

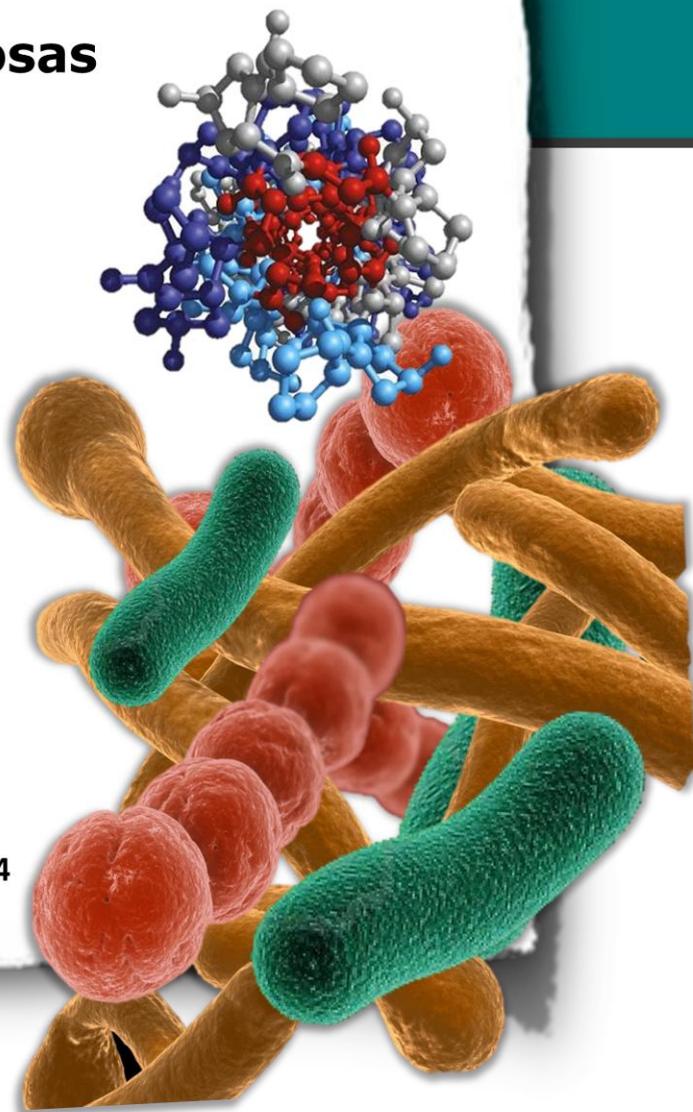


UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Renata Pereira Estrêla

Atividade antimicrobiana da carbodiimida (EDC) sobre microrganismos presentes em lesões cariosas



Araraquara • 2014

Estrêla, Renata Pereira.

Atividade antimicrobiana da carbodiimida (EDC) sobre microrganismos presentes em lesões cariosas / Renata Pereira Estrêla - Araraquara: [s.n.], 2014.

91 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling

1. Etildimetilaminopropil carbodi-imida 2. Antibacterianos
3. Lactobacillus acidophilus I.Título



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Renata Pereira Estrêla

**Atividade antimicrobiana da carbodiimida
(EDC) sobre microrganismos presentes em
lesões cariosas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling
Co-Orientadora: Profa. Dra. Denise Madalena Polomari Spolidorio

ARARAQUARA
2014

Renata Pereira Estrêla

**Atividade antimicrobiana da carbodiimida
(EDC) sobre microrganismos presentes em
lesões cariosas**

Comissão Julgadora

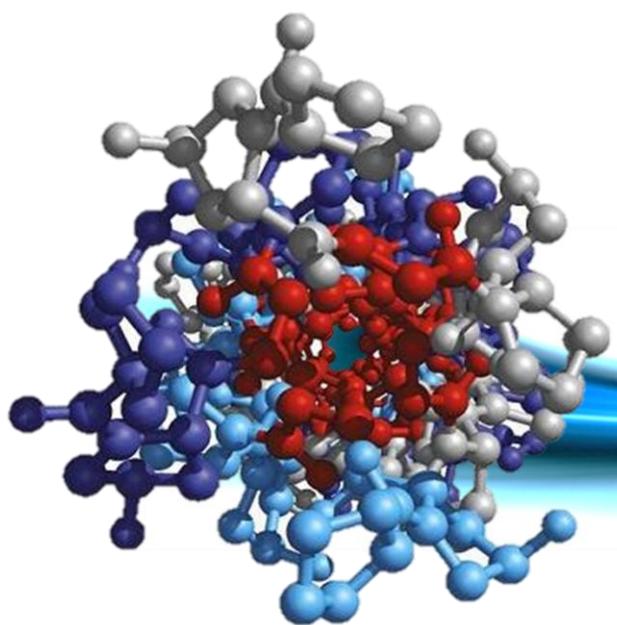
Dissertação para obtenção do Grau de Mestre

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Josimeri Hebling

2º examinador: Dra. Débora Lopes Salles Scheffel

3º examinador: Profa. Dra. Daniela Prócida Raggio

Araraquara, 26 de março de 2014.



Dados Curriculares

DADOS CURRICULARES

Renata Pereira Estrela

Nascimento: 06/10/1986, Goiânia, GO

Filiação: Paulo Antônio da Costa Estrela (*in memoriam*)

Nanci de Fátima Pereira Estrela

2007 a 2011: Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista – UNESP

2012 a 2014: Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria, Nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista - UNESP

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria. O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece. Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal; Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade; Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.”

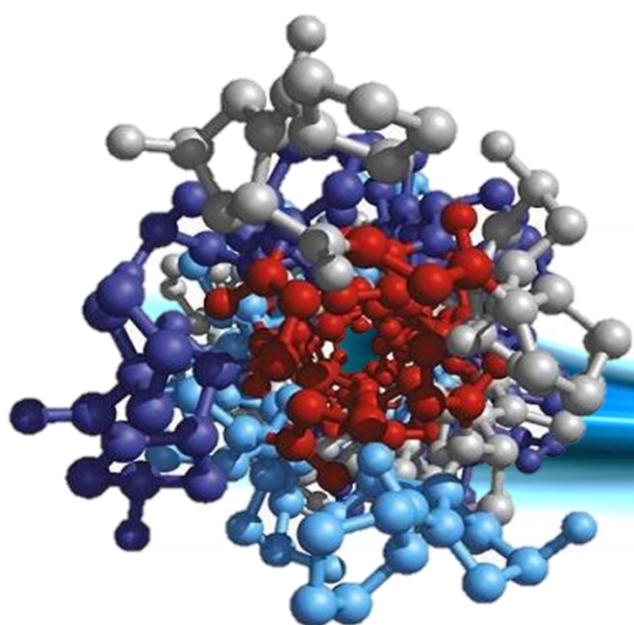
1 Coríntios 13:2.4-7.

Obrigada Meu Deus por toda fé que tenho. Pelos momentos em que pensei em desistir ou fraquejei, o senhor esteve comigo; muitas vezes carregando-me em seus braços e acalmando meu coração.

A jornada até aqui não foi fácil, mesmo com muitos tormentos e tribulações, o senhor não me desamparou. Com seu amor imensurável amparou-me em todos os momentos e me deu a certeza de que um dia eu iria vencer.

Agradeço Meu Deus e Nossa Senhora por mais essa vitória! Obrigada por ouvirem minhas preces e me usarem para transmitir amor, fé, alegria e esperança. Sem o amor vocês eu nada seria.

Por tudo o que tens feito por mim e toda proteção diária, é que agradeço e entrego tudo o que fiz ao Senhor e Minha Mãe.



Dedicatória

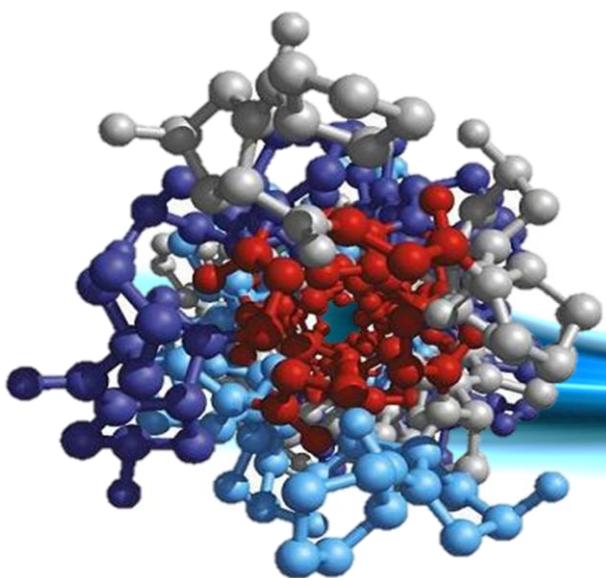
“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem...”

Guimarães Rosa

Paulo Antônio da Costa Estrêla (*in memoriam*)

Jahyr Abrão da Costa Estrela (*in memoriam*)

Vocês foram meus inspiradores durante essa jornada. Foi pensando em vocês e nos ensinamentos que me deram durante todo o momento em que estiveram presentes em minha vida que eu me embasei para seguir a diante. Obrigada por tudo o que fizeram por mim para que eu chegasse até aqui. Nós conseguimos e vencemos mais essa etapa! Essa vitória é nossa! Independente de onde estiverem sei que jamais me abandonam e torcem sempre por mim! Saudades eternas e amor infinito!



Agradecimentos Especiais

“Um dia você aprende...

*Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias,
e que, de fato, os bons e verdadeiros amigos foram a nossa própria família que nos
permitiu conhecer”. William Shakespeare*

E que a dádiva de Deus em nossas vidas é a nossa família.

A minha mãe Nanci, mulher guerreira e determinada, por ser um exemplo para mim. Nunca me deixou desistir e enfrentou muitos obstáculos para que eu conseguisse realizar meu sonho. Obrigada por ter estendido a mão em minhas quedas, pelo conforto nas palavras doces, pelos ensinamentos durante toda minha vida e pela família maravilhosa que me concedeu (ela não poderia ter sido mais perfeita!). Você sempre será minha melhor amiga! Eu amo você!

Aos meus irmãos Marcelo e Ricardo, por serem mais do que irmãos, eternos amigos e presente de Deus na minha vida. Obrigada por acreditar no meu potencial, confiar em mim e sonhar comigo. Sem vocês jamais conseguiria ter a força que tenho. Somos a prova de que o amor tudo suporta! Vocês são meu exemplo e meu orgulho!

Ao meu amor, Sérgio Filho, pela pessoa incrível que é; exemplo de determinação e dedicação. Você é um homem maravilhoso, com o coração mais puro e sincero que eu já conheci. Obrigada por acreditar em mim sempre, pelos sorrisos mais gostosos e abraços aconchegantes e por estar ao meu lado em todas as etapas dessa jornada: nos estudos, nas pesquisas, nos laboratórios, nos estresses, nos cansaços, na qualificação e nas vitórias. Cada momento que passei durante meu Mestrado, você sempre foi um homem atencioso e compreensivo e sempre me mostrou que eu era capaz de superar qualquer obstáculo e desafio que a vida me apresentava. Essa conquista também é sua! Sem você tudo seria mais difícil! Obrigada Meu Bem, eu amo você!

Às minhas cunhadas Amanda e Marinna, vocês agora fazem parte de minha vida e são mulheres maravilhosas e incríveis! Obrigada por me acolherem sempre com palavras carinhosas e sorrisos no rosto, por me amarem como eu sou e fazerem felizes quem eu mais amo: meus irmãos! Amo vocês!

A minha avó Chiquita, a pessoa mais linda desse mundo! Você sempre será meu exemplo de um matrimônio perfeito. Obrigada por

compreender minha ausência quase que contínua e sempre ter em suas orações e pensamentos os meus sonhos. Amo você mais do que tudo!

A minha grande família Pereira e Estrela, em especial aos Primos do Pereirada, agradeço por compreenderem as festas de aniversário que não pude estar presente, as reuniões de família que não conseguir comparecer, as conquistas que tive que comemorar de longe, as viagens e shows desmarcados... Obrigada por possuírem um amor como esse e entenderem minha ausência durante sete anos longe de vocês.

Aos meus sogros, Sérgio e Jailma, e meu cunhado Filipe, fazer parte da família de você é uma dádiva de Deus! Vocês me acolheram com muito amor e carinho e sempre torceram pelo meu sucesso. Além disso, compartilharam comigo o que possuem de mais sagrado, o Serginho. Agradeço muito pelas torcidas e orações, elas foram fundamentais para que eu conseguisse alcançar com louvor essa vitória.

Às minhas amigas do Piada Íntima, vocês são as melhores amigas do mundo! Sempre estiveram presentes durante todo meu crescimento pessoal e profissional e são meu maior orgulho e exemplo de amizade

verdadeira! Vocês são minhas irmãs de coração e quem eu jamais me esqueço, independente da distância e correria diária!

A minha orientadora Profa. Dra. Josimeri Hebling, obrigada por compartilhar seus conhecimentos em pesquisa e em clínica e colaborar com minha formação. Fazer parte da sua equipe durante meus dois últimos anos de graduação e meus dois anos de Mestrado foi essencial para meu amadurecimento e crescimento pessoal e profissional. Você acreditou em meu potencial e sou muito grata a você por isso.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio, me faltam palavras para agradecer todo o carinho e dedicação que você teve comigo durante esses dois anos. MUITÍSSIMO obrigada por me acolher com tanto amor em sua equipe, por me acalmar quando chegava desesperada com os experimentos que não davam certo, por me dar uma luz quando achava que os resultados estavam “cabulosos” demais, pelas palavras sempre acolhedoras e por ser muito mais do que uma co-orientadora, uma grande amiga que quero ter para sempre. Com certeza só consegui chegar onde estou devido a sua paciência e atenção

para comigo em explicar cada passo dos experimentos. Obrigada por tudo!

A minha amiga e companheira de pesquisa, Renata Serignoli Francisconi jamais teria conseguido sem você! Já admirava desde os tempos de graduação e hoje só tive a certeza do quanto você é esforçada, inteligente e amiga. Obrigada por sempre estar de braços abertos para me acolher, pelas palavras sábias, por ouvir meus desabafos e compartilhar minhas conquistas, por dedicar um período do seu tempo para me ensinar e me ajudar na metodologia. Nós conseguimos!

A minha amiga de mestrado, Thamiris Orrico Rodrigues toda minha gratidão pela amizade e companheirismo! Você é uma pessoa incrível e de uma gentileza indescritível! Valeu todos esses anos compartilhando com você os conhecimentos e aprendizados! Sua amizade foi de uma importância enorme para mim durante essa fase em que estávamos e eu vou levá-la para sempre comigo! Torço muito pelo seu sucesso e sei que você será uma excelente profissional. Valeu todos os obstáculos que conseguimos superar juntas!

A amiga Dra. Débora Lopes Salles Scheffel, sua paciência e serenidade em transmitir para mim tudo o que você aprendeu até hoje com certeza foram fundamentais para meu crescimento. Sempre prestativa você esteve disposta a buscar meu crescimento e ampliar meus conhecimentos. Obrigada pela grande ajuda redação da tese, por compartilhar seus conhecimentos sobre o assunto da pesquisa, pela paciência em me explicar toda a cadeia química da relação da carbodiimida com as fibrilas de colágeno, pela presença em aulas de apresentação do projeto, na qualificação e em qualquer momento em que eu precisasse de ajuda. Agradeço a Deus por tê-la colocado em meu caminho e por você ser essa pessoa especial. Essa conquista também é sua!

As amigas e companheiras de apartamento Ana Laura Cintra Jacintho e Juliana Manoela de Aveiro, seria impossível não agradecer a todos os momentos em que estiveram presentes em minha vida, desde a época de graduação até a pós. Vocês são incríveis e verdadeiras amigas, sempre me incentivaram e acreditaram em meu potencial.

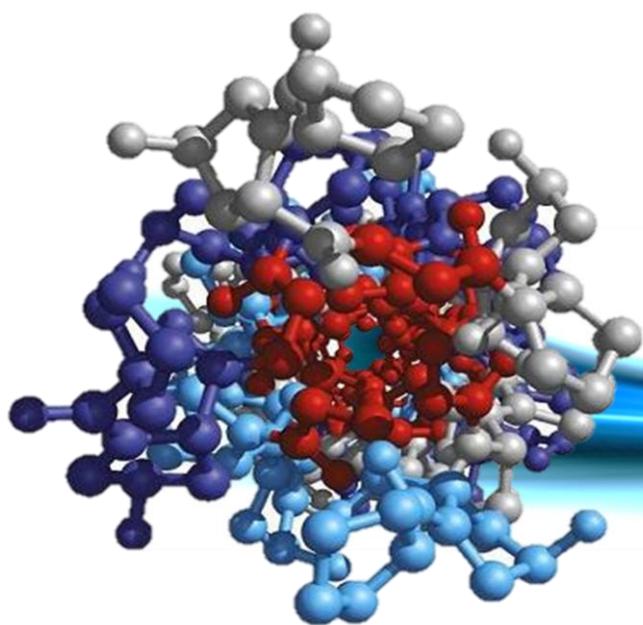
A Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato, pela amizade desde sempre, pelo carinho de amiga e abraço de mãe. Obrigada por sempre se fazer presente em minha vida e sempre me amparar em todos os momentos. Tenho um orgulho enorme de poder dizer que fui sua aluna e hoje sou sua amiga.

Aos amigos Carlos Rappeti, Andressa Ortega e Ricardo Baptistella, minha gratidão pela amizade e ajuda durante meus anos em Araraquara.

Aos meus colegas de pós-graduação, em especial Maria Sílvia Maurício Rigolin, Cássio Rocha Scarduelli, Camila Galletti Espir, Letícia Boldrin Mestieri, Patricia Maquera, Érica Dorigatti de Ávila e Nicole Nogueira, pela amizade, companheirismos, alegria, convívio e ajuda nos momentos em que precisei.

As novas pós-graduandas, Caroline Coradi Tonon e Ester Alves Ferreira Bordini obrigada por tornarem os dias de pesquisa alegres e transformarem o laboratório em um ambiente agradável. Foi um grande prazer aprender com vocês e tê-las como amigas!

Aos alunos da graduação da turma 83 e 84, por acreditarem em meus conhecimentos e compartilharem os seus, tornando as clínicas de Odontopediatria mais gostosas e prazerosas.



Agradecimientos

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”.

Charles Chaplin

À Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho”, em nome do magnífico Reitor Prof. Dr. Júlio César Durigan e Vice-Reitora Prof^a. Dr^a. Marilza Vieira Cunha Rudge.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista, representados pela digníssima Diretora Prof^a. Dr^a. Andréia Affonso Barretto Montandon e pela Vice-Diretora Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgavioli Massucato.

Ao Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP representada pelo Chefe de Departamento Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani e Vice-Chefe Prof^a. Dr^a. Lídia Parsekian Martins.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAR - UNESP, Ângela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Fábio César Braga de Abreu e Lima, Josimeri Hebling, Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto, Fernanda Lourenção Brighenti e Rita de Cássia Loiola Cordeiro pelos ensinamentos adquiridos e companheirismo diário.

À Coordenação de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAR– UNESP, representados pelos professores Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Júnior e Prof^a. Dr^a. Lídia Parsekian Martins.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAR – UNESP, Mara Cândida Munhoz do Amaral e José Alexandre Garcia pela atenção e dedicação que sempre nos disponibilizaram.

Ao Laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Fisiologia e Patologia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Denise Madalena Palomari Spolidorio

e em especial às técnicas do laboratório, Juliana Pirola e Aline Zenatti, pela amizade e dedicação na execução dos experimentos.

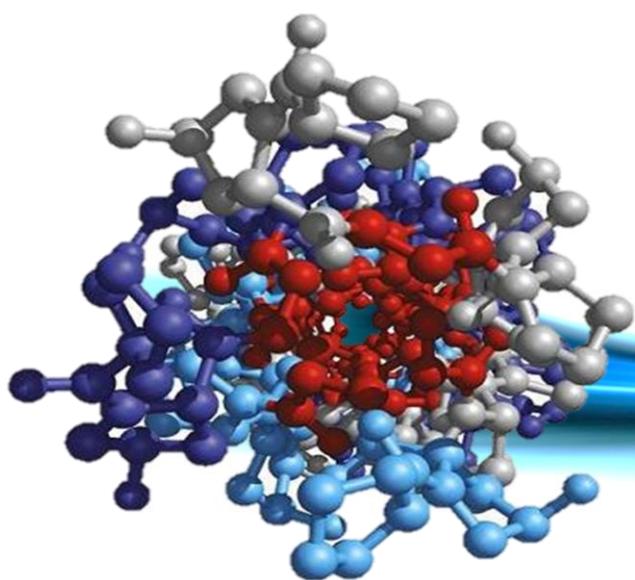
Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Tânia Aparecida Moreira dos Santos, Odete Amaral, Dulce Helena de Oliveira, Sônia Maria Tircailo (Soninha), Pedro César Alves, Diego Cardoso Pendenza, Antônio Parciaseppe e Regina Aparecida Favarin pelo convívio amigável, ajuda em hora oportuna e por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas, Marley Cristina Chiusoli Montagnoli, Disleide Silvia Valério Gounella, Adriano Ferreira Luiz, Eliane Maria Sanches Scarso, Maria Inês Carlos, Ana Cristina Jorge, Denise Floriano da Silva, Laudicélia Martins Arantes, Maria Aparecida Capella Carvalho. Obrigada pela simpatia, ajuda, carinho, atenção e por serem sempre prestativos.

A Prof^a. Dr^a. Fernanda Brighenti pela colaboração no aprimoramento do projeto de pesquisa do Exame Geral de Qualificação. E

ao Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani pela ajuda no desenvolvimento da aula de Traumatismo Dental para o Exame Geral de Qualificação. Obrigada por serem atenciosos, prestativos, grandes mestres e amigos!

A todos aqueles que diretamente e indiretamente contribuíram para o desenvolvimento e conclusão dessa pesquisa, o meu muito obrigado.



Resumo

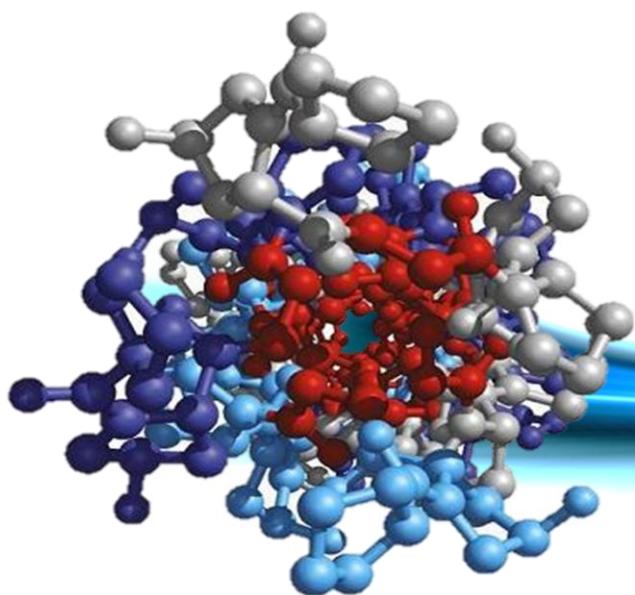
Estrêla RP. Atividade antimicrobiana da carbodiimida (EDC) sobre microrganismos presentes em lesões cariosas. [Dissertação Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

RESUMO

Tem sido demonstrado que a carbodiimida (EDC) apresenta notável potencial inibidor de proteases (MMPs) e de melhorar as propriedades mecânicas do colágeno quando aplicada sobre a dentina desmineralizada. Entretanto, não existem informações a respeito de sua ação antimicrobiana sobre microrganismos comumente encontrados em lesões de cárie ou mesmo após a sua remoção. **Objetivo:** Investigar a atividade antimicrobiana do EDC em diferentes concentrações sobre microrganismos presentes em cavidades cariosas. **Métodos:** Soluções de EDC foram preparadas e testadas contra *S. mutans* e *S. sobrinus*, *L. acidophilus* e *Candida albicans*. Inicialmente, foi utilizado o teste de difusão em ágar, no qual discos de papel filtro foram impregnados com EDC 2, 1, 0,5, 0,3 ou 0,1 mol/L, clorexidina 0,12%, nistatina 1% ou tampão Sorensen pH 6,2 (n=6). Em seguida, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) do EDC sobre *L. acidophilus* em suspensão planctônica (n=9), por meio de turvamento. Por fim, a atividade do EDC (de 0,01 à 2 mol/L) sobre *L. acidophilus* em biofilme monoespécie foi definida por meio do ensaio de XTT (n=6). Os dados foram submetidos aos testes estatísticos de ANOVA e Tukey ou Mann-Whitney ($p < 0,05$). **Resultados:** No teste de difusão em ágar, nenhuma atividade antimicrobiana foi observada para EDC nas concentrações de 0,1 e 0,3 mol/L, assim como para o grupo

controle. EDC 0,5, 1 e 2 mol/L exerceu efeito antimicrobiano apenas sobre *L. acidophilus*. A CIM do EDC foi de 0,01 mol/L e a CBM foi de 0,03 mol/L. Todas as concentrações de EDC igual ou superiores a 0,05 mol/L foram capazes de reduzir significativamente o metabolismo do biofilme formado por *L. acidophilus*. Essa redução variou de 84,2 para 0,05 mol/L até 93,4% para 2 mol/L. **Conclusão:** O EDC apresentou atividade antimicrobiana apenas contra *L. acidophilus* reduzindo significativamente o crescimento deste microrganismo quando em suspensão planctônica e o seu metabolismo quando em biofilme monoespécie a partir de 0,05 mol/L.

Palavras-chave: Etildimetilaminopropil carbodi-imida, antibacterianos, *Lactobacillus acidophilus*



Abstract

Estrêla RP. Antimicrobial activity of carbodiimide (EDC) against caries-related microorganisms. [Dissertação Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

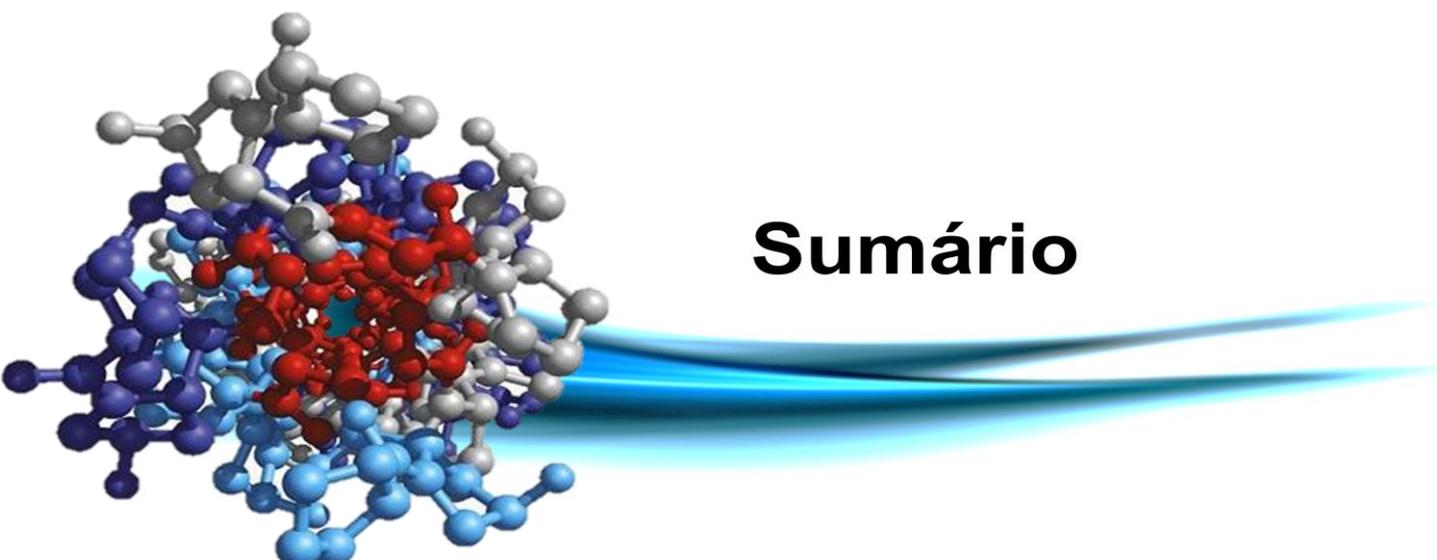
ABSTRACT

It has been demonstrated that carbodiimide (EDC) is a potent protease inhibitor (MMPs) and is able to improve the mechanical properties of collagen when applied on the demineralized dentin. However, there is no information about its antimicrobial effect on microorganisms commonly found in caries lesions or even after its removal.

Objective: To investigate the antimicrobial activity of different concentrations of EDC against microorganisms present in caries lesions. **Methods:** EDC solutions were prepared and tested against *S. mutans* and *sobrinus*, *L. acidophilus* and *Candida albicans*. Initially, the agar diffusion test was used, where paper discs were impregnated with 2, 1, 0.5, 0.3 or 0.1 mol/L EDC, 0.12% chlorhexidine, nistatin 1% or Sorensen's buffer pH 6.2 (control) (n=6). Then, the minimum inhibitory (MIC) and bactericide concentrations (MBC) of EDC were determined against *L. acidophilus* using turbidity. Finally, the growth inhibitory activity of EDC (from 0.01 to 2 mol/L) against *L. acidophilus* in monospecies biofilm was defined using the XTT assay (n=6). Data were submitted to ANOVA and Tukey tests or Mann-Whitney ($p < 0.05$). **Results:** For the agar diffusion test, lack of antimicrobial activity was seen for EDC at 0.1 and 0.3 mol/L, as well as for the control group. 0.5, 1 and 2 mol/L EDC exerted a growth inhibitory effect only against *L. acidophilus*. The MIC for EDC was set as 0.01 mol/L and the MBC as 0.03

mol/L. Concentrations equal to or greater than 0.05 mol/L were capable of significantly reducing the metabolism of *L. acidophilus* when in monospecies biofilm. This reduction ranged from 84.2% for 0.05 mol/L to 93.4% for 2 mol/L. **Conclusion:** EDC exerted antibacterial activity only against *L. acidophilus* significantly reducing its growth in planktonic suspension and its metabolism in biofilms in the concentration of 0.05 mol/L or higher.

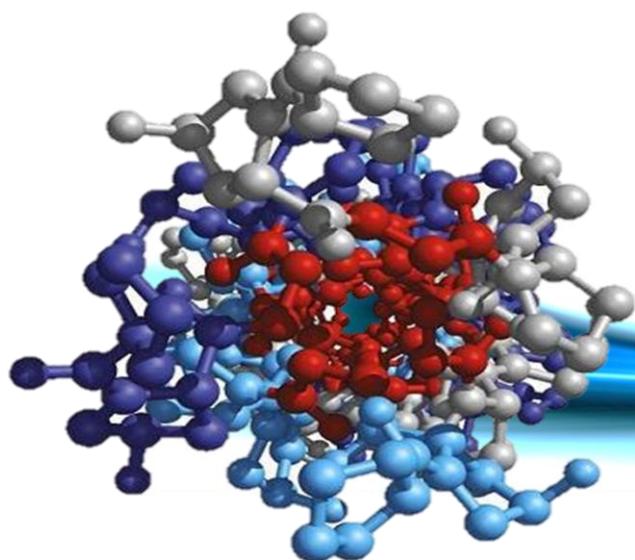
Keywords: Ethyldimethylaminopropyl Carbodiimide, anti-bacterial agents, *Lactobacillus acidophilus*



Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	32
2	REVISÃO DA LITERATURA	36
3	PROPOSIÇÃO	47
4	MATERIAL E MÉTODO	49
4.1	<i>Isolados bacteriano e fúngico</i>	50
4.2	<i>Reativação das espécies</i>	50
4.3	<i>Preparo das soluções de EDC e de digluconato de clorexidina</i>	51
4.4	<i>Teste de difusão em Agar</i>	52
4.5	<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</i>	54
4.6	<i>Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)</i>	55
4.7	<i>Formação do biofilme</i>	57
4.8	<i>Atividade metabólica do biofilme (Teste de XTT)</i>	57
4.9	<i>Análise estatística</i>	58
5	RESULTADO	59
5.1	<i>Halo de inibição (difusão em ágar)</i>	60
5.2	<i>Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)</i>	62
5.3	<i>Metabolismo (ensaio de XTT) do biofilme monoespécie</i>	64
6	DISCUSSÃO	66
7	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICE	89



Introdução

1 Introdução

A degradação da união resina-dentina vem sendo relatada como fator limitante da durabilidade das interfaces adesivas (Breschi et al.¹⁴, 2008; Hebling et al.³⁷, 2005; Liu et al.⁵³, 2011; Pashley et al.⁸¹, 2011). Este fenômeno ocorre de forma gradual devido a deterioração da porção resinosa da união, bem como pela clivagem das fibrilas de colágeno ao longo do tempo (Pashley et al.⁸¹, 2011). Durante a remoção do conteúdo mineral superficial da dentina pelo condicionamento ácido, o colágeno dentinário é exposto e proteases como as metaloproteinases da matriz (MMPs) e cisteínas catépsinas, são liberadas e ativadas (Tersariol et al.¹⁰⁵, 2010; Zhang, Kern¹²⁶ 2009). Mesmo após a impregnação das fibrilas desmineralizadas pelos monômeros do sistema adesivo, zonas de colágeno permanecem expostas (Hashimoto et al.³⁶, 2000; Nakabayashi et al.⁷¹, 1998; Spencer et al.⁹⁸, 2004; Wang, Spencer¹¹⁹ 2003) e altamente suscetíveis a degradação enzimática (Fanchon et al.²⁶, 2007).

As MMPs desempenham um papel importante e benéfico no processo de remodelação e formação da matriz extracelular e algumas atuam na mineralização da dentina (Fanchon et al.²⁶, 2007). No entanto, também participam do processo inflamatório, ocorrência de metastase de tumores, doenças periodontais e lesões de cárie, destruindo o colágeno e outras proteínas da matriz extracelular (Chaussain-Miller et al.¹⁹, 2006; Kukacka et al.⁴⁹, 2005; Liu et al.⁵³, 2006; Nemeth et al.⁷⁴, 2002; Tjäderhane et al.¹¹², 1998).

A atividade das MMPs também se faz presente na união resina-dentina, resultando na perda da resistência de união à dentina em longo prazo devido à degradação do colágeno exposto na camada híbrida (Brackett et al.¹¹, 2007; Carrilho et al.¹⁷, 2007; Brackett et al.¹⁰, 2009; Ricci et al.⁸⁶, 2010), quer seja no momento de sua formação ou devido a lixiviação de monômeros e oligômeros em decorrência da ação da água circulante na interface (Hashimoto et al.³⁶, 2000).

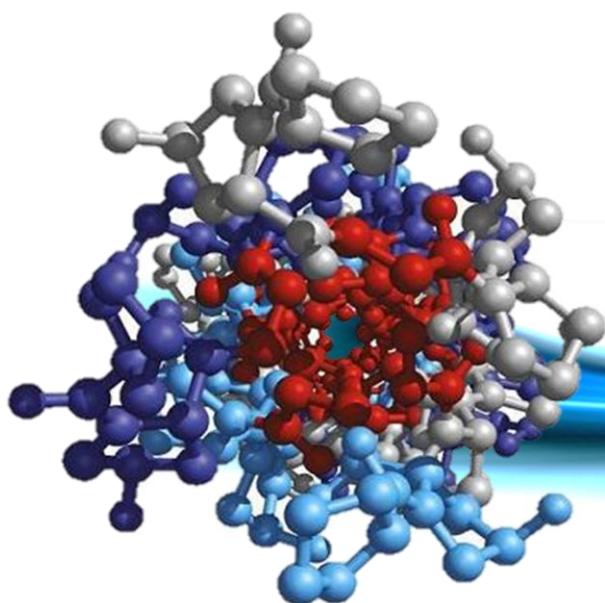
Visando reduzir a atividade destas proteases e preservar a integridade da interface adesiva em longo prazo, a clorexidina tem sido utilizada como um inibidor inespecífico de MMPs (Brackett et al.¹¹, 2007; Brackett et al.¹⁰, 2009; Carrilho et al.¹⁷, 2007; Gendron et al.²⁸, 1999; Hebling et al.³⁷, 2005; Ricci et al.⁸⁶, 2010), mostrando-se também eficiente contra catepsinas (Scaffa et al.⁸⁹, 2012), além de apresentar comprovado efeito antibacteriano (Twetman et al.¹¹⁵, 2004). No entanto esta substância é solúvel em água e pode sofrer lixiviação da camada híbrida, comprometendo sua eficácia ao longo do tempo (Ricci et al.⁸⁶, 2010).

Uma alternativa para aumentar a qualidade e longevidade das restaurações adesivas é o tratamento da dentina desmineralizada com agentes *cross-linkers* inespecíficos, capazes de promover o aumento do número de ligações cruzadas intra e inter moléculas de colágeno, assim como inter fibrilas de colágeno (Al-Ammar et al.², 2009; Bedran-Russo et al.⁶, 2010). O 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC) é capaz de agregar aminoácidos em peptídeos, por meio da ativação de grupos carboxila dos ácidos glutâmico e aspártico presentes nas proteínas (Timkovich,¹¹⁰ 1977; Zeeman et al.¹²⁵, 1999), resultando em *cross-links* sem grupos residuais ativos (Olde et al.^{79, 80}, 1996). Além de não apresentar citotoxicidade transdentinária sobre

células odontoblastóides (Scheffel DLS, em fase de elaboração*), o EDC é capaz de melhorar as propriedades mecânicas do colágeno desmineralizado, tornando-o mais resistente a degradação enzimática (Bedran-Russo et al.⁶, 2010) e de inativar MMPs, ligando-se covalentemente ao sítio ativo destas proteases (Scheffel et al.⁹⁰, 2013; Tezvergil-Mutluay et al.¹⁰⁷, 2012). Deste modo, sugere-se que a inativação gerada pelo EDC dure muito mais do que a proporcionada pela clorexidina (Scheffel DL et al.⁹⁰, 2014).

No entanto, seria desejável que além destas propriedades o EDC também fosse efetivo contra microrganismos presentes nas lesões cariosas, uma vez que estes permanecem no substrato dentinário, mesmo após a remoção clínica total do tecido cariado. Desta forma o EDC proporcionaria não só maior qualidade da interface adesiva por meio da biomodificação do colágeno e da inativação de MMPs, mas também por meio da assepsia da cavidade, reduzindo o número de microrganismos viáveis na dentina afetada por cárie. Até o momento, não são encontradas na literatura informações sobre a atividade antimicrobiana do EDC, fato este que motivou o desenvolvimento do presente estudo.

* Scheffel DLS, Bianchi L, Soares DG, Basso FG, Sabatini C, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Transdental cytotoxicity of carbodiimide (edc) and glutaraldehyde on odontoblast-like cells. Aceito para publicação no periódico Operative Dentistry no dia 19 de maio de 2014



Revisão da Literatura

2 Revisão da Literatura

A dentina é um tecido tubular complexo e altamente mineralizado constituído, em peso, por 70% de conteúdo mineral, 20% de conteúdo orgânico e 10% de água (Embery et al.²⁵, 2001). O conteúdo orgânico dentinário apresenta 90% de colágeno, principalmente do tipo I e 10% de proteínas não colagenosas e glicoproteínas (Yamakoshi et al.¹²¹, 2005).

O colágeno do tipo I é uma molécula heterotrimérica em forma de bastão, composta por três cadeias de polipeptídeos chamadas de cadeias α , sendo duas cadeias α_1 e uma cadeia α_2 , que originam uma estrutura em tripla hélice (Yamauchi, Shiiba¹²³, 2008). As moléculas de colágeno são capazes de se organizarem em fibrilas por meio de ligações covalentes denominadas de ligações cruzadas. Essas ligações endógenas estão presentes no interior e entre as moléculas de colágeno (Kagan, Ryvkin⁴⁵, 2011), assim como entre as fibrilas, e promovem a viscoelasticidade, estabilidade e resistência características destas estruturas (Yamauchi¹²², 2000).

Dentre as proteínas não colagenosas encontradas na dentina podem ser citadas as metaloproteinases da matriz (MMPs) e as cisteínas catepsinas, enzimas expressas pelos odontoblastos (Tersariol et al.¹⁰⁵, 2010) durante a dentinogênese e aprisionadas no tecido após a mineralização da matriz dentinária (Mazzoni et al.⁶⁴, 2009). As MMPs são endopeptidases zinco/cálcio dependentes que utilizam íons cálcio para manter sua estrutura terciária e íons zinco para exercer sua atividade catalisadora da hidrólise (Visse, Nagase¹¹⁸, 2003). Elas degradam componentes da matriz extracelular e regulam o metabolismo fisiológico e patológico de tecidos à base de colágeno (Visse, Nagase¹¹⁸,

2003). Também atuam no processo de formação da lesão de cárie em dentina (Chaussain-Miller et al.¹⁹, 2006; Tjäderhane et al.¹¹², 1998) e, embora sua família seja constituída por vinte e seis membros identificados até o presente momento (Hannas et al.³⁴, 2007), apenas as MMP-2, MMP-9 (gelatinases) (Toledano et al.¹¹⁴, 2010; Martinde las Heras et al.⁵⁹, 2000; Mazzoni et al.⁶⁴, 2009), MMP-3 (estromelina) (Mazzoni et al.⁶², 2011), MMP-8 (colagenase) (Sulkala et al.¹⁰¹, 2007) e MMP-20 (amelolisina) (Sulkala et al.¹⁰⁰, 2002) tem sido relacionadas ao processo de degradação da união resina-dentina (Pashley et al.⁸², 2004).

As cisteínas catepsinas são doze proteases que diferem entre si em estrutura, mecanismo catalítico e em sua afinidade por diferentes substratos. Na cavidade bucal, participam de várias condições fisiológicas e patológicas (Dickinson et al.²⁴, 2002), como a formação de dentina peritubular (Tersariol et al.¹⁰⁵, 2010), o processo de formação da cárie dentinária (Perdigão et al.⁸⁴, 2013; Tjäderhane et al.¹¹², 1998), a reabsorção óssea (Söderström et al.⁹⁷, 1999) e a hidrólise das fibrilas de colágeno em pequenos peptídeos (Kafienah et al.⁴⁴, 1998).

Na dentina mineralizada, as fibrilas de colágeno são protegidas da ação das MMPs e catepsinas pelo seu envólucro de cristais de hidroxiapatita. A remoção do conteúdo mineral superficial durante o condicionamento com ácido fosfórico expõe o colágeno e cria nanoporosidades necessárias para a infiltração dos monômeros do sistema adesivo e o estabelecimento da camada híbrida (Nakabayashi et al.⁷⁰, 1982). Assim, a adesão ao substrato dentinário é baseada na substituição do material inorgânico pela resina sintética, resultando em um embricamento micromecânico dos polímeros formados in situ com a estrutura dental.

Embora ocorra a impregnação das fibrilas expostas pelo condicionamento ácido pelos monômeros do sistema adesivo, zonas de colágeno permanecem expostas no interior da camada híbrida (Spencer et al.⁹⁸, 2004; Wang, Spencer¹¹⁸ 2003; Nakabayashi et al.⁷¹, 1998; Hashimoto et al.³⁶, 2000), as quais são altamente suscetíveis à hidrólise mediada (Fanchon et al.²⁶, 2007) pelas MMPs e cisteínas catepsinas liberadas e ativadas (Matee et al.⁶⁰, 1992; Tersariol et al.¹⁰⁵, 2010; Zhang, Kern¹²⁶, 2009) durante os procedimentos adesivos (Mazzoni et al.⁶³, 2006; Scaffa et al.⁸⁹, 2012), assim como àquela mediada diretamente pela água circulante na interface. O resultado dessa degradação, a qual concomitantemente também está ocorrendo com os polímeros pela ação da água (processo de plastificação da resina), é a falência funcional da união resina-dentina em longo prazo.

Visando reduzir a degradação da união adesiva, agentes inibidores de proteases como a clorexidina (CLX), o glutaraldeído (GA), o 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC), a proantocianidina (PA) e os quartenário de amônio tem sido aplicados à dentina desmineralizada previamente à aplicação do sistema adesivo (Gendron et al.²⁸, 1999; Bedran-Russo et al.⁵, 2008; Bedran-Russo et al.⁶, 2010; Tezvergil-Mutluay et al.¹⁰⁶, 2011). A clorexidina apresenta uma ampla atividade antimicrobiana (Carrilho¹⁶, 2012) e é um inibidor inespecífico de MMPs (Gendron et al.²⁸, 1999) e cisteínas catepsinas (Scaffa et al.⁸⁹, 2012). Por um mecanismo similar à quelação, a clorexidina interage com as MMPs impedindo que íons zinco e cálcio, presentes na dentina, se liguem à estas enzimas inibindo sua atividade (Carrilho¹⁶, 2012). Além disso, possui a capacidade de interagir com o sítio ativo das catepsinas dificultando a união dessas proteases ao substrato a ser degradado (Scaffa et al.⁸⁹, 2012). Entretanto, a interação química da CLX com as fibrilas

de colágeno é apenas eletrostática, não suficientemente forte para impedir sua lixiviação da camada híbrida, comprometendo assim sua eficácia ao longo do tempo (Ricci et al.⁸⁶, 2010).

Como alternativa à aplicação da clorexidina, o uso de agentes capazes de promover a formação de novas ligações cruzadas no colágeno dentinário tem sido proposto. A aplicação destas substâncias visa melhorar as propriedades mecânicas e reduzir a biodegradação da matriz orgânica da dentina exposta na união adesiva (Al-Ammar et al.², 2009; Bedran-Russo et al.⁶, 2010; Mazzoni et al.⁶¹, 2013). Os agentes formadores de ligações cruzadas (*cross-linkers*) podem ser tanto sintéticos, como o GLU e o EDC, quanto naturais, como a genipina e a PA (Scheffel et al.⁹⁰, 2013; Scheffel et al.⁹¹, 2014; Sung et al.¹⁰², 2003; Bedran-Russo et al.⁶, 2010; Castellan et al.¹⁸, 2013).

O EDC é um isômero de cianamida estável, capaz de agregar aminoácidos em peptídeos pela ativação do grupo carboxila dos ácidos glutâmico e aspártico presentes nas moléculas de colágeno (Timkovich¹¹⁰, 1977; Zeeman et al.¹²⁵, 1999), formando um composto intermediário denominado O-acylisourea. Esse último, após reagir com um grupo amina livre proveniente, em sua maioria, da lisina e da hidroxilisina presentes nas moléculas de colágeno (Olde Damink et al.^{79, 80}, 1996; Bedran-Russo et al.⁶, 2010) origina uma nova ligação peptídica e libera como subproduto da reação a uréia (Olde Damink et al.^{79, 80}, 1996), facilmente solúvel em água.

O EDC não apresenta citotoxicidade transdentinária sobre células odontoblastóides quando utilizado em concentrações de até 0,5 mol/L (Scheffel DLS, em fase de elaboração), e além de aumentar o módulo de elasticidade e a temperatura de degradação do colágeno em períodos de aplicação condizentes com os

procedimentos clínicos, ou seja, 30 e 60 segundos (Scheffel et al.⁹¹, 2014), também é capaz de inibir MMPs ao reagir com os ácidos glutâmico e aspártico presentes na estrutura e no sítio ativo destas enzimas (Scheffel et al.⁹⁰, 2013), causando a redução da mobilidade molecular.

Assim como nos protocolos de adesão de compósitos ao tecido dentinário, no processo cariioso também ocorre à dissolução do componente mineral da dentina e exposição da matriz orgânica à ação de proteases do hospedeiro (MMPs e catepsinas) e também das provindas dos microrganismos que infectam a lesão de cárie (Chaussain-Miller et al.¹⁹, 2006). As MMPs e as cisteínas catepsinas têm um papel importante na patogenicidade da cárie, degradando os componentes da matriz dentinária (Nascimento et al.⁷², 2011), assim como as collagenases produzidas por microrganismos presentes em lesões cariosas, como *Streptococcus mutans* e *sobrinus* (Harrington³⁵, 1996), *Lactobacillus acidophilus* e *Candida albicans* (Lima et al.⁵², 2009). Em lesões de cárie dentinária existe uma superexpressão de genes que codificam para collagenases e outras proteases que atuam na degradação das proteínas dentinárias, especialmente do colágeno (Simón-Soro et al.⁹⁶, 2013).

A lesão de cárie tem início com a colonização de bactérias gram-positivas, particularmente os gêneros *Lactobacillus*, *Actinomyces* e *Streptococcus*. Os *Streptococcus mutans* são a espécie predominante nas lesões em geral (Becker et al.⁴, 2002), enquanto os *Streptococcus sobrinus* possuem um forte envolvimento na cárie da primeira infância (Okada et al.⁷⁸, 2005). Na lesão superficial de cárie há o favorecimento do crescimento de anaeróbios facultativos enquanto que, a microflora

encontrada nas regiões mais profundas é dominada por organismos obrigatoriamente anaeróbicos (Simón-Soro et al.⁹⁶, 2013).

Streptococcus mutans e *sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Candida albicans* são brevemente descritos a seguir por terem sido alvo de avaliação do presente estudo. Os *S. mutans* são bactérias gram-positivas, consideradas como a espécie mais cariogênica da cavidade oral (Loesche⁵⁵, 1986) e possuem propriedades acidogênicas e acidúricas, permitindo que o microrganismo sobreviva e se prolifere em pH baixo (Bradshaw et al.¹², 1989). Esses microrganismos utilizam sacarose para produzir exopolissacáridos (EPS), que atuam como pontos de ancoragem para outras bactérias (colonizadores secundários) como *Lactobacillus acidophilus* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Além disso, são um dos principais contribuintes para o desenvolvimento de doenças bucais como abscessos odontogênicos e infecções do canal radicular (Suci, Young⁹⁹, 2011; Patel et al.⁸³, 2013) e podem também formar biofilmes por um mecanismo independente de sacarose (Brown et al.¹⁵, 2005).

Sua característica acidúrica, modulando vias metabólicas de açúcares juntamente com uma ligação irreversível aos tecidos dentários é um componente fundamental para sua patogenicidade (Metwalli et al.⁶⁷, 2013). Seus principais traços de virulência ainda envolvem sua capacidade de produzir quantidades elevadas de ácidos orgânicos (acidogenicidade) a partir da metabolização de carboidratos e de realizar a síntese extracelular de homopolímeros de glucana a partir da sacarose, que desempenham um papel fundamental na fixação inicial, colonização e acúmulo de biofilme em superfícies dentárias (Bowen, Koo⁹ 2011; Loesche⁵⁵, 1986).

S. sobrinus apresentam bioquímica e virulência diferentes dos *S. mutans* e sua presença na saliva está associada à um aumento de lesões de cárie em superfícies lisas (Hirose et al.³⁹, 1993; Madison et al.⁵⁷, 1991). Estes microrganismos se aderem com maior facilidade à películas formadas por glicosiltransferases sobre a hidroxiapatita quando comparados ao *S. mutans* (Gibbons et al.²⁹, 1986). Assim, sua colonização na cavidade bucal é mais sacarose-dependente e sua adesão é aumentada quando a película é exposta a sacarose e permite a síntese de glucana (Gibbons et al.²⁹, 1986).

Além de serem mais acidogênicos e possuírem uma virulência maior (Colby, Russel²⁰ 1997; Hirasawa, Takada³⁸, 2003) que o *S. mutans*, são capazes de produzir uma maior quantidade de ácidos em pH baixos (de Soet et al.²³, 1989). Assim como ocorre para os *S. mutans*, os polímeros extracelulares são o principal componente dos biofilmes formados por esses microrganismos e auxiliam na sua aderência. Já os intracelulares agem como reservas energéticas, permitindo o metabolismo bacteriano na produção de ácidos por certo período de tempo mesmo após a remoção dos carboidratos da dieta (Jakubovics et al.⁴², 2005).

Os *Lactobacillus* são bacilos Gram-positivos que possuem um papel benéfico devido à sua capacidade de produzir agentes antimicrobianos, como peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que podem impedir espécies patogênicas de prosperar (Zhu et al.¹²⁷, 2000, Teanpaisan et al.¹⁰⁴, 2011). Sendo assim, eles podem ser utilizados como probióticos (Ahola et al.¹, 2002). Considerados patógenos secundários importantes na cárie dentária (Van Houte¹¹⁷, 1994), principalmente em lesões profundas, os *Lactobacillus* produzem ácido láctico a partir de açúcares fermentáveis e são capazes de viver em ambientes altamente ácidos (Mei et al.⁶⁶, 2013). As espécies

mais frequentemente encontradas nas lesões de cárie são: *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus acidophilus* (Knight et al.⁴⁷, 2008). Os *Lactobacillus*, por si só, não podem formar o biofilme sobre a superfície dentária e dependem de polissacarídeos extracelulares produzidos por outros organismos orais, principalmente estreptococcus, para colonizar a superfície (Wen et al.¹²⁰, 2010).

As leveduras do gênero *Candida* são patógenos oportunistas que podem causar infecções na mucosa (Nikawa et al.⁷⁵, 1998). É sugerido que *Candida albicans* participa no processo de formação da lesão de cárie (Moalic et al.⁶⁸, 2001; Nikawa et al.⁷⁶, 2003), principalmente em crianças, adolescentes e adultos jovens (Moalic et al.⁶⁸, 2001; de Carvalho et al.²¹, 2006). Estes microrganismos estão frequentemente presentes na cavidade bucal de crianças com cárie da primeira infância, semelhante ao *S. mutans* e *Lactobacillus* (de Carvalho et al.²¹, 2006).

A *C. albicans* tem um papel importante no estabelecimento do biofilme, uma vez que promove a formação de uma matriz de glicanos capaz de aumentar a capacidade de adesão dos *S. mutans* na superfície do esmalte dental (Gregoire et al.³², 2011). Além disso, está envolvida na progressão da cárie devido à sua elevada acidogenicidade (Signoretto et al.⁹⁵, 2009; Klinke et al.⁴⁶, 2011; Lai, Li⁵⁰ 2011) e por apresentar uma forte aderência ao colágeno (Makihira et al.⁵⁸, 2002).

A lesão da cárie em dentina possui uma zona externa, denominada dentina infectada e uma mais interna, conhecida como dentina afetada, diferentes em textura e composição. A dentina infectada é caracterizada por um tecido dentinário necrótico, com perda praticamente completa do seu conteúdo mineral, rede de colágeno irreversivelmente degradada e presença de um grande número de microrganismos

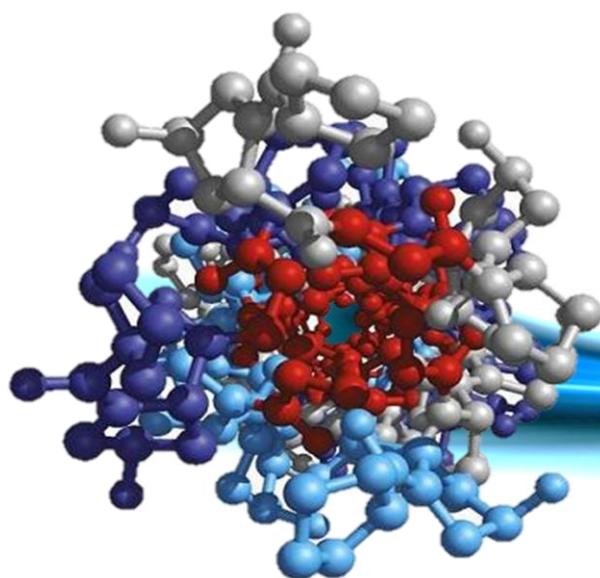
essencialmente proteolíticos (Ogawa et al.⁷⁷, 1983). A dentina afetada apresenta-se mais endurecida, porém com menor conteúdo mineral e maior presença de porosidades na zona de dentina intertubular quando comparada a dentina hígida (Yoshiyama et al.¹²⁴, 2000; Zheng et al.¹²⁷, 2003). Embora apresente uma rede de colágeno desorganizada, ainda é passível de remineralização e tem menor número de microrganismos (Ogawa et al.⁷⁷, 1983).

Mesmo após a remoção da dentina infectada, microrganismos permanecem na dentina afetada por cárie, sendo impossível a esterilização da cavidade a ser restaurada. Diante disto, seria desejável que substâncias capazes de favorecer a durabilidade na união resina-dentina também atuassem como agentes antimicrobianos, proporcionando a assepsia da dentina previamente a aplicação do sistema adesivo.

A CLX, além de inibir MMPs e cisteínas catepsinas na união resina-dentina, é um biocida utilizado em produtos anti-sépticos como desinfetante e conservante. Possui um amplo espectro antimicrobiano e alta substantividade para a pele e mucosa (McDonnell, Russell⁶⁵, 1999). Sua característica molecular é hidrófoba e lipofílica e é carregada positivamente. Sua eficácia ocorre devido à alteração do equilíbrio osmótico das células bacterianas por meio da interação eletrostática da CHX com fosfolípidos e lipopolissacáridos presentes na membrana celular dos microrganismos (Athanasiadis et al.³, 2007; Tiralí et al.¹¹⁰, 2013).

O EDC é comprovadamente um biomodificador do colágeno dentinário e inibidor de MMPs, favorecendo a estabilidade e durabilidade da interface adesiva (Bedran-Russo et al.⁶, 2010; Scheffel et al.⁸⁹, 2013). No entanto, não há na literatura

informações sobre seu potencial de reduzir ou impedir o crescimento de microrganismos associados ao estabelecimento e progressão do processo de cárie.



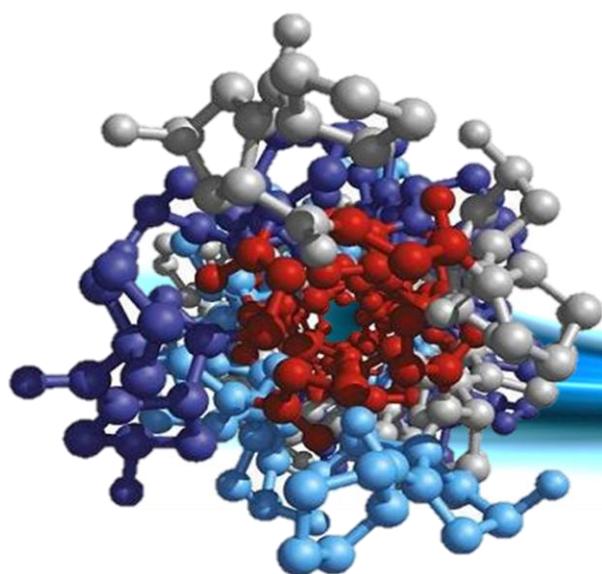
Proposição

3 PROPOSIÇÃO GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral investigar o potencial antimicrobiano do EDC sobre microrganismos presentes em lesões cariosas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações de EDC sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Candida albicans*;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) das concentrações de EDC sobre *L. acidophilus* em suspensão planctônica;
- Investigar a atividade antimicrobiana das diferentes concentrações de EDC sobre o metabolismo de *L. acidophilus* em biofilme monoespécie.



Material e Método

4 Material e Método

4.1 Isolados bacteriano e fúngico

Foram utilizadas cepas de referência de *Streptococcus mutans* [American Type Culture Collection (ATCC) 25175], *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 27607) e *Candida albicans* (ATCC 90028). Previamente aos experimentos, as espécies bacterianas foram reativadas em meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion Broth*, HIMEDIA Laboratories PVT. LTD., Mumbai, India,) e mantidas em sistema de jarra de microaerofilia a 37 °C por 48 h.

Candida albicans foi reativada em meio de cultura TSB (*Triptic Soy Broth*, Neogen Corporation, Lansing, Michigan, EUA) e incubada a 37 °C por 48 h.

4.2 Reativação das espécies

Os isolados foram reativados em 5 mL de meio de cultura BHI ou TSB e mantidos a 37 °C por 18 h em uma concentração final de 1×10^7 UFC/mL. Após o crescimento, a suspensão foi centrifugada (Centrífuga Microprocessada Rotor Horizontal para Microplacas - Spinlab SL-5M, Bimodol, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) a 21,465 rcf por 5 minutos. O meio de cultura (sobrenadante) foi aspirado e os microrganismos foram lavados delicadamente duas vezes com solução salina de tampão fosfato (PBS) esterilizada (Apêndice) previamente à adição de 5 mL de novo meio. Em seguida, o material resultante (microrganismo + meio) teve sua turbidez ajustada com o auxílio de espectrofotômetro (BioPhotometer Plus, Eppendorf, São Paulo, Brasil) no comprimento de onda 600 nm, até que fosse atingida a absorvância determinada previamente ao experimento, correspondente a uma suspensão para

solução estoque de 1×10^7 UFC/mL. A suspensão dos microrganismos foi utilizada no prazo máximo de 60 minutos após o ajuste da concentração.

4.3 Preparo das soluções de EDC e de Digluconato de Clorexidina

Soluções de EDC (Fluka, Sigma-Aldrich, MO, EUA) foram preparadas imediatamente antes do uso nas seguintes concentrações: 2 mol/L, 1 mol/L, 0,5 mol/L, 0,3 mol/L e 0,1 mol/L (Tabela 1). Como solvente, foi utilizada solução tampão Sorensen [Apêndice], pH 6,2. Para o preparo do digluconato de clorexidina 0,12% (CLX), foram diluídos 0,300 mL de digluconato de clorexidina 2% [veículo aquoso, fabricado com água destilada e acrescentado nipagin 0,1%] (Arte Ciência Farmacêuticas, Cosméticas, Homeopáticas e Florais; Araraquara, São Paulo, BR) em 4,7 mL de água deionizada previamente esterilizada.

Tabela 1 - Soluções de EDC (soluto) preparadas em tampão Sorensen (solvente) pelo método de microdiluição.

Concentração final	Massa (g) do soluto (EDC)	Volume (mL) do solvente	Volume (mL) concentração 2 mol/L
2 mol/L	1,92	5	-
1 mol/L	-	0,500	0,500
0,5 mol/L	-	0,750	0,250
0,3 mol/L	-	0,850	0,150
0,1 mol/L	-	0,950	0,050

4.4 Teste de Difusão em Ágar

Os testes de difusão em ágar foram realizados seis (n=6) vezes para cada solução e cepa, em placas Petri esterilizadas (140 mm de diâmetro x 15 mm de altura) com camada base. Essa camada foi obtida com 35 mL de meio de cultura BHI Agar (*Brain Heart Infusion Agar*, Neogen Corporation, Lansing, Michigan, EUA) para as bactérias ou SDA (*Sabourad Dextrose Agar*, HIMEDIA Laboratories PVT. LTD., Mumbai, India) para o fungo, esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 minutos e resfriados até cerca de 50 °C. Em seguida foram acrescentados ao meio 700 µL dos inóculos, e a mistura foi vortexada antes de ser vertida nas placas Petri (Figuras 1 e 2). Depois da solidificação do meio, oito discos de papel filtro (Papel filtro Qualitativo 50 g, código: 501.1250, Procedência Alemã, Unifil) esterilizados, de 4 mm de diâmetro, foram colocados em cada placa seguindo o gabarito estabelecido previamente ao experimento (Figura 3).

Figura 1 - Homogeneização do meio de cultura (35 mL) com os microrganismos (700 µL) em vortex.



Figura 2 - Meio de cultura (35 mL) específico, contendo 700 µL de microrganismo vertido em placa Petri.

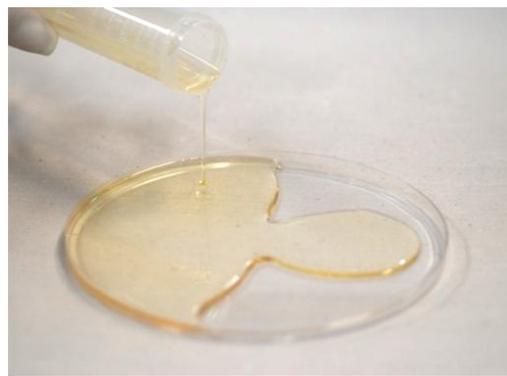
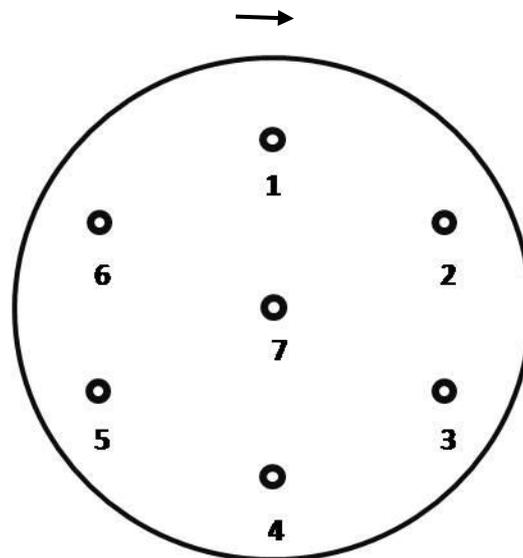
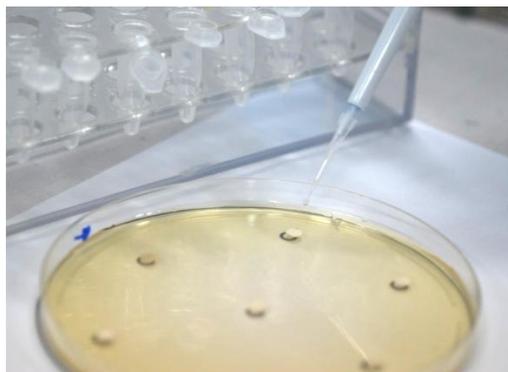


Figura 3 - Gabarito utilizado para direcionar a posição dos discos de papel filtro. Seguindo uma ordem onde: 1) EDC 2 mol/L; 2) EDC 1 mol/L; 3) EDC 0,5 mol/L; 4) EDC 0,3 mol/L; 5) EDC 0,1 mol/L; 6) CLX 0,12% ou Nistatina e 7) Solução tampão Sorensen.



Sobre cada disco de papel filtro foram adicionados 5 μ L das soluções de EDC com auxílio de uma micropipeta (Figura 4). Como controle positivo foi utilizado CLX 0,12% ou Nistatina, suspensão oral, (100.000 UI por dose de 1 mL, EMS S/A, Hodrolândia, São Paulo, BR) e o controle negativo foi representado pela solução tampão Sorensen, totalizando os sete discos por placa (Figura 3)

Figura 4 - Placa Petri com camada base e discos de papel filtro distribuídos de forma equidistante. Aplicação das soluções (5 μ L) nos discos de papel filtro já posicionados na placa com auxílio de micropipeta.



As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 2 horas para pré difusão dos materiais e, após esse período, foram mantidas em estufa a 37 °C por 48 h de acordo com as condições fisiológicas de cada microrganismo (*Candida albicans* foi incubada em aerobiose e as espécies bacterianas em microaerofilia).

A leitura dos diâmetros dos halos de inibição foi realizada por um único examinador não informado sobre a sequência das soluções (delineamento simples cego) com auxílio de um paquímetro digital (Mod. 500-144b, Mytutoyo Sul Americana Ltda., SP, Brasil) com resolução de 0,1 mm. Foram realizadas três medidas alternadas do maior diâmetro do halo formado ao redor dos discos e a média foi calculada para a análise dos dados. Ao final do experimento foram obtidos seis (n=6) valores por solução/microrganismo.

Para a determinação da CIM e CBM, foram utilizadas somente as cepas para as quais foram observados halos de inibição no teste de difusão em agar.

4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima foi determinada por meio do método de microdiluição em caldo M27-A2 preconizado pelo CLSI¹³ (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Em placa de microtitulação (96 poços), dez (n=10) poços foram preenchidos com 200 µL de cada solução de EDC (em concentrações que variaram de 0,000625 mol/L até 2 mol/L), CLX 0,12% ou meio BHI. Em seguida em nove (n=9) poços foram adicionados 2 µL da solução estoque de *L. acidophilus*. O décimo poço, correspondente ao *blank*, foi mantido apenas com as soluções, ou seja, sem inoculação dos microrganismos, para posterior auxílio na leitura da absorbância em leitor de Elisa.

As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C em agitador a 53,66 rcf (Incubadora,

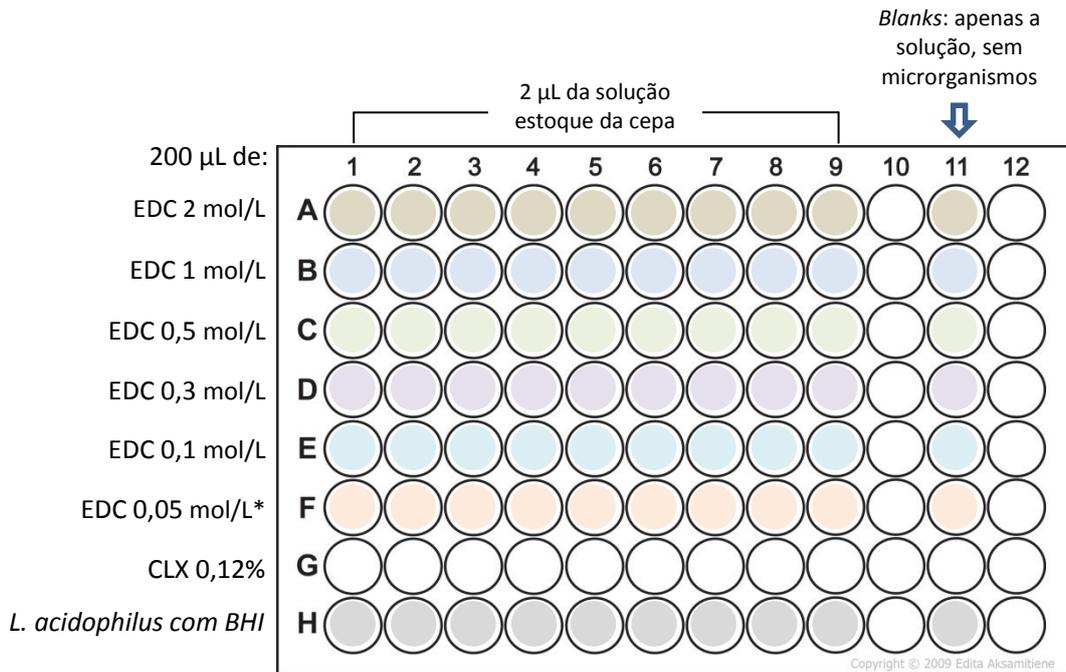
430, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil). Decorrido esse período, foi realizada a leitura da absorbância em leitor de Elisa no comprimento de onda de 590 nm (Leitora TP-READER BASIC Thermo Plate, China). Todos os ensaios foram realizados em duplicata, ou seja, em 2 experimentos independentes. Foi considerada a CIM a menor concentração do EDC onde não houve turvação do meio, observada ao olho desarmado, indicativo de ausência de crescimento bacteriano.

4.6 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

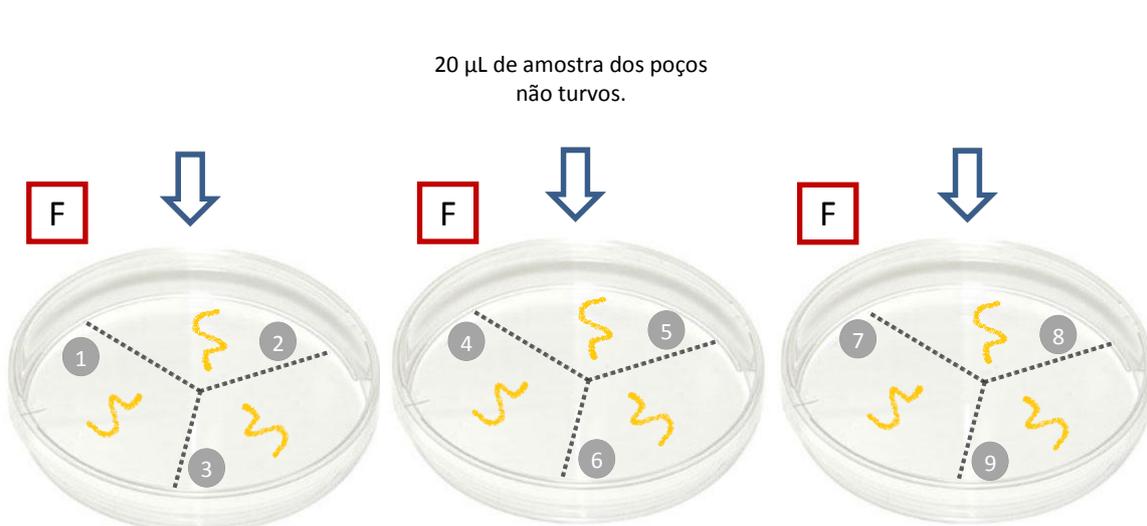
Dos poços que não apresentaram turvação foram coletados 20 μ L, os quais foram imediatamente plaqueados em meio de cultura BHI ágar preparado em placas Petri, como descrito anteriormente. As placas foram mantidas a 37 °C por 48 horas. Este experimento também foi realizado em duplicata.

A CBM foi definida como a menor concentração capaz de reduzir o inóculo inicial em $\geq 99,9\%$, ou seja, sem crescimento bacteriano observável ao olho nu. A representação esquemática da determinação da CIM e CBM pode ser visualizada na Figura 5.

Figura 5 - Representação esquemática de placa de microtitulação (96 poços) para determinação do CIM e CBM, respectivamente. Os números (colunas) correspondem ao número de repetições (n=9) para cada concentração da solução de EDC testada (2; 1; 0,5; 0,3; 0,1; 0,05; 0,03; 0,01; 0,005; 0,0025; 0,00125 e 0,000625 mol/L), CLX 0,12% e BHI. Cada compartimento foi preenchido com 200 μ L das soluções, seguido da inoculação de 2 μ L da solução de estoque da bactéria *L. acidophilus*, com exceção dos blanks. Dos poços sem turvação, 20 μ L foram coletados e plaqueados em meio BHI.



*até a concentração de 0,000625 mol/L



4.7 Formação do biofilme

O método de formação de biofilme em placas de microtitulação (96 poços) foi descrito previamente por Thein et al.¹⁰⁷. As cepas de *L. acidophilus* foram reativadas em uma concentração final de 1×10^7 UFC/mL, conforme descrito em “Reativação das espécies”. A formação do biofilme monoespécie foi realizada em placa de microtitulação (96 poços), sendo seis poços (n=6) para cada concentração de EDC e grupos controles, com meio BHI acrescido de microrganismos (BHI+MO) e 0,12% CLX.

Utilizando-se técnicas assépticas, cada poço foi preenchido com 100 µL da suspensão de *L. acidophilus* e a placa foi incubada a 37 °C por 1 hora e 30 minutos, em agitador a 53,66 rcf, tempo este correspondente à fase de adesão dos microrganismos à superfície de acrílico do fundo dos poços. Após o período de adesão, a suspensão celular foi cuidadosamente aspirada e o poço lavado duas vezes com 100 µL de PBS esterilizado para a remoção dos microrganismos não aderidos. Em seguida, 100 µL de BHI foram adicionados para promover o crescimento do biofilme e as placas foram novamente incubadas a 37 °C por 48 horas. Decorrido este período, o meio BHI foi aspirado e o poço lavado com 100 µL de PBS para posterior adição de 100 µL das diferentes concentrações do EDC ou CLX sobre o biofilme formado no fundo dos poços. A placa foi incubada a 37 °C por mais 24 horas.

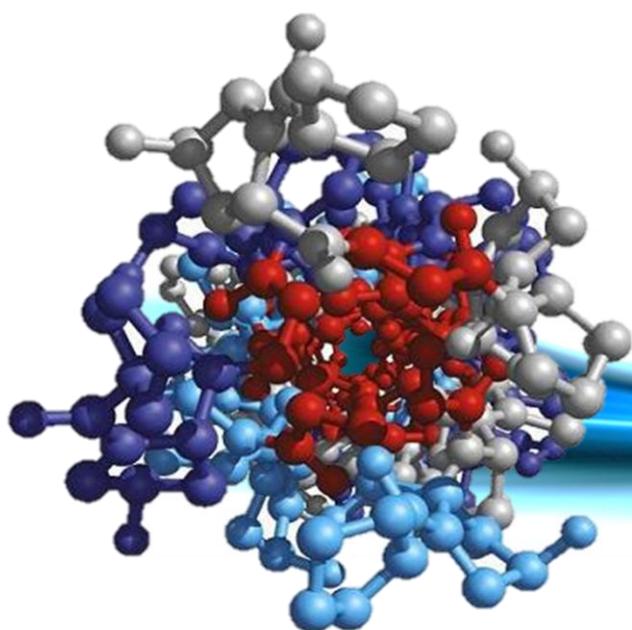
4.8 Atividade metabólica do biofilme (Ensaio de XTT)

A atividade metabólica do biofilme foi determinada segundo o ensaio de XTT, conforme descrito por Roehm et al.⁸⁶. O sal de XTT (Sigma-Aldrich, MO, EUA) foi preparado em água ultra purificada na concentração final de 1 mg/mL. A solução foi

filtrada e estocada a -80°C até o uso. A solução de menadiona (Sigma-Aldrich, MO, EUA) foi preparada em acetona a $0,4\text{ mM}$ anteriormente ao experimento. Após 24 h de incubação, as soluções foram removidas e os poços lavados 1 vez com solução salina esterilizada. Cada poço recebeu $200\ \mu\text{L}$ de solução de XTT, composta por $158\ \mu\text{L}$ de PBS com 200 mM glicose, $40\ \mu\text{L}$ de XTT e $2\ \mu\text{L}$ de menadiona diluída. As placas foram incubadas por 3 horas protegidas da luz a 37°C . Então, a absorbância foi determinada no comprimento de onda de 492 nm por espectrofotometria (Leitora TP-READER BASIC Thermo Plate, China). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.9 Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados, foram considerados como fatores de variação (variáveis independentes) do presente estudo (1) as substâncias (concentrações de EDC e controles), e (2) as espécies microbianas. As variáveis de resposta (variáveis dependentes) foram o tamanho do halo de inibição (para o experimento de difusão em ágar), e a absorbância (para a CIM, CBM e metabolismo do biofilme). Aos dados de halo de inibição foram aplicados os testes de ANOVA a dois critérios fixos, complementado por testes de Tukey para comparação dos grupos aos pares. Para os dados de CIM, CBM e metabolismo foram utilizados testes de Mann-Whitney sempre comparando os grupos experimentais com os controles. Grupos foram considerados estatisticamente diferentes quando $p \leq 0,05$, ou seja, ao nível de significância de 5%.



Resultado

5 Resultado

5.1 Halo de inibição (difusão em ágar)

Os valores de halo de inibição (mm) produzidos pelas diferentes concentrações de EDC, clorexidina 0,12% ou nistatina e controle (solução tampão Sorensen) estão apresentados na Tabela 2. Nenhuma atividade antimicrobiana (halo de inibição = 0) foi observada para EDC nas concentrações de 0,1 e 0,3 mol/L, assim como para o grupo controle. EDC 0,5 mol/L, 1 mol/L e 2 mol/L exerceram efeito antimicrobiano apenas sobre *Lactocacillus acidophilus*, enquanto que a clorexidina 0,12% foi efetiva contra o crescimento de todas bactérias sendo o mesmo observado para a nistatina contra a *Candida albicans* (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividade antimicrobiana, valores do halo de inibição (mm), de diferentes concentrações de EDC e clorexidina 0,12% ou nistatina sobre quatro cepas de microrganismos presentes em lesões cariosas.

Solução de tratamento da dentina	Microrganismo			
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Candida albicans</i>
EDC 0,1 mol/L	0 [*]	0	0	0
EDC 0,3 mol/L	0	0	0	0
EDC 0,5 mol/L	0	0	8,98±1,48 ^B	0
EDC 1 mol/L	0	0	10,90±1,40 ^B	0
EDC 2 mol/L	0	0	12,30±2,39 ^B	0
0,12 % CLX ou nistatina**	18,90±1,3 ^b	23,07±1,11 ^a	20,88±4,32 ^{A,ab}	5,79±0,11 ^c
Tampão Sorensen	0	0	0	0

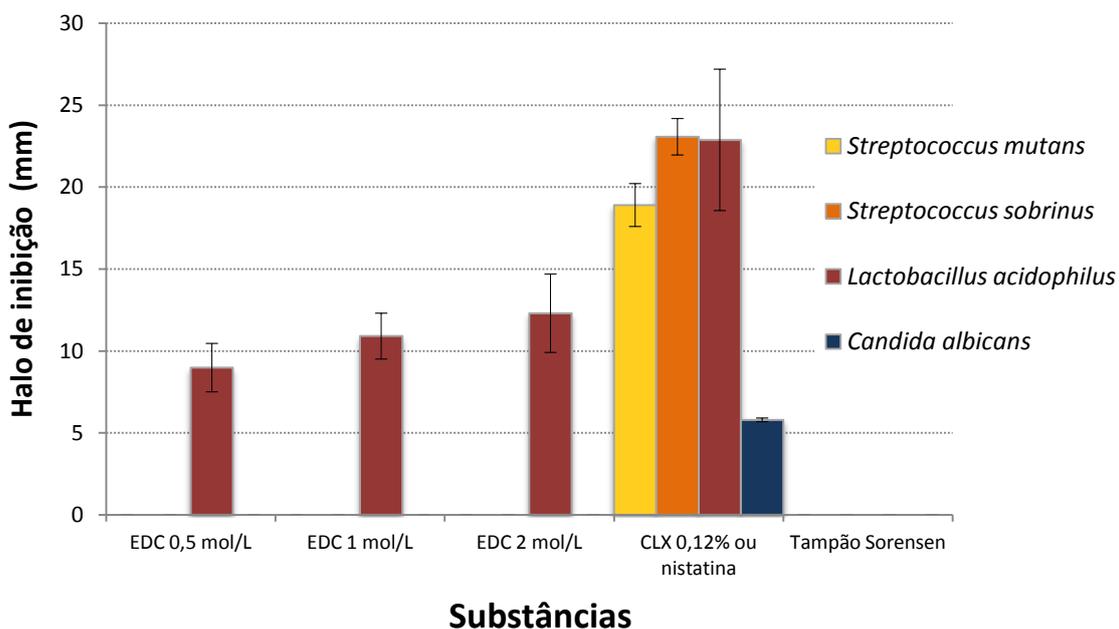
* o método utilizado não resultou em crescimento do microrganismo (halo de inibição=0); ** clorexidina (CLX) foi utilizada para as cepas bacterianas, enquanto que nistatina 100.000 UI foi utilizada para *Candida albicans*;

^{aA} valores são média±desvio-padrão (mm), n=6. Médias identificadas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente (Tukey, p>0.05).

Considerando os dados obtidos para a clorexidina, os maiores valores de halo de inibição foram registrados para *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus acidophilus*, embora o efeito antibacteriano exercido sobre o último tenha sido similar ao exercido para o *Streptococcus mutans*. A menor atividade antimicrobiana foi vista para a *Candida albicans*, neste caso, exercida pela nistatina (Tabela 2, linha).

Das substâncias que exerceram atividade contra o crescimento de *Lactobacillus acidophilus*, a mais efetiva foi a clorexidina 0,12%, seguida do EDC nas diferentes concentrações, sem diferença entre elas (Tabela 2, coluna). Os dados apresentados na Tabela 2 com resultado positivo quanto a atividade antimicrobiana estão representados graficamente na Figura 6.

Figura 6 - Atividade antimicrobiana (halo de inibição, mm) de diferentes concentrações de EDC, 0,12% clorexidina (ou 1% nistatina 100.00 UI, no caso de *Candida albicans*) sobre microrganismos presentes em lesões cariosas. Colunas representam médias e barras de erro representam os desvios-padrões, n=6.

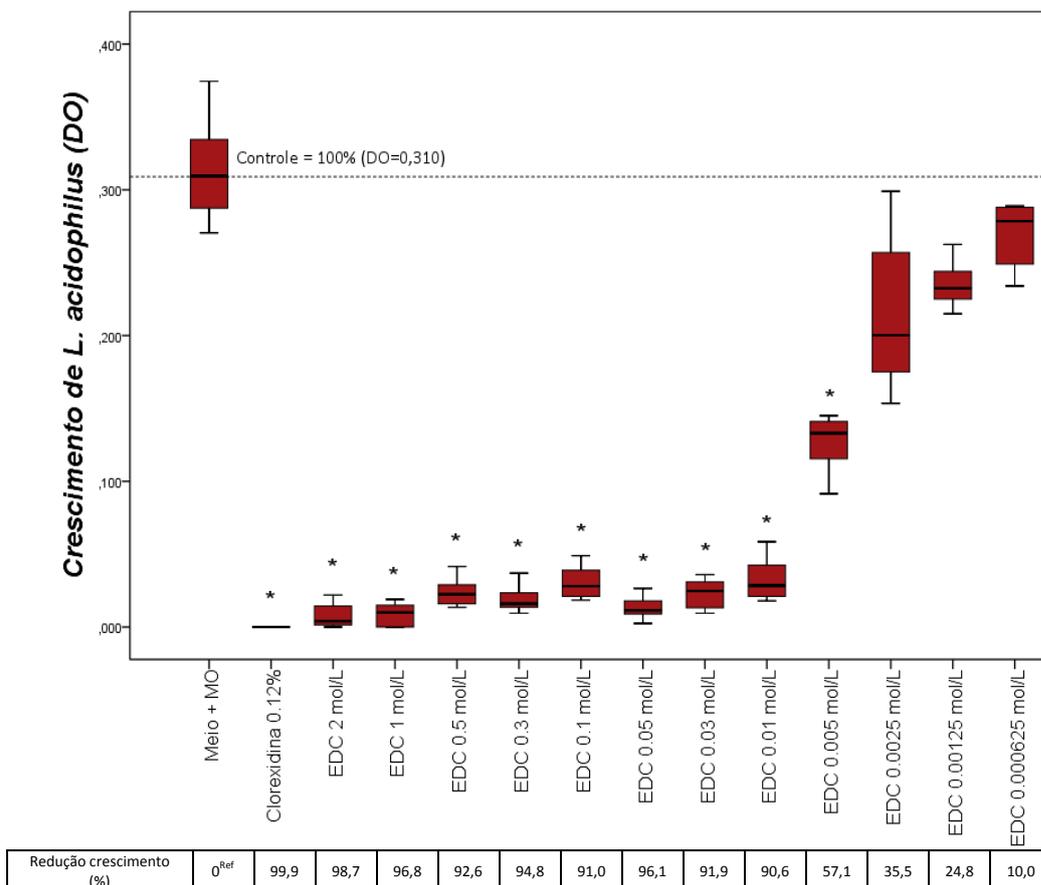


5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A concentração inibitória e bactericida mínima do EDC foram determinadas apenas para *Lactobacillus acidophilus*, uma vez que foi apenas contra este microrganismo que o EDC apresentou atividade antibacteriana. Os valores de absorbância (590 nm), representativos do crescimento de *L. acidophilus* na presença das diferentes concentrações de EDC estão apresentados na Figura 7. Em relação ao grupo controle (Meio + MO), o EDC resultou em redução significativa do crescimento bacteriano em todas as concentrações maiores ou igual a 0,005 mol/L. Entretanto, a menor concentração de EDC onde não foi observado turvamento do meio foi a de 0,01 mol/L, sendo considerada a concentração inibitória mínima de EDC sobre *L. acidophilus* quando em suspensão planctônica.

Em relação à concentração bactericida mínima (CBM), dentre as concentrações de EDC onde não foi observada turvação do meio, ausência de desenvolvimento de unidades formadoras de colônias (UFC), ou seja, de crescimento bacteriano, foi observada a partir da concentração de 0,03 mol/L. Portanto esta foi considerada como sendo a CBM para o EDC.

Figura 7 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Crescimento de *L. acidophilus* em suspensão planctônica (meio BHI) após contato com diferentes concentrações de EDC ou clorexidina a 0,12%. A linha horizontal pontilhada representa a densidade óptica (DO) detectada para o grupo controle, considerada como 100% de crescimento bacteriano. Grupos identificados com asterisco (*) diferem significativamente em relação ao controle meio+MO (Mann-Whitney, $p < 0,05$). Diagrama de caixas (*boxplot*) onde as extremidades inferiores e superiores das antenas representam o valor mínimo e máximo de cada grupo, respectivamente. O limite inferior das caixas indica o percentil 25 enquanto que o superior indica o percentil 75. As caixas contêm 50% dos dados de cada grupo (intervalo interquartílico) e a linha horizontal em seu interior representa a mediana, $n=9$.



Ref. Referência: Meio+MO (controle) = 100% de crescimento bacteriano

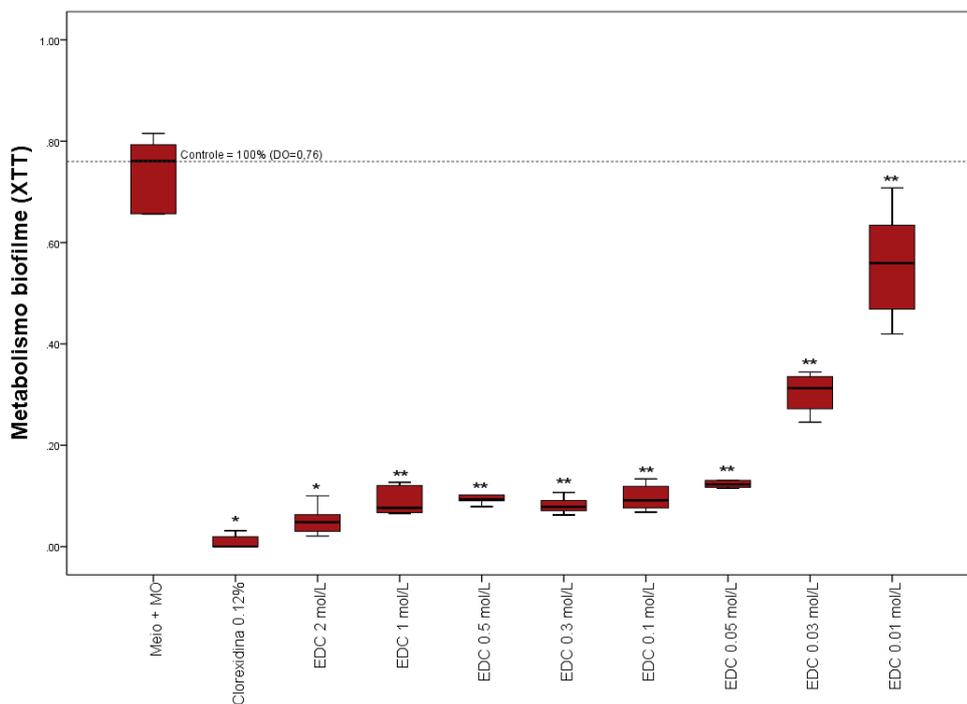
Substâncias

5.3 Metabolismo (ensaio de XTT) do Biofilme Monoespécie

A atividade antibacteriana das diferentes concentrações de EDC e da clorexidina contra *Lactobacillus acidophilus* em biofilme monoespécie está apresentada na Figura 8. Quando comparadas ao grupo controle (meio + MO), todas as concentrações de EDC, exerceram atividade antibacteriana significativa contra *Lactobacillus acidophilus*, reduzindo o metabolismo do biofilme de 26,3 a 93,4% (Figura 8). A clorexidina 0,12% foi a única substância que resultou em praticamente ausência de metabolismo do biofilme, redução de 99,9% em relação ao controle (Figura 8).

Considerando-se a atividade antibacteriana exercida pela clorexidina 0,12%, apenas o EDC na concentração de 2 mol/L exerceu efeito comparável, sem diferença estatística entre os grupos. Entretanto, embora diferentes da clorexidina, as concentrações de EDC maiores do que 0,03 mol/L foram capazes de reduzir o metabolismo do biofilme de *L. acidophilus* em mais de 80%, atividade antibacteriana esta bastante satisfatória.

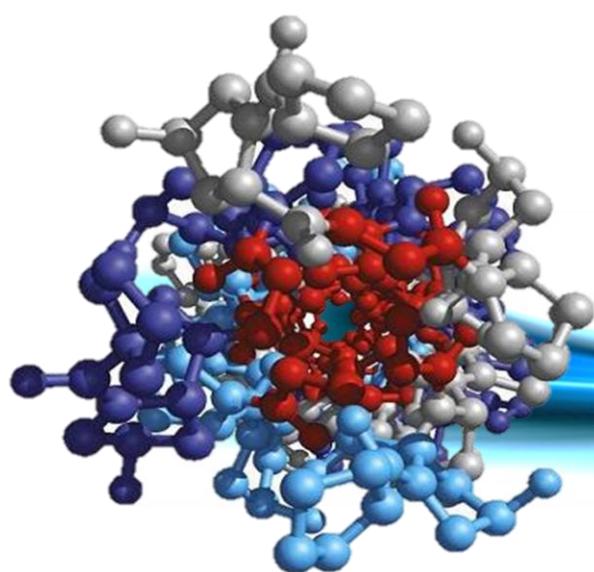
Figura 8 - Metabolismo de *Lactobacillus acidophilus* em biofilme monoespécie (ensaio de XTT) após contato com diferentes concentrações de EDC ou clorexidina a 0,12%. A linha horizontal pontilhada representa a densidade óptica (DO) detectada para o grupo controle meio+MO, considerada como 100% de metabolismo bacteriano. Grupos identificados com um asterisco (*) diferem significativamente em relação ao controle meio+MO, enquanto os identificados com dois asteriscos (**) diferem do controle e do grupo clorexidina 0,12% (Mann-Whitney, $p < 0,05$). Diagrama de caixas (*boxplot*) onde as extremidades inferiores e superiores das antenas representam o valor mínimo e máximo de cada grupo, respectivamente. O limite inferior das caixas indica o o percentil 25 enquanto que o superior indica o percentil 75. As caixas contêm 50% dos dados de cada grupo (intervalo interquartílico) e a linha horizontal em seu interior representa a mediana, $n=6$.



Redução metabolismo (%)	0 ^{Ref}	99,9	93,4	89,5	88,2	89,5	88,2	84,2	59,2	26,3
-------------------------	------------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Ref. Referência: Meio+MO (controle) = 100% de metabolismo

Substâncias



Discussão

6 Discussão

O teste de difusão em ágar é um método simples, por não exigir nenhum equipamento especial, rápido quanto à obtenção dos resultados, de fácil interpretação, baixo custo e que possibilita uma avaliação qualitativa (Jorgensen, Ferraro⁴³, 2009). Entretanto algumas de suas limitações implicam na impossibilidade de inferir se o resultado obtido para um determinado material refletiu seu efeito bactericida ou somente bacteriostático, além de ser difícil comparar dados de inibição bacteriana obtidos em diferentes estudos utilizando essa técnica, mesmo quando se trata do mesmo material, devido as variáveis envolvidas (Tobias et al.¹¹³, 1985), como o tipo de meio de cultura e o número de microrganismos inoculados. Apesar de suas limitações, este teste ainda é o mais utilizado para diagnóstico clínico de rotina e para fins de monitoramento de tratamentos antimicrobianos (Gould³¹, 2000). Além do mais, permite a triagem de microrganismos, substâncias e concentrações para análises posteriores utilizando-se métodos mais honerosos, porém mais sensíveis e específicos.

No presente estudo, os resultados do teste de difusão em ágar demonstraram que o EDC apresentou atividade antimicrobiana apenas contra *L. acidophilus*, em concentrações maiores do que 0,5 mol/L. Os *Lactobacillus* são considerados patógenos importantes, especialmente no desenvolvimento da lesão de cárie em dentina (Van Houte¹¹⁷, 1994; Simón-Soro et al.⁹⁶, 2013) e as espécies mais encontradas nessas lesões são *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus acidophilus* (Knight et al.⁴⁷, 2008). A análise metagenômica das comunidades bacterianas presentes em diferentes estágios do desenvolvimento da lesão de cárie demonstrou que em cavidades em dentina

ocorre uma superexpressão de genes que codificam para a tolerância ao estresse osmótico, assim como para colagenases e outras proteases que possibilitam a degradação do colágeno (Simón-Soro et al.⁹⁶, 2013). No mesmo estudo, foi demonstrado que espécies de *Lactobacillus* apenas apareceram em lesões profundas de cárie em dentina, ratificando o conceito de que os *Lactobacillus* não apresentam uma função fundamental no início da lesão de cárie, mas sim na sua progressão (Van Houte¹¹⁷, 1994).

Além da ação proteolítica exercida pelos *Lactobacillus* sobre a matéria orgânica da dentina, a produção de ácidos promovida por essas bactérias ativam MMPs dentinárias, as quais passam a ter uma função crucial na destruição tecidual (Tjäderhane et al.¹¹², 1998). Dessa forma, em lesões de cárie dentinária existe a somatória de mecanismos que culminam com a degradação do colágeno.

Somada à ação antibacteriana observada no presente estudo para o EDC contra *L. acidophilus*, este mesmo agente apresenta potencial de inibição de MMPs (Tezvergill-Mutluay et al.¹⁰⁷, 2012; Scheffel et al.⁹⁰, 2013; Mazzoni et al.⁶¹, 2013; Scheffel et al.⁹¹, 2014). Como inibidor de MMPs, o EDC tem sido estudado na concentração de 0,5 mol/L, aplicado sobre a dentina condicionada com ácido fosfórico pelos períodos clinicamente reproduzíveis de 30 e 60 segundos (Scheffel et al.⁹⁰, 2013; Scheffel et al.⁹¹, 2014). Entretanto, foi demonstrado que a CIM e CBM do EDC contra *L. acidophilus* é bastante inferior.

A CIM do EDC foi observada como sendo de 0,01 mol/L, enquanto que a CBM foi determinada como 0,03 mol/L. Apesar desses resultados, essas concentrações ainda não foram investigadas quanto a sua efetividade na inibição de MMPs e na

promoção de novas ligações peptídicas intra e inter-moléculas de colágeno, assim como, inter-fibrilas de colágeno. Essas são as propriedades que norteiam a utilização de agentes de ligações cruzadas nos procedimentos adesivos à dentina. Para essas finalidades, o EDC tem sido estudado principalmente na concentração de 0,5 mol/L, ou seja, em soluções 17 vezes mais concentradas do que a CBM demonstrada no presente estudo.

A utilização de biofilmes apresenta vários benefícios em comparação ao estudo da atividade antimicrobiana de agentes diversos contra microrganismos em suspensão planctônica. A diferença dos resultados obtidos em forma planctônica e em biofilme ocorre devido a essas células serem de 10-100 vezes mais resistentes a antimicrobianos em relação às células planctônicas (Blankenship, Mitchell⁸, 2006; Behlau et al.⁷, 2008). Essa resistência ocorre pela presença da matriz exopolimérica (Lehner et al.⁵¹, 2005) e assim o biofilme protege as células de inúmeros fatores de estresse ambiental, como calor, agentes antimicrobianos, detergentes ácidos, luz ultravioleta (UV), estresse osmótico, antibióticos, fagócitos e anticorpos (Lehner et al.⁵¹, 2005). Entretanto, mesmo quando em biofilme monoespécie, o EDC ainda apresentou atividade de redução significativa do metabolismo deste biofilme, em concentrações superiores ou igual a 0,05, ou seja, 10 vezes inferior a concentração atualmente investigada para sua atuação como inibidor da ação de MMPs e agente *cross-linker* (Scheffel et al.⁹⁰, 2013; Scheffel et al.⁹¹, 2014).

Uma vez que não existem informações na literatura sobre a atividade antimicrobiana do EDC, o exato mecanismo por meio do qual esse agente paraliza ou inibe o crescimento de *L. acidophilus* ainda não é conhecido. Estudos futuros são

necessários para comprovar e demonstrar esse mecanismo. Mesmo para a CLX, seu mecanismo de ação sobre os *Lactobacillus* não está completamente elucidado. Entretanto, sugere-se que ele ocorra sobre as camadas da superfície bacteriana, denominada de camada S (S-layer)

Partindo do mesmo pressuposto, pode ser sugerido que o EDC atue sobre as proteínas presentes nas camadas S dos *L. acidophilus*, resultando em rompimento dessas camadas. A ausência de atividade antimicrobiana sobre os demais microrganismos investigados no presente estudo poderia levantar a hipótese de uma composição celular diferente da presente nos *Lactobacillus*, uma vez que nos *Streptococcus* há a presença de peptidoglicanos, polissacarídeos, proteína e formas de glicerol (ácidos teicóicos e lipoteicóicos) (Hamada, Slade³³ 1980) e na *Candida albicans* há a presença de três polissacarídeos: quitina, β -gucanas e N-/O- mananas (Murciano et al.⁶⁹, 2011).

As camadas S são matrizes cristalinas compostas por numerosas e idênticas subunidades de proteínas e glicoproteínas unidas e ligadas à parede celular por ligações não covalentes (Sára, Sleytr⁸⁸ 2000) e responsáveis pela hidrofobia da superfície (Vadillo-Rodriguez et al.¹¹⁶, 2005). Podemos encontrar em espécies de bactérias Gram positivas e Gram negativas e em Archaea (Sára, Sleytr⁸⁸ 2000) e quando presentes, formam a camada mais externa da célula, sendo ocasionalmente coberta apenas por uma cápsula (Fouet et al.²⁷, 1999).

Suas funções em bactérias patogênicas são caracterizadas por contribuir para a virulência de vários mecanismos, incluindo adesão e coagregação (Shimotahira et al.⁹⁴, 2013), variação antigênica (Thompson¹⁰⁹, 2002), proteção de complemento ou de

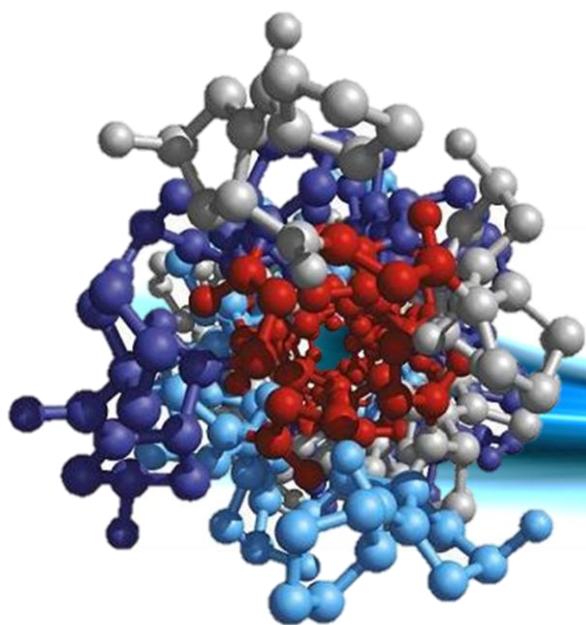
fagocitose (Thompson¹⁰⁹, 2002; Shimotahira et al.⁹⁴, 2013) ou modulação de respostas de células T ou citocinas (Sekot et al.⁹², 2011; Settem et al.⁹³, 2013). Além disso, protege a célula bacteriana de diversos fatores ambientais como radiação (Kotiranta et al.⁴⁸, 1999), peptídeos antimicrobianos (de la Fuente - Núñez et al.²², 2012), alterações no pH do ambiente (Gilmour et al.³⁰, 2000), bacteriófagos (Howard, Tipper⁴⁰, 1973), predadores microbianos bacterianos ou eucariotos (Tarao et al.¹⁰³, 2009), de enzimas bacteriolíticas (Lortal et al.⁵⁶, 1992) e algumas atuam como enzimas de degradação (Prado Acosta et al.⁸⁵, 2008). Especificamente nos *Lactobacillus*, possui funções adesivas, sendo que sua remoção pode reduzir a adesão dessas bactérias a diferentes alvos, função de proteção, por exemplo, ao suco gástrico, e mesmo contra a ação enzimática, mediada pela enzima mureína hidrolase na parede celular (Hynönen, Palva⁴¹, 2013).

As propriedades de agentes terapêuticos, incluindo-se os materiais e técnicas odontológicas, devem ser consideradas conjuntamente, uma vez que nenhum tratamento contempla todas as propriedades ideais. Desta forma, embora o EDC não tenha apresentado atividade antimicrobiana contra três dos quatro microrganismos investigados no presente estudo, associado ao seu efeito de controle/inibição de crescimento sobre *L. acidophilus*, esse agente promotor de ligações cruzadas tem sido enaltecido quanto a sua atuação na redução da degradação e no fortalecimento do colágeno da dentina desmineralizada (Bedran-Russo et al.⁶, 2010; Scheffel et al.⁹⁰, 2013; Scheffel et al.⁹¹, 2014; Tezvergil-Mutluay et al.¹⁰⁷, 2012). Adicionalmente, o EDC é capaz de reduzir a mobilidade molecular ao inativar as MMPs (Scheffel et al.⁹⁰, 2013), de aumentar o módulo de elasticidade e a temperatura de degradação do colágeno (Scheffel et al.⁹¹, 2014), melhorando desta forma a estabilidade longitudinal da união

resina-dentina, além de não apresentar citotoxicidade transdentinária sobre células odontoblastóides em concentrações de até 0,5 mol/L (Scheffel DLS, em fase de elaboração*).

Uma vez que *Lactobacillus* desempenham funções importantes no desenvolvimento de lesões de cárie em dentina (Simón-Soro et al.⁹⁶, 2013) e ativam MMPs presentes neste substrato por meio da produção de ácidos (Tjäderhane et al.¹¹², 1998), a potencial antibacteriano do EDC contra essas bactérias agrega mais uma propriedade positiva a este agente.

* Scheffel DLS, Bianchi L, Soares DG, Basso FG, Sabatini C, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Transdental cytotoxicity of carbodiimide (edc) and glutaraldehyde on odontoblast-like cells. Aceito para publicação no periódico *Operative Dentistry* no dia 19 de maio de 2014



Conclusão

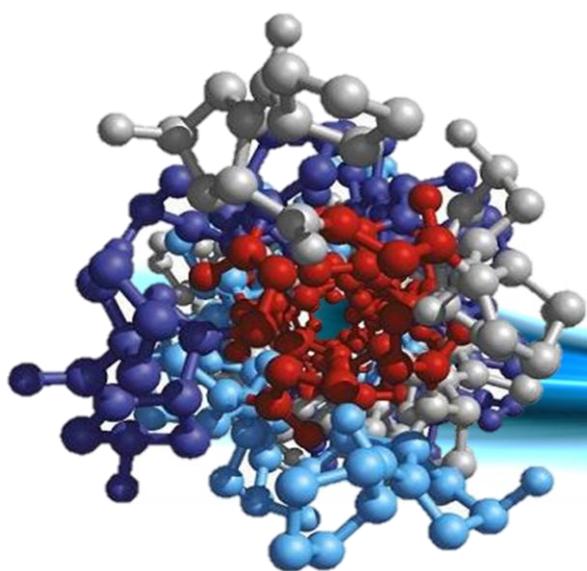
7 Conclusão

Dentro das limitações do estudo e de acordo com os resultados obtidos foi possível concluir que:

- quando o potencial antimicrobiano do EDC foi avaliado por meio do teste de difusão em ágar, o mesmo demonstrou ser capaz de exercer atividade apenas contra o crescimento de *L. acidophilus*;

- a concentração inibitória (CIM) e bactericida mínima (CBM) do EDC contra *L. acidophilus* em suspensão planctônica foram de 0,01 mol/L e de 0,03 mol/L, respectivamente;

- concentrações de EDC igual ou superiores a 0,05 mol/L foram capazes de reduzir o metabolismo de biofilme monoespécie de *L. acidophilus* em mais de 80%.



Referências

Referências*

1. Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlstrom A, Meurman JH, et al. Short-term consumption of probiotic - containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Arch Oral Biol.* 2002; 47(11): 799–804.
2. Al-Ammar A, Drummond JL, Bedran-Russo AK. The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 91(1): 419-24.
3. Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J.* 2007; 52(1 Suppl): S64–82.
4. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(3): 1001–9.
5. Bedran-Russo AK, Pashley DH, Agee K, Drummond JL, Miescke KJ. Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen cross-linkers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008; 86(2): 330-4.
6. Bedran-Russo AK, Vidal CM, Dos Santos PH, Castellan CS. Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomaterials* 2010; 94(1): 250-5.
7. Behlau I, Gilmore M. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. *Arch. Ophthalmol.* 2008; 126(11): 1572-81.
8. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 9(6): 588-94.
9. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans* derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011; 45(1): 69–86.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

10. Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dip A, Dipp FA, Mai S, et al. In vivo chlorhexidine stabilization of an acetone-based dentin adhesives. *Oper Dent.* 2009; 34(4): 381–5.
11. Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dip A, Sword RJ, Pashley DH. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Oper Dent.* 2007; 32(2): 107–11.
12. Bradshaw DJ, McKee AS, Marsh PD. Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities in vitro. *J Dent Res.* 1989; 68(9): 1298-302.
13. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Organização Pan-Americana de Saúde. Organização Mundial de Saúde. Projeto de monitoramento e prevenção da resistência microbiana em serviços de saúde. Brasília: ANVISA/OPAS/OMS; 2006. [acesso em 30 abril 2012]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/manual_testes_antimicrobianos.pdf
14. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater.* 2008; 24(1): 90-101.
15. Brown TA, Ahn SJ, Frank RN, Chen YYM, Lemos JA, Burne RA. A hypothetical protein of *Streptococcus mutans* is critical for biofilm formation. *Infect Immun.* 2005; 73(5): 3147–51
16. Carrilho MR. Can exogenous protease inhibitors control dentin matrix degradation? *J Dent Res.* 2012; 91(12): 1099-102.
17. Carrilho MRO, Geraldeli S, Tay FR, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res.* 2007; 86(6): 529–33.
18. Castellan CS, Bedran-Russo AK, Antunes A, Pereira PN. Effect of dentin biomodification using naturally derived collagen cross-linkers: one-year bond strength study. *Int J Dent.* 2013; 2013: 918010.

19. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res.* 2006; 85(1): 22–32.
20. Colby, SM, Russell RRB. Sugar metabolism by mutans streptococci. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser.* 1997; 26: 80S-88S.
21. de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DMP. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(11): 1024–8.
22. de la Fuente-Núñez C, Mertens J, Smit J, Hancock RE. The bacterial surface layer provides protection against antimicrobial peptides. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(15): 5452–6.
23. de Soet JJ, Toors FA, De Graaff J. Acidogenesis by oral streptococci at different pH values. *Caries Res.* 1989; 23(1): 14-7.
24. Dickinson DP. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13(3): 238–75.
25. Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001; 12(4): 331-49.
26. Fanchon S, Bourd K, Septier D, Fanchon S, Everts V, Beertsen W, et al. Involvement of matrix metalloproteinases in the onset of dentin mineralization. *Eur J Oral Sci.* 2007; 112(2): 171-6.
27. Fouet A, Mesnage S, Tosi-Couture E, Gounon P, Mock M. *Bacillus anthracis* surface: capsule and S-layer. *J Appl Microbiol.* 1999; 87(2): 251–5.
28. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6(3): 437-9.
29. Gibbons RJ, Cohen L, Hay DI. Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attached to different pellicle receptors. *Infect Immun.* 1986; 52(2): 555-6

30. Gilmour R, Messner P, Guffanti AA, Kent R, Scheberl A, Kendrick N, et al. Two-dimensional gel electrophoresis analyses of pH-dependent protein expression in facultatively alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 lead to characterization of an S-layer protein with a role in alkaliphily. *J Bacteriol.* 2000; 182(21): 5969–81.
31. Gould IM. Towards a common susceptibility testing method. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 45(6): 757-62.
32. Gregoire S, Xiao J, Silva BB, Gonzalez I, Agidi PS, Klein MI, 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.* 2011; 77(18): 6357–67.
33. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* 1980; 44(2): 331-84.
34. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 2007; 65(1): 1-13.
35. Harrington DJ. Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. *Infect Immun.* 1996; 64(6): 1885-91.
36. Hashimoto M, Ohno H, Endo K, Kaga M, Sano H, Oguchi H. The effect of hybrid layer thickness on bond strength: demineralized dentin zone of the hybrid layer. *Dent Mater.* 2000; 16(6): 406-11.
37. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res.* 2005; 84(8): 741–6.
38. Hirasawa M, Takada K. A new selective medium for *Streptococcus mutans* and the distribution of *S. mutans* and *S. sobrinus* and their serotypes in dental plaque. *Caries Res.* 2003; 37(3): 212-7.
39. Hirose H, Hirose K, Isogai E, Miura H, Ueda I. Close association between *Streptococcus sobrinus* in the saliva of young children and smooth-surface caries increment. *Caries Res.* 1993; 27(4): 292-7.

40. Howard L, Tipper DJ. A polypeptide bacteriophage receptor: modified cell wall protein subunits in bacteriophage-resistant mutants of *Bacillus sphaericus* strain P-1. *J Bacteriol.* 1973; 113(3): 1491–504.
41. Hynönen U, Palva A. *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013; 97(12): 5225-43.
42. Jakubovics NS, Stromberg N, van Dolleweerd CJ, Kelly CG, Jenkinson HF. Differential binding specificities of oral streptococcal antigen I/II family adhesins for human or bacterial ligands. *Mol Microbiol.* 2005; 55(5): 1591-605.
43. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis.* 2009; 49(11): 1749-55.
44. Kafienah W, Brömme D, Buttle DJ, Croucher LJ, Hollander AP. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem J.* 1998; 331(Pt3): 727–32.
45. Kagan HM, Ryvkin F. *Lysyl oxidase and lysyl oxidase-like enzymes. The extracellular matrix: an overview.* New York: Springer; 2011.
46. Klinke T, Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T. Dental caries in rats associated with *Candida albicans*. *Caries Res.* 2011; 45(2): 100–6.
47. Knight GM, McIntyre JM, Craig GG, Mulyani, Zilm PS. The inability of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* to form a biofilm in vitro on dentine pretreated with ozone. *Aust Dent J.* 2008, 53(4): 349-53.
48. Kotiranta AK, Ito H, Haapasalo MP, Lounatmaa K. Radiation sensitivity of *Bacillus cereus* with and without a crystalline surface protein layer. *FEMS Microbiol Lett.* 1999; 179(2): 275–80.
49. Kukacka J, Prusa R, Kotaska K, Pelouch V. Matrix metalloproteinases and their function in myocardium. *Biomed Papers.* 2005; 149(2): 225-36.
50. Lai G, Li M. The possible role of *Candida albicans* in the progression of dental caries. *Int Res J Microbiol.* 2011; 2: 504–6.

51. Lehner A, Riedel K, Eberl L, Breeuwer P, Diep B, Stephan R. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. *J Food Prot.* 2005; 68: 2287-94.
52. Lima CA, Rodrigues PMB, Porto TS, Viana DA, Lima Filho JL, Porto ALF, et al. Production of a collagenase from *Candida albicans* URM3622. *Biochem Eng J.* 2009; 43: 315–20.
53. Liu KZ, Hynes A, Man A, Alsagheer A, Singer DL, Scott DA. Increased local matrix metalloproteinase-8 expression in the periodontal connective tissues of smokers with periodontal disease. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1762(8): 775-80.
54. Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, et al. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res.* 2011; 90(8): 953-68.
55. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Ver.* 1986; 50(4): 353-80.
56. Lortal S, van Heijenoort J, Gruber K, Sleytr UB. S-layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046: isolation, chemical characterization and reformation after extraction with lithium chloride. *J Gen Microbiol.* 1992; 138: 611–8.
57. Madison KM, Bowen WH, Pearson SK, Falany JL. Enhancing the virulence of *Streptococcus sobrinus* in rats. *J Dent Res.* 1991; 70(1): 38-43.
58. Makihiro S, Nikawa H, Tamagami M, Hamada T, Nishimura H, Ishida K, et al. Bacterial and *Candida* adhesion to intact and denatured collagen in vitro. *Mycoses.* 2002; 45(9-10): 389-92.
59. Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol.* 2000; 45(9): 757-65.

60. Matee MIN, Mikx FHM, Maselle SYM, Van Palenstein Helderman WH. Mutans streptococci and Lactobacilli in breast-fed children with rampant caries. *Caries Res.* 1992; 26(3): 183—7.
61. Mazzoni A, Angeloni V, Apolonio FM, Scotti N, Tjäderhane L, Tezvergil-Mutluay A, et al. Effect of carbodiimide (EDC) on the bond stability of etch-and-rinse adhesive systems. *Dent Mater.* 2013; 29(10): 1040-7.
62. Mazzoni A, Papa V, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, Ruggeri A, et al. Immunohistochemical and biochemical assay of MMP-3 in human dentine. *J Dent.* 2011; 39(3): 231-7.
63. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials.* 2006; 27(25): 4470-6.
64. Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A, et al. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res A.* 2009; 88(3): 697-703.
65. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12(1): 147-79.
66. Mei ML, Chu CH, Low KH, Che CM, Lo EC. Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with *S. mutans* and *L. acidophilus* dual-species cariogenic biofilm. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013; 18(6): 824-31.
67. Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS Pathog.* 2013; 9(10): 1003-16.
68. Moalic E, Gestalin A, Quinio D, Gest PE, Zerilli A, Le Flohic AM. The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. *Caries Res.* 2001; 35(2): 149–55.

69. Murciano C, Moyes DL, Runglall M, Islam A, Mille C, Fradin C, et al. *Candida albicans* cell wall glycosylation may be indirectly required for activation of epithelial cell proinflammatory responses. *Infect Immun*. 2011; 79(12): 4902-11.
70. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Sci*. 1982; 16(3): 265–73.
71. Nakabayashi N, Watanabe A, Arao T. A tensile test to facilitate identification of defects in dentine bonded specimens. *J Dent*. 1998; 26(4): 379-85.
72. Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldeli S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *J Dent Res*. 2011; 90(4): 506-11.
73. Nemeth JA, Yousif R, Herzog M, Che M, Upadhyay J, Shekarriz B, et al. Matrix metalloproteinase activity, bone turnover, and tumor proliferation in prostate cancer bone metastasis. *J Nat Cancer Inst*. 2002; 94(1): 17-25.
74. Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque – past and recent concerns. *J Dent*. 1998; 26(4): 299–304.
75. Nikawa H, Yamashiro H, Makihira S, Nishimura M, Egusa H, Furukawa M, et al. In vitro cariogenic potential of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2003; 46(11-12): 471–8.
76. Ogawa K, Yamashita Y, Ichijo T, Fusayama T. The ultrastructure and hardness of the transparent layer of human carious dentin. *J Dent Res*. 1983; 62(1): 7-10.
77. Okada M, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J, Miura K, et al. Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children. *J Med Microbiol*. 2005; 54(Pt7): 661-5.
78. Olde Damink LH, Dijkstra PJ, van Luyn MJ, van Wachem PB, Nieuwenhuis P, Feijen J. In vitro degradation of dermal sheep collagen cross-linked using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials*. 1996; 17(7): 679-84.
79. Olde Damink LH, Dijkstra PJ, van Luyn MJ, van Wachem PB, Nieuwenhuis P,

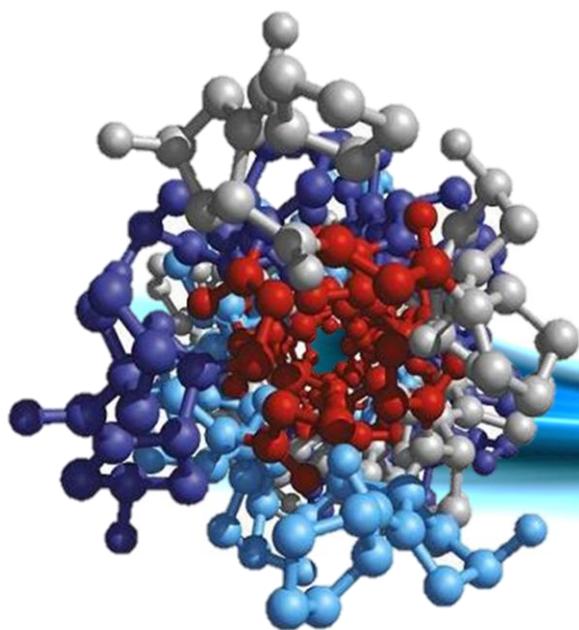
- Feijen J. Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials*. 1996; 17(8): 765-73.
80. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2011; 27(1): 1–16.
81. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res*. 2004; 83(3): 216–21.
82. Patel M, Naidoo R, Owotade FJ. Inhibitory effect of *dodonaea viscosa* var. *angustifolia* on the virulence properties of the oral pathogens *streptococcus mutans* and *porphyromonas gingivalis*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; 2013: 624089.
83. Perdigão J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. *J Esthet Restor Dent*. 2013; 25(4): 219-41.
84. Prado Acosta M, Mercedes Palomino M, Allievi MC, Sanchez Rivas C, Ruzal SM. Murein hydrolase activity in the surface layer of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74(24): 7824–7.
85. Ricci HA, Sanabe ME, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin-dentin bonds. *Eur J Oral Sci*. 2010; 118(4): 411-6.
86. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods*. 1991; 142(2): 257-65.
87. Sára M, Sleytr UB. S-layer proteins. *J Bacteriol*. 2000; 182(4): 859–8.
88. Scaffa PM, Vidal CM, Barros N, Gesteira TF, Carmona AK, Breschi L, et al. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *J Dent Res*. 2012; 91(4): 420-5.
89. Scheffel D, Hebling J, Scheffel R, Agee K, Turco G, de Souza Costa C, et al. Inactivation of matrix-bound matrix metalloproteinases by cross-linking agents in

- acid-etched dentin. *Oper Dent.* 2013 Jun 20. [Epub ahead of print].
90. Scheffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee KA, Cadenaro M, Turco G, et al. Stabilization of dentin matrix after cross-linking treatments, in vitro. *Dent Mater.* 2014; 30(2): 227-33.
 91. Sekot G, Posch G, Messner P, Matejka M, Rausch-Fan X, Andrukhov O, et al. Potential of the *Tannerella forsythia* S-layer to delay the immune response. *J Dent Res.* 2011; 90(1): 109–14.
 92. Settem RP, Honma K, Nakajima T, Phansopa C, Roy S, Stafford GP, et al. A bacterial glycan core linked to surface (S)- layer proteins modulates host immunity through Th17 suppression. *Mucosal Immunol.* 2013; 6(2): 415–26.
 93. Shimotahira N, Oogai Y, Kawada-Matsuo M, Yamada S, Fukutsuji K, Nagano K, et al. The S-layer of *Tannerella forsythia* contributes to serum resistance and oral bacterial co-aggregation. *Infect Immun.* 2013; 81(4): 1198-206.
 94. Signoretto C, Burlacchini G, Faccioni F, Zanderigo M, Bozzola N, Canepari P. Support for the role of *Candida* spp. in extensive caries lesions of children. *New Microbiol.* 2009; 32(1): 101–7.
 95. Simón-Soro A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Alcaraz LD, Mira A. A tissue-dependent hypothesis of dental caries. *Caries Res.* 2013; 47(6): 591-600.
 96. Söderström M, Salminen H, Glumoff V, Kirschke H, Aro H, Vuorio E. Cathepsin expression during skeletal development. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1446(6): 35–46.
 97. Spencer P, Wang Y, Katz JL. Identification of collagen encapsulation at the dentin/adhesive interface. *J Adhes Dent.* 2004; 6(2): 91-5.
 98. Suci P, Young M. Selective killing of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* by ciprofloxacin during development of a dual species biofilm with *Streptococcus sanguinis*. *Arch Oral Biol.* 2011; 56(10): 1055–63.
 99. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjaderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res.*

- 2002; 81(9): 603-7.
100. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Tjaderhane L. Matrix metalloproteinase 8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(2): 121-7.
 101. Sung HW, Chang WH, Ma CY, Lee MH. Crosslinking of biological tissues using genipin and/or carbodiimide. *J Biomed Mater Res A.* 2003; 64(3): 427–38.
 102. Tarao M, Jezbera J, Hahn MW. Involvement of cell surface structures in size-independent grazing resistance of freshwater Actinobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(14): 4720–6.
 103. Teanpaisan R, Piwat S, Dahlen G. Inhibitory effect of oral lactobacillus against oral pathogens. *Lett Appl Microbiol.* 2011; 53(4): 452–9.
 104. Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Pääkkönen V, Martins MT, et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod.* 2010; 36(3): 475–81.
 105. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Uchiyama T, Imazato S, Mutluay MM, Cadenaro M, et al. The inhibitory effects of quaternary ammonium methacrylates on soluble and matrix-bound MMPs. *J Dent Res.* 2011; 90(4): 535-40.
 106. Tezvergil-Mutluay A, Mutluay MM, Agee KA, Seseogullari-Dirihan R, Hoshika T, Cadenaro M, et al. Carbodiimide cross-linking inactivates soluble and matrix-bound MMPs, in vitro. *J Dent Res.* 2012; 91(2): 192-6.
 107. Thein ZM, Smaranayake YH, Smaranayake LP. Dietary sugars, serum and the biocide chlorhexidine digluconate modify the population and structural dynamics of mixed *Candida albicans* and *Escherichia coli* biofilms. *APMIS.* 2007; 115(11): 241-51.
 108. Thompson SA. *Campylobacter* surface-layers (S-layers) and immune evasion. *Ann Periodontol.* 2002; 7(1): 43–53.
 109. Timkovich R. Detection of the stable addition of carbodiimide to proteins. *Anal Biochem.* 1977; 79(1-2): 135-43.

110. Tirali RE, Gulsahi K, Cehreli SB, Karahan ZC, Uzunoğlu E, Elhan A. Antimicrobial efficacy of octenidine hydrochloride, MTAD and chlorhexidine gluconate mixed with calcium hydroxide. *J Contemp Dent Pract.* 2013; 14(3): 456-60.
111. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinase in dentin matrix during breakdown in carious lesions. *J Dent Res.* 1998; 77(8): 1622–9.
112. Tobias RS, Browne RM, Wilson CA. Antibacterial activity of dental restorative Materials. *Int Endod J.* 1985; 18(3): 161-71.
113. Toledano M, Nieto-Aguilar R, Osorio R, Campos A, Osorio E, Tay FR, et al. Differential expression of matrix metalloproteinase-2 in human coronal and radicular sound and carious dentine. *J Dent.* 2010; 38(8): 635-40.
114. Twetman S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Res.* 2004; 38(3): 223-9.
115. Vadillo-Rodriguez V, Busscher HJ, van der Mei HC, de Vries J, Norde W. Role of Lactobacillus cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2005; 41(1): 33-41.
116. Van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res.* 1994; 73(3): 672-81.
117. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Circ Res.* 2003; 92(8): 827–39.
118. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res.* 2003; 82(2): 141-5.
119. Wen ZT, Yates D, Ahn SJ, Burne RA. Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 111.

120. Yamakoshi Y, Hu JC, Fukae M, Zhang H, Simmer JP. Dentin glycoprotein: the protein in the middle of the dentin sialophosphoprotein chimera. *J Biol Chem.* 2005; 280(17): 17472-9.
121. Yamauchi M. Collagen biochemistry: an overview. In: Phillips GO, editor. *Advances in tissue banking.* New Jersey: World Scientifica; 2000. v.6, p. 455-500.
122. Yamauchi M, Shiiba M. Lysine hydroxylation and cross-linking of collagen. *Methods Mol Biol.* 2008; 446: 95–108.
123. Yoshiyama M, Urayama A, Kimochi T, Matsuo T, Pashley DH. Comparison of conventional vs. self-etching adhesive bonds to caries-affected dentin. *Oper Dent.* 2000; 25(3): 163–9.
124. Zeeman R, Dijkstra PJ, Van Wachem PB, Van Luyn MJ, Hendriks M, Cahalan PT, et al. Successive epoxy and carbodiimide cross-linking of dermal sheep collagen. *Biomaterials.* 1999; 20(10): 921–31.
125. Zhang S-C, Kern M. The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *Int J Oral Sci.* 2009; 1(4): 163–76.
126. Zheng L, Hilton JF, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. Dentin caries activity status related to hardness and elasticity. *Eur J Oral Sci.* 2003; 111(3): 243- 52.
127. Zhu WM, Liu W, Wu DQ. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* kt7. *J Appl Microbiol.* 2000; 88(5): 877–86.



Apêndice

Apêndice

I. Solução salina de tampão fosfato (PBS)

Solução A

1. Pré aquecer a balança por 30 min
2. Pesar NaCl 4 g, KH_2PO_4 0,12 g, KCl 0,1 g
3. Pegar 200 mL de água Milli-Q com uma proveta e colocar em um Becker.
4. Levar ao agitador com um peixinho
5. Inserir os reagentes e esperar dissolver
6. Colocar esta solução novamente na proveta, completar com água Milli-Q (até 250 mL) e homogeneizar
7. Levar para uma garrafa e identificá-la como solução A

Solução B

1. Pré aquecer a balança por 30 min
2. Pesar Na_2HPO_4 0,72 g
3. Pegar 200 mL de água Milli-Q com uma proveta e colocar em um Becker.
4. Levar ao agitador com um peixinho
5. Inserir o reagente e esperar dissolver
6. Colocar esta solução novamente na proveta, completar com água Milli-Q (até 250 mL) e homogeneizar
7. Levar para uma garrafa e identificá-la como solução B

Autoclavar as soluções. Dentro do fluxo, juntar as soluções A e B e homogeneizar

Identificar a garrafa final como PBS

II. Solução Tampão Sorensen

Solução A (0,1 M) - Na_2HPO_4

Diluir 1,42 g do pó em 100 mL de água destilada

Solução B (0,1 M) - NaH_2PO_4

Diluir 3,60 g do pó em 300 mL de água destilada

Para 500 mL de solução tampão Sorensen misturar 12,5 mL da solução A + 237,50 mL da solução B + 250 mL de água destilada

Medir o pH (deve ficar em torno de 6,2), e depois autoclavar

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservados ao autor)
Araraquara, 26 de março de 2014
Renata Pereira Estrêla