



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

NAYARA SILVA DE MACÊDO NERES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
Lactobacillus plantarum* Lp62 SOBRE *Streptococcus mutans

Vitória da Conquista, BA

2017

NAYARA SILVA DE MACÊDO NERES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
Lactobacillus plantarum Lp62 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^a. Dr^a. Regiane Yatsuda
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Trovatti Uetanabaro
Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC

Vitória da Conquista, BA

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

NAYARA SILVA DE MACÊDO NERES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
Lactobacillus plantarum Lp62 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**, Vitória e Abel (*in memoriam*), base do meu caráter e incentivadores dos meus sonhos. À **Manoel Neres**, pelo amor, companheirismo, dedicação e incentivo. À **Alice Neres**, a qual me ensinou a melhor forma de amor e mais intensa existente, o amor de mãe.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e de sonhar, pois sem sonhos nunca teria chegado a lugar algum.

À minha mãe Vitória, por me ensinar a nunca desistir mesmo nas dificuldades.

Ao meu esposo Manoel, que além de esposo, colega de profissão e um dos meus maiores incentivadores.

À minha filha Alice, por ser o repositivo de força e energia, por me ensinar que coisas tão simples são mais importantes do que aparentam.

A toda a minha família pelo apoio.

Agradeço à Professora Dr^a. Regiane Yatsuda minha orientadora, pelo convívio, dedicação, ajuda, paciência, confiança, orientação e amizade. Sou muito grata por ter tido uma ótima orientadora durante a minha iniciação científica e mestrado. Se fui capaz de conquistar meus objetivos com sucesso, foi devido ao seu apoio. Não tenho palavras para lhe agradecer por tudo o que fez pela minha vida profissional e acadêmica, por ter me aberto portas e apresentado oportunidades antes nunca sonhada.

À Professora Dr^a Ana Paula Trovatti Uetanabaro, pela co-orientação e disponibilização dos micro-organismos.

Ao Professor Dr. Carlos Priminho Pirovani pela disponibilização do liofilizador.

À Professora Dr^a Amélia Cristina pela disponibilidade dos equipamentos para realização de alguns experimentos.

Aos professores da UFBA que de forma direta ou indiretamente contribuíram para o meu conhecimento.

A todos do grupo de pesquisa, em especial ao grupo Mutans: Rafael, Brenda, Louise, Ananda, Patrick, Leonardo, Jeisa e Manuela. Agradeço infinitamente a oportunidade de fazer parte de um grupo tão consolidado e por ter me mostrado que a pesquisa científica é feita com muitos detalhes e dedicação, mas também com companheirismo, honestidade e confiança.

À Sônia, a quem sou grata pela compreensão e parceria.

Aos membros da banca avaliadora por reservarem parte de seu tempo para avaliação desta dissertação.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Algo só é impossível até que alguém duvide e prove o contrário”. (Autor desconhecido)

RESUMO

MACÊDO- NERES, NAYARA SILVA. **Avaliação da atividade antimicrobiana de *Lactobacillus plantarum* Lp62 sobre *Streptococcus mutans* UA159.** 2017. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

A cárie é uma doença infecciosa multifatorial contagiosa e é causada por microorganismos orais, principalmente por *Streptococcus mutans*, que participa na formação de biofilmes bacterianos patogênicos, levando ao desenvolvimento de cáries, através da produção de ácidos e desmineralização do dente. Evidências mostram os benefícios do uso de probióticos como moduladores de crescimento profilático e bacteriano. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de *Lactobacillus plantarum* Lp62 e seus compostos contra *S. mutans* UA159. Para isso, foi realizada uma curva de crescimento de *L. plantarum* e tanto o inóculo como os metabólitos formados na fermentação foram testados contra o crescimento de *S. mutans* UA159 nos testes de difusão em ágar, 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. A zona de inibição começou a ser formada às 12 horas com maior formação de zona de inibição às 16 horas e o inóculo contendo *L. plantarum* Lp62 também apresentou zona de inibição. A CIM para os metabólitos foi de 15 mg/mL e o CBM foi obtido com o dobro da concentração a 30 mg/mL. Metade da concentração de CIM (7,5 mg/mL) foi necessária para inibir a adesão de *S. mutans* à superfície das microplacas. O tratamento com os metabólitos reduziu a biomassa ($7,69 \pm 4,42$ mg/biofilme), glucanos insolúveis ($2,55 \pm 1,18$ mg/biofilme) e solúvel em álcali ($5,19 \pm 3,88$ mg/biofilme) em comparação com o biofilme do controle. Os metabólitos também afetaram a produção de ácido e a tolerância ácida de células de *S. mutans* em biofilmes, o que confirma e amplia uma observação anterior que mostra os efeitos disruptivos dos metabolitos de *L. plantarum* Lp62 contra células planctônicas de *S. mutans*. Desta forma, *L. plantarum* Lp62 e seus metabólitos apresentaram potencial antimicrobiano contra células planctônicas e do biofilme de *S. mutans*, exigindo testes adicionais para identificar as substâncias e os mecanismos dessas ações.

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

ABSTRACT

MACÊDO- NERES, NAYARA SILVA. **Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* Lp62 against *Streptococcus mutans* UA159.** Master's Dissertation – Multidisciplinary Institute of Health, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017

Caries is a contagious multifactorial infectious disease and is caused by oral microorganisms, mainly by *Streptococcus mutans*, which participates in the formation of pathogenic bacterial biofilms, leading to the development of caries, through the production of acids and demineralization of the tooth. Evidence shows the benefits of using probiotics as prophylactic and bacterial growth modulators. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* Lp62 and its compounds against *S. mutans* UA159. For this, a growth curve of *L. plantarum* was performed and both the inoculum and the metabolites formed in the fermentation were tested against the growth of *S. mutans* UA159 in the agar diffusion test, in the minimal inhibitory concentration, in the minimal bactericidal concentration. The inhibition of the biofilm formation, pH drop and Proton permeability were also tested. The zone of inhibition began to be formed at 12 hours with higher formation of zone of inhibition at 16 hours and the inoculum containing *L. plantarum* Lp62 also showed zone of inhibition. The MIC for the metabolites was 15 mg/mL and MBC was obtained with the double of the concentration at 30 mg/mL. Half of the concentration of MIC (7.5 mg/mL) was necessary to inhibit the *S. mutans* adhesion to the surface on the microplates. The treatment with the metabolites reduced biomass (7.69 ± 4.42 mg/biofilm), glucans insoluble (2.55 ± 1.18 mg/biofilm) and soluble in alkali (5.19 ± 3.88 mg/biofilm) in comparison to control biofilm. The metabolites also affected both the acid production and acid tolerance of *S. mutans* cells within biofilms, which confirms and extends a previous observation showing disruptive effects of the agent against planktonic cells of *S. mutans*. In this way, *L. plantarum* Lp62 and their metabolites showed antimicrobial potential against planktonic and biofilm cells of *S. mutans*, requiring further tests to identify the substances and the mechanisms of these actions.

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

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Sequência da confecção dos corpos de prova.....	16
FIGURA 2 - Representação das fases do ensaio de formação, <i>in vitro</i> , do biofilme por <i>S. mutans</i>	17
GRAPHIC 1 - Growth curve of <i>Lactobacillus plantarum</i> Lp62 in MRS broth medium until 16 hours.....	43
TABLE 1 - Plate microdiffusion test using metabolites of <i>Lactobacillus plantarum</i> Lp62 produced at different times on the growth curve against <i>Streptococcus mutans</i> UA159.....	44
TABLE 2 - Microdiffusion plaque test using the <i>Lactobacillus plantarum</i> Lp62 inoculum as antimicrobial agent against <i>Streptococcus mutans</i> UA159.....	45
TABELA 3 -. Values of Minimal Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Inhibitory Concentration of Cell Adhesion (MICA) of the metabolites of <i>Lactobacillus plantarum</i> Lp62 against <i>Streptococcus mutans</i> UA159.....	46
TABLE 4 - Effects of the metabolites of the <i>Lactobacillus plantarum</i> Lp62 on viability of <i>Streptococcus mutans</i> UA159 in Biofilms.....	47
TABLE 5 - Effects of the metabolites of the <i>Lactobacillus plantarum</i> Lp62 on the composition of <i>Streptococcus mutans</i> UA159 in Biofilms.....	48
GRAPHIC 2 - Influence of metabolites of <i>Lactobacillus plantarum</i> Lp62 on glycolytic pH-drop in <i>Streptococcus mutans</i> UA159 in Biofilms.....	49
GRAPHIC 3 - Influence of the metabolites of the <i>Lactobacillus plantarum</i> Lp62 on proton permeabilities of <i>Streptococcus mutans</i> UA159 in Biofilms.....	50

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

°C:	Grau Celsius
µg:	Micrograma
µL :	Microlitro
ANOVA:	Análise de variância
BA:	Bahia
BAL:	Bactérias ácido lácticas
CBM	Concentração bactericida mínima
Células HT-29:	Células de adenocarcinoma de colo humano
UFC:	Unidade formadora de colônia
CIM:	Concentração inibitória mínima
CIMA:	Concentração inibitória mínima da aderência
CO₂:	Dióxido de carbono
DNA:	Ácido desoxirribonucléico
gp340:	Glicoproteína-340
GtfA:	Glucosiltransferases A
GtfB:	Glucosiltransferases B
GtfC:	Glucosiltransferases C
GtfD	Glucosiltransferases D
Gtf-I:	Glucosiltransferases I
Gtf-S:	Glucosiltransferases S
Gtf-SI:	Glucosiltransferases SI
HCl:	Ácido clorídrico
IL-8:	Interleucina 8
KCl:	Cloreto de potássio
KOH:	Hidróxido de potássio
Log	Logarítmica
Caldo BHI:	Meio brain heart infusion para cultivo de estreptococos
Caldo MRS:	Formulações de Man, Rogosa e Sharpe para cultivo de <i>Lactobacillus</i>

mg:	Miligrama
mm:	Milímetro
mM:	Milimolar
PEC:	Polissacarídeos extracelulares
PFL:	Produto da fermentação de <i>L. Plantarum</i> liofilizado
pH:	Potencial hidrogeniônico
Phe:	Fenilalanina
PIC:	Polissacarídeos intracelulares
Pro:	Prolina
PVC:	Policloreto de polivinila
rpm:	Rotações por minuto
rRNA:	Ácido ribonucléico ribossomal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	A cárie dentaria.....	3
2.1.1	<i>Streptococcus mutans</i>	4
2.2	Características gerais dos probióticos.....	6
2.2.1	Probióticos na prevenção da cárie	7
2.2.2	<i>Lactobacillus</i>	9
3	OBJETIVOS	12
3.1	Objetivos Gerais.....	12
3.2	Objetivos específicos	12
4	MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1	<i>Micro-organismos e cultivo</i>	13
4.2	Produção e obtenção da substância antimicrobiana.....	13
4.3	Avaliação antimicrobiana de <i>Lactobacillus plantarum</i> Lp62 por microdifusão em placa.....	13
4.4	Liofilização.....	14
4.5	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	14
4.6	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	15
4.7	Inibição da aderência celular (CIMA)	15
4.8	Confecção dos discos para realização do biofilme.....	15
4.9	Ensaio de Biofilme.....	16
4.10	Queda de pH (via glicolítica)	18
4.11	Permeabilidade das células dos biofilmes a prótons	19
4.12	Análises estatísticas	19
	CAPÍTULO	32
5	Considerações Finais	56

1 INTRODUÇÃO

Ações na saúde pública de alguns governos geraram melhorias em saúde bucal em vários países. No entanto, no âmbito das infecções que causam estas doenças, ainda persistem problemas a serem superados. As doenças da cavidade oral são particularmente elevadas em grupos desfavorecidos nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Condições como cárie dentária, doença periodontal, perda de dentes e lesões de mucosas são grandes problemas que tem efeitos sobre a saúde geral e qualidade de vida (ACHARYA; TANDON, 2011).

Neste contexto, a cárie merece destaque por ser uma doença crônica associada à infecção bacteriana que, dentre as doenças orais, atinge o maior número de pessoas mundialmente (BROADBENT; THOMSON; POULTON, 2006; PETERSEN et al., 2005). Esta doença se configura como multifatorial dependendo da interação entre o hospedeiro, a constituição da microbiota e o tipo e frequência da dieta consumida (JORGE, 2012).

Quanto à constituição da microbiota, a prevenção da cárie com base em perfis de espécies microbianas envolvidas tem se mostrado mais difícil do que o previsto devido à alta variabilidade interpessoal e geográfica das bactérias que ocasionam a doença (PETERSON, SCOTT N et al., 2014). No entanto, surge como consenso na literatura que a espécie bacteriana *Streptococcus mutans* é um importante agente na indução da desmineralização do dente e da cárie. Embora não seja o único agente infeccioso envolvido, *S. mutans* possui mecanismos de virulência capazes de ditar o processo de degradação do dente (ALVES et al., 2017; DOS SANTOS; SOVIERO, 2002; KRZYSCIAK et al., 2014; VALDEZ et al., 2017).

O combate à *S. mutans* por antimicrobiano convencional apresenta alguns empecilhos, dentre eles estão o advento de cepas multirresistentes a antibióticos e os efeitos colaterais associados ao uso da clorexidina, utilizada no controle da placa bacteriana (ROBERTS, 2002). Desta forma, a pesquisa e utilização de métodos alternativos contra *S. mutans* pode reduzir a alta incidência de doenças que afetam o elemento dental. Neste segmento vários estudos buscam antimicrobianos alternativos para o combate desta bactéria (CHATTERJEE; DAS, 2017; KOO, H. et al., 2000; YATSUDA et al., 2005).

Nesta perspectiva, o tratamento com probióticos vêm ganhando destaque no controle de infecções bacterianas, demonstrando potencial para prevenir a ação de bactérias patogênicas presentes na cavidade oral (GOLDIN, B.; GORBACH, 2008; MEURMAN, 2005). Um micro-organismo amplamente utilizado como provável probiótico é o *Lactobacillus plantarum*, uma espécie de bactéria normalmente não patogênica que é

encontrada em diversos nichos. Probióticos produzem substâncias capazes de atuarem como antimicrobianos sobre as bactérias patogênicas (VIEIRA; TEIXEIRA; MARTINS, 2013). Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do *L. plantarum* e de seus metabólitos sobre *S. mutans*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A cárie dentária

A cavidade bucal humana é um ambiente dinâmico muitas vezes exposta a variações tais como mudanças de pH, fontes de nutrientes, disponibilidade de carboidratos e alterações na tensão de oxigênio. Mesmo com todo este dinamismo este ambiente serve como reservatório para mais de 350 espécies diferentes de micro-organismos (BARBIERI et al., 2014). Quando esta população microbiana apresenta-se em equilíbrio com o hospedeiro ajudam a prevenir uma ampla variedade de doenças. No entanto, este equilíbrio pode ser perturbado por fatores endógenos associados tanto ao hospedeiro, tais como resposta imunológica, fluxo salivar e capacidade tampão, quanto aos fatores relacionados ao meio ambiente, como a frequente presença de sacarose na dieta (BIZZINI et al., 2012; KOO, et al., 2006).

Segundo Peterson e colaboradores (2013), a cárie é a principal doença presente na infância com ocorrência cinco vezes maior do que a asma, que ocupa o segundo lugar no ranque de doenças mais comuns para esta faixa etária, está associada à formação de biofilme por bactérias presentes na cavidade oral. No processo patogênico estas bactérias promovem a fermentação de açúcares advindos da alimentação levando à produção de ácidos, que interrompem a homeostase microbiana e provoca a dissolução de minerais dentários. Estes eventos podem ser agravados pela falta ou má higienização da cavidade oral (MARSH, 2003). O desenvolvimento do biofilme é um importante fator responsável pelo aparecimento de várias doenças, incluindo cárie, gengivite e periodontite (MARSH; BRADSHAW, 1995; WASHIO; MAYANAGI; TAKAHASHI, 2010).

Os biofilmes, definidos como comunidades de micro-organismos imobilizados conjuntamente numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares de origem microbiana, representam a parte majoritária de toda a vida bacteriana (XAVIER et al., 2003). O biofilme dental é composto por um grupo heterogêneo de micro-organismos em diferentes sítios. Clinicamente, as infecções causadas por esta estrutura representam graves problemas, uma vez que, estando embutidas na matriz extracelular, as bactérias tornam-se resistentes aos antibióticos e a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro (PELEG; HOGAN; MYLONAKIS, 2010). O controle da formação do biofilme é uma estratégia essencial para a prevenção da cárie e outras doenças. Escovação, uso de fio dental e gargarejos são os métodos

mais aceitos e eficazes para o controle de placa, sendo que recentemente, muitos estudos têm tentado identificar compostos extraídos de plantas que podem ser utilizadas como agentes antimicrobianos para prevenir a cárie e doenças periodontais (KIM et al., 2011; MOHSIN et al., 2015; PARK et al., 2012; SAVOIA, 2012; YATSUDA et al., 2005).

Um dos principais causadores da cárie é *S. mutans*, bactéria formadora de biofilmes presentes na superfície dos dentes e gengivas (AHN et al., 2008; KHAN et al., 2011; WEN et al., 2010). A colonização por *S. mutans* pode levar a infecção do canal radicular, levar à formação de abscessos odontogênicos, pulpite e até mesmo endocardite (BISWAS et al., 2010; DA SILVA et al., 2006; DE et al., 2016; HAMADA; SLADE, 1980; MARSH, 1994; NAIDOO et al., 2012; VALDEZ et al., 2017).

2.1.1 *Streptococcus mutans*

S. mutans foi descoberto por Clarke em 1924, no entanto, estudos mais detalhados sobre estas bactérias só foram desenvolvidos a partir de 1960 por Fitzgerald e Keyes. Posteriormente, a correlação com a cárie foi extensivamente estudada, mostrando ser esta bactéria o principal agente etiológico desta doença (LEITES; PINTO; SOUSA, 2006). *S. mutans* são cocos Gram-positivos pertencentes ao filo Firmicutes e ao grupo mutans que habitam preferencialmente a boca, mas, também pode ser encontrado em faringe e intestino (LOESCHE, 1986).

S. mutans possui características importantes que contribuem para a sua virulência. São bactérias acidogênicas (metabolizam uma grande variedade de carboidratos e produzem grandes quantidades de ácido), são acidúricas (toleram ambientes extremamente ácidos) e sintetizam polissacarídeos extracelulares, principalmente a partir da sacarose, que melhoram a adesão à superfície do dente (MARSH, 2009). Os ácidos orgânicos excretados resultam em forte queda de pH localizada que pode causar lesões do esmalte dentário e assim iniciar o desenvolvimento da cárie (BURNE et al., 2012; KUTSCH; YOUNG, 2011; TAKAHASHI; NYVAD, 2011).

Em humanos, dentre os estreptococos do grupo mutans, além do *S. mutans*, o *Streptococcus sobrinus* também possui potencial cariogênico. Outras espécies encontradas em animais e humanos, não parecem ser tão virulentas (MALTS, 2000). Estudos sugerem que os isolados de *S. mutans* têm maior capacidade de formar biofilme do que células planctônicas de outras espécies de *Streptococcus* colonizadores da cavidade oral (JAYKUS; WANG; SCHLESINGER, 2009; TAMURA et al., 2009). Esta bactéria, além de formar biofilme,

exibe expressão diferente de algumas proteínas em comparação com culturas planctônicas, por exemplo, um aumento na expressão da exopolifosfatase e diminuição da expressão da lactato desidrogenase ou da piruvato quinase (SVENSATER et al., 2001). Fatores de virulência como composição de sua superfície celular (sorotipo) e produção de bacteriocinas (mutacinas), têm sido investigados em relação ao seu potencial cariogênico (PINHEIRO et al., 2012; RODRIGUES et al., 2010).

A capacidade de *S. mutans* em colonizar a superfície do dente é resultante de muitos fatores localizados e segregados na superfície celular e é significativamente influenciado pela disponibilidade de sacarose dietética (CROWLEY et al., 1999; LEE; PROGULSKE-FOX; BLEIWEIS, 1988; YATSUDA et al., 2005). Alguns estudos revelaram que *S. mutans* produz pelo menos três glucosiltransferases (GtfB, GtfC e GtfD), também conhecido respectivamente como Gtf-I, Gtf-SI e Gtf-S que utilizam sacarose para gerar moléculas adesivas, polímeros conhecidos como glucanos ou mutanos (LIAO et al., 2014; VACCA-SMITH; BOWEN, 1998). Esses polímeros extracelulares facilitam a adesão bacteriana na mucosa oral promovendo a criação de microambientes ácidos e mantendo a integridade e a estabilidade dos biofilmes (BANAS; VICKERMAN, 2003; BOWEN; KOO, 2011; GREGOIRE et al., 2011; KOO et al., 2010; XIAO et al., 2012). Todas as Gtfs exibem algum grau de atividade de ligação à glucanos. Várias proteínas adicionais, não enzimáticas, localizadas nas células também possuem alta afinidade de ligação à glucanos (BANAS; VICKERMAN, 2003; LYNCH et al., 2007).

A adesão bacteriana inicial à película superficial do esmalte dentário contribui para a maturação do biofilme. Os estreptococos competem por locais de ligação e adesão nesta superfície que normalmente é revestida por saliva (NOBBS et al., 2007). A Glicoproteína-340 (gp340), encontrada nos dentes, na saliva e nas vias aéreas, tem uma elevada capacidade de ligação às bactérias e reconhece diferentes receptores bacterianos (LOIMARANTA et al., 2005). A presença desta glicoproteína nas superfícies dos dentes promove a aderência bacteriana por interação com proteínas salivares (BIKKER et al., 2002; GIBBONS, 1989; ITO et al., 2016; KOBAYASHI et al., 2009),

A ausência de aderência bacteriana a parede do tubo de vidro ou placa de poliestireno em testes *in vitro*, demonstram a capacidade de inibir a síntese de glucano pela glucosiltransferase, uma vez que segundo Leites e colaboradores (2006), os carboidratos são fermentados pelos micro-organismos formadores da cárie de modo direto, mas, na presença de grandes quantidades, são armazenados na forma de polissacarídeos intra (PIC) e extracelulares (PEC). Os PEC formados na parede celular da bactéria, além de serem

importantes na adesão bacteriana também contribuem para as propriedades de difusão da matriz da placa, aumentando a concentração de ácido na interface dente-biofilme.

Apesar de estudos moleculares recentes terem comprovado um ecossistema diversificado no biofilme dentário em que *S. mutans* representa apenas uma pequena fração da comunidade bacteriana, vários outros trabalhos relatam que esta bactéria continua sendo principal causadora da cárie (LI et al., 2005; LOESCHE; SOCRANSKY; GIBBONS, 1964; LOESCHE, 1986; SIMON-SORO; MIRA, 2015).

A terapia convencional contra a cárie tem o objetivo de manter a saúde dos tecidos orais, porém a recolonização resultante da falha de uma terapia preventiva de manutenção, pode acarretar na doença recorrente (JUIZ; ALVES; BARROS, 2010). Ainda, o advento de cepas de *S. mutans* multirresistentes a antibióticos (ROBERTS, 2002) e efeitos colaterais associados ao uso da clorexidina dificultam o tratamento. A clorexidina é o padrão ouro no controle da placa bacteriana, e apresenta como efeitos colaterais: inativação na presença de sulfatos e cálcio, manchamento extrínseco no esmalte dentário, hiperplasia de papilas linguais e perda do sentido da gustação. Desta forma estudos buscam induzir competência imunológica para proteger o indivíduo dessa bactéria e descobrir formas alternativas de prevenção para a cárie dentária (KOO, H. et al., 2010; LEE; KIM, 2014; SHANMUGAM et al., 2013; ZHANG et al., 2014), como por exemplo, o uso de probióticos (PALOMBO, 2011; SIMARK-MATTSSON et al., 2007; TAO et al., 2011; VELLOSO, 2016; JONES, 1997).

2.2 Características gerais dos probióticos

O termo "probiótico" foi desenvolvido em 1965 por Lilly e Stillwell. Os probióticos são definidos como micro-organismos que, quando administrado em quantidades adequadas, promovem efeitos benéficos sobre a saúde do hospedeiro. Gêneros microbianos comumente associados com efeitos probióticos geralmente têm a capacidade de restaurar o equilíbrio da microbiota, regular o tráfego intestinal, produzir ácidos graxos de cadeia curta e competir com patógenos por sítios de adesão. Outras propriedades, como a modulação imunológica e produção de substâncias bioativas específicas, são restritas para algumas espécies (DICKS; BOTES, 2010; FERREIRA DOS SANTOS, T. et al., 2016; FIJAN, 2014; HILL et al., 2014; LILLY; STILLWELL, 1965).

Além das propriedades mencionadas, os probióticos devem ser inócuos, manter-se viáveis por longo período de tempo durante a estocagem e transporte, tolerar o baixo pH do suco gástrico e resistir à ação da bile e das secreções pancreática e intestinal, não transportar

genes transmissores de resistência a antibióticos e ter propriedades anti-mutagênicas e anticarcinogênicas, assim como resistir a fagos e ao oxigênio (HAVENAAR; TEN BRINK; HUIS, 1992; HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002; OUWEHAND et al., 1999; SAARELA et al., 2000)

Dentre os agentes utilizados como probióticos estão bactérias ácido-láticas, bactérias não ácidas lácticas e leveduras. Os probióticos mais extensivamente estudados pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* (FULLER, 2012; GOLDIN, GORBACH, 1992). As espécies representativas incluem *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium Longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (DE MENEZES; GIL-TURNES, 2004; ISHIBASHI; YAMAZAKI, 2001).

Os probióticos são reconhecidos por realizarem várias ações no sistema digestivo prevenindo adesão celular e invasão de bactérias patogênicas. Geralmente modificam o ambiente intestinal e modulam a resposta imune inflamatória local e sistêmica (FLOCH et al., 2011). Tradicionalmente, os probióticos (principalmente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) têm sido utilizados para prevenir ou tratar doenças no trato gastrointestinal e/ou tratar efeitos indesejáveis da antibioticoterapia. Contudo, novas abordagens demonstraram o potencial desses micro-organismos como adjuvantes para o tratamento ou prevenção de doenças extras intestinais. Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente em possíveis efeitos probióticos na cavidade oral (GELVEZ, 2016; HASSLOF et al., 2013; PINTO, 2011).

2.2.1 Probióticos na prevenção da cárie

Existem vários critérios de seleção para escolha de uma determinada cepa de probiótico, porém, a adesão pode ser considerada a característica que mais favorece a atividade protetora da cepa. A capacidade dos probióticos de aderirem às superfícies da cavidade oral pode evitar ou reduzir a sua rápida exclusão (HAUKIOJA et al., 2006; SAMOT; LEBRETON; BADET, 2011; STAMATOVA; MEURMAN, 2009).

Estudos recentes relataram o potencial uso dos probióticos na prevenção de doenças bucais como cáries e doença periodontal (NASE et al., 2001; PETERSSON et al., 2011; SAÑUDO et al., 2017; STECKSEN-BLICKS; SJOSTROM; TWETMAN, 2009). Dados obtidos por alguns grupos de pesquisa confirmam o caráter protetor dos probióticos contra patógenos envolvidos na cárie, inclusive demonstrando que o consumo de *L. reuteri* e *L.*

rhamnosus diminui as contagens de *S. mutans* (AHOLA et al., 2002; DEVINE; MARSH, 2009; CAGLAR et al., 2007; CAGLAR et al., 2008). Assim, lactobacilos que ocorrem naturalmente na cavidade oral podem inibir significativamente o crescimento de estreptococos (SIMARK-MATTSSON et al., 2007). Tanzer e colaboradores, (2010) verificaram que ratos livres de patógenos específicos inoculados com *S. mutans* e alimentados com uma dieta suplementada com *Lactobacillus paracasei* obtiveram redução de cárie em 27%.

Embora os lactobacilos sejam considerados microbiota oral residente, contagens elevadas foram relatadas após ingestão de probióticos (MONTALTO et al., 2004). A capacidade dos lactobacilos de fermentarem os açúcares mostrou-se dependente do tipo de carboidrato e da espécie bacteriana utilizada (HEDBERG et al., 2008). Por exemplo, *L. plantarum* produz ácidos a uma taxa rápida, enquanto que *L. reuteri* produz por meio de glicose, lactose, sacarose, maltose e melibiose lentamente em condições aeróbicas e anaeróbicas (HEDBERG et al., 2008; TWETMAN; KELLER, 2012). Soderling e colaboradores (2011) relataram que a ingestão de cápsulas contendo *L. rhamnosus* ou *L. reuteri* não afeta os níveis de ácido láctico na placa dentária. Com a crescente tendência de adição de bactérias probióticas em muitos produtos comercialmente disponíveis, estudos sobre a segurança de lactobacilos destinados ao uso oral são importantes.

Apesar dos avanços, a pesquisa com probióticos também enfrenta alguns problemas. A maioria dos ensaios clínicos, até o momento, apresentou pequeno tamanho amostral e relatou a cárie como fator de risco intermediário, o que limita as conclusões sobre a real eficácia da administração de probióticos na prevenção de lesão cáries. Os mecanismos de ação dos probióticos ainda não são claros (TANZER et al., 2010; JASBERG et al., 2016). Estudos clínicos que avaliam os efeitos das bifidobactérias na microbiota oral são controversos e muito pouco se sabe sobre o seu papel na saúde bucal. Somado a estes fatores, as avaliações clínicas de probióticos específicos para a cavidade oral são incomuns. Até a presente data, a maioria das espécies ou isolados desenvolvidos para aplicações de saúde intestinal e gastrointestinal foram adaptadas para a pesquisa dental, o que pode não ser o ideal, considerando o complexo biofilme oral e microambiente único que persiste na cavidade (TWETMAN; KELLER, 2012).

No entanto, as informações geradas ao longo dos últimos anos indicam que vários probióticos têm, além de sua atividade como promotores de crescimento e reguladores da microbiota das mucosas, efeito imunomodulador, embora a forma de ação seja pouco conhecida. As evidências acumuladas sobre os benefícios decorrentes do uso dos probióticos justificam o aprofundamento dos estudos sobre seu modo de ação, a fim de aperfeiçoar sua

utilização como profiláticos, moduladores de crescimento e/ou imunológico (DE MENEZES; GIL-TURNES, 2004). A maioria dos probióticos é capaz de produzir uma variada gama de substâncias *in vitro*, que podem ser inibidoras de outras bactérias. Tais substâncias incluem: toxinas, enzimas bacteriolíticas, subprodutos de via metabólica (ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio) e bacteriocinas (PEREIRA; CASTRO GÓMEZ, 2007; TAGG; DAJANI; WANNAMAKER, 1976).

2.2.2 *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* é distribuído em 182 espécies e 27 subespécies. A divisão clássica do gênero está baseada em suas características metabólicas, nas quais o tipo de fermentação pode ser classificado em: homofermentativo obrigatório, heterofermentativo facultativo e heterofermentativo obrigatório. Os representantes deste gênero estão amplamente distribuídos no meio ambiente, especialmente nos vegetais, no trato gastrintestinal e genital (STAMATOVA; MEURMAN, 2009). *Lactobacillus* pertencem ao grupo das bactérias ácido láctico (BAL) e estão distribuídos ao longo de todo o intestino delgado. São definidos como bactérias Gram-positivas, com forma de bastonetes ou cocabacilos, geralmente imóveis e catalase negativa, entretanto a atividade da pseudocatalase pode estar presente em algumas linhagens. São ácido-tolerantes, aerotolerantes e estritamente fermentativos. A maioria dos lactobacilos é homofermentativo, tendo como produto final o ácido láctico, mas existem representantes heterofermentativos, que produzem lactato, dióxido de carbono e etanol em quantidades equimolares (PEREIRA, 2014; TSAI; CHENG; PAN, 2012).

O número de espécies de bactérias ácido-láticas (BALs) que tiveram o genoma sequenciado ainda é restrito, mas têm aumentado rapidamente nos últimos anos. O sequenciamento dos genomas de *L. plantarum* (KLEEREBEZEM et al., 2003), *L. johnsonii* (PRIDMORE et al., 2004), *L. sakei* (CHAILLOU et al., 2005), *L. salivarius* (CLAESSON et al., 2006) e *L. helveticus* (CREMONESI; CHESSA; CASTIGLIONI, 2012) tem contribuído para o maior entendimento desses lactobacilos como probióticos. Essas bactérias são nutricionalmente fastidiosas, exigindo um meio rico em nutrientes: carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, sais, derivados de ácidos nucleicos e vitaminas. São microorganismos ubíquos, podendo ser encontrados em uma variedade de ambientes onde existam carboidratos disponíveis para seu metabolismo (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

As BALs podem produzir bacteriocinas que têm como alvo principal as bactérias Gram-positivas, podendo também atuar contra bactérias da mesma espécie (estreito espectro de atividade) ou contra bactérias de outros gêneros (amplo espectro de atividade) (COTTER; HILL; ROSS, 2005). Essas bacteriocinas são um grupo heterogêneo de compostos antimicrobianos de natureza peptídica, formados por 20 a 60 resíduos de aminoácidos, com características anfipáticas e ponto isoelétrico elevado. Esses peptídeos são distintos dos antibióticos na sua síntese, modo de ação, espectro de atividade, massa molecular, propriedades bioquímicas, mecanismos de resistência, toxicidade e origem genética (CAROLISSEN-MACKAY; ARENDSE; HASTINGS, 1997). Está comprovado que ocorre um ótimo potencial de inibição de *L. acidophilus* contra bactérias patogênicas como *Clostridium perfringens* (causador de enterite necrótica), *Salmonella* e *Escherichia coli* (CLEVELAND et al., 2001; HAN et al., 2007), sendo que tal inibição pode estar relacionada à produção de bacteriocinas por este lactobacilo.

2.2.2.1 *Lactobacillus plantarum*

L. plantarum é uma bactéria láctica aeróbica facultativa, que apresenta, como diferencial, a alta produção de lactato (MCFALL; MONTVILLE, 1989; MULLER; GÓMEZ; CALLIARI, 2015). É um micro-organismo encontrado naturalmente em diversos nichos incluindo produtos lácteos, carnes, vegetais além de residir no trato gastrointestinal dos seres humanos e outros animais. Geralmente são homofermentativos e convertem mais de 80% dos açúcares fermentáveis à lactato (MCFALL; MONTVILLE, 1989).

O sequenciamento revelou que esse micro-organismo possui maquinaria molecular voltada para o catabolismo de compostos orgânicos, pois foram encontrados genes altamente expressos codificadores de enzimas envolvidas no metabolismo desses compostos. Também foi descoberto um número relativamente alto de genes envolvidos na adaptação de *L. plantarum* a ambientes diversos (KLEEREBEZEM et al., 2003).

Em um estudo realizado por Strom e colaboradores (2002), uma cepa de *L. plantarum* com propriedades antifúngicas foi isolada da silagem de capim. Três substâncias antifúngicas produzidas pela cepa foram identificadas como ácido 3-fenilacético e dois de peptídeos cíclicos: ciclo (L-Phe-L-Pro) e ciclo (L-Phe-trans-4-OH- L-Pro), este foi considerado o primeiro relato da produção de dipeptídeos cíclicos por BAL. A avaliação da atividade antimicrobiana do sobrenadante de fermentado de *L. plantarum* DCTA 8420 contra as cepas patogênicas de *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella entérica*

demonstrou que a cepa de lactobacilos produziu substâncias capazes de inibir os patógenos em teste de inibição, formando halos de 20 a 32 mm (COSTA et al., 2012).

Dentre os lactobacilos o *L. plantarum* é um dos mais usados na produção de alimentos fermentados (KATO et al., 1994; RUIZ-BARBA; PIARD; JIMENEZ-DIAZ, 1991; VAN REENEN; DICKS; CHIKINDAS, 1998; ZAPATA et al., 2009). Estudos relataram o isolamento e caracterização de uma cepa nativa de *L. plantarum* a partir do leite cru fermentado (SALAZAR, 2003), bem como o isolamento, purificação e caracterização parcial de sua bacteriocina. A composição antibacteriana do referido composto sugere que esta cepa ou a sua bacteriocina possam ser usados como uma substância antimicrobiana de amplo espectro na preservação dos alimentos. Estas características de *L. plantarum* sugerem que estas bactérias podem ser testadas contra diferentes patógenos, inclusive infecções da cavidade oral.

L. plantarum Lp62, foi obtido e identificado da fermentação espontânea de amêndoas do cacau da região de Ilhéus-Itabuna/BA. Foi identificado por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA (GenBank: KU291427) e pertence à Coleção de Bactérias Lácticas do Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) (FERREIRA, et al., 2016). Existem poucos estudos sobre o potencial probiótico desta cepa, sendo que os trabalhos publicados investigam as atividades imunomoduladoras, antiinflamatórias, antinociceptiva e galactogogas (MESSIAS et al., 2017). Lp62 conseguiu inibir a produção de IL-8 por células HT-29 estimuladas por *Salmonella Typhi* e impediu a adesão de agentes patogênicos a essas células epiteliais (FERREIRA, et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar o potencial antimicrobiano da cepa *Lactobacillus plantarum* Lp62 e dos metabólitos produzidos em sua fermentação contra *Streptococcus mutans* UA159.

3.2 Objetivos específicos

- Obter metabólitos a partir da fermentação de *L. plantarum* Lp62;
- Verificar a inibição de crescimento de *S. mutans* UA159 a partir de microdifusão em ágar;
- Determinar a concentração inibitória mínima e bactericida mínima dos metabólitos de *L. plantarum* Lp62 sobre *S. mutans* UA159;
- Avaliar a inibição da aderência celular dos metabólitos de *L. plantarum* Lp62 sobre *S. mutans* UA159;
- Avaliar a inibição da formação de biofilme de *S. mutans* UA159 pelos metabólitos de *L. plantarum* Lp62;
- Avaliar a ação dos metabólitos de *L. plantarum* Lp62 sobre a via glicolítica de *S. mutans* UA159 em modelo de biofilme;
- Avaliar a ação dos metabólitos de *L. plantarum* Lp62 sobre a permeabilidade a prótons da membrana de *S. mutans* UA159 em modelo de biofilme;
- Avaliar a ação dos metabólitos de *L. plantarum* Lp62 sobre a produção de polissacarídeos de *S. mutans* UA159 em modelo de biofilme.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos e cultivo

As cepas utilizadas para os testes *in vitro* foram *S. mutans* UA159 e *L. plantarum* Lp62. *L. plantarum* Lp62 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 KU291427- (FERREIRA et al., 2016) 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 CO₂ 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 CO₂ 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. plantarum* foi realizada em sistema fechado com incubação em meio caldo MRS (Kasvi), a 37°C e 5% de CO₂. 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 10 minutos para obtenção do sobrenadante contendo os compostos produzidos durante o crescimento das bactérias.

4.3 Avaliação antimicrobiana de *Lactobacillus plantarum* Lp62 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. plantarum* (0 às 16 horas) ou o inóculo (leitura feita por espectrofotometria de 0,135 em 630 nm) contendo diferentes quantidades de *L. plantarum* em meio MRS (20-100 μL). As placas foram incubadas durante 18 horas a 37°C, 5% de CO_2 , seguido de medição dos halos de inibição com o paquímetro (milímetros).

4.4 Liofilização

Os produtos da fermentação da curva de crescimento de *L. plantarum* 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. plantarum* 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 (60 - 1,875 mg/mL). As placas foram incubadas durante 24 horas, a 37°C e 5% de CO_2 . 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 CO₂, 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 (30 - 0,9347 mg/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 CO₂ 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).

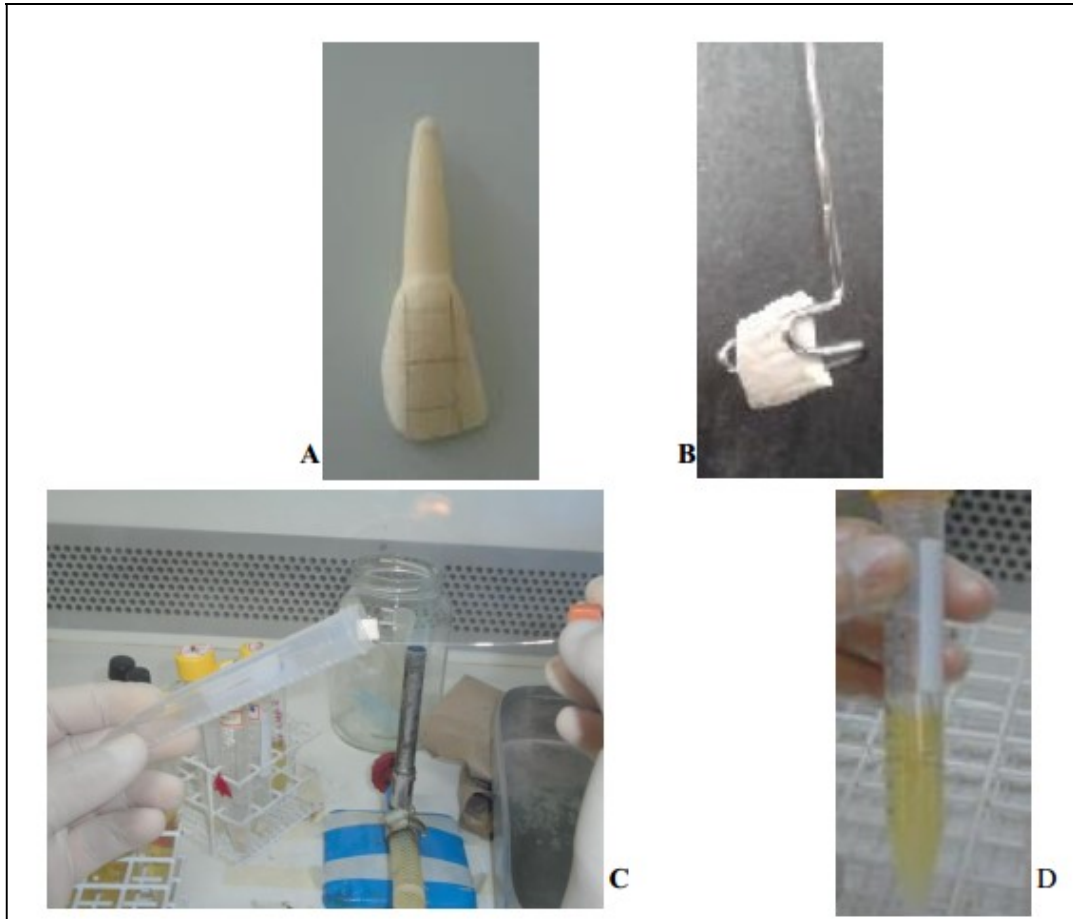


FIGURA 1: Sequência da confecção dos corpos de prova: A- incisivo inferior permanente bovino hígido com a demarcação do tamanho dos blocos de esmalte; B- fragmento dentário no aparato confeccionados com fios ortodôntico; C- superfície sólida para formação do biofilme no tubo Falcon; D- tubo com bloco 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 CO₂ como descrito por Koo et al. (2003) 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 200 vezes o resultado do CBM (6g/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).

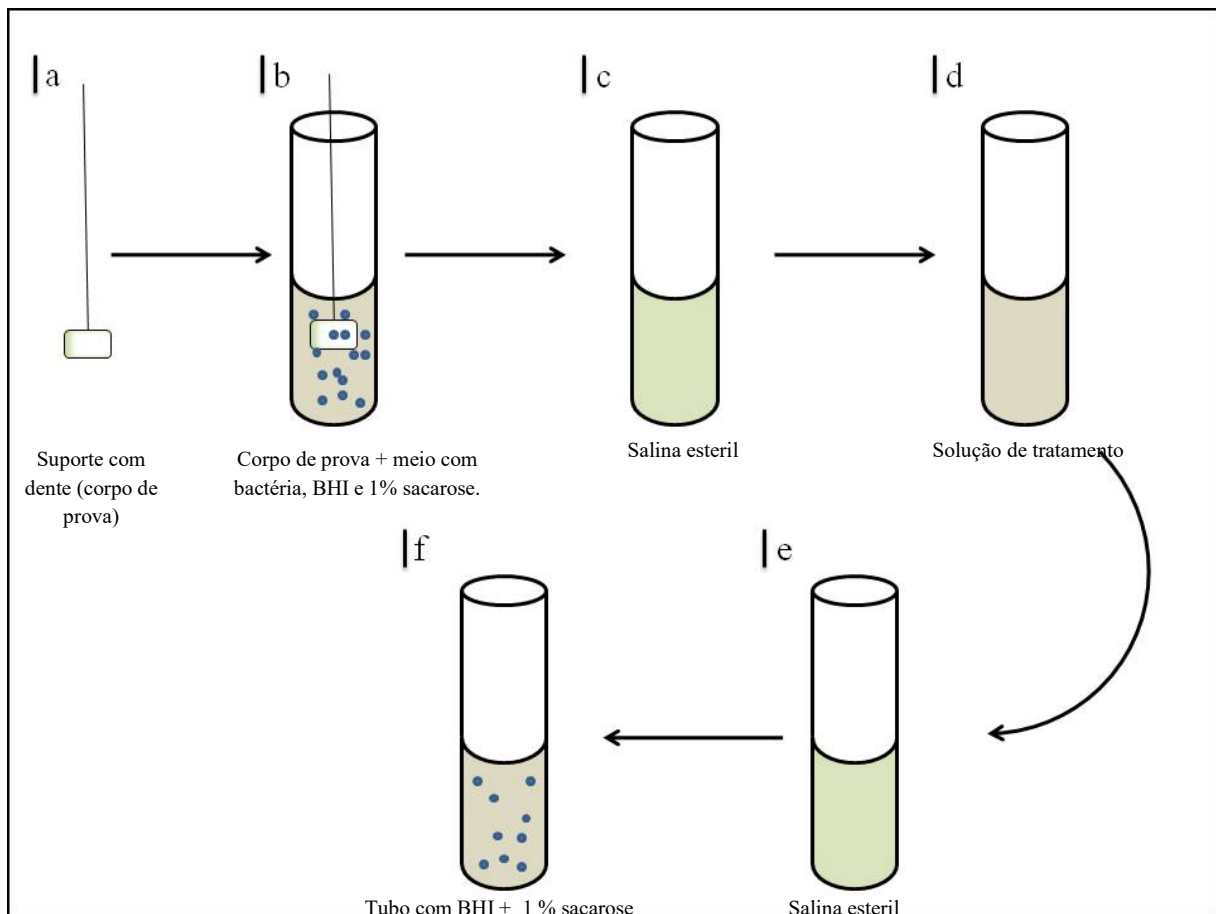


FIGURA 2: Representação das fases do ensaio de formação, *in vitro*, do biofilme por *S. mutans*: A- Corpo de prova; B - Corpo de prova já com biofilme; C- Lavagem em salina a 0,9%; D- Inserção da superfície sólida nas soluções de tratamento por duas vezes (por tempo de 30 segundos); E- lavagem em salina; 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 sonificador 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 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 sonificador 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 CO₂. 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 a 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 tubo e adicionado etanol gelado e o pellet formado (insolúvel) foi adicionado 2ml de água destilada. O solúvel em álcali foi obtido a partir da retirada de 1,5 mL do tubo contendo o insolúvel, esta 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 CO₂). 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

- ACHARYA, S.; TANDON, S. The effect of early childhood caries on the quality of life of children and their parents. **Contemp Clin Dent**, v. 2, n. 2, p. 98-101, Apr 2011.
- AHN, S. J. et al. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. **Infect Immun**, v. 76, n. 9, p. 4259-68, Sep 2008.
- AHOLA, A. J. et al. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. **Arch Oral Biol**, v. 47, n. 11, p. 799-804, Nov 2002.
- ALVES, L. A. et al. The two-component system VicRK regulates functions associated with *Streptococcus mutans* resistance to complement immunity. **Mol Oral Microbiol**, v. 32, n. 5, p. 419-431, Oct 2017.
- BANAS, J. A.; VICKERMAN, M. M. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 14, n. 2, p. 89-99, 2003.
- BARBIERI, D. S. et al. Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol**, v. 59, n. 9, p. 887-96, Sep 2014.
- BIKKER, F. J. et al. Identification of the bacteria-binding peptide domain on salivary agglutinin (gp-340/DMBT1), a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. **J Biol Chem**, v. 277, n. 35, p. 32109-15, Aug 30 2002.
- BISWAS, S. et al. *Streptococcus mutans* infective endocarditis complicated by vertebral discitis following dental treatment without antibiotic prophylaxis. **J Med Microbiol**, v. 59, n. Pt 10, p. 1257-9, Oct 2010.
- BIZZINI, B. et al. Probiotics and oral health. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 34, p. 5522-5531, 2012.
- BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Res**, v. 45, n. 1, p. 69-86, 2011.
- BROADBENT, J. M.; THOMSON, W. M.; POULTON, R. Progression of dental caries and tooth loss between the third and fourth decades of life: a birth cohort study. **Caries Res**, v. 40, n. 6, p. 459-65, 2006.

BURNE, R. A. et al. Progress dissecting the oral microbiome in caries and health. **Adv Dent Res**, v. 24, n. 2, p. 77-80, Sep 2012.

CAGLAR, E. et al. Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary *mutans streptococci* and lactobacilli. **Clin Oral Investig**, v. 11, n. 4, p. 425-9, Dec 2007.

CAGLAR, E. et al. Short-term effect of ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. **Acta Odontol Scand**, v. 66, n. 3, p. 154-8, Jun 2008.

CAROLISSEN-MACKAY, V.; ARENDSE, G.; HASTINGS, J. W. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. **Int J Food Microbiol**, v. 34, n. 1, p. 1-16, Jan 1997.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Crit Rev Microbiol**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CHAILLOU, S. et al. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. **Nat Biotechnol**, v. 23, n. 12, p. 1527-33, Dec 2005.

CHATTERJEE, T.; DAS, S. M. P. Antimicrobial efficacy of some medicinal plant extract against *Streptococcus mutans* causing dental caries. **Journal of Medicinal Plants**, v. 5, n. 2, p. 315-317, 2017.

CLAESSON, M. J. et al. Multireplicon genome architecture of *Lactobacillus salivarius*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 17, p. 6718-23, Apr 25 2006.

CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int J Food Microbiol**, v. 71, n. 1, p. 1-20, Dec 04 2001.

COSTA, G. N. et al. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* frente a microrganismos patogênicos "in vitro". **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1839-1846, 2012.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 10, p. 777-88, Oct 2005.

CREMONESI, P.; CHESSA, S.; CASTIGLIONI, B. Genome sequence and analysis of *Lactobacillus helveticus*. **Front Microbiol**, v. 3, p. 435, 2012.

- CROWLEY, P. J. et al. Virulence of a spaP mutant of *Streptococcus mutans* in a gnotobiotic rat model. **Infect Immun**, v. 67, n. 3, p. 1201-6, Mar 1999.
- DA SILVA, L. A. et al. Bacterial profile in primary teeth with necrotic pulp and periapical lesions. **Braz Dent J**, v. 17, n. 2, p. 144-8, 2006.
- DE, A. et al. Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Streptococcus mutans* isolated from diabetic patients in Rome, Italy. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1794, 2016.
- DE MENEZES, C., MARIO; GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.
- DEVINE, D. A.; MARSH, P. D. Prospects for the development of probiotics and prebiotics for oral applications. **J Oral Microbiol**, v. 1, May 01 2009.
- DICKS, L. M.; BOTES, M. Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. **Benef Microbes**, v. 1, n. 1, p. 11-29, Mar 2010.
- DOS SANTOS, A. P. P.; SOVIERO, V. M. Prevalência de cárie e fatores de risco em crianças de 0 a 36 meses. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 203-208, 2002.
- 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.
- FERREIRA DOS SANTOS, T. et al. Immunomodulatory Effects of *Lactobacillus plantarum* Lp62 on Intestinal Epithelial and Mononuclear Cells. **Biomed Res Int**, v. 2016, 2016.
- FERREIRA DOS SANTOS, T. et al. Immunomodulatory Effects of *Lactobacillus plantarum* Lp62 on Intestinal Epithelial and Mononuclear Cells. **Biomed Res Int**, v. 2016, p. 8404156, 2016.
- FIJAN, S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 5, p. 4745-67, May 05 2014.
- FLOCH, M. H. et al. Recommendations for probiotic use—2011 update. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 45, p. S168-S171, 2011.
- FULLER, R. **Probiotics: the scientific basis**. Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 9401123640.

GELVEZ, Y. A. J. **Probióticos orais**. 2016.

GIBBONS, R. J. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. **J Dent Res**, v. 68, n. 5, p. 750-60, May 1989.

GOLDIN, B.; GORBACH, S. Clinical indications for probiotics: an overview. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. Supplement_2, p. S96-S100, 2008.

GOLDIN, B. R.; GORBACH, S. L. Probiotics for humans. **Probiotics: the scientific basis**, p. 355-376, 1992.

GREGOIRE, S. et al. Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, n. 18, p. 6357-67, Sep 2011.

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev**, v. 44, n. 2, p. 331-84, Jun 1980.

HAN, K. S. et al. Characterization and purification of acidocin 1B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* GP1B. **J Microbiol Biotechnol**, v. 17, n. 5, p. 774-83, May 2007.

HASSLOF, P. et al. Early intervention with probiotic *Lactobacillus paracasei* F19 has no long-term effect on caries experience. **Caries Res**, v. 47, n. 6, p. 559-65, 2013.

HAUKIOJA, A. et al. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. **Oral Microbiol Immunol**, v. 21, n. 5, p. 326-32, Oct 2006.

HAVENAAR, R.; TEN BRINK, B.; HUIS, J. H. Selection of strains for probiotic use. In: (Ed.). **Probiotics**: Springer, 1992. p.209-224.

HEDBERG, M. et al. Sugar fermentation in probiotic bacteria--an in vitro study. **Oral Microbiol Immunol**, v. 23, n. 6, p. 482-5, Dec 2008.

HILL, C. et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 11, n. 8, p. 506-14, Aug 2014.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre-and probiotics. **Food Research International**, v. 35, n. 2, p. 109-116, 2002.

ISHIBASHI, N.; YAMAZAKI, S. Probiotics and safety. **Am J Clin Nutr**, v. 73, n. 2 Suppl, p. 465S-470S, Feb 2001.

ITO, T. et al. Streptococcal SspB peptide analog inhibits saliva-promoted adhesion and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. **Open Journal of Stomatology**, v. 6, n. 03, p. 81, 2016.

JASBERG, H. et al. Bifidobacteria inhibit the growth of Porphyromonas gingivalis but not of *Streptococcus mutans* in an in vitro biofilm model. **Eur J Oral Sci**, v. 124, n. 3, p. 251-8, Jun 2016.

JAYKUS, L.-A.; WANG, H. H.; SCHLESINGER, L. S. **Food-borne microbes: shaping the host ecosystem**. ASM Press, 2009. ISBN 1555814050.

JONES, C. G. Chlorhexidine: is it still the gold standard? **Periodontol 2000**, v. 15, n. 1, p. 55-62, 1997.

JORGE, A. **Microbiologia e imunologia oral**. Elsevier Brasil, 2012. ISBN 8535265244.

JUIZ, P. J. L.; ALVES, R. J.; BARROS, T. F. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. 2010.

KATO, T. et al. Plantaricin-149, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NRIC 149. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 77, n. 3, p. 277-282, 1994.

KHAN, A. U. et al. A proteomic approach for exploring biofilm in *Streptococcus mutans*. **Bioinformation**, v. 5, n. 10, p. 440-5, Feb 15 2011.

KIM, M. J. et al. Antimicrobial effect of Korean propolis against the mutans streptococci isolated from Korean. **J Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 161-4, Feb 2011.

KLEEREBEZEM, M. et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 4, p. 1990-5, Feb 18 2003.

KOBA, H. et al. Role of lysine in interaction between surface protein peptides of *Streptococcus gordonii* and agglutinin peptide. **Oral Microbiol Immunol**, v. 24, n. 2, p. 162-9, Apr 2009.

KOO, H. et al. Effect of a new variety of Apis mellifera propolis on mutans Streptococci. **Curr Microbiol**, v. 41, n. 3, p. 192-6, Sep 2000.

- 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.
- KOO, H. et al. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. **J Bacteriol**, v. 192, n. 12, p. 3024-32, Jun 2010.
- KRZYSCIĄK, W. et al. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 33, n. 4, p. 499-515, Apr 2014.
- KUTSCH, V. K.; YOUNG, D. A. New directions in the etiology of dental caries disease. **J Calif Dent Assoc**, v. 39, n. 10, p. 716-21, Oct 2011.
- LEE, S.-H.; KIM, Y.-J. A comparative study of the effect of probiotics on cariogenic biofilm model for preventing dental caries. **Archives of microbiology**, v. 196, n. 8, p. 601-609, 2014.
- LEE, S. F.; PROGULSKE-FOX, A.; BLEIWEIS, A. S. Molecular cloning and expression of a *Streptococcus mutans* major surface protein antigen, P1 (I/II), in *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 56, n. 8, p. 2114-9, Aug 1988.
- LEITES, A.; PINTO, M. B.; SOUSA, E. R. D. Aspectos microbiológicos da cárie dental. **Salusvita**, v. 25, n. 2, p. 239-52, 2006.
- LI, Y. et al. Survey of oral microbial diversity using PCR-based denaturing gradient gel electrophoresis. **J Dent Res**, v. 84, n. 6, p. 559-564, 2005.
- LIAO, S. et al. *Streptococcus mutans* extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. **J Bacteriol**, v. 196, n. 13, p. 2355-66, Jul 2014.
- LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-8, Feb 12 1965.
- LOESCHE, W.; SOCRANSKY, S.; GIBBONS, R. *Bacteroides oralis*, proposed new species isolated from the oral cavity of man. **J Bacteriol**, v. 88, n. 5, p. 1329-1337, 1964.
- LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol Rev**, v. 50, n. 4, p. 353-80, Dec 1986.

LOIMARANTA, V. et al. Fluid- or surface-phase human salivary scavenger protein gp340 exposes different bacterial recognition properties. **Infect Immun**, v. 73, n. 4, p. 2245-52, Apr 2005.

LYNCH, D. J. et al. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. **FEMS Microbiol Lett**, v. 268, n. 2, p. 158-65, Mar 2007.

MALTS, M. Cárie dental: fatores relacionados. In: (Ed.). **Saúde bucal coletiva**: Santos, 2000. p.319-39. ISBN 8572881182.

MARSH, P. D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv Dent Res**, v. 8, n. 2, p. 263-71, Jul 1994.

_____. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, v. 149, n. Pt 2, p. 279-94, Feb 2003.

_____. Dental plaque as a biofilm: the significance of pH in health and caries. **Compendium**, v. 30, n. 2, p. CE2, 2009.

MARSH, P. D.; BRADSHAW, D. J. Dental plaque as a biofilm. **J Ind Microbiol**, v. 15, n. 3, p. 169-75, Sep 1995.

MCFALL, S. M.; MONTVILLE, T. J. pH-mediated regulation of pyruvate catabolism in *Lactobacillus plantarum* chemostat cultures. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 4, n. 5, p. 335-340, 1989.

MESSIAS, G. C. Avaliação da atividade galactagoga do microrganismo *Lactobacillus plantarum* isolado da fermentação de amêndoas de cacau. 2017.

MEURMAN, J. H. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? **European journal of oral sciences**, v. 113, n. 3, p. 188-196, 2005.

MOHSIN, S. et al. The effects of a dentifrice containing propolis on Mutans Streptococci: a clinico-microbiological study. **Ethiopian journal of health sciences**, v. 25, n. 1, p. 9-16, 2015.

MONTALTO, M. et al. Probiotic treatment increases salivary counts of lactobacilli: a double-blind, randomized, controlled study. **Digestion**, v. 69, n. 1, p. 53-6, 2004.

MULLER, S. B.; GÓMEZ, R. J. H. C.; CALLIARI, C. M. Desenvolvimento de pó efervescente probiótico e simbiótico. **Journal of Health Sciences**, 2015.

NAIDOO, R. et al. Inhibitory activity of *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia* extract against *Streptococcus mutans* and its biofilm. **J Ethnopharmacol**, v. 144, n. 1, p. 171-4, Oct 31 2012.

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 Res**, v. 35, n. 6, p. 412-20, Nov-Dec 2001.

NOBBS, A. H. et al. *Streptococcus gordonii* Hsa environmentally constrains competitive binding by *Streptococcus sanguinis* to saliva-coated hydroxyapatite. **J Bacteriol**, v. 189, n. 8, p. 3106-14, Apr 2007.

OUWEHAND, A. C. et al. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 1, p. 43-52, 1999.

PALOMBO, E. A. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2011, p. 680354, 2011.

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.

PARK, S.-N. et al. Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. **Anaerobe**, v. 18, n. 3, p. 369-372, 2012.

PELEG, A. Y.; HOGAN, D. A.; MYLONAKIS, E. Medically important bacterial-fungal interactions. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 5, p. 340-9, May 2010.

PEREIRA, G. V.; CASTRO GÓMEZ, R. J. H. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, 2007.

PEREIRA, H. C. D. Correlação entre capacidade ectonucleotidásica de isolados de *Lactobacillus* e a produção de citocinas por células dendríticas. 2014.

PETERSEN, P. E. et al. The global burden of oral diseases and risks to oral health. **Bull World Health Organ**, v. 83, n. 9, p. 661-9, Sep 2005.

PETERSON, S. N. et al. Functional expression of dental plaque microbiota. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 4, 2014.

PETERSON, S. N. et al. The dental plaque microbiome in health and disease. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58487, 2013.

PETERSSON, L. G. et al. Reversal of primary root caries lesions after daily intake of milk supplemented with fluoride and probiotic lactobacilli in older adults. **Acta Odontol Scand**, v. 69, n. 6, p. 321-7, Nov 2011.

PINHEIRO, A. M. et al. Efeito antimicrobiano de tinturas de produtos naturais sobre bactérias da cárie dentária. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 25, n. 2, 2012.

PINTO, G. D. S. **Associação entre o uso do iogurte contendo probióticos e a redução de Estreptococos do grupo mutans em pacientes sob tratamento ortodôntico**. 2011. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

PRIDMORE, R. D. et al. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 8, p. 2512-7, Feb 24 2004.

ROBERTS, M. C. Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. **Periodontol 2000**, v. 28, p. 280-97, 2002.

RODRIGUES, M. R. et al. Análise do sorotipo e dos genes para mutacinas em streptococcus mutans isolados de pré-escolares com diferentes experiências de cárie. **Brazilian Dental Science**, v. 11, n. 4, 2010.

RUIZ-BARBA, J. L.; PIARD, J. C.; JIMENEZ-DIAZ, R. Plasmid profiles and curing of plasmids in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. **J Appl Bacteriol**, v. 71, n. 5, p. 417-21, Nov 1991.

SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **J Biotechnol**, v. 84, n. 3, p. 197-215, Dec 28 2000.

SALAZAR, A. C. B. **Aislamiento de cepas nativas de probióticos y comparación de la viabilidad por efecto de un prebiótico**. 2003. Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.

SAÑUDO, A. I., LUQUE, R., DÍAZ-ROPERO, M. P., FONOLLÁ, J., & BAÑUELOS, Ó. In vitro and in vivo anti-microbial activity evaluation of inactivated cells of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 against *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, 84, 58-63, 2017.

SAMOT, J.; LEBRETON, J.; BADET, C. Adherence capacities of oral lactobacilli for potential probiotic purposes. **Anaerobe**, v. 17, n. 2, p. 69-72, Apr 2011.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future microbiology**, v. 7, n. 8, p. 979-990, 2012.

SHANMUGAM, K. et al. Dental caries vaccine—a possible option? **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 7, n. 6, p. 1250, 2013.

SIMARK-MATTSSON, C. et al. *Lactobacillus*-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs. caries-active subjects. **Eur J Oral Sci**, v. 115, n. 4, p. 308-14, Aug 2007.

SIMON-SORO, A.; MIRA, A. Solving the etiology of dental caries. **Trends Microbiol**, v. 23, n. 2, p. 76-82, Feb 2015.

STAMATOVA, I.; MEURMAN, J. H. Probiotics: health benefits in the mouth. **Am J Dent**, v. 22, n. 6, p. 329-38, Dec 2009.

STECKSEN-BLICKS, C.; SJOSTROM, I.; TWETMAN, S. Effect of long-term consumption of milk supplemented with probiotic lactobacilli and fluoride on dental caries and general health in preschool children: a cluster-randomized study. **Caries Res**, v. 43, n. 5, p. 374-81, 2009.

SVENSATER, G. et al. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 205, n. 1, p. 139-46, Nov 27 2001.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriol Rev**, v. 40, n. 3, p. 722-56, Sep 1976.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. **J Dent Res**, v. 90, n. 3, p. 294-303, Mar 2011.

TAMURA, S. et al. Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiol Immunol**, v. 24, n. 2, p. 152-61, Apr 2009.

TANZER, J. M. et al. Caries inhibition by and safety of *Lactobacillus paracasei* DSMZ16671. **J Dent Res**, v. 89, n. 9, p. 921-6, Sep 2010.

TAO, R. et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of pleurocidin against cariogenic microorganisms. **Peptides**, v. 32, n. 8, p. 1748-54, Aug 2011.

- TSAI, Y. T.; CHENG, P. C.; PAN, T. M. The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 96, n. 4, p. 853-62, Nov 2012.
- TWETMAN, S.; KELLER, M. K. Probiotics for caries prevention and control. **Adv Dent Res**, v. 24, n. 2, p. 98-102, Sep 2012.
- VACCA-SMITH, A.; BOWEN, W. Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. **Arch Oral Biol**, v. 43, n. 2, p. 103-110, 1998.
- VALDEZ, R. M. A. et al. Genotypic diversity and phenotypic traits of *Streptococcus mutans* isolates and their relation to severity of early childhood caries. **BMC Oral Health**, v. 17, n. 1, p. 115, Jul 14 2017.
- VAN REENEN, C. A.; DICKS, L. M.; CHIKINDAS, M. L. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. **J Appl Microbiol**, v. 84, n. 6, p. 1131-7, Jun 1998.
- VELLOSO, M. D. S. Efeitos de *Lactobacillus* spp. isolados da cavidade bucal de indivíduos livres de cárie sobre *Streptococcus mutans*: estudo do potencial probiótico. 2016.
- VIEIRA, A. T.; TEIXEIRA, M. M.; MARTINS, F. S. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. **Frontiers in immunology**, v. 4, 2013.
- WASHIO, J.; MAYANAGI, G.; TAKAHASHI, N. Challenge to Metabolomics of Oral Biofilm:—From “What Are They?” to “What Are They Doing?”—. **Journal of Oral Biosciences**, v. 52, n. 3, p. 225-232, 2010.
- WEN, Z. T. et al. Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. **BMC Microbiol**, v. 10, p. 111, Apr 14 2010.
- XAVIER, J. et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, v. 76, n. 1, p. 2-13, 2003.
- XIAO, J. et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, p. e1002623, 2012.
- 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.

ZAPATA, S. et al. Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. **Vitae**, v. 16, n. 1, p. 75-82, 2009.

ZHANG, Y. et al. Identification of *Lactobacillus* from the saliva of adult patients with caries using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e106185, 2014.

CAPÍTULO I

**Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* Lp62 against
Streptococcus mutans UA159**

Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* Lp62 against *Streptococcus mutans* UA159

Nayara Silva de Macêdo Neres¹, Aracely Vieira de Melo¹, Erika Pereira de Souza¹, Ana Paula Trovatti Uetanabaro², Regiane Yatsuda^{1,2}

1 Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Brasil

2 Universidade de Santa Cruz (UESC), Campus Soane Nazaré de Andrade, Ihéus, Brasil

*Email: naysmacedo@yahoo.com.br; reyatsuda@yahoo.com

ABSTRACT

ABSTRACT

Streptococcus mutans is the mainly bacterial on oral pathogenic biofilm, leading to the production of acids and demineralization of the tooth. This study evaluated the antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* Lp62 metabolites against *S. mutans*. The metabolites of Lp62 formed in the growth curve after 16 h of fermentation were tested against the *S. mutans* UA159. The minimum inhibitory concentration (MIC), the minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum inhibitory adhesion (MICA) were determined. The inhibition of the biofilm formation, and its effects on glycolysis and proton permeability were also determined. The metabolites of *L. plantarum* Lp62 showed MIC (15 mg mL⁻¹), MBC (30 mg mL⁻¹) and MICA (7.5 mg mL⁻¹), reduced the biomass, insoluble and soluble glucans, and changed the aciduric and acidogenic capacity of *S. mutans* UA159 in biofilms. Thus, the metabolites of *L. plantarum* Lp62 showed antimicrobial potential and affects important virulence factors of *S. mutans*, and further studies should be conducted to identify these metabolites.

Keywords: *Streptococcus mutans*; Probiotics; Antimicrobial; *Lactobacillus plantarum*; Biofilm; Metabolites.

1. Introduction

Streptococcus mutans plays a potent role in the induction of dental caries, because strongly produces lactic acid and tolerates a low acidic environment (Lemme, Sztajer et al., 2010). Furthermore, *S. mutans* produces glucan from sucrose by glucosyltransferases such as GtfB, GtfC, and GtfD (Monchois, Willemot et al., 1999, Lee and Kim, 2014) and uses sucrose as a substrate for growth (Kreth, Zhu et al., 2008). Oral biofilm consists of oral bacteria, glucan, and debris. Among these components, glucan is a key contributor to the development of biofilm via formation of a thick barrier (Marsh, 2004). The biofilm of a healthy person maintains a balanced composition of bacterial species. However, when the conditions of the oral biofilm are changed by a sugar-rich diet, low pH, and low saliva flow, the proportion of *S. mutans* in the oral biofilm increases compared with other streptococci (Marsh, 2006). Therefore, the glucosyltransferases (Gtfs) and acid production are important virulence factors of *S. mutans*. Cariogenic biofilm with *S. mutans* is considered to be a greater risk factor for induction of dental caries than planktonic *S. mutans* (Kim and Lee, 2016). Inhibiting the colonization of *S. mutans* on the tooth surface is believed to prevent the formation of dental plaque and development of dental caries (Dhawan and Dhawan, 2013, SrivaStava, Saha et al., 2016).

Probiotics are live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host (Hill, Guarner et al., 2014). Probiotics are beneficial bacteria that can improve the micro-ecological balance of the host (Lara-Villoslada, Olivares et al., 2007). When caries-related bacteria increase and beneficial bacteria are reduced, the dental plaque can be transformed from non-cariogenic plaque to cariogenic plaque (Lin, Chen et al., 2017). Probiotics have shown favorable properties in maintaining oral health (Jiang, Stamatova et al., 2016). Most probiotic bacteria belong to the genera *Lactobacillus* or *Bifidobacterium* and these bacteria are commonly added to probiotic drinks or yogurt products (Lin, Chen et al., 2017).

The mechanism as to how exactly probiotics interfere with the caries process are unclear. Three frequently described explanations are (1) probiotic competition with cariogenic bacteria for nutrition or adhesive surfaces (Terai, Okumura et al., 2015), (2) the antimicrobial effects of probiotics via aggregation (Lang, Böttner et al., 2010), or (3) inhibitory compounds produced like bacteriocin with antibacterial effects (Cheikhoussef, Pogori et al., 2008, Martinez, Balciunas et al., 2013). However, both in vitro and clinical studies yielded

ambiguous results with regard to the benefits or risks associated with caries prevention via probiotics (Schwendicke, Korte et al., 2017).

Therefore, it is necessary to develop substances or treatments with potent antimicrobial activity, capable of reducing the development of pathogenic biofilm with reduced side effects. In this context, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of *L. plantarum* Lp62 against *S. mutans* *in vitro*. Furthermore, this is the first report of antimicrobial activity of *L. plantarum* Lp62.

2. Material and Methods

2.1. Microorganisms

The strains used for the *in vitro* tests were *S. mutans* UA159 and *L. plantarum* Lp62. *L. plantarum* Lp62 were isolated from originate spontaneous cocoa fermentations from the region of Ilhéus-Itabuna / BA, Brazil and identified by 16SrRNA gene sequencing (GenBank access number KU291427) (Ferreira et al., 2016) 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 MRS broth (KASVI) at 37°C, 5% CO₂ 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% CO₂ in BHI broth (KASVI) and stored at - 80°C.

2.2. Production of the metabolites of *L. plantarum* Lp62

A growth curve of *L. plantarum* was performed in a closed system with incubation in MRS broth medium, at 37°C and 5% CO₂. 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), and centrifuged at 14000 rpm for 10 minutes to obtain the supernatant containing the compounds produced by the bacteria.

2.3. Antimicrobial evaluation of *L. plantarum* Lp62 and its metabolites by diffusion in agar

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 $1-2 \times 10^5$ CFU mL⁻¹. After

homogenization, a volume of 300 μL 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 μL of the metabolites of *L. plantarum* Lp62, collected before at the different times of *L. plantarum* curve growth (T 0 to T16h), or the inoculum containing *L. plantarum* in MRS medium (20 to 100 μL , - 2×10^6 CFU mL^{-1} - 1×10^7 CFU mL^{-1}). The plates were incubated for 18 hours at 37°C, 5% CO_2 , 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. plantarum* Lp62 at the concentration of metabolites ranging from 60 to 1.875 mg mL^{-1} . For MIC determination, the starting inoculum was $1-2 \times 10^8$ CFU mL^{-1} . This test was performed in 96 wells microplates, in which each well was filled with 190 μL BHI with inoculum (inoculation 1:1000), except the negative control wells. The plates were incubated for 24 hours, at 37°C and 5% CO_2 . MIC was defined as the lowest concentration of metabolites that had restricted growth to a level lower than 0.05 (no visible growth).

For the determination of MBC, an aliquot (20 μL) 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_2 , 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. plantarum* Lp62 were tested with sub-MIC concentrations (ranging from 7.5 to 1.875 mg mL^{-1}). After the incubation for 24 hours, 5% CO_2 , 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* UA 159 were formed on fragments of bovine tooth placed in a vertical position in BHI culture with 1% of sucrose at 37 °C and 5% CO₂ for 5 days, as described by (Koo, Hayacibara et al. 2003) and (Duarte, Koo et al. 2003). 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. plantarum* Lp62 (6 g mL⁻¹), 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. (2003). The effects of the metabolites of *L. plantarum* Lp62 on glycolysis were measured by standard pH drop with dense cell suspensions as previously described by Belli et al. (1995). The test Proton Permeability was also done (Phan, Buckner et al., 2004). Tests were conducted in sixplicate 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

The dynamics of the bacterial growth can be studied by plotting the cell growth (absorbance) versus the incubation time (Graphic 1). The Lag Phase of *L. plantarum* Lp62 was in the period from 1 to 3 h. *L. plantarum* Lp62 start the exponential or logarithmic (log) phase at 4h until 13h, and the stationary phase was reached at 14h and stay until 16h.

The supernatant collected on the growth curve was the result of the production of metabolites during the fermentation of *L. plantarum* on the MRS medium. The inhibition of *S.*

mutans growth by contact with the metabolites started at 4 hours of growth until 11 hours (Table 1). The zone of inhibition began to be formed at 12 hours (2.33 ± 0.44 mm), with higher formation of the zone of inhibition at 16 hours (4.33 ± 0.44 mm). It was observed that in the stationary period of bacterial growth, the largest zones of inhibitions were obtained. At 16h, it was counted 16.6×10^6 CFU mL⁻¹ of *L. plantarum* Lp62. The positive control used was chlorhexidine 0.12%, which presented the highest zones of inhibition with 8.33 ± 0.44 millimeters. When the inoculum containing *L. plantarum* Lp62 was used (Table 2), all the volumes tested showed contact inhibition and the volumes of 80 (8×10^6 CFU mL⁻¹) and 100 microliters (1×10^7 CFU mL⁻¹) presented zone of inhibition of 3.00 ± 1.00 mm and 4.00 ± 0.50 mm, respectively.

Values of Minimal Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Inhibitory Concentration of Cell Adhesion (MICA) of the metabolites of *Lactobacillus plantarum* Lp62 against *S. mutans* UA159 are shown in Table 3. The metabolites of 16 h of growth showed the better antimicrobials results on the sensitivity test (Difusion agar test), and then, they were liofilized and used in the following tests. The MIC for the metabolites was 15 mg/mL and MBC was obtained with the double of the concentration at 30 mg mL⁻¹. Half of the concentration of MIC (7.5 mg mL⁻¹) was necessary to inhibit the *S. mutans* adhesion to the surface os the microplates.

After the determination of the antimicrobial activity of the metabolites of the *L. plantarum* Lp62 on placktonics cells of *S. mutans*, the metabolites were tested in a biofilm model. The effects of the metabolites on the viability of *S. mutans* UA159 was described in Table 4. The metabolites of *L. plantarum* Lp62 at 6 g mL⁻¹ ($2.02 \times 10^8 \pm 1.96 \times 10^8$ CFU mL⁻¹) and chlorhexidine 0.12% ($1.12 \times 10^4 \pm 8.26 \times 10^2$ CFU mL⁻¹) were able to reduced the *S. mutans* viable cells in biofilms when compared to the saline treatment ($1.73 \times 10^9 \pm 2.00 \times 10^9$ CFU mL⁻¹) ($p < 0.05$). There was statistical difference between the antimicrobial activity of the metabolites of *L. plantarum* Lp62 and chlorhexidine 0.12% ($p < 0.05$).

The biofilms were analyzed for dry weight, the biomass of biofim (Table 5). The treatment with chlorhexidine 0.12% reduced the total biomass of biofilm to 4.40 ± 3.00 mg per biofilm and the metabolites reduced to 7.69 ± 4.42 mg per biofilm, while the biomass of saline control was 13.92 ± 7.83 mg per biofilm ($p < 0.05$). There is no statistical difference in the reduction of dry weight between chlorhexidine and metabolites ($p > 0.05$). The soluble glucans from the biofilms treated with metabolites of *L. plantarum* Lp62 and chlorhexidine did not differ from the concentrations in the biofilm treated with saline ($p > 0.05$). Although, the quantity of glucans insoluble and soluble in alkali was reduced by the metabolites. The

metabolites reduced the soluble glucans in alkali (5.19 ± 3.88 mg per biofilm) in comparison to the control biofilm (8.63 ± 5.34 mg per biofilm) ($p < 0.05$), and reduced the insoluble glucans (2.55 ± 1.18 mg per biofilm) in comparison to control biofilm (3.44 ± 1.30 mg per biofilm). Chlorhexidine were not able to affect the production of any glucans insoluble or soluble in alkali in the biofilms.

Acid production by *S. mutans* in biofilms was significantly reduced by the metabolites of *L. plantarum* Lp62 as determined by glycolytic pH-drop test in the presence of excess of glucose (Graphic 2). The metabolites and chlorhexidine showed statistically reduction in the production of acids when compared to the saline biofilm, in the period of 15 min to 120 min ($p < 0.05$). There was no difference between metabolites and chlorhexidine at 15 min ($p > 0.05$), but the reduction in the production of acids were higher with chlorhexidine in comparison to the metabolites at times from 30 min to 120 min ($p < 0.05$).

The permeability of cells membrane to protons of *S. mutans* was altered by the metabolites and chlorhexidine as shown on the Graphic 3. The metabolites started to reduce the acid tolerance of the *S. mutans* on biofilms from 30 min to 90 min, and from 110 to 120 min comparable to the saline ($p < 0.05$). The chlorhexidine reduce the acid tolerance from 50 min to 120 min comparing to the saline control ($p < 0.05$). The acid tolerance reduced of *S. mutans* is also indicated by the higher final pH values at 120 min, 4.93 ± 0.08 for metabolites, and 5.0 ± 0.18 for chlorhexidine when compared to the saline at 4.83 ± 0.11 .

4. Discussion

Dental caries is a chronic and multifactorial disease associated with bacterial infection. *S. mutans* is the main etiological agent of caries (Loesche 1986, Leites, Pinto et al., 2006). This bacterium is involved in the formation of biofilm present on the surface of the teeth and gums and one of its mechanisms of virulence consists in the production of acids that lead to the demineralization of the tooth and consequently caries (Ahn, Ahn et al., 2008, Wen, Yates et al., 2010, Khan, Islam et al., 2011). The control of *S. mutans* by conventional antibacterial therapy presents some obstacles, among them are the advent of multiresistant antibiotic strains and the side effects associated with the use of chlorhexidine, used in bacterial plaque control (Roberts, 2002). In this perspective, treatment with probiotics may be an alternative potential for the treatment of infections in the oral cavity. A widely used microorganism as a probable probiotic is *L. plantarum*, a species of normally non-pathogenic bacteria that is found in several niches (Vieira, Teixeira et al., 2013).

In the present study, it was verified that the time of the growth curve with the best antimicrobial activity against *S. mutans* UA159 in the micro diffusion test was after 16 hours of *L. plantarum* growth, when the bacteria is on the stationary phase. It is known that the stress responses of bacterial cultures vary depending on the growth phase: bacteria entering the stationary phase develop a general resistance to stress and are thus more resistant to various types of stresses (including subsequent processing and storage) (Brashears and Gilliland, 1995; Lorca and de Valdez, 1999; Van de Guchte, Serror et al., 2002). Inhibition of the growth of *S. mutans* UA159 was also obtained by the *L. plantarum* Lp62 inoculum and the largest zone of inhibition occurred with the volume of 100 μ l of the inoculum. Probably, the formation of the zone of inhibition with the inoculum could be justified by the competition between the bacteria *L. plantarum* and *S. mutans* or by the local production of the antimicrobial metabolites diffused in the agar. Antibacterial substances produced by probiotic lactobacilli include lactic acid, which can inhibit microbial growth by lowering the pH; hydrogen peroxide, which can inhibit bacterial DNA synthesis (Lopez-Medina, Fan et al., 2015) and bacteriocins, which can destroy bacterial cell membranes to kill gram-positive bacteria. As *S. mutans* is acid-tolerant and hydrogen peroxide production by lactobacilli is low, it is possible that the antibacterial substances in probiotics may be primarily bacteriocins or bacteriocin-like proteins. Studies have shown that *L. reuteri* and *L. plantarum* showed significant inhibitory effects on *S. mutans* due to bacteriocin production (Hedberg, Hasslof et al., 2008). However, at the present study, the antimicrobial mechanism of probiotic lactobacilli against *S. mutans* is still not fully understood and requires further researches.

The agar diffusion test is a sensitivity test, considering that a large number of variables can affect the test (CLSI, 2017). In order to better evaluate the antimicrobial activity of *L. plantarum* metabolites, minimal inhibitory and minimal bactericidal concentration tests were determined. MIC was obtained with 15 mg mL⁻¹, which a high concentration compared to the MIC that is obtained by other antimicrobials. However, this concentration is not only of the bacteriocins produced by *L. plantarum*, in the freeze-drying the supernatant of the growth curve, there are all subproducts of fermentation and culture medium. For bactericidal activity, it was necessary to double the concentration found for the bacteriostatic activity.

Four factors are known to be critical in the development of dental caries by oral bacteria: the abilities of the bacteria to adhere to the tooth surface, to form biofilms, to metabolize carbohydrates, and to tolerate fluctuations in the environment, especially with regard to pH and nutrient limitation (Burne, 1998). Adherence is the first and crucial step in biofilm formation as it permits the establishment of microorganisms in the oral cavity (Tarsi,

Muzzarelli et al., 1997). Glucans promote the adherence and accumulation of cariogenic streptococci on the tooth surface and play an essential role in the development of caries (Hamada and Slade, 1980; Schilling and Bowen, 1992; Yamashita, Bowen et al., 1993). Thus, a promising approach for the prophylaxis of dental caries is then based on the inhibition of the *S. mutans* adherence and subsequent colonization of the tooth surface. The metabolites of *L. plantarum* Lp62 were capable of diminishing *S. mutans* in planktonic cells adhesion, at sub-MIC concentrations. Adherence to surface it is an important virulence factor of *S. mutans*.

Although, it is recognized that microorganisms behave differently in biofilms compared with that in the planktonic state (Marsh and Bradshaw, 1995; Hall-Stoodley, Costerton et al., 2004). Cariogenic biofilm is considered to be a greater risk factor for induction of dental caries (Kim and Lee, 2016), because Mmature biofilm cells are more resistant to acid stress than planktonic cells. Cariogenic biofilm is a biofilm structure that gradually sediments in the surface of the tooth. This structure contains a variety of bacteria that form a complex ecological environment in which *streptococci* and other caries-related microorganisms produce acids, which is the direct cause of caries (Marsh, Head et al., 2015). To be effective in preventing caries, probiotics must have an inhibitory effect on *Streptococcus* species (Lin, Chen et al., 2017). Biofilms of *S. mutans* UA159 were treated by four days, twice a day, with the metabolites of *L. plantarum* Lp62, and the metabolites were able to inhibit the biofilm formation of *S. mutans* as they show bactericidal effect, by reducing the viable cells on biofilm, with a concentration 200 times higher than that tested with planktonic cells. A higher concentration of the agent was used and necessary because the biofilms have a higher biomass density, which difficult the penetration of the metabolites. Considering that biofilms display increased resistance, and the presence of an exopolysaccharide matrix that acts as a barrier to diffusion of antimicrobial agents (Stewart, 1996), it was necessary a higher concentration of the metabolites, and it is noteworthy that they were capable of acting against *S. mutans* in mature (5-day-old) biofilms.

Another approach to reducing the incidence of tooth decay is the development of therapeutic agents that can prevent the formation of plaque matrix, where glucans comprises 10–20% of dry weight of dental plaque (Gibbons, 1968; Emilson, Nilsson et al., 1984). Glucans promote bacterial accumulation on the tooth surface and contribute to the formation of the extracellular polysaccharide matrix, which confers bulk and structural integrity to biofilms (Bowen, 2002; Leme, Koo et al., 2006). The metabolites of *L. plantarum* Lp62 were able to reduce the production of insoluble and soluble glucans in alkali in the biofilm of *S. mutans*. The lower levels of this glucan are important for the reduction of formation of

biomass from the biofilm and to reduce the attachment of microorganisms to the biofilm, and may disrupt the development of virulent biofilms related to dental caries. The exopolymers produced *in situ* provide a coherent, adherent and mechanically stable matrix, and offer a continuum of a diverse range of binding sites for microorganisms (Guggenheim and Burckhardt, 1974; Hayacibara, Koo et al., 2004).

In addition, soluble glucans may be readily digested and used as a reserve source of energy and contribute in part at least to the low pH values observed in cariogenic plaque (Leme, Koo et al., 2006). The insoluble glucans synthesized by these enzymes impart structural integrity and bulk to biofilms (Bowen, 2002). It is also noteworthy that elevated amounts of insoluble glucans in dental plaque significantly reduced the inorganic concentration in the matrix, particularly Ca, P and F (Cury, Rebelo et al., 2000; Leme, Koo et al., 2006). Probably, the metabolites have influence on surface adsorbed glucosyltransferase (Gtf) B activity. GtfB (formally known as GtfI) synthesizes primarily insoluble glucan rich in α -1,3-linkages, GtfC (GtfSI) produces a mixture of soluble (with mostly α -1,6-linkages) and insoluble glucans, and GtfD (GtfS) forms predominantly soluble glucans (Aoki, Shiroza et al., 1986; Hanada and Kuramitsu, 1989).

Moreover, continuous production of glucan and acid by *S. mutans* reduces the pH level and leads to formation of mature biofilm that ultimately induces dental caries. Therefore, the glucosyltransferases (Gtfs) and acid production are important virulence factors of *S. mutans*. The metabolites reduced the acid formation resulting from metabolism through the carbohydrate glycolytic pathway as observed in the pH-drop assay. The *S. mutans* can survive and carry out glycolysis at a low pH, which can lead to the demineralization of the adjacent dental enamel, leading to formation of carious lesions (Loesche, 1986). *S. mutans* cells rapidly degrade glucose and lower the pH value of the suspension until they can no longer maintain a cytoplasmic pH compatible with the activity of glycolytic enzymes. Acid sensitization can be rapidly seen in glycolytic pH-drop experiments in which cells are given excess glucose. Thus, the rate of pH drop reflects the acidogenic capacities of the cells, while the final pH values of the suspensions reflect acid tolerance. The metabolites affected both the acid production and acid tolerance of *S. mutans* cells within biofilms, which confirms and extends a previous observation showing disruptive effects of the agent against planktonic cells of *S. mutans*. The metabolites sensitized the biofilm's cells to acidification to the point that the final pH values were significantly higher than those in the presence of the vehicle control. These effects may be related to disturbances of net membrane permeability to protons based on pH-drop curves and not related to any biocidal activity observed previously. To assess the

ability of the metabolites to change the membrane permeability, it was performed the proton permeability test. The metabolites also increased proton-permeability, affecting the aciduric capacity of *S. mutans*. Protons from the environment diffuse inward across the cell membrane after acidification of the suspension but can be extruded by the F-ATPase of the cell membrane. Alterations in proton permeability of the membrane cause cytoplasmic acidification, which disrupts the activity of acid-sensitive enolase and other enzymes of the glycolytic pathway (Murata, Branco de Almeida et al., 2008). Thus, the F-ATPase protects *S. mutans* against environmental acid stress by regulating pH homeostasis, which is critical for the optimum function of glycolysis in *S. mutans* (Sturr and Marquis, 1992). Our data suggest that one of the mechanisms by which metabolites modulates the acidogenicity of *S. mutans* involves partial inhibition of proton-translocating F-ATPase activity.

The metabolites of *L. plantarum* Lp62 formed during fermentation of the medium in the growth curve were able to show anti-adherence and bactericidal effect against planktonic and biofilm cells of *S. mutans* UA159. Furthermore, altered the aciduric and acidogenic capacity of *S. mutans* UA159 in biofilms. Thus, bacteriotherapy or treatment with the metabolites of *L. plantarum* Lp62 demonstrates a potential to prevent the activity of these pathogens in the oral cavity. Therefore, it is necessary to identify and isolate these metabolites, which may become an alternative to the use of chlorhexidine that has several adverse effects.

Acknowledgments

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.

Funding

Research was supported by grants and scholarships of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - PIBIC), Federal University of Bahia (PIBIC), The State of Bahia Research Foundation (FAPESB – REDE 11/2014; PIBIC) and Coordination for the Enhancement of Higher Education Personnel (CAPES), Tutorial Educational Program (FNDE/MEC/SESU).

Graphic 1. Growth curve of *Lactobacillus plantarum* Lp62 in MRS broth medium until 16 hours.

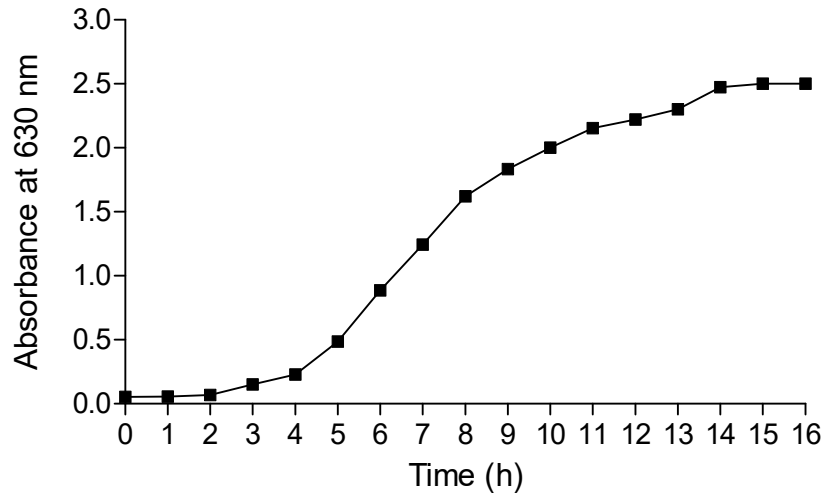


Table 1. Plate microdiffusion test using metabolites of *Lactobacillus plantarum* Lp62 produced at different times on the growth curve against *Streptococcus mutans* UA159.

Treatments	Mean of zone of inhibition in millimeters (mm)
Metabolites 1 h	-----
Metabolites 2 h	-----
Metabolites 3 h	-----
Metabolites 4 h	Contact
Metabolites 5 h	Contact
Metabolites 6 h	Contact
Metabolites 7 h	Contact
Metabolites 8 h	Contact
Metabolites 9 h	Contact
Metabolites 10 h	Contact
Metabolites 11 h	Contact
Metabolites 12 h	2.33 ± 0.44
Metabolites 13 h	2.00 ± 0.01
Metabolites 14 h	2.00 ± 0.01
Metabolites 15 h	2.67± 1.11
Metabolites 16 h	4.33 ± 0.44
Chlorhexidine 0.12%	8.33 ± 0.44

(-----) there was no inhibition of growth; (Contact) There was no formation of zone inhibition, but there was inhibition of bacterial growth by contact. Experiment performed in triplicate (n=9).

Table 2. Microdiffusion plaque test using the *Lactobacillus plantarum* Lp62 inoculum as antimicrobial agent against *Streptococcus mutans* UA159.

Quantity in microliters (μl) of <i>L. plantarum</i> Lp62	Mean of zone of inhibition in millimeters (mm)
20	Contact
40	Contact
60	Contact
80	3.00 ± 1.00
100	4.00 ± 0.50

(Contact) There was no formation of zone inhibition, but there was inhibition of bacterial growth by contact. Experiment performed in triplicate (n=9).

Tabela 3. Values of Minimal Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Inhibitory Concentration of Cell Adhesion (MICA) of the metabolites of *Lactobacillus plantarum* Lp62 against *Streptococcus mutans* UA159.

Microorganisms	Metabolites of the <i>L. plantarum</i> Lp62		
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MICA (mg/mL)
<i>S. mutans</i> UA159	15	30	7.5

MIC, MBC and MICA values are expressed in mg/mL. The concentrations of compounds ranged from 60 to 1.875 mg/mL. (n=18)

Table 4. Effects of the metabolites of the *Lactobacillus plantarum* Lp62 on viability of *Streptococcus mutans* UA159 in biofilms.

Treatments	CFU/biofilm
Saline	$1.73 \times 10^9 \pm 2.00 \times 10^{9a}$
Chlorhexidine 0.12%	$1.12 \times 10^4 \pm 8.26 \times 10^{2b}$
<i>L. plantarum</i> Lp62	$2.02 \times 10^8 \pm 1.96 \times 10^{8c}$

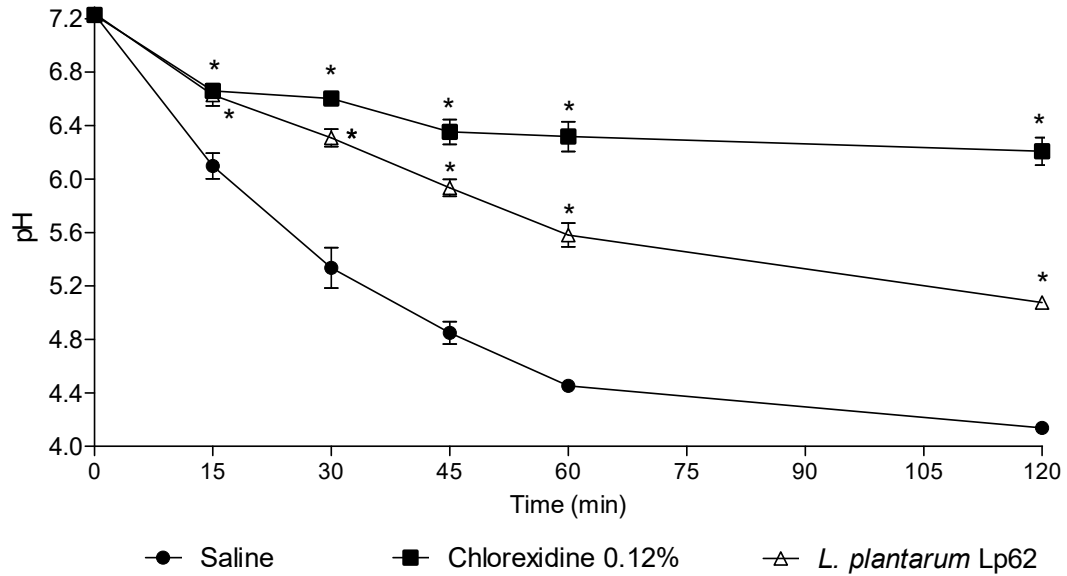
* Values in the same column followed by equal letters are statistically the same ($p > 0.05$). Statistical analysis were performed between saline, chlorhexidine 0.12% and metabolites of *L. plantarum* Lp62 (6 g/mL), by ANOVA, comparing all pairs with the Bonferroni's test (n = 18).

Table 5. Effects of the metabolites of the *Lactobacillus plantarum* Lp62 on the composition of *Streptococcus mutans* UA159 in biofilms.

Treatments	Dry weight Biofilm (mg)	Soluble glucans in alkali $\mu\text{g}/\text{biofilme}$	Soluble glucans mg/biofilm	Insoluble glucans mg/biofilme
Saline	13.92 \pm 7.83 ^a	8.63 \pm 5.34 ^a	1.01 \pm 0.62 ^a	3.44 \pm 1.30 ^a
Chlorhexidine 0.12%	4.40 \pm 3.00 ^b	6.03 \pm 3.28 ^{ab}	1.70 \pm 1.19 ^a	2.92 \pm 1.28 ^{ab}
<i>L. plantarum</i> Lp62	7.69 \pm 4.42 ^c	5.19 \pm 3.88 ^b	1.47 \pm 1.01 ^a	2.55 \pm 1.18 ^b

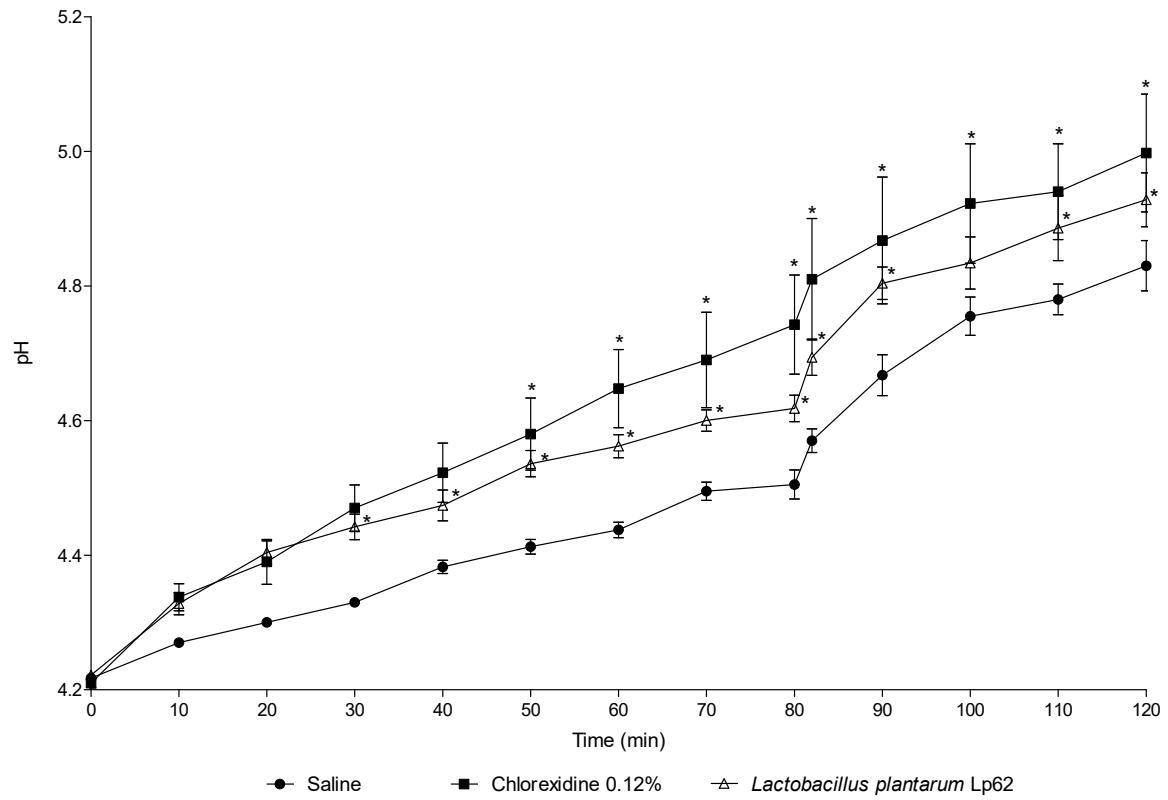
* Values in the same column followed by equal letters are statistically the same ($p > 0.05$). Statistical analysis were performed between saline, chlorhexidine 0.12% and metabolites of *L. plantarum* Lp62, by ANOVA, comparing all pairs with the Kruskal-Wallis test (n = 18).

Graphic 2. Influence of metabolites of *Lactobacillus plantarum* Lp62 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. plantarum* Lp62 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 plantarum* Lp62 on proton permeabilities of *Streptococcus mutans* UA159 in Biofilms.



* Statistical difference was found among the treatments with chlorhexidine 0.12% and metabolites of *L. plantarum* Lp62 compared to saline treatment ($p < 0.05$). Statistical analysis were performed by ANOVA, comparing all pairs with the Bonferroni's test ($n = 18$).

5. References

- Ahn, S. J., S. J. Ahn, Z. T. Wen, L. J. Brady and R. A. Burne (2008). "Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva." *Infect Immun* 76(9): 4259-4268.
- Aoki, H., T. Shiroza, M. Hayakawa, S. Sato and H. Kuramitsu (1986). "Cloning of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis." *Infection and Immunity* 53(3): 587-594.
- Belli, W., D. Buckley and R. Marquis (1995). "Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5." *Canadian journal of microbiology* 41(9): 785-791.
- Bowen, W. H. (2002). "Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium?" *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 13(2): 126-131.
- Brashears, M. and S. Gilliland (1995). "Survival During Frozen and Subsequent Refrigerated Storage of *Lactobacillus acidophilus* Cells as Influenced by the Growth Phase1." *Journal of dairy science* 78(11): 2326-2335.
- Burne, R. (1998). "Oral streptococci... products of their environment." *Journal of Dental Research* 77(3): 445-452.
- Cheikhoussef, A., N. Pogori, W. Chen and H. Zhang (2008). "Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: from production to their application." *International journal of food microbiology* 125(3): 215-222.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)(2017). M100. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 27th ed. Wayne: CLSI
- Cury, J., M. Rebelo, A. D. B. Cury, M. Derbyshire and C. Tabchoury (2000). "Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose." *Caries research* 34(6): 491-497.
- Dhawan, S. and R. Dhawan (2013). "Role of probiotics on oral health—A randomized, double blind, placebo-controlled microbiological study." *Journal of Research and Practice in Dentistry* 2013: 1-9.
- Duarte, S., H. Koo, W. H. Bowen, M. F. Hayacibara, J. A. Cury, M. Ikegaki and P. L. Rosalen (2003). "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(4): 527-531.
- Emilson, C., B. Nilsson and W. Bowen (1984). "Carbohydrate composition of dental plaque from primates with irradiation caries." *Journal of Oral Pathology & Medicine* 13(3): 213-220.
- Gibbons, R. (1968). "Formation and significance of bacterial polysaccharides in caries etiology." *Caries research* 2(2): 164-171.
- Guggenheim, B. and J. Burckhardt (1974). "Isolation and properties of a dextranase from *streptococcus mutans* OMZ 176." *Helvetica odontologica acta* 18(2): 101-113.
- Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton and P. Stoodley (2004). "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." *Nature reviews. Microbiology* 2(2): 95.

- Hamada, S. and H. D. Slade (1980). "Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*." *Microbiological reviews* 44(2): 331.
- Hanada, N. and H. K. Kuramitsu (1989). "Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* *gtfD* gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis." *Infection and immunity* 57(7): 2079-2085.
- Hayacibara, M. F., H. Koo, A. M. V. Smith, L. K. Kopec, K. Scott-Anne, J. A. Cury and W. H. Bowen (2004). "The influence of mutanase and dextranase on the production and structure of glucans synthesized by streptococcal glucosyltransferases." *Carbohydrate research* 339(12): 2127-2137.
- Hedberg, M., P. Hasslof, I. Sjostrom, S. Twetman and C. Stecksén-Blicks (2008). "Sugar fermentation in probiotic bacteria--an in vitro study." *Oral Microbiol Immunol* 23(6): 482-485.
- Hill, C., F. Guarner, G. Reid, G. R. Gibson, D. J. Merenstein, B. Pot, L. Morelli, R. B. Canani, H. J. Flint, S. Salminen, P. C. Calder and M. E. Sanders (2014). "Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11(8): 506-514.
- Jiang, Q., I. Stamatova, V. Kainulainen, R. Korpela and J. H. Meurman (2016). "Interactions between *Lactobacillus rhamnosus* GG and oral micro-organisms in an in vitro biofilm model." *BMC microbiology* 16(1): 149.
- Khan, A. U., B. Islam, S. N. Khan and M. Akram (2011). "A proteomic approach for exploring biofilm in *Streptococcus mutans*." *Bioinformation* 5(10): 440-445.
- Kim, Y.-J. and S.-H. Lee (2016). "Inhibitory effect of *Lactococcus lactis* HY 449 on cariogenic biofilm." *J. Microbiol. Biotechnol* 26(11): 1829-1835.
- Koo, H., M. Hayacibara, B. Schobel, J. Cury, P. Rosalen, Y. Park, A. Vacca-Smith and W. Bowen (2003). "Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and *tt*-farnesol." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52(5): 782-789.
- Kreth, J., L. Zhu, J. Merritt, W. Shi and F. Qi (2008). "Role of sucrose in the fitness of *Streptococcus mutans*." *Molecular Oral Microbiology* 23(3): 213-219.
- Lang, C., M. Böttner, C. Holz, M. Veen, M. Ryser, A. Reindl, M. Pompejus and J. Tanzer (2010). "Specific *lactobacillus/mutans streptococcus* co-aggregation." *Journal of dental research* 89(2): 175-179.
- Lara-Villoslada, F., M. Olivares, S. Sierra, J. M. Rodríguez, J. Boza and J. Xaus (2007). "Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk." *British Journal of Nutrition* 98(S1): S96-S100.
- Lee, S.-H. and Y.-J. Kim (2014). "A comparative study of the effect of probiotics on cariogenic biofilm model for preventing dental caries." *Archives of microbiology* 196(8): 601-609.
- Leites, A., M. B. Pinto and E. R. d. Sousa (2006). "Aspectos microbiológicos da cárie dental." *Salusvita* 25(2): 239-252.

- Leme, A. P., H. Koo, C. Bellato, G. Bedi and J. Cury (2006). "The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation—new insight." *Journal of dental research* 85(10): 878-887.
- Lemme, A., H. Sztajer and I. Wagner-Döbler (2010). "Characterization of mleR, a positive regulator of malolactic fermentation and part of the acid tolerance response in *Streptococcus mutans*." *BMC microbiology* 10(1): 58.
- Lin, X., X. Chen, Y. Tu, S. Wang and H. Chen (2017). "Effect of Probiotic Lactobacilli on the Growth of *Streptococcus Mutans* and Multispecies Biofilms Isolated from Children with Active Caries." *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 23: 4175.
- Loesche, W. J. (1986). "Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay." *Microbiol Rev* 50(4): 353-380.
- Lopez-Medina, E., D. Fan, L. A. Coughlin, E. X. Ho, I. L. Lamont, C. Reimann, L. V. Hooper and A. Y. Koh (2015). "Candida albicans inhibits *Pseudomonas aeruginosa* virulence through suppression of pyochelin and pyoverdine biosynthesis." *PLoS pathogens* 11(8): e1005129.
- Lorca, G. L. and G. F. de Valdez (1999). "The effect of suboptimal growth temperature and growth phase on resistance of *Lactobacillus acidophilus* to environmental stress." *Cryobiology* 39(2): 144-149.
- Marsh, P. (2004). "Dental plaque as a microbial biofilm." *Caries research* 38(3): 204-211.
- Marsh, P. and D. Bradshaw (1995). "Dental plaque as a biofilm." *Journal of industrial microbiology* 15(3): 169-175.
- Marsh, P. D. (2006). "Dental plaque as a biofilm and a microbial community—implications for health and disease." *BMC Oral health* 6(1): S14.
- Marsh, P. D., D. A. Head and D. A. Devine (2015). "Dental plaque as a biofilm and a microbial community—Implications for treatment." *Journal of Oral Biosciences* 57(4): 185-191.
- Martinez, F. A. C., E. M. Balciunas, A. Converti, P. D. Cotter and R. P. de Souza Oliveira (2013). "Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review." *Biotechnology Advances* 31(4): 482-488.
- Monchois, V., R.-M. Willemot and P. Monsan (1999). "Glucansucrases: mechanism of action and structure–function relationships." *FEMS Microbiology Reviews* 23(2): 131-151.
- Murata, R. M., L. S. Branco de Almeida, R. Yatsuda, M. H. Dos Santos, T. J. Nagem, P. L. Rosalen and H. Koo (2008). "Inhibitory effects of 7-epiclusianone on glucan synthesis, acidogenicity and biofilm formation by *Streptococcus mutans*." *FEMS microbiology letters* 282(2): 174-181.
- Roberts, M. C. (2002). "Antibiotic toxicity, interactions and resistance development." *Periodontol* 2000 28: 280-297.

- Schilling, K. M. and W. H. Bowen (1992). "Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*." *Infection and immunity* 60(1): 284-295.
- Schwendicke, F., F. Korte, C. E. Dörfer, S. Kneist, K. F. El-Sayed and S. Paris (2017). "Inhibition of *Streptococcus mutans* Growth and Biofilm Formation by Probiotics in vitro." *Caries research* 51(2): 87-95.
- SrivaStava, S., S. Saha and S. M. Minti KuMari (2016). "Effect of Probiotic Curd on Salivary pH and *Streptococcus mutans*: A Double Blind Parallel Randomized Controlled Trial." *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR* 10(2): ZC13.
- Stewart, P. S. (1996). "Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 40(11): 2517-2522.
- Sturr, M. G. and R. E. Marquis (1992). "Comparative acid tolerances and inhibitor sensitivities of isolated F-ATPases of oral lactic acid bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 58(7): 2287-2291.
- Tarsi, R., R. Muzzarelli, C. Guzman and C. Pruzzo (1997). "Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans." *Journal of dental research* 76(2): 665-672.
- Terai, T., T. Okumura, S. Imai, M. Nakao, K. Yamaji, M. Ito, T. Nagata, K. Kaneko, K. Miyazaki and A. Okada (2015). "Screening of probiotic candidates in human oral bacteria for the prevention of dental disease." *PloS one* 10(6): e0128657.
- van de Guchte, M., P. Serror, C. Chervaux, T. Smokvina, S. D. Ehrlich and E. Maguin (2002). "Stress responses in lactic acid bacteria." *Antonie Van Leeuwenhoek* 82(1-4): 187-216.
- Vieira, A. T., M. M. Teixeira and F. S. Martins (2013). "The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity." *Frontiers in immunology* 4.
- Wen, Z. T., D. Yates, S. J. Ahn and R. A. Burne (2010). "Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model." *BMC Microbiol* 10: 111.
- Yamashita, Y., W. Bowen, R. Burne and H. Kuramitsu (1993). "Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model." *Infection and immunity* 61(9): 3811-3817.

5 Considerações Finais

- Os metabólitos de *L. plantarum* Lp62 formados durante a fermentação na curva de crescimento tiveram potencial anti-aderência e efeito bactericida contra células planctônicas e biofilme de *S. mutans* UA159;
- Conseguiram alterar a capacidade acidúrica e acidogênica de *S. mutans* UA159 em biofilmes;
- A bacterioterapia ou tratamento com os metabólitos de *L. plantarum* Lp62 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. plantarum* Lp62 contra *S. mutans* UA159 e os resultados promissores encontrados podem abrir caminhos para novos estudos.

