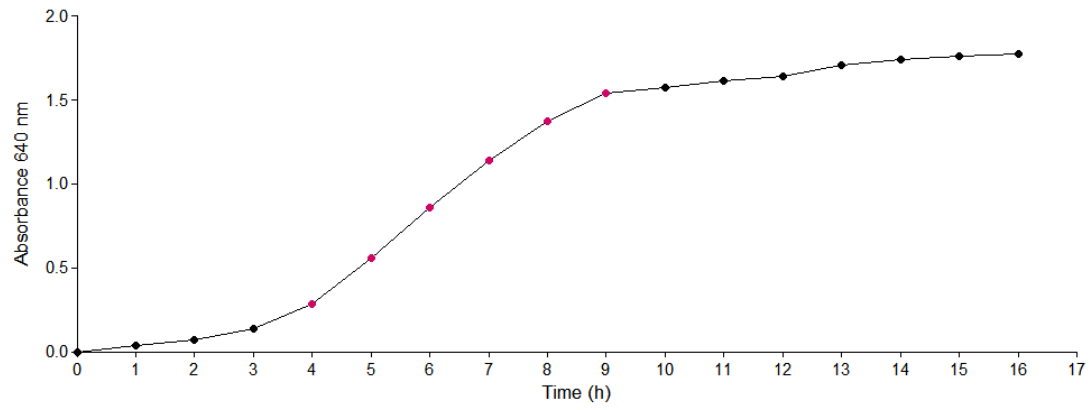
## **Acknowledgements**

The authors are also very grateful to all student volunteers who took part in this study, to Professor Carlos Priminho Pirovani for the contributions in the methodology from State University of Santa Cruz. Research was supported by grants and scholarships of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the State of Bahia Research Foundation (FAPESB – REDE 11/2014) and Coordination for the Enhancement of Higher Education Personnel (CAPES), Tutorial Educational Program (MEC/SESU).



## Graphic and tables

**Graphic 1.** Growth curve of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 in MRS broth medium until 16 hours



**Table 1.** Diffusion agar test using metabolites of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 produced at different times on the growth curve against *Streptococcus mutans* UA159.

Treatments	Mean of zone of inhibition in millimeters (mm)
Metabolites 1 h	----
Metabolites 2 h	----
Metabolites 3 h	----
Metabolites 4 h	----
Metabolites 5 h	----
Metabolites 6 h	----
Metabolites 7 h	Contact
Metabolites 8 h	Contact
Metabolites 9 h	Contact
Metabolites 10 h	Contact
Metabolites 11 h	Contact
Metabolites 12 h	Contact
Metabolites 13 h	Contact
Metabolites 14 h	1.80 ± 0.53
Metabolites 15 h	1.75 ± 0.70
Metabolites 16 h	1.50 ± 0.33
Chlorhexidine 0.12%	8.00 ± 0.57
<i>L. fermentum</i> TcUESC01 (100 µL)	1.50 ± 0.33
MRS médium (100 µL)	----

(----) there was no inhibition of growth; (Contact - The growth inhibition zones appeared in the places, where the antimicrobial compounds contacted with the agar layer) There was no formation of zone inhibition, but there was inhibition of bacterial growth by contact. Experiment performed in triplicate (n=9).

**Table 2.** Values of Minimal Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Inhibitory Concentration of Cell Adhesion (MICA) of the metabolites of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 against *Streptococcus mutans* UA159.

Microorganisms	Metabolites of the <i>L. fermentum</i> TcUESC01		
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MICA (mg/mL)
<i>S. mutans</i> UA159	1280	5120	640

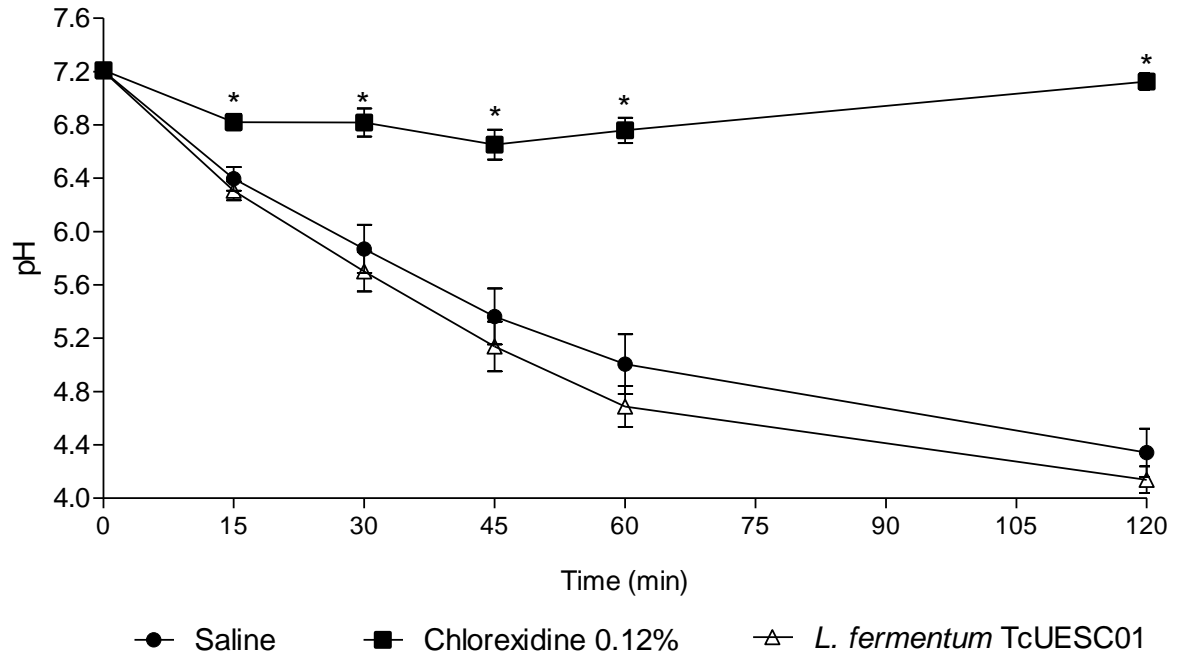
MIC, MBC and MICA values are expressed in mg/mL. The concentrations of compounds ranged from 5120 to 160 mg/mL. (n=18)

**Table 3.** Effects of the metabolites of the *Lactobacillus fermentum*TcUESC01 on viability of *Streptococcus mutans* UA159 in biofilms.

Treatments	CFU/biofilm
Saline	$6.76 \times 10^7 \pm 1.29 \times 10^{8a}$
Chlorhexidine 0.12%	$3.75 \times 10^3 \pm 3.88 \times 10^{3b}$
<i>L. fermentum</i> TcUESC01	$7.94 \times 10^7 \pm 1.72 \times 10^{8a}$

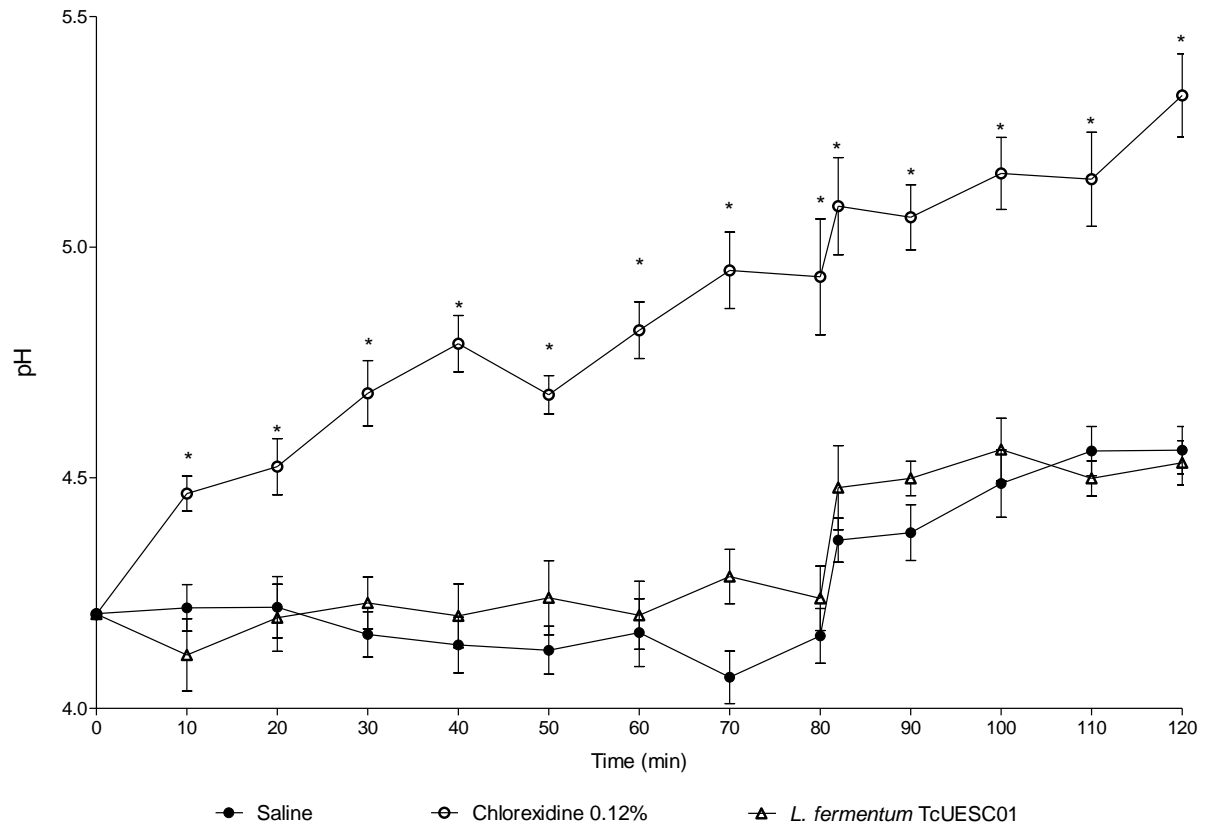
\*Values in the same column followed by equal letters are statistically the same ( $p > 0.05$ ). Statistical analysis were performed between saline, chlorhexidine 0.12% and metabolites of *L. fermentum* TcUESC01 (15.63 g/mL), by ANOVA, comparing all pairs with the Bonferroni's test (n = 18)

**Graphic 2.** Influence of metabolites of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 on glycolytic pH-drop in *Streptococcus mutans* UA159 in biofilms.



\* Statistical difference was found among the treatments with Chlorhexidine 0.12% and metabolites of *L. fermentum* TcUESC01 compared to saline treatment ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis were performed by ANOVA, comparing all pairs with the Bonferroni's test ( $n = 18$ ).

**Graphic 3.** Influence of the metabolites of the *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 on proton permeabilities of *Streptococcus mutans* UA159 in biofilms.



\* Statistical difference was found among the treatments with chlorhexidine 0.12% and metabolites of *L. fermentum* TcUESC01 compared to saline treatment ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis were performed by ANOVA, comparing all pairs with the Bonferroni's test ( $n = 18$ ).

**Table 4.** Effects of the metabolites of the *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 on the composition of *Streptococcus mutans* UA159 in biofilms.

<b>Treatments</b>	<b>Dry weight Biofilm (mg)</b>	<b>Soluble glucans in alkali mg/biofilm</b>	<b>Soluble glucans µg/biofilm</b>	<b>Insoluble glucans mg/biofilm</b>
Saline	25.90±14.13 <sup>a</sup>	3.10±1.52 <sup>a</sup>	713.13±14.0 <sup>a</sup>	13.41 ±0.71 <sup>a</sup>
Chlorhexidine 0.12%	14.33±6.14 <sup>b</sup>	1.14±0.40 <sup>a</sup>	723.23±21.532 <sup>a</sup>	5.53 ± 0.55 <sup>b</sup>
<i>L. fermentum</i> TcUESC01	17.40±9.79 <sup>a</sup>	1.74±0.52 <sup>a</sup>	756.40±13.24 <sup>a</sup>	11.24±0.78 <sup>a</sup>

\*Values in the same column followed by equal letters are statistically the same ( $p > 0.05$ ). Statistical analysis were performed between saline, chlorhexidine 0.12% and metabolites of *L. fermentum* TcUESC01, by ANOVA, comparing all pairs with the Kruskal-Wallis test (n = 18).

## References

- [1] Petersen, P. E., et al. Policy and Practice The global burden of oral diseases and risks to oral health. **Police and Practice: Theme papers**. (2005) 661–669.
- [2] Hoshino, T., Fujiwara, T. and Kawabata, S. Evolution of Cariogenic Character in *Streptococcus mutans* : Horizontal Transmission of Glycosyl Hydrolase Family 70 genes. **Scientific reports**. (2012).
- [3] Selwitz, R. H., Ismail, A. I. and Pitts, N. B. Dental caries. **Seminars**. 369 (2007) 51–59.
- [4] Touger-Decker, R. and Loveren, C. Van. Sugars and dental caries. **Am J Clin Nutr**.78 (2003).
- [5] Kuramitsu, H. K. Virulence Factors of Mutans Streptococci : Role of Molecular Genetics. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**. 4 (1993) 159–176.
- [6] Ai, I., et al. Caries management pathways preserve dental tissues and promote oral health. **Community Dent Oral Epidemiol**. (2013) 12–40.
- [7] Pitts, N. B., et al. Dental caries. **Nature reviews: Disease primers**. 3 (2017).
- [8] Gross, L. E., et al. Beyond *Streptococcus mutans*: Dental Caries Onset Linked to Multiple Species by 16S rRNA Community Analysis. **PLOS one**. (2012).
- [9] Twentman, S. Are you ready for caries prevention through bacteriotherapy? **Brazilian Oral Research**. 26 (2012) 64–70.
- [10] FAO/WHO. Food and Agriculture Organization (FAO). World Health Organization (WHO). Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>, 2002 (accessed 10 August 2018).
- [11] Cagetti, M. G., et al. The Use of Probiotic Strains in Caries Prevention: A Systematic Review. **Nutrients**. (2013) 2530–2550.
- [12] Parvez, S., et al. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**. 100 (2006) 1171–1185.
- [13] Meurman, J. H., Stamatova, I. Probiotics: contributions to oral health. **Oral diseases**. (2007) 443–451.
- [14] Behnsen, J., et al. Probiotics: Properties, Examples, and Specific Applications. **Cold spring harbor Perspective in medicine**. (2013) 1–15.
- [15] Ahola, A. J., et al. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. **Archives of oral biology**. 47 (2002) 799–804.
- [16] Wasfi, R. Probiotic *Lactobacillus* spp. inhibit growth , biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*. **J. Cell. Mol**. 22 (2018) 1972–1983.



- [17] Fernandez, C. E., et al. Effect of the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* LB21 on the Cariogenicity of *Streptococcus mutans* UA159 in a Dual-Species Biofilm Model. **Caries research**. (2015) 583–590.
- [18] Rossoni, R. D., et al. Inhibitory effect of probiotic *Lactobacillus* supernatants from the oral cavity on *Streptococcus mutans* biofilms. **Microbial Pathogenesis**. 123 (2018) 361-367.
- [19] Saito, V. S., et al. Viability and resistance of lactobacilli isolated from cocoa fermentation to simulated gastrointestinal digestive steps in soy yogurt. **Journal of food science**. 79 (2014).
- [20] Melo, T. A., et al. Functional Profile Evaluation of *Lactobacillus fermentum* TCUESC01: A New Potential Probiotic Strain Isolated during Cocoa Fermentation. **Hindawi BioMed Research International**. (2017).
- [21] Koo, H., et al. "Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol." **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. (2003) 782-789.
- [22] Duarte, S., et al. "Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci." **Biological and pharmaceutical bulletin**. 26 (2003) 527-531.
- [23] Belli, W., Buckley, D. H. and Marquis, R. E. "Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5." **Canadian journal of microbiology**. 41 (9) (1995) 785-791.
- [24] Phan, T. N., et al. Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. **Oral Microbiology and Immunology**. 19 (2004) 31-38.
- [25] Garcia, S. S., et al. Targeting of *Streptococcus mutans* Biofilms by a Novel Small Molecule Prevents Dental Caries and Preserves the Oral Microbiome. **J Dent Res**. (2017) 807-814.
- [26] Saha, S., et al. Investigation of probiotic bacteria as dental caries and periodontal disease. **Beneficial microbes**. 5 (2014) 447–460.
- [27] Caufield, P. W., et al. Oral Lactobacilli and Dental Caries: A Model for Niche Adaptation in Humans. **JDR Clinical Research Supplement**. 94 (2015).
- [28] Llorens, J. M. N., Tormo, A. and Martínez-García, E. Stationary phase in gram-negative bacteria, **FEMS Microbiology Reviews**. 34 (2010) 476–495.
- [29] Reis, A. J., et al. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. **Food Eng. Rev.** (2012) 124-140.
- [30] O'hanlon, D. E. O., et al. Cervicovaginal fluid and semen block the microbicidal activity of hydrogen peroxide produced by vaginal lactobacilli. **BMC Infectious Diseases**. (2010).
- [31] Servin, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **Infection and Immunity**. 28 (1992) 405–440.

- [32] Mokoena, M. P. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. **Molecules** **2017**. (2017).
- [33] Thmourespour, A., et al. The anti-biofouling effect of *Lactobacillus fermentum* derived biosurfactant against *Streptococcus mutans*. **Biofouling**. *27* (2011) 385-392.
- [34] Schillingt, K. M. and Bowen, W. H. Glucans Synthesized In Situ in Experimental Salivary Pellicle Function as Specific Binding Sites for *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**. *60* (1992) 284–295.
- [35] Dhawan, R. and Dhawan, S. Role of probiotics on oral health: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Journal of Interdisciplinary Dentistry**. *3* (2013).
- [36] Banas, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Frontiers in Bioscience**. *16* (2004) 1267–1277.
- [37] Burne, R. "Oral streptococci... products of their environment." **Journal of Dental Research**. (1998) 445-452.
- [38] Stewart, P. S. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. **Antimicrob Agents Chemother**. *40* (1996) 2517–2522.
- [39] Stewart, P. S. Antimicrobial Tolerance in Biofilms. **Microbial spectr**. *3* (2015) 1–30.
- [40] Che, L. J., et al. *In Vitro* Antagonistic Growth Effects of *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus salivarius* and their Fermentative Broth on Periodontal Pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**. (2012) 1376-1384.

## Highlights

- Metabolites were synthesized in a growth curve of *L. fermentum* TcUESC01.
- These metabolites had potential anti-adherence and bactericidal effect against planktonic cells of *S. mutans* UA159.
- However, they were unable to alter the formation of *S. mutans* UA159 biofilms and its virulence factors.

**Glossary**

**MIC:** Minimum Inhibitory Concentration

**MBC:** Minimum Bactericidal Concentration

**MICA:** Minimum Inhibitory Concentration of Cell Adhesion

**GTFs:** Glucosyltransferases

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os metabólitos de *L. fermentum* TcUESC01 formados durante a fermentação na curva de crescimento tiveram potencial anti-aderência e efeito bactericida contra células planctônicas de *S. mutans* UA159;
- Porém não conseguiram alterar a capacidade acidúrica e acidogênica de *S. mutans* UA159 em biofilmes;
- A bacterioterapia ou tratamento com os metabólitos de *L. fermentum* TcUESC01 demonstra potencial na prevenção da atividade desses patógenos na cavidade oral e tratar várias doenças bucais. No entanto há necessidade de identificar e isolar esses metabólitos, que podem se tornar uma alternativa ao uso de clorexidina que possui vários efeitos adversos;
- Este é o primeiro trabalho que utiliza *L. fermentum* TcUESC01 contra *S. mutans* UA159 e os resultados promissores encontrados podem abrir caminhos para novos estudos.