



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Veronica Canela Estevam dos Santos

Efeito do oxigênio ativo sobre biofilme de *Streptococcus mutans*

Araraquara
2023



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Veronica Canela Estevam dos Santos

Efeito do oxigênio ativo sobre biofilme de *Streptococcus mutans*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do grau de Cirurgião-dentista.

Orientador: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

Araraquara
2023

S237e Santos, Veronica Canela Estevam dos
Efeito do oxigênio ativo sobre biofilme de Streptococcus mutans / Veronica Canela Estevam dos Santos. -- Araraquara, 2023
32 f. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Odontologia)
- Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Denise Madalena Palomari Spolidorio

1. Streptococcus mutans. 2. Biofilmes. 3. Agentes infecciosos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).


Essa ficha não pode ser modificada.

**UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara**

Veronica Canela Estevam dos Santos

Efeito do oxigênio ativo sobre biofilme de *Streptococcus mutans*

Orientador: Prof (a) Dr (a) Denise Madalena Palomari Spolidorio

Assinatura Orientador (a): 

Assinatura Aluno (a): *Veronica Canela E. dos Santos*

Araraquara, 28 de Fevereiro de 2023.

Dedico este trabalho de conclusão de curso aos meus avós, paternos e maternos: Francisco Estevam dos Santos, Jandira Gonçalves dos Santos, Sebastião Brás Canela e Susana Rosa Canela. Foram eles os meus maiores incentivadores, pessoas das quais eu me orgulho e que me esforço deveras para que também sintam orgulho de mim. Essa dedicatória se faz em especial para meus dois avós, que hoje não estão mais fisicamente em minha vida, mas que junto de Deus seguem me protegendo e guiando meus passos.

O presente estudo também é dedicado em memória de uma amiga querida, Vívian M. Tellaroli Rodrigues Minhaco, para que ela, mesmo em espírito, saiba que fez parte da minha formação acadêmica e pessoal, e que sempre será lembrada por mim com estima e carinho.

Ofereço este tratado acadêmico também a minha enteada Luiza Moraes Taveira, minha luta diária é para que um dia eu consiga realizar todos os seus sonhos, e pra que possamos trilhar juntas um caminho de muito sucesso e felicidade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Susete Susana Canela e Mauricio Estevam dos Santos, que viveram comigo o sonho de ingressar e vivenciar a Universidade Pública em todos os seus aspectos.

À minha orientadora Denise Madalena Palomari Spolidorio, que acreditou no meu potencial e me abriu as portas desse universo tão grandioso que é a pesquisa.

À minha co-orientadora Patricia Milagros Maquera Huacho, que dividiu comigo seus conhecimentos e foi uma grande mentora e amiga durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao meu namorado, Marcelo Eduardo Menezes Taveira, que me apoiou em toda minha trajetória sendo um grande suporte emocional para mim.

À minha irmã, Marieta Canela Estevam dos Santos, que sempre se fez presente durante minha caminhada acadêmica apesar da distância.

À minha dupla de faculdade e de vida Leticia Pereira Lima Durão, que dividiu comigo dias tristes e alegres da nossa trajetória Universitária, e sempre esteve ao meu lado.

Às minhas colegas de apartamento Leticia de Freitas Carvalho e Milena da Silva Gimenes, que me acolheram e tornaram os dias difíceis mais felizes e leves.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2019/25534-4) pelo apoio financeiro essencial para realização desse estudo de pesquisa.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos”^{1*}

^{1*} Marie Curie, conforme citado em “Our Precarious Habitat” (1973), por Melvin A. Bernarde

Santos VCE. Efeito do oxigênio ativo sobre biofilme *Streptococcus mutans*
[Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação em Odontologia]. Araraquara:
Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

RESUMO

Este estudo avaliou a capacidade antimicrobiana do colutório BlueM[®] contra a bactéria *Streptococcus mutans* e sua influência na expressão do gene *gbpA*, bem como seu efeito citotóxico em células fibroblásticas. O BlueM[®] apresentou atividade antimicrobiana, com valores de MIC e MBC de 0,005% e 0,01%, respectivamente. O MBIC foi de 6,25% para *S. mutans*. A contagem de CFU e a microscopia confocal revelaram efeito significativo do BlueM[®] no biofilme de *S. mutans* pré-formado nas superfícies dentinárias. Curiosamente, a análise da expressão do gene *gbpA* indicou uma diminuição na expressão do gene após 15 min de tratamento com BlueM[®] na concentração de 25%, como também exibiu baixos níveis de citotoxicidade. Em conclusão, nossos resultados mostraram a eficácia antimicrobiana de BlueM[®] contra *S. mutans*, além de sua capacidade de modular a expressão do gene *gbpA* e sua baixa citotoxicidade. Este estudo suporta o potencial terapêutico do BlueM[®] como um agente alternativo para o controle do biofilme oral

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*. Biofilmes. Agentes infecciosos.

Santos VCE. Effect of active oxygen on *Streptococcus mutans* biofilm [Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

ABSTRACT

This study evaluated the antimicrobial capacity of BlueM[®] mouthwash against the bacterium *Streptococcus mutans* and its influence on gbpA gene expression as well as its cytotoxic effect on fibroblast cells. BlueM[®] showed antimicrobial activity, with MIC and MBC values of 0.005% and 0.01%, respectively. The MBIC was 6.25% for *S. mutans*. CFU count and confocal microscopy revealed significant effect of BlueM[®] on *S. mutans* biofilm pre-formed on dentin surfaces. Interestingly, the analysis of gbpA gene expression, indicated a decrease in gene expression after 15 min of treatment with BlueM[®] at a concentration of 25%. Moreover, BlueM[®] exhibited low levels of cytotoxicity. In conclusion, our results showed the antimicrobial effectiveness of BlueM[®] against *S. mutans*, its ability to modulate the expression of the gbpA gene and its low cytotoxicity. This study supports the therapeutic potential of BlueM[®] as an alternative agent for the control of oral biofilm.

Keywords: *Streptococcus mutans*. Biofilms. Anti-infective agents.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 PROPOSIÇÃO	11
2.1 Objetivos específicos.....	11
3 PUBLICAÇÃO	12
3.1 Publicação 1	12
4 DISCUSSÃO	24
5 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS.....	29
ANEXO A.....	32

1 INTRODUÇÃO

Novas substâncias estão sendo desenvolvidas para atuar no controle do biofilme e na prevenção e progressão de patologias orais como a cárie e a doença periodontal. Entre esses produtos está o BlueM[®], que possui em sua formulação um composto à base de oxigênio, mel e outros compostos. O oxigênio é importante para o meio bucal porque libera energia para reações químicas e funções celulares, como a respiração, mantendo o equilíbrio redox e prevenindo distúrbios de homeostase na cavidade oral¹. Em relação ao mel, sua ação antimicrobiana sugere uma possível produção de hidrogênio, peróxido e outros fatores, incluindo alto teor de açúcar, levando a alguns fatores osmóticos e conseqüentemente causando desidratação bacteriana e baixo pH².

Apesar de várias abordagens terem sido utilizadas na tentativa de reduzir a incidência de cárie dentária, esta doença ainda é considerada uma das mais onipresentes e dispendiosas doenças bucais dependentes do biofilme em todo o mundo³. Lesões de cárie não tratadas podem ter importantes conseqüências na saúde bucal. Portanto, a tendência é caminhar para a prevenção e, são vários os alvos onde a profilaxia pode surtir efeito⁴. Um dos principais responsáveis pela formação de biofilme cariogênico tanto no esmalte quanto na dentina são bactérias⁵. Entre elas podemos citar o *Streptococcus mutans*, que está associado à etiologia da cárie dentária, causando destruição de estruturas dentárias duras (esmalte, dentina e cimento) pela ação de bactérias acidogênicas/acidúricas^{6,7}. É amplamente aceito que o potencial cariogênico do *Streptococcus mutans* está associado principalmente à sua capacidade de sintetizar grandes quantidades de polímeros glucanos extracelulares da sacarose, que permitem a colonização permanente dos dentes e a formação in situ de matriz polimérica extracelular⁸.

Uma vez que a adesão bacteriana é um importante evento precoce na colonização bacteriana das estruturas dentárias, diferentes moléculas de adesão foram caracterizadas para espécies bacterianas. Nesse processo, enzimas extracelulares de glicosiltransferase (Gtfs) proteínas de ligação a glucano (gbps) e frutossiltransferase (fff) são produzidos por *S. mutans*. Entre eles, gbps são fatores de virulência diretamente relacionados à capacidade do *S. mutans* de formar biofilme dental. Mais especificamente, o gene gbpA está envolvido na formação de biofilme durante o processo cariogênico, pela adesão a estrutura dental e o acúmulo de microorganismos no biofilme, resultando em seu crescimento⁹.

Clinicamente, o uso de enxaguatórios bucais que contenham flúor, álcoois e agentes antimicrobianos (sejam químicos ou naturais) são recomendados para auxiliar no controle e redução dos biofilmes dentários. Para ser ideal, esses agentes antimicrobianos devem ser eficazes contra microrganismos, agir rapidamente, manter a atividade em baixas concentrações, não apresentar efeitos colaterais e ser usado sem causar nenhum desconforto¹⁰. Apesar de ter um excelente desempenho controle químico, a clorexidina – que é considerado o padrão ouro para redução de patógenos orais – pode promover alterações na cor dos dentes, descamação e alteração da mucosa oral, sensibilidade e alteração de paladar^{11,12}.

Levantamentos epidemiológicos mostram que a exposição da dentina à cavidade oral está se tornando comum à medida que a população envelhece¹³. Nesse sentido, é crescente o interesse em avaliar o efeito antibiofilme e antibacteriano de novos produtos na formação de biofilme em dentina. Por isso, o colutório BlueM® apresenta-se como uma alternativa aos métodos convencionais de controle de biofilme. No entanto, suas propriedades e mecanismos de ação no biofilme cariogênico ainda não são esclarecidas na literatura. Sendo assim, o objetivo deste estudo é investigar a potencial ação antimicrobiana deste produto contra a formação de biofilme de *S. mutans* e sua capacidade de influenciar na expressão do gene *gbpA*. Além disso, a biocompatibilidade deste colutório também é avaliada em fibroblastos.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito do oxigênio ativo (BlueM[®]) na formação do biofilme e na expressão do fator de virulência do gene *gbpA* envolvido na aderência de *Streptococcus mutans*, bem como sua citotoxicidade frente a fibroblastos.

2.1 Objetivos específicos

- A. Determinar o efeito antimicrobiano de diferentes concentrações do BlueM[®] sobre *Streptococcus mutans* na forma planctônica e biofilme.
- B. Avaliar o efeito antibiofilme sobre biofilmes pré-formados de *Streptococcus mutans* em discos de dentina.
- C. Avaliar o fator de virulência *gbpA* em *S. mutans* na presença do BlueM[®], por PCR em tempo real.
- D. Avaliar efeito citotóxico frente a fibroblastos.

3 PUBLICAÇÃO

A partir do Projeto intitulado “Efeito do oxigênio ativo sobre biofilme de *Streptococcus mutans*”, financiado pela “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)” (processo: 2019/25534-4), foi elaborado artigo científico intitulado “Effects of BlueM[®] against *Streptococcus mutans* biofilm and its virulence gene expression” aceito para publicação no periódico Brazilian Dental Journal, da editora Scielo.

3.1 Publicação 1*

“Effects of BlueM[®] against *Streptococcus mutans* biofilm and its virulence gene expression”

Veronica Canela Estevam dos Santos, Patricia Milagros Maquera Huacho, Maria Júlia Mancim Imbriani, Vívian M. Tellaroli Rodrigues Minhaco, Denise M. Palomari Spolidorio.

Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araraquara (Unesp), Rua Humaitá, 1680, Araraquara, São Paulo 14801-903, Brasil.

RESUMO

Este estudo avaliou a capacidade antimicrobiana do colutório BlueM[®] contra a bactéria *Streptococcus mutans* e sua influência na expressão do gene *gbpA*, bem como seu efeito citotóxico em células fibroblásticas. O BlueM[®] apresentou atividade antimicrobiana, com valores de MIC e MBC de 0,005% e 0,01%, respectivamente. O MBIC foi de 6,25% para *S. mutans*. A contagem de CFU e a microscopia confocal revelaram efeito significativo do BlueM[®] no biofilme de *S. mutans* pré-formado nas superfícies dentinárias. Curiosamente, a análise da expressão do gene *gbpA* indicou uma diminuição na expressão do gene após 15 min de tratamento com BlueM[®] na

* Artigo publicado no periódico *Brazilian Dental Journal*.
Cf. Braz. Dent. J. 34 (1) • Jan-Feb 2023. <https://doi.org/10.1590/0103-6440202305133>

concentração de 25%, como também exibiu baixos níveis de citotoxicidade. Em conclusão, nossos resultados mostraram a eficácia antimicrobiana de BlueM[®] contra *S. mutans*, além de sua capacidade de modular a expressão do gene *gbpA* e sua baixa citotoxicidade. Este estudo suporta o potencial terapêutico do BlueM[®] como um agente alternativo para o controle do biofilme oral.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*. Biofilme. Agente Antimicrobiano

INTRODUÇÃO

Novas substâncias estão sendo desenvolvidas para atuar no controle do biofilme e na prevenção e progressão de patologias orais como a cárie e a doença periodontal. Entre esses produtos está o BlueM[®], que possui em sua formulação um composto à base de oxigênio, mel e outros compostos. O oxigênio é importante para o meio bucal porque libera energia para reações químicas e funções celulares, como a respiração, mantendo o equilíbrio redox e prevenindo distúrbios de homeostase na cavidade oral¹. Em relação ao mel, sua ação antimicrobiana sugere uma possível produção de hidrogênio, peróxido e outros fatores, incluindo alto teor de açúcar, levando a alguns fatores osmóticos e conseqüentemente causando desidratação bacteriana e baixo pH².

Apesar de várias abordagens terem sido utilizadas na tentativa de reduzir a incidência de cárie dentária, esta doença ainda é considerada uma das mais onipresentes e dispendiosas doenças bucais dependentes do biofilme em todo o mundo³. Lesões de cárie não tratadas podem ter importantes conseqüências na saúde bucal. Portanto, a tendência é caminhar para a prevenção e, são vários os alvos onde a profilaxia pode surtir efeito⁴. Um dos principais responsáveis pela formação de biofilme cariogênico tanto no esmalte quanto na dentina são bactérias⁵. Entre elas podemos citar o *Streptococcus mutans*, que está associado à etiologia da cárie dentária, causando destruição de estruturas dentárias duras (esmalte, dentina e cimento) pela ação de bactérias acidogênicas/acidúricas^{6,7}. É amplamente aceito que o potencial cariogênico do *Streptococcus mutans* está associado principalmente à sua capacidade de sintetizar grandes quantidades de polímeros glucanos extracelulares da sacarose, que permitem a colonização permanente dos dentes e a formação in situ de matriz polimérica extracelular⁸.

Uma vez que a adesão bacteriana é um importante evento precoce na colonização bacteriana das estruturas dentárias, diferentes moléculas de adesão foram caracterizadas para espécies bacterianas. Nesse processo, enzimas extracelulares de glicosiltransferase (Gtfs) proteínas de ligação a glucano (gbps) e frutossiltransferase (ftf) são produzidos por *S. mutans*. Entre eles, gbps são fatores de virulência diretamente relacionados à capacidade do *S. mutans* de formar biofilme dental. Mais especificamente, o gene *gbpA* está envolvido na formação de biofilme durante o processo cariogênico, pela adesão a estrutura dental e o acúmulo de microorganismos no biofilme, resultando em seu crescimento⁹.

Clinicamente, o uso de enxaguatórios bucais que contenham flúor, álcoois e agentes antimicrobianos (sejam químicos ou naturais) são recomendados para auxiliar no controle e redução dos biofilmes dentários. Para ser ideal, esses agentes antimicrobianos devem ser eficazes contra microorganismos, agir rapidamente, manter a atividade em baixas concentrações, não apresentar efeitos colaterais e ser usado sem causar nenhum desconforto¹⁰. Apesar de ter um excelente desempenho controle químico, a clorexidina – que é considerado o padrão ouro para redução de patógenos orais – pode promover alterações na cor dos dentes, descamação e alteração da mucosa oral, sensibilidade e alteração de paladar^{11,12}.

Levantamentos epidemiológicos mostram que a exposição da dentina à cavidade oral está se tornando comum à medida que a população envelhece¹³. Nesse sentido, é crescente o interesse em avaliar o efeito antibiofilme e antibacteriano de novos produtos na formação de biofilme em dentina. Por isso, o colutório BlueM[®] apresenta-se como uma alternativa aos métodos convencionais de controle de biofilme. No entanto, suas propriedades e mecanismos de ação no biofilme cariogênico ainda não são esclarecidas na literatura. Sendo assim, o objetivo deste estudo é investigar a potencial ação antimicrobiana deste produto contra a formação de biofilme de *S. mutans* e sua capacidade de influenciar na expressão do gene *gbpA*. Além disso, a biocompatibilidade deste colutório também é avaliada em fibroblastos.

MATERIAL E MÉTODOS

Soluções

BlueM[®] foi obtido diretamente do fabricante, na sua formulação original. Foram preparadas soluções diluídas em BHI (Brain Heart Infusion, Acumedia, Lansing, MI,

USA) nas concentrações 50% - 0.002%. A clorexidina (CHX) 0,12% foi utilizada como controle positivo e o meio de cultura BHI, como controle negativo.

Atividade Antimicrobiana

Cepa bacteriana e condições de crescimento

Foi utilizado neste estudo a cepa de referência de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). As culturas foram previamente preparadas em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion, Acumedia, Lansing, MI, USA) suplementado com extrato de levedura (Yeast Extract Powder, Himedia, Vadhani, MB, IND), mantido em jarra de microaerofilia por 18 h a 37 °C. Posteriormente, o material resultante teve sua turbidez ajustada com o auxílio do espectrofotômetro (Eppendorf AG, 22331 Hamburg, Germany), até atingir absorvância 0,2 em 600 nm correspondente a uma suspensão de trabalho de 1×10^7 UFC ml⁻¹.

Determinação da Concentração inibitória mínima (MIC) e Concentração bactericida mínima (MBC)

Foi realizado o método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (MIC) em placa de microtitulação de 96 poços (TPP, Switzerland). Utilizando-se técnicas assépticas, cada poço recebeu separadamente o volume de 100 µL de BHI acrescido das diluições de BlueM[®] (50%- 0,02%) e 5 µL da suspensão de *S. mutans* numa concentração final de 1×10^7 UFC mL⁻¹ em cada poço. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. e em seguida quantificada em leitor SYNERGY a 600 nm (GEN52.07). Para a Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos orifícios que não mostraram crescimento visível, ou seja, DO 600nm ≤ 0.05, foram retirados 10 µL das amostras e plaqueadas em meio de cultura Mitis Salivarius Agar (Agar Mitis Salivarius, Himedia, Vadhani, MB, IND) e mantidas a 37 °C por 48 h. O MBC foi definido como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e experimentos independentes.

Concentração mínima para inibição de biofilme (CIMB)

Biofilme de *S. mutans* foi formado em placas de microtitulação de 96 poços (n = 9). Inicialmente, para formação da película adquirida, foi adicionado 50 µL de

saliva humana/poço estéril, as placas incubadas a 37 °C sob agitação de 70 rpm por 1 h. Após este período, a saliva foi removida. Posteriormente, foram adicionados 200 µL da suspensão bacteriana correspondendo a 1×10^5 CFU/mL do *S. mutans* para formação de biofilme. As placas foram armazenadas em jarras de microaerofilia por 48 h e o meio gasto foi renovado após 24 h. Após 48 h de incubação o meio foi aspirado e foram adicionados a cada poço 200 µL das concentrações de BlueM® previamente preparadas nas seguintes concentrações: 50% até 0,01%. As placas foram incubadas em condições de microaerofilia a 37 °C durante 24 h. Após incubação, o biofilme resultante foi avaliado pelo Teste Cristal Violeta.

Efeito do Blue M em biofilme formado sobre disco de dentina

Previamente foram obtidos discos de dentina (8.0mm x 3.0mm x 1,5mm) a partir de coroas de incisivos bovinos. Os discos foram polidos e submetidos a avaliação da rugosidade superficial (Ra) pelo rugosímetro portátil (Mitutoyo surfest SJ-401, Mitutoyo Corporation, Japão). Em seguida, solução de EDTA 0,5 M (pH 7,2) foi aplicada, seguida por hipoclorito de sódio 5,25 %, solução de ácido cítrico 6% e água deionizada esterilizada com objetivo de remoção da smear layer e limpeza dos túbulos dentinários. Os discos foram distribuídos em grupos experimentais e controle, por meio da aleatorização por restrição. Posteriormente os discos foram embalados e enviados para esterilização por meio de gás de óxido de etileno (Acecil- Centro de Esterelização Comercio e Industria LTDA).

Utilizando uma pinça estéril, discos de dentina foram posicionados em placa de cultura celular de 48 poços. Para formação da película adquirida, foram adicionados 200 µL de saliva humana estéril/poço e as etapas seguintes foram desenvolvidas como descrito anteriormente. Em seguida, foram adicionados aos poços 500 µL de microrganismo previamente ajustado (1×10^5 CFU/mL), e incubada durante 24 h, para a formação do biofilme. Após este período o meio com microrganismos não aderidos foi aspirado delicadamente, e 500 µL por poço da solução de BlueM® nas concentrações de 50%, 25% e 12,5% (selecionadas a partir dos resultados do CIMB) foram adicionados durante 60 segundos para o tratamento do biofilme formado. Posteriormente, os discos foram lavados delicadamente com solução salina, e o biofilme resultante foi avaliado por Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL).

Análise por microscopia confocal de varredura a laser

Os biofilmes crescidos sobre discos de dentina e tratados com diferentes concentrações de BlueM[®] como descrito anteriormente, foram corados com o kit Live/Dead BacLight Bacterial Viability (L7012, Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, foi preparada uma solução estoque em PBS estéril contendo 12 µL da solução SYTO 9 e 12 µL da solução de Iodeto de Propídio. Em seguida, foram adicionados 750 µL da solução homogeneizada em cada poço, permanecendo em contato com os corpos de prova durante 15 minutos à 37°C e protegido da luz. As amostras foram posicionadas sobre uma lamínula, deixando a superfície a ser analisada em contato com a mesma, o que possibilitou a análise do biofilme por microscopia. Os comprimentos de onda de excitação/emissão foram 488/500 nm para SYTO 9 e 488/635 nm para Iodeto de Propídio. A fluorescência das células coradas foi visualizada por MCVL (LSM 780 invertido, Zeiss, Jena, Alemanha) e as imagens adquiridas com o software ZEN 2012 (Zeiss) com uma resolução de 1.024 por 1.024 pixels. As imagens de um único plano focal do biofilme foram capturadas pelo sistema com uma lente de ampliação de 20x. A área selecionada para a análise do biofilme foi definida aleatoriamente, mas de forma que não seja tão próxima às bordas dos corpos de prova

Análise da expressão do fator de virulência do gene *gbpA* envolvido na aderência de *S. mutans*

Para investigar a influência do tratamento com BlueM[®] na expressão gênica de *gbpA*, *S. mutans* foi cultivado em 40 mL de meio BHI suplementado com extrato de levedura até sua fase mid-log ($DO_{600} S. mutans = 0,45$). Em seguida 2,5 mL dos microrganismos crescidos foram transferidos para tubos falcon e concentrações de BlueM[®] (50% e 25%) foram adicionadas no volume de 2,5 mL, e os tubos incubados durante 15 e 30 minutos a 37 °C. Como controle negativo foram utilizadas células sem tratamento (meio de cultura) e como controle positivo células tratadas com CHX 0.12%.

Após o tempo de incubação, a cultura bacteriana foi centrifugada (5000 rpm, 5 minutos), o sobrenadante descartado e 500 µL de novo meio de cultura foi adicionado, com o intuito de ressuspender o pellet do microrganismo. As células bacterianas foram então tratadas durante 5 minutos com RNAprotect Bacteria (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), seguido por centrifugação (5000 rpm, 10 minutos) (Bordini et al., 2018). Foi

realizada a lise celular, isolamento e purificação do RNA utilizando RNeasy minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) segundo o protocolo do fabricante. As quantidades de RNAm foram quantificadas com o aparelho Synergy H1 (Biotek, Winooski, VT, USA) e o RNAm de cada amostra (100 ng/mL) foi transcrito de forma reversa em termociclador utilizando o High Capacity cDNA Reverse Transcriptions Kit (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA), seguindo as recomendações do fabricante.

Os cDNAs obtidos foram utilizados nas reações de PCR tempo real para determinação da quantidade relativa de RNAm do gene alvo *gbpA* e o gene constitutivo 16S rRNA de cada microrganismo, utilizado como controle interno para normalização dos dados. Os primers utilizados para o RT-qPCR foram adquiridos da Life Technologies Inc. (São Paulo, SP, Brasil) e estão listados na Tabela 1.

As reações foram preparadas com 20 µL da mistura de PCR contendo 10 µL de Fast SYBR™ Green Master Mix, 5 µL de cDNA, 1 µL de cada primer específico e 3 µL água livre de DNase e RNase. As amostras foram amplificadas utilizando o equipamento StepOnePlus Real time PCR system (Applied biosystems). As condições de amplificação foram: 95 °C por 20 segundos, seguido por 40 ciclos a 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos. Os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes e um conjunto representativo de dados é apresentado.

Tabela 1. Primers para a análise de RT-qPCR de *S. mutans*

Genes	Sequência de primers	Tamanho (pb)	Referências
16S rRNA <i>S. mutans</i>	5'-CCATGTGTAGCGGTGAAATGC-3' 5'-TCATCGTTTACGGCGTGGAC-3'	144	Bordini et al. ⁹
<i>gbpA</i>	5'-CGCCAATAGTTCTCCAGCCGAT-3' 5'-CGAACCAGCGACTGCTGCA-3'	154	Bordini et al. ⁹

Citotoxicidade

Cultura Celular

Linhagem celular de Fibroblastos (L929) foram cultivadas e mantidas em meio de cultura Dulbecco's Medium (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)

suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, EUA) e 1% de penicilina, estreptomicina e glutamina (100 UT/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina (Gibco, Grand Island, NY, EUA) em atmosfera umidificada a 5% de CO₂ a 37°C. As células foram sub-cultivadas até obtenção de número adequado de células para o estudo.

Citotoxicidade em Fibroblastos (L929)

Fibroblastos L929 foram cultivados em placas de 96 poços (2 x 10⁴ células/poço) e mantidos em incubadora umidificada por 24 h. Previamente, foram preparadas concentrações de BlueM[®] de 50 % – 0,04% em DMEM com 1% de soro fetal bovino inativado. Após o período de 24 h, foi adicionado a cada poço 100 µL das concentrações de BlueM[®] e a placa incubada por 2 h. Camptotecina 10 µM foi utilizada como controle positivo. Após o período teste, os efeitos citotóxicos foram avaliados utilizando o ensaio de MTT (metiltetrazolium) para análise do metabolismo celular.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados usando o GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.). O objetivo das análises foi comparar os resultados de cada desfecho de acordo com as diferentes concentrações do BlueM[®] por meio de ANOVA com teste post-hoc de Tukey para comparações pareadas. O nível de significância foi estabelecido em 95% ($p < 0,05$) em todas as análises. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes.

RESULTADOS

Atividade antibacteriana e inibição do biofilme

A Tabela 2 mostra os valores de CIM, MBC e MBIC de BlueM[®] testados em culturas planctônicas e biofilme de *S. mutans*. As diluições seriadas de BlueM[®] (50% - 0,002%) foram analisadas e *S. mutans* foi sensível ao BlueM[®] com valores de CIM e MBC de 0,005% e 0,01%, respectivamente. A concentração mínima para inibição de biofilme (CMIB) do BlueM[®] capaz de inibir o crescimento do biofilme. A atividade antimicrobiana do BlueM[®] foi analisada pelo teste de cristal violeta obtendo CMIB a partir da concentração de 6,25%, indicando redução microbiana do BlueM[®].

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Mínima de inibição de biofilme (CIM) de BlueM® em *S. mutans*

Microrganismo	BlueM®		
	CIM (%)	MBC (%)	MBIC (%)
<i>S. mutans</i>	0.005	0.01	6.25

Análise antimicrobiana do BlueM® sobre biofilme pré-formado em corpos de prova

O efeito antimicrobiano do BlueM® foi avaliado sobre corpos de prova de dentina após 60 segundos de tratamento. A Figura 1 mostra que concentrações de 50% e 25% de BlueM® apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa no número de microrganismos viáveis quando comparado ao grupo controle negativo sem tratamento. Entretanto, a concentração de 12,5% não apresentou diminuição estatisticamente significativa ($p>0,05\%$). Surpreendentemente, o tratamento com clorexidina 0,12% não apresentou uma redução significativa quando comparada ao grupo controle negativo.

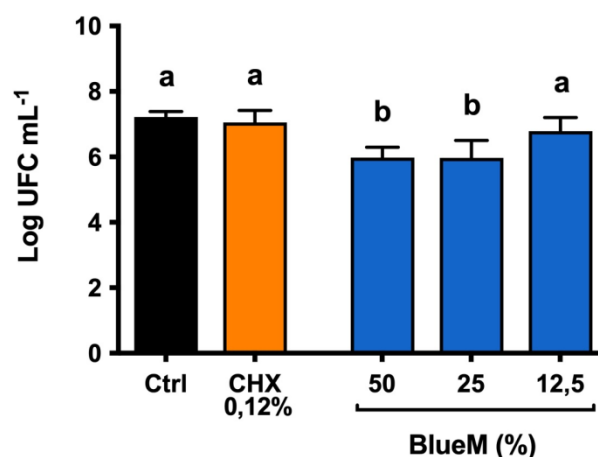


Figura 1. Efeito do BlueM® sobre biofilme de *S. mutans* (ATCC 25175) crescido em superfícies de dentina bovina. As contagens de bactérias após cada tratamento são expressas em logaritmo de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro. Diferenças estatísticas estão representadas por diferentes letras para comparação entre tratamentos (ANOVA One-way seguido pelo teste de Tukey, $p<0.05$).

Análise por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

A Figura 2 ilustra a avaliação do biofilme formado em dentina por MCVL. Os microrganismos viáveis apresentam-se corados em verde e os não viáveis corados em tom amarelo-avermelhado. A Figura 2A corresponde ao controle negativo, a qual apresenta uma massa homogênea de microrganismos viáveis. Na Figura 2B, referente a CHX 0,12%, nota-se coloração mais amarelada, indicando menor viabilidade das células. No que diz respeito aos grupos correspondentes ao BlueM[®], observa-se um efeito dose-dependente, onde há um aumento da redução da viabilidade após o tratamento com concentrações maiores de BlueM[®]. Assim, observa-se a predominância da coloração alaranjada que indica uma redução da viabilidade dos microrganismos, após o tratamento com BlueM[®] 50 % (Figura 2C) e nas imagens que se referem as concentrações de 25% e 12,5 % de BlueM[®] (Figura 2D e 2E) nota-se maior quantidade de bactérias viáveis representadas pela cor verde.

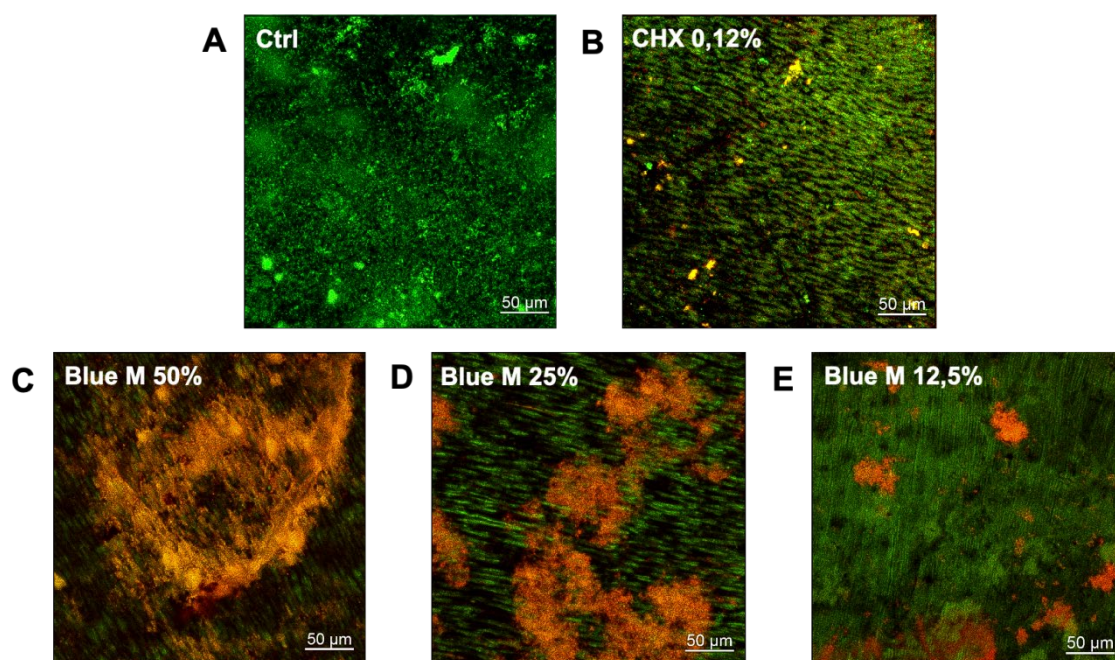


Figura 2. Imagens de microscopia confocal de varredura a laser da ação do BlueM[®], sobre biofilme de *S. mutans* ATCC 25175 desenvolvido em corpos de prova de dentina. Controle Negativo (A), Clorexidina 0,12% (B), BlueM[®] 50% (C), BlueM[®] 25% (D) e BlueM[®] 12,5% (E).

Análise da expressão do fator de virulência do gene *gbpA* envolvido na aderência de *S. mutans*

A expressão do fator de virulência do gene *gbpA*, que está relacionado a adesão bacteriana e formação de biofilme dental pelo *S. mutans* foi avaliada após tratamento por 15 e 30 minutos com concentrações de BlueM[®] de 50% e 25%. Na figura 3 pode-se observar que após o tratamento com as concentrações testes de BlueM[®] por 15 e 30 minutos houve uma redução altamente significativa na expressão do gene *gbpA* (** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Da mesma forma, clorexidina 0,12% apresentou uma redução significativa na expressão do gene após ambos períodos avaliados (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$).

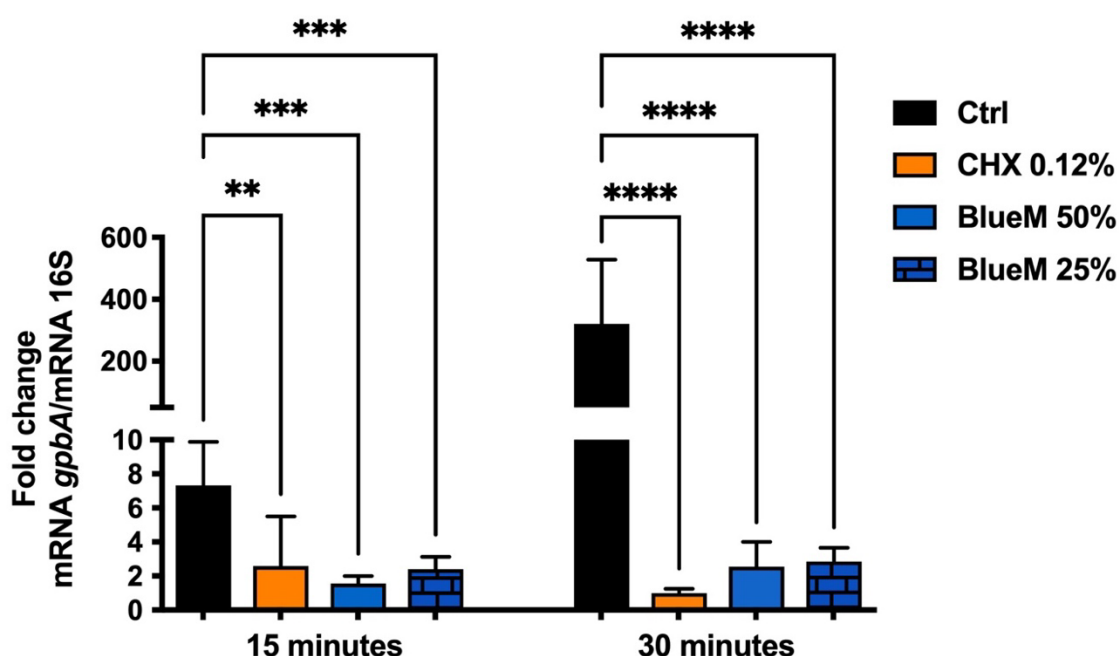


Figura 3. Efeito do BlueM[®], sobre a expressão de mRNA do gene *gbpA* envolvido na adesão e formação do biofilme de *S. mutans* (ATCC 25175). Os resultados estão expressos em médias \pm DP de ensaios em triplicata para três experimentos independentes (ANOVA/teste de Tukey, $\alpha = 0,05$). \square indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle para cada período de avaliação (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Avaliação da citotoxicidade do BlueM[®]

Os efeitos citotóxicos do BlueM[®] estão expostos na Figura 4. Pode-se observar que concentrações de 50% a 0,78% de BlueM[®] apresentaram diminuição

estatisticamente significativa ($p < 0,01\%$) na viabilidade das células após o tempo de tratamento, quando comparados ao grupo controle. Contudo as concentrações de 0,39% a 0,04% não apresentaram diminuição estatisticamente significativa na viabilidade celular ($p > 0,01\%$).

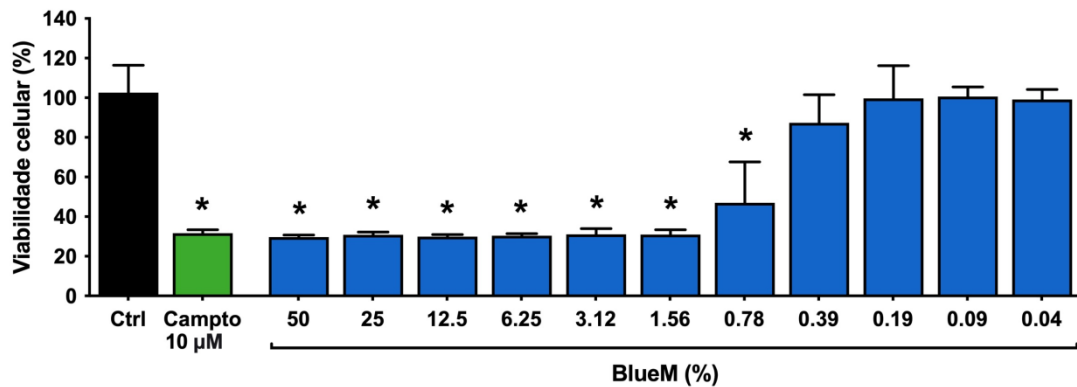


Figura 4. Viabilidade celular (% do controle) de fibroblastos L929 após 2h de exposição com diferentes concentrações de BlueM®, (50% - 0,04% v/v) e camptotecina 10 µM utilizado como controle positivo. *, indica redução da viabilidade celular estatisticamente significativa comparada ao grupo controle (ANOVA One-way seguido pelo teste de Tukey, $p < 0,001$).

4 DISCUSSÃO

O uso de métodos complementares de higienização oral, tais como os enxaguantes bucais, associados aos métodos tradicionais, vem sendo amplamente estudados a fim de entender os possíveis mecanismos para o controle de bactérias patogênicas da cavidade bucal. No presente estudo mostrou-se o efeito antimicrobiano do BlueM[®] contra *S. mutans*. Até o momento não existem estudos científicos demonstrando a efetividade desse produto sobre bactérias cariogênicas, apenas sobre *Porphyromonas gingivalis*, bactéria relacionada a doença periodontal¹⁴. No entanto, o Blue M[®] atribui seu potencial antimicrobiano principalmente ao oxigênio ativo presente em sua formulação e se apresenta como uma alternativa no que se refere ao combate de microrganismos¹⁵.

A cárie dentária é uma doença multifatorial, ou seja, seu surgimento depende de vários fatores tais como presença de biofilme e dieta e se apresenta como uma doença dinâmica, que resulta em perda líquida de minerais dos tecidos dentais¹⁶. As principais bactérias associadas são o *L. acidophilus* e *S. mutans*, que na presença de carboidratos fermentáveis, liberam, como produto metabólico, ácido na superfície dental¹⁷. Neste contexto, o potencial cariogênico do *S. mutans* está relacionado com três características principais do mesmo: 1. capacidade de sintetizar grande quantidade de polímeros extracelulares, como o glucano; 2. Capacidade de converter em ácidos orgânicos uma ampla gama de carboidratos; 3. capacidade de sobreviver frente a estresse ambiental, principalmente no que se refere a baixo pH⁸.

Os resultados apresentados no presente estudo, mostram o efeito antimicrobiano do BlueM[®] contra *S. mutans*. Não existem estudos na literatura sobre o potencial antimicrobiano do BlueM[®] contra bactérias cariogênicas tais como *S. mutans* em estado planctônico. Os resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CMB), mostram valores de 0.005% e 0.01%. Desta forma, baixas concentrações de BlueM[®] foram capazes tanto de inibir o crescimento bacteriano, quanto apresentar ação bactericida. Como já descrito, o Blue M[®] contém em sua composição oxigênio ativo^{14,15}, logo os mecanismos de ação dessas partículas podem elucidar os resultados obtidos, pois essas moléculas tem como mecanismo de ação antimicrobiano a interação com grupos tiol de enzimas, proteínas, DNA e parede celular de bactérias¹⁸.

No processo de formação de biofilme, as superfícies dos dentes são imediatamente recobertas por mucoproteínas salivares formando a película adquirida, a qual é um fator imperativo para a adesão bacteriana através de ligações iônicas, inicialmente fracas, mas que se fortalecem através da interação entre moléculas bacterianas¹⁹. Assim, no presente estudo foi utilizada saliva humana não estimulada para formação de biofilme, com o objetivo de simular uma condição clínica. A avaliação de Concentração Mínima para Inibição de Biofilme (CMIB) foi utilizado como um teste preliminar para determinar a menor concentração capaz de inibir 50% da formação do biofilme de *S. mutans*²⁰. Apesar do teste de cristal violeta ser considerado um teste quantitativo que avalia a biomassa do biofilme, esse tem sido comumente utilizado como um método de avaliação para determinar a redução e/ou inibição de um biofilme^{21,22}. Os resultados apresentados sugerem que Blue M[®] 6,25% é capaz de reduzir o biofilme de *S. mutans* e estão de acordo com os resultados apresentados em diversos trabalhos^{14,15} que indicam, por meio de estudos in vivo e in vitro, que o oxigênio ativo possui ação antibacteriana.

Colonizadores primários no biofilme são predominantemente Gram-positivos do gênero *Streptococcus*, os quais favorecem uma colonização secundária de bactérias tornando o biofilme mais complexo e maduro^{23,24}. Como observado nos resultados de Análise Antimicrobiana do BlueM[®] sobre Biofilme Pré-formado em Corpos de Prova (UFC/mL) e imagens de Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLSM), os resultados mostraram redução estatisticamente significativa após o tratamento com BlueM[®] sobre biofilme de *S. mutans* crescido em superfícies de dentina bovino. Neste contexto, podemos sugerir que o efeito antimicrobiano do Blue M[®] é devido ao seu principal composto, o oxigênio ativo, essencial cofator para a formação de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, substrato para a geração de espécies reativas ao oxigênio (EROs). As espécies reativas de oxigênio (EROs), são moléculas que contem O₂ em sua estrutura e que foram, por meio da adição de elétrons, reduzidas adquirindo formato radical altamente reativo²⁵. Adicionalmente, as EROs consistem em moléculas apolares que tem a capacidade de se difundirem rapidamente através de membranas celulares típicas, por meio da água²⁶. Portanto, possuem alta capacidade antimicrobiana frente bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, bem como atuam na prevenção da formação de biofilme²⁵.

Estudos prévios têm demonstrado efeito antimicrobiano contra *S. mutans* após o tratamento com Clorexidina²⁷⁻²⁹. Supreendentemente, no presente estudo CHX 0.12% não mostrou redução estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle negativo. Tendo em consideração que na forma de biofilme, os microrganismos tornam-se mais resistentes comparados a sua forma planctônica, devido a trocas metabólicas inter e intraespécies; assim como o tipo de superfícies onde o biofilme é aderido; pode ser sugerido que, considerando a presença de exopolissacarídeos no biofilme, estes poderiam dificultar a penetração de produtos antimicrobianos tais como a Clorexidina³⁰.

Um dos mecanismos pelo qual o fator de virulência influencia no processo de colonização de *S. mutans* é o fato de o microrganismo expressar alguns genes que auxiliam no acúmulo e crescimento bacteriano na superfície dental³¹. *S. mutans* sintetiza três proteínas de ligação ao glucano sem atividades enzimáticas conhecidas *gbpA*, *gbpB* e *gbpC*³². As propriedades associadas à virulência destes genes específicos são bem estudadas. No entanto, o *gbpA* é o principal representante desse grupo sendo um gene glucano dependente que atua na adesão bacteriana e coesão durante a formação de biofilme³¹. Os glucanos extracelulares promovem aderência e são críticos para aumentar a concentração de *S. mutans* no biofilme bacteriano³³. No presente estudo, qPCR foi realizado para investigar o efeito do Blue M[®] na expressão do gene relacionado a adesão de *S. mutans*. Esta análise mostrou que o tratamento do biofilme de *S. mutans* com Blue M[®] reduz a expressão de *gbpA*, o que nos leva a sugerir que as mudanças na virulência resultam ou podem influenciar nas mudanças da estrutura do biofilme. Neste contexto, Jang et al.³⁴ sugerem que a expressão do gene *gbpA* pode estar correlacionado com a quantidade de microrganismos presentes no biofilme, diminuindo assim sua expressão conforme redução do número de microrganismos.

A biocompatibilidade de um produto destinado para o tratamento ou prevenção de infecções orais é um parâmetro chave a se considerar. Desta forma testes de citotoxicidade do Blue M[®] foram realizados sobre células tipo fibroblastos. Estas células foram selecionadas devido ao fato de serem tipos celulares que se encontram dentro da composição da mucosa oral, a qual é a primeira barreira com a qual um colutório entra em contato. Concentrações baixas de Blue M[®] mostraram-se não citotóxicas para as células. Justificando-se pelo fato de que o oxigênio ativo em altas

concentrações promove morte celular, contudo em concentrações baixas o mesmo é capaz de regular a colonização microbiana, a resposta imune e a função celular^{18,25}.

O presente estudo trata-se de um estudo inédito. Não existem estudos preliminares que relatem a eficácias do Blue M[®] sobre bactérias cariogênicas. Portanto testes adicionais in vivo e in vitro são necessários para corroborar e elucidar o seu mecanismo de ação, assim como sua eficácia no tratamento da cárie.

5 CONCLUSÕES

- Com base nos achados do presente estudo, pode-se demonstrar que o Blue M[®] usado como enxaguante bucal possui efeito antimicrobiano contra o *S. mutans*, promovendo efeitos bactericidas, bacteriostáticos, antibiofilme e não citotóxico em baixas concentrações.

- O Blue M[®] foi capaz de reduzir a expressão do gene *gfpA*, interferindo na capacidade de adesão do *S. mutans*.

REFERÊNCIAS*

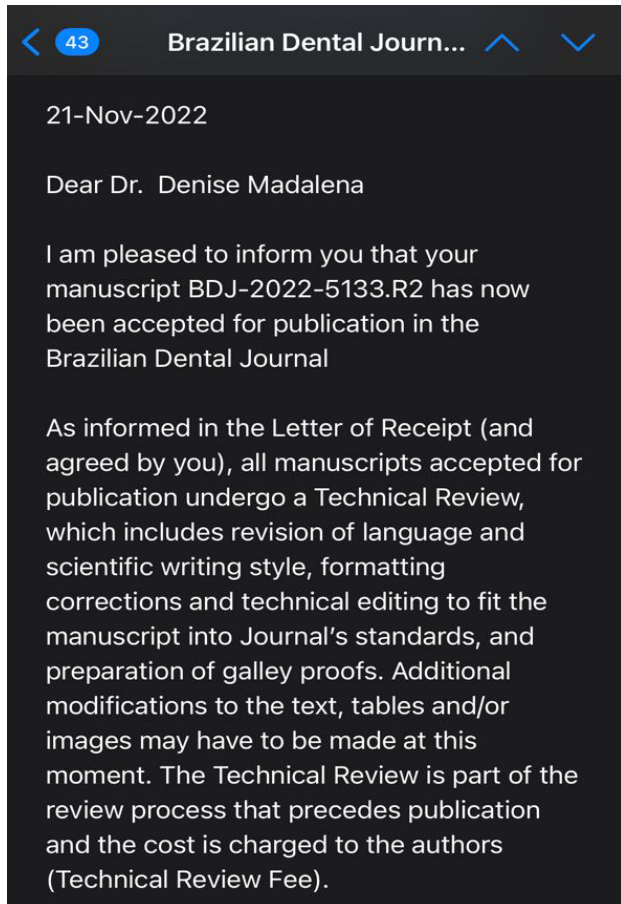
1. Żukowski P, Maciejczyk M, Waszkiel D. Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. *Arch Oral Biol*. 2018; 92: 8-17.
2. Saikaly SK, Khachemoune A. Honey and wound healing: an update. *Am J Clin Dermatol*. 2017; 18(2): 237-51.
3. Hajishengallis E, Parsaei Y, Klein MI, Koo H. Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. *Mol Oral Microbiol*. 2017; 32(1): 24-34.
4. Schestakow A, Guth MS, Eisenmenger TA, Hannig M. Evaluation of anti-biofilm activity of mouthrinses containing tannic acid or chitosan on dentin in situ. *Molecules*. 2021; 26(5), 1351.
5. Fakhruddin KS, Egusa H, Ngo HC, Panduwawala C, Pesee S, Samaranayake LP. Clinical efficacy and the antimicrobial potential of silver formulations in arresting dental caries: a 495 systematic review. *BMC Oral Health* 2020; 20(1):160.
6. Scalioni F, Carrada C, Machado F, Devito K, Ribeiro LC, Cesar D, Ribeiro R. Salivary density of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* and dental caries in children and adolescents with Down syndrome. *J Appl Oral Sci*. 2017; 25(3): 250-7.
7. Klein MI, Hwang G, Santos PHS, Campanella OH, Koo H. *Streptococcus mutans* - derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015; 5:10.
8. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, Abranches J, Brady LJ. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr* 2019; 7(1):10.
9. Bordini EAF, Tonon CC, Francisconi RS, Magalhães FAC, Huacho PMM, Bedran TL et al. Antimicrobial effects of terpinen-4-ol against oral pathogens and its capacity for the modulation of gene expression. *Biofouling*. 2018; 34(7):815-25.
10. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19(1): 61-4.
11. Ehsani M, Marashi MA, Zabihi E, Issazadeh M, Khafri S. A Comparison between antibacterial activity of propolis and Aloe vera on *Enterococcus faecalis*: an in vitro study. *Int J Mol Cell Med Summer*. 2013; 2(3): 110-7.
12. Zhu J, Huang Y, Chen M, Hu C, Chen Y. Functional synergy of antimicrobial peptides and chlorhexidine acetate against gram-negative/gram-positive bacteria and a fungus in vitro and in vivo. *Infect Drug Resist*. 2019; 12: 3227-39.
13. McKenna G, Tsakos G, Burke F, Brocklehurst P. Managing an ageing population: challenging oral epidemiology. *Prim Dent J*. 2020; 9(3), 14–7.
14. Deliberador TM, Weiss SG, Rychuv F, Cordeiro G, Cate MCLT, Leonardi L et al. Comparative analysis in vitro of the application of blue@m oral gel versus chlorhexidine on *Porphyromonas gingivalis*: a pilot study. *Adv Microbiol*. 2020; 10(4):194-201.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

15. Cunha EJ, Auersvald CM, Deliberador TM, Gonzaga CC, Esteban Florez FL, Correr GM et al. Effects of active oxygen toothpaste in supragingival biofilm reduction: a randomized controlled clinical trial. *Int J Dent*. 2019; 2019: 3938214
16. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A et al. Terminology of dental caries and dental caries management: consensus report of a workshop organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res*. 2020 ;54(1): 7-14.
17. Mathur VP, Dhillon JK. Dental caries: a disease which needs attention. *Indian J Pediatr*. 2018; 85(3): 202-6.
18. Dryden M, Cooke J, Salib R, Holding R, Pender SLF, Brooks J. Hot topics in reactive oxygen therapy: antimicrobial and immunological mechanisms, safety and clinical applications. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017; 8: 194-8.
19. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3: 17030.
20. Miladi H, Mili D, Slama RB, Zouari S, Ammar E, Bakhrouf A. Antibiofilm formation and anti-adhesive property of three mediterranean essential oils against a foodborne pathogen *Salmonella* strain. *Microb Pathog*. 2016; 93: 22-31.
21. Labrecque J, Bodet C, Chandad F, Grenier D. Effects of a high-molecular-weight cranberry fraction on growth, biofilm formation and adherence of *Porphyromonas gingivalis*. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 58(2): 439-43.
22. Wakabayashi H, Yamauchi K, Kobayashi T, Yaeshima T, Iwatsuki K, Yoshie H. Inhibitory effects of lactoferrin on growth and biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(8): 3308-16.
23. Exterkate RA, Crielaard W, Cate JMT. Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. *Caries Res*. 2010; 44(4): 372-9.
24. Wang C, van der Mei HC, Busscher HJ, Ren Y. *Streptococcus mutans* adhesion force sensing in multi-species oral biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2020; 6(1): 25.
25. Dryden M. Reactive oxygen species: a novel antimicrobial. *Int J Antimicrob Agents*. 2018; 51(3): 299-303.
26. Memar MY, Ghotaslou R, Samiei M, Adibkia K. Antimicrobial use of reactive oxygen therapy: current insights. *Infect Drug Resist*. 2018; 11: 567-76.
27. Kaushik M, Reddy P, Roshni, Udameshi P, Mehra N, Marwaha A. The effect of coconut oil pulling on *Streptococcus mutans* count in saliva in comparison with chlorhexidine mouthwash. *J Contemp Dent Pract*. 2016; 17(1): 38-41.
28. Coelho ASEC, Paula ABP, Carrilho TMP, da Silva MJRF, Botelho MFRR, Carrilho EVVF. Chlorhexidine mouthwash as an anticaries agent: a systematic review. *Quintessence Int*. 2017; 48(7): 585-91.
29. Wang H, Ren D. Controlling *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus aureus* biofilms with direct current and chlorhexidine. *AMB Express*. 2017; 7(1): 204.
30. Gartika M, Pramesti HT, Kurnia D, Satari MH. A terpenoid isolated from sarang semut (*Myrmecodia pendans*) bulb and its potential for the inhibition and eradication of *Streptococcus mutans* biofilm. *BMC Complement Altern Med*. 2018; 18(1): 151.

31. Cota ALS, Silva V, da Silva SMB. Virulence of *Streptococcus mutans*: an intrafamilial shorte study on transmission of genotypes. J Clin Exp Dent. 2020; 12(1): e59-e64.
32. Banas JA, Fountain TL, Mazurkiewicz JE, Sun K, Vickerman MM. *Streptococcus mutans* glucan-binding protein: a affects *Streptococcus gordonii* biofilm architecture. FEMS Microbiol Lett. 2007; 267(1): 80-8.
33. Haas W, Banas JA. Ligand-binding properties of the carboxyl-terminal repeat domain of *Streptococcus mutans* glucan-binding protein A. J Bacteriol. 2000; 182(3): 728-33.
34. Jang KK, Gil SY, Lim JG, Choi SH. Regulatory characteristics of vibrio vulnificus gbpA gene encoding a mucin-binding protein essential for pathogenesis. J Biol Che.2016; 291(11): 5774-87.

ANEXO A – E-mail confirmando que o presente trabalho foi aceito para publicação, bem como cópia de parte do manuscrito que comprova que a aluna Veronica Canela Estevam dos Santos é tida como primeira autora.



Brazilian Dental Journal Page 16 of 28

16

1
2
3
4 449 Funding Sources
5 450 Veronica Canela Estevam dos Santos was supported by a scholarship provided by São Paulo
6 451 Research Foundation (FAPESP; Grant #2019/25534-4).
7
8 452
9
10 453 Acknowledgements
11 We wish to thank Rubens Moreno and Telma B. Lombardo Bedran for providing the
12 454 BlueM® solution. We also thank Juliana Pirola and José Zuanon for their technical support.
13
14
15 456
16
17 457 Statement of Ethics
18 This study protocol was reviewed and approved by Research Ethics Committee of the
19 458 School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University, approval number (CAAE
20 459 41872620.0.00005416).
21
22 460
23 461
24
25 462 Disclosure statement
26 The authors have no conflicts of interest to declare.
27 463
28
29 464
30
31 465 Author Contributions
32 DMPS and PMMH, conceived and designed the experiments. VCES, PMMH, MJMI and
33 466 VMTRM performed the experimental assays. PMMH analyzed the statistical analysis. VCES,
34 467 DMPS and PMMH drafted the manuscript. DMPS and PMMH reviewed and edited the
35 468 manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.
36
37
38 469
39
40 470
41
42 471 Data Availability Statement
43 The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries
44 472 can be directed to the corresponding author.
45 473
46
47 474
48
49 475 ORCID
50 476 Veronica Canela Estevam dos Santos <https://orcid.org/0000-0003-0164-613X>
51 477 Patricia Milagros Maquera Huacho <https://orcid.org/0000-0002-2193-9979>
52 478 Maria Júlia Mancin Imbriani <https://orcid.org/0000-0002-3600-0307>
53 479 Vivian M. Tellaroli Rodrigues Minhaco (*in memoriam*)
54 480 Denise Palomari Spolidorio <https://orcid.org/0000-0003-2376-1024>
55
56
57
58
59 481
60

<https://mc04.manuscriptcentral.com/bdj-scielo>