



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



ESTER ALVES FERREIRA BORDINI

**AVALIAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
E VIABILIDADE CELULAR DE BACTÉRIA CARIOGÊNICA NA PRESENÇA DO
TERPINEN-4-OL: ESTUDO IN VITRO**

Araraquara

2016



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”



Faculdade de Odontologia de Araraquara

ESTER ALVES FERREIRA BORDINI

**AVALIAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
E VIABILIDADE CELULAR DE BACTÉRIA CARIOGÊNICA NA PRESENÇA DO
TERPINEN-4-OL: ESTUDO IN VITRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Biologia Craniofacial e Biomateriais, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Denise M. P. Spolidorio

Araraquara

2016

Bordini, Ester Alves Ferreira

Avaliação dos fatores de virulência, atividade antimicrobiana e viabilidade celular de bactéria cariogênica na presença do Terpinen-4-ol: estudo in vitro / Ester Alves Ferreira Bordini.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

54 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

1. Fatores de virulência 2. Cárie dentária 3. Medicamentos
fitoterápicos I. Título

ESTER ALVES FERREIRA BORDINI

**AVALIAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
E VIABILIDADE CELULAR DE BACTÉRIA CARIOGÊNICA NA PRESENÇA DO
TERPINEN-4-OL: ESTUDO IN VITRO**

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

2º Examinador: Profª. Drª. Telma Blanca Lombardi Bedran

3º Examinador: Profª. Drª. Alessandra Nara de Souza Rastelli

Araraquara, 23 de março de 2016.

DADOS CURRICULARES

ESTER ALVES FERREIRA BORDINI

Nascimento	17/05/1991, Taquaritinga, SP
Filiação	Alessandra Henriqueta Alves Ferreira Neuclair Bordini Júnior
2009-2013	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP
2014-2016	Curso de Pós-graduação em Odontologia, Área de Concentração em Biologia Craniofacial e Biomateriais, nível de Mestrado pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

DEDICATÓRIA

À Deus,

Obrigada por me permitir a graça de cumprir essa jornada. Por me sustentar, ser meu auxílio e minha fortaleza. Bom é saber que Tu estás comigo todos os dias da minha vida.

“Porque d’Ele, e por meio d’Ele, e para Ele são todas as coisas. A Ele, pois, a glória eternamente. Amém!”

I Timóteo 6:16

A minha mãe Alessandra,

Não tenho palavras pra descrever a minha gratidão e admiração pela mãe que você é e por todo seu amor. Obrigada por me incentivar a cumprir os meus sonhos e sonhá-los junto comigo. Obrigada por vibrar com as minhas vitórias e por me apoiar nos momentos difíceis desta jornada. Você é parte fundamental na minha vida e esta vitória também é sua! Amo você!

Aos meus avós Angélica e Novaldir,

Obrigada por estarem comigo em mais esta etapa, participando diretamente com orações, palavras de amor e incentivo. Vocês são exemplos de pessoas determinadas, íntegras e amorosas que quero ser. Minha gratidão por ter vocês em minha vida. Amo-os muito.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora Profa. Dra. Denise Spolidorio

Obrigada por todos estes anos de orientação, amizade, carinho e paciência. Por me abrir as portas do mundo científico desde a iniciação científica até a pós-graduação. Agradeço pelo direcionamento nos momentos mais difíceis e pela oportunidade de ministrar aulas, orientar pesquisas e crescer como ser humano. A senhora é um exemplo e merece toda minha admiração.

AGRADECIMENTOS

À minha família,

Que sempre me apoiou e torceu pelo meu sucesso;

Às queridas Renata, Carol e Patty,

Obrigada por todos os conselhos e por me ajudarem diretamente na execução deste trabalho, sem vocês isto não seria possível. Agradeço pela convivência diária, amizade e carinho de vocês. Foi muito bom compartilharmos estes dois anos de muito aprendizado. Vocês são muito especiais e estão guardadas em meu coração com muito carinho!

Ao Fernando Magalhães,

Obrigada por sua paciência e competência em me ensinar e me ajudar. Por todas as conversas e por acreditar em mim. Você foi peça fundamental para conclusão deste trabalho. Obrigada!

Aos funcionários Zé, Juliana e Aline,

Por todo apoio em várias etapas para execução dessa pesquisa, sempre com muita alegria, paciência e disposição. A ajuda de vocês foi de extrema importância!

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa,

Por disponibilizar o uso do Laboratório de Patologia Experimental em várias etapas deste trabalho;

À Fernanda Basso,

Pela atenção dispensada a mim em todos os momentos com muito carinho;

À Tete,

Por sempre me incentivar e pela disposição em me ajudar;

Ao Sebastião do Instituto de Física da Universidade de São Paulo,

Pelo companheirismo e pela análise de Microscopia Confocal de Varredura a Laser;

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,

Representada pela digníssima Diretora Profa. Dra. Andréia Affonso Barretto Montandon e pela Vice-Diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato;

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP,

Representado pelo Coordenador Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior e Vice-Coordenador Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli;

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP,

Alexandre e Cristiano por sempre me atenderem e me ajudarem com muita atenção e dedicação;

As secretárias do Departamento de Fisiologia e Patologia,

Silvana e Carla por me atenderem sempre com muita eficiência, paciência e carinho;

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara e em especial aos funcionários da portaria,

Sem o suporte de vocês seria inviável a realização deste trabalho;

À CAPES e FAPESP,

Pelo apoio financeiro sem o qual não conseguiria realizar este trabalho (Nº Processo FAPESP 2014/23241-6);

A minha família espiritual,

Obrigada pelas orações que me sustentaram em momentos difíceis e que eu sei que não me deixaram esmorecer e desviar do meu propósito;

À todos,

Que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes.

Cora Coralina

Bordini EAF. Avaliação dos fatores de virulência, atividade antimicrobiana e viabilidade celular de bactéria cariogênica na presença do Terpinen-4-ol: estudo in vitro [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP; 2016

Resumo

A utilização de óleos essenciais tem sido amplamente difundida no tratamento de doenças infecciosas que acometem a cavidade oral por serem eficazes contra patógenos presentes em biofilme. Dentre estes produtos de origem natural, destaca-se o Terpinen-4-ol um biocida membrana-ativo, com amplo espectro de ação contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e bactérias multi-resistentes. Neste estudo, investigou-se o efeito antimicrobiano do Terpinen-4-ol sobre culturas planctônicas e biofilmes de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) e a expressão gênica de glucano de ligação de proteína A (*gbpA*) envolvido na adesão em biofilme. A atividade antimicrobiana do Terpinen-4-ol (0.059 % a 0.95 %) foi avaliada pelo teste de microdiluição em caldo com a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) para o microrganismo na forma planctônica. O biofilme formado em placa de cultura celular foi tratado com diferentes concentrações de Terpinen-4-ol e o metabolismo celular do biofilme resultante foi avaliado por meio de ensaio de hidróxido de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil) -2H-tetrazólio-5-caboxanilide (XTT). A análise do biofilme formado sobre blocos de esmalte e dentina tratados com Terpinen-4-ol (0.24 % e 0.95 %) e Clorexidina (CHX 0.12 %) durante 60 segundos foi realizada por meio de ensaio de XTT e razão espectral (verde/vermelho) das imagens obtidas por Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL). A expressão gênica de *gbpA* foi investigada por RT-PCR quantitativo após exposição de *S. mutans* ao Terpinen-4-ol e CHX por 15 e 30 minutos. Os dados obtidos apresentaram distribuição normal e, portanto, foram utilizados os testes paramétricos de ANOVA One-way e de Tukey. Todos os testes estatísticos foram considerados em nível de significância de 5% ($p < 0.05$). Terpinen-4-ol demonstrou atividade antimicrobiana a partir da concentração de 0.24 % tanto para o microrganismo em cultura planctônica quanto para biofilme formado em placa de cultura celular e esmalte, com redução microbiana próxima a 100 %. Não houve diferença estatisticamente significativa entre Terpinen-4-ol e CHX. Para biofilme em dentina, a concentração de Terpinen-4-ol 0.95 % apresentou atividade antimicrobiana tanto pela análise por XTT quanto por MCVL. Houve redução na expressão de *gbpA* quando em contato com Terpinen-4-ol durante 15 minutos, no entanto a superexpressão gênica ocorreu a partir dos 30 minutos de exposição. CHX levou a superexpressão do gene *gbpA* em todos os tempos testados. Estes achados demonstram que Terpinen-4-ol apresenta importante atividade antimicrobiana e capacidade de modulação da expressão de genes envolvidos na formação de biofilme cariogênico, podendo ser utilizado no tratamento de doenças infecciosas bucais.

Palavras-chave: Fatores de virulência. Cárie dentária. Medicamentos Fitoterápicos.

Bordini EAF. Evaluation of virulence factors, antimicrobial activity and cariogenic bacteria cell viability in the presence of Terpinen-4-ol: in vitro study [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP; 2016

Abstract

The use of essential oils has been widespread in the treatment of infectious diseases that affect the oral cavity to be effective against pathogens in biofilms. Among these natural products, there is the Terpinen-4-ol a biocide membrane-active, with broad spectrum of action against gram-positive bacteria, gram-negative and multi-resistant bacteria. In this study, we investigated the antimicrobial effect of Terpinen-4-ol on planktonic and biofilm cultures of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) and gene expression gbpA (glucan binding protein A) involved in the adhesion of biofilm. The antimicrobial activity of Terpinen-4-ol (0.059 % to 0.95 %) was assessed by the broth microdilution test for the determination of MIC and MBC for the microorganism in planktonic form. The biofilm formed in cell culture plate were treated with different concentrations of Terpinen-4-ol and cell metabolism resulting plaque was assessed using the hidróxido de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil) -2H-tetrazólio-5-caboxanilide (XTT). The analysis of the biofilm formed on enamel blocks and dentin treated with Terpinen-4-ol (0.24 % and 0.95 %) and chlorhexidine (CHX 0.12 %) for 60 seconds was performed by XTT assay and spectral Ratio (Green/Red) of images obtained by microscopy Laser Scanning Confocal (CLSM). The gbpA gene expression was investigated by quantitative RT-PCR after *S. mutans* have been exposed to Terpinen-4-ol and CHX for 15 and 30 minutes. The data were normally distributed and therefore parametric tests of ANOVA One-way and Tukey were used. All statistical tests were considered at a significance level of 5 % ($p < 0.05$). Terpinen-4-ol showed antimicrobial activity at concentrations 0.24% for both planktonic microorganisms in culture and to biofilm formation in cell culture plate and enamel with microbial reduction near 100 %. There was no statistically significant difference between Terpinen-4-ol and CHX. For biofilm on dentin, the concentration of Terpinen-4-ol 0.95 % showed antimicrobial activity both by analysis by XTT and by CLSM. There was a reduction in gbpA expression when in contact with Terpinen-4-ol for 15 minutes, however the gene overexpression occurred after 30 minutes of exposure. CHX caused overexpression of the gbpA gene in all tested times. These findings demonstrate that Terpinen-4-ol shows a significant antimicrobial activity and ability to modulate the expression of genes involved in cariogenic biofilm formation, can be used in treating oral infectious diseases.

Keyword: Virulence Factors. Dental Caries. Phytotherapeutic Drugs.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	17
3 PUBLICAÇÃO 1	18
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
REFERÊNCIAS	38
APÊNDICE A – Metodologia descrita.....	43
ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP.....	52

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral é um ambiente dinâmico e adequado para o crescimento de aproximadamente 700 espécies microbianas (Kayalvizhi et al.³⁰, 2013). Essa diversidade de colonização se deve a presença de alguns fatores, como umidade, oxigênio, temperatura, variações no pH, fornecimento de nutrientes (Legéňová, Bujdákova³⁵, 2015) e carboidratos (Barbieri et al.⁵, 2014) que devem estar em equilíbrio para que não favoreça o desenvolvimento de doenças bucais (Do et al.¹⁶, 2013).

Nesse ambiente, os microrganismos organizam-se sobre superfícies naturais (dentes, mucosa) ou artificiais (prótese, implantes), formando os biofilmes dentários que são estruturas altamente organizadas e estruturadas, embutidas em uma massa de polissacarídeos extracelulares, que é resultado da sua aderência e multiplicação (Jenkinson, Lappin–Scott²⁸, 2001; Belibasakis⁷, 2014).

A matriz de polissacarídeos extracelulares determina a maioria das propriedades físicas, químicas e biológicas dos biofilmes, sendo responsável pela sua morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional. As interações que permitem a agregação de diferentes espécies microbianas neste biofilme envolvem a participação de adesinas extracelulares produzidas por algumas bactérias, mantendo-as em posição ao longo do substrato sólido (Almeida et al.¹, 2002). O consumo frequente de carboidratos fermentáveis produz quedas constantes no pH do biofilme, com ruptura na homeostasia entre o hospedeiro e os microrganismos, criando um ambiente para que espécies acidúricas que encontravam-se presentes em menor proporção no biofilme se desenvolvam e, conseqüentemente ocorra o aparecimento de patologias, como a cárie (Marsh⁴³, 2006; Filoche et al.²⁰, 2010; Do et al.¹⁶, 2013).

S. mutans é um colonizador primário (Lee³⁴, 2013; Jung et al.²⁹, 2014), considerado o principal agente etiológico da cárie e quando em associação com *Streptococcus sobrinus* produz ácido no interior do biofilme tornando esse ambiente favorável para o desenvolvimento de outras espécies bacterianas como *Lactobacillus* spp. que são bactérias cariogênicas com importante função na formação da cárie de dentina (Mei et al.⁴⁸, 2013).

A colonização do biofilme por *S. mutans* ocorre devido a produção de uma variedade de fatores de virulência que lhe permite a utilização de fontes de hidratos de carbono, manutenção do metabolismo ativo em ambiente ácido e sobrevivência em baixo pH. Uma característica que o distingue das demais espécies é a capacidade de se acumular em grandes proporções na presença de sacarose. A sacarose é um substrato utilizado por três enzimas do

S. mutans denominadas glicosiltransferases (GTFS - GTFB, GTFC e GTFD), que clivam moléculas de sacarose e polimerizam os radicais de glicose em glucanos aderentes (Lynch et al.³⁸, 2013). Estes glucanos são polímeros insolúveis em água, que participam da formação do biofilme cariogênico (Matsui, Cvitkovitch⁴⁴, 2010) e auxilia a manutenção do ácido láctico produzido pelo *S. mutans* no interior do biofilme, promovendo a desmineralização dos tecidos duros dentários, como o esmalte, tornando-os mais susceptíveis ao aparecimento de lesões cáries (Filoche et al.²⁰, 2010; Marsh⁴³, 2006).

Dentre os glucanos produzidos pelo *S. mutans* destaca-se o GbpA, uma proteína que está envolvida na adesão celular bacteriana à superfície do dente, que contribui para o desenvolvimento de um biofilme com ótimas propriedades e minimiza o stress sobre a população bacteriana que nele está presente. Além disto, testes *in vitro* e *in vivo* demonstram que esta proteína contribui aumentando a cariogenicidade de *S. mutans* (Matsumoto-Nakano et al.⁴⁶, 2007; Banas et al.⁴, 2007; Matsumi et al.⁴⁵, 2015). Quando a doença cárie se estabelece, a progressão ocorre caso não haja tratamento, chegando a acometer outros tecidos dentários como a dentina, causando também a sua desmineralização (Shinno et al.⁵⁷, 2016). A dentina é composta por microestruturas chamadas túbulos dentinários que possuem diâmetro aproximado de 1.5 - 2.0 μm e estão orientados da polpa para a junção esmalte-dentina. Este diâmetro permite a penetração de *S. mutans* (0.7 – 0.9 μm) aos túbulos dentinários e dificulta sua remoção mesmo após o preparo cavitário (Hamama et al.²⁴, 2014).

Apesar das diversas abordagens na tentativa de reduzir a incidência da cárie dentária, esta continua sendo uma das doenças bucais infecciosas mais comuns e ainda de grande prevalência (Mohankumar et al.⁵⁰, 2013; Vieira⁶⁶, 2012). Para que se desenvolva, necessita ocorrer uma interação ao longo do tempo entre a superfície dentária, as bactérias e a saliva, além de ser modulada por dieta cariogênica, susceptibilidade do hospedeiro e o tipo de microrganismo envolvido (Selwitz et al.⁵⁵, 2007).

Por esta razão, há necessidade de prevenção e controle do biofilme dentário por meio de cuidados bucais e remoção mecânica (Tvetman⁶³, 2004; López-Gómez et al.³⁶, 2016). Para auxiliar no controle e na redução do biofilme da superfície do dente, recomendam-se bochechos que contenham flúor, alcoóis e agentes antimicrobianos que podem ser produtos químicos ou naturais. Estes agentes antimicrobianos, para serem considerados ideais, devem ser eficazes contra os microrganismos por meio da promoção de um desequilíbrio ecológico do biofilme, ação rápida e manutenção de sua atividade em baixas concentrações, a fim de que não ocorram efeitos colaterais, podendo ser utilizados sem causar desconforto (Marsh^{41,42}, 1994, 2003; Takarada et al.⁶⁰, 2004).

Um dos agentes antimicrobianos mais utilizados na Odontologia é a Clorexidina, considerada padrão-ouro na prevenção e tratamento de doenças bucais (Cosyn et al.¹², 2005). Porém, estudos sugerem que ela esteja relacionada com a seleção de bactérias resistentes a antibióticos, além de não apresentar grande efetividade no tratamento e prevenção da cárie dentária (McDonnell, Russell⁴⁷, 1999; De Soet et al.¹⁵, 2002; Filoche et al.¹⁹, 2005). Além disso, são relatados efeitos colaterais com seu uso contínuo, como alteração da coloração dos dentes, descamação da mucosa oral, sensibilidade e alteração do paladar (Ehsani et al.¹⁸, 2013; Khairnar et al.³², 2015). A resistência bacteriana associada à Clorexidina é sugerida devido às alterações provocadas na membrana externa bacteriana que afetam a permeabilidade da membrana ou o efluxo ativo mediado por proteínas da membrana de transporte (Hassan et al.²⁶, 2013).

Desta forma, cada vez mais trabalhos revelam que agentes antimicrobianos naturais são opções eficazes para prevenção e tratamento de doenças infecciosas bucais (Valera et al.⁶⁴, 2013; Almeida et al.², 2008; Duarte et al.¹⁷, 2006; Catalán et al.¹¹, 2008; Maggi et al.⁴⁰, 2009; Newman, Cragg⁵², 2007) por causarem menos efeitos colaterais em pacientes, não promoverem resistência bacteriana devido aos seus diferentes mecanismos de ação (Thomsen et al.⁶², 2013) e por inibirem efetivamente o crescimento e a adesão de bactérias patogênicas, contribuindo para a não formação do biofilme dentário (Takarada et al.⁶⁰, 2004).

Neste contexto, alguns fitoterápicos estão sendo inseridos em diversos produtos farmacêuticos como cremes, xampus, sabonetes, soluções antimicóticas e antissépticas dentre outras, por não causarem resistência bacteriana, pois são constituídos por um amplo espectro de compostos (Maggi et al.⁴⁰, 2009).

O óleo de *Melaleuca alternifolia*, conhecido como Tea Tree Oil – TTO é uma planta nativa da Austrália, em que seu óleo essencial é obtido através da destilação a vapor das folhas e ramos terminais da árvore, obtendo-se um óleo amarelo-pálido que é separado do destilado aquoso (Carson et al.¹⁰, 2006). O TTO é composto por aproximadamente 100 componentes (Brophy et al.⁸, 1989) obtidos por cromatografia gasosa, sendo os monoterpenos como Terpinen-4-ol e 1,8-cineole, presentes em maiores proporções e os sesquiterpenos como alfa-terpieno, gama-terpieno e alfa-pineno, em menores proporções (Cox et al.¹³, 2001).

Por se tratar de uma planta a composição do óleo pode variar de acordo com a forma de extração e a região geográfica onde foi obtido, por isso a ISO 4730 determinou o padrão de concentração dos componentes conhecidos (Tabela 1) e estabeleceu que para que o óleo seja considerado de qualidade, o Terpinen-4-ol deve estar presente em níveis acima de 30 % da

sua composição (Carson et al.¹⁰, 2006; Cox et al.¹³, 2001; Keszei et al.³¹, 2010; Shelton et al.⁵⁶, 2004).

Tabela 1 - Principais componentes do óleo de *Melaleuca alternifolia* e suas proporções.

Componente	Composição (%)	
	ISO 4730	Composição típica
Terpinen-4-ol	$\geq 30^b$	40,1
γ -Terpineno	10-28	23,0
α -Terpineno	5-13	10,4
1,8-Cineole	$\leq 15^c$	5,1
Terpinoleno	1,5-5	3,1
ρ -Cymene	0,5-12	2,9
α -Pinene	1-6	2,6
α -Terpineol	1,5-8	2,4
Limoneno	0,5-4	1,0

Fonte: Carson et al.¹⁰, 2006.

A atividade antimicrobiana do TTO é atribuída principalmente ao Terpinen-4-ol por ser o principal componente ativo do óleo (Carson et al.¹⁰, 2006) e por apresentar caráter hidrofílico/hidrofóbico e por permitir por meio de sua hidrofiliabilidade se difundir pela água ao redor da membrana citoplasmática bacteriana e pela hidrofobicidade se difundir pela membrana citoplasmática bacteriana, levando a perda de material intracelular, incapacidade de manter a homeostase e a inibição da respiração, ocorrendo, portanto a perda de integridade e de função da membrana (Carson, Riley⁹, 2001).

Estudos de Maggi et al.⁴⁰ (2009), demonstraram a eficácia antimicrobiana do Terpinen-4-ol na inibição do crescimento e desenvolvimento de bactérias que fazem parte do biofilme cariogênico. Hammer et al.²⁵ (2003), avaliaram a atividade in vitro do óleo contra 161 isolados de microrganismos bucais de 15 gêneros diferentes. Em *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus rhamnosus*, os resultados mostraram decréscimos > 3 log da viabilidade de

UFC/mL depois de apenas 30 segundos e após 5 minutos não era mais possível detecção de microrganismos viáveis, sugerindo assim, que o óleo pode ser utilizado na prevenção de patologias e manutenção da higiene bucal.

Na busca de produtos que substituíssem o uso da Clorexidina no tratamento de doenças bucais, Groppo et al.²² (2002) mostraram que extrato de alho (*Allium Sativum*) e óleo de *Melaleuca* são eficientes na inibição sobre o crescimento e adesão de microrganismos bucais, principalmente sobre *S. mutans* (Takarada et al.⁶⁰, 2004; Catalán et al.¹¹, 2008), comprovando assim que fitoterápicos podem ser incorporados em produtos suplementares da higienização bucal, como cremes dentais e enxaguatórios bucais (Maggi et al.⁴⁰, 2009; Santamaria Jr et al.⁵⁴, 2014).

O Terpinen-4-ol é encontrado em outras plantas além da *Melaleuca alternifolia*, tais como *Hajeb Layoun arboreta* (Tunisia) e *Alpinia zerumbet* se destacando por suas excelentes propriedades medicinais, com ação antimicrobiana em *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (Loughlin et al.³⁷, 2008), *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp. (García-Godoy, Hicks²¹, 2008), antifúngica em *Candida albicans* (Jandourek et al.²⁷, 1998), anti-inflamatória (Nogueira et al.⁵³, 2014) e estudos indicam que além das propriedades citadas acima, possui efeito anti-tumoral (Sun et al.⁵⁹, 2012; Wu et al.⁶⁷, 2012). O conhecimento sobre novas formas de evitar ou diminuir as infecções bucais tornam-se imprescindíveis. Esforços devem ser realizados para se intensificar estudos com a porção solúvel Terpinen-4-ol sobre biofilmes cariogênicos, como também compreender os mecanismos e a capacidade antimicrobiana deste componente, possibilitando sua aplicação clínica na prevenção e tratamento das patologias bucais.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito antimicrobiano do Terpinen-4-ol na formação do biofilme cariogênico e da expressão do gene *gbpA* envolvido na aderência do *S. mutans*.

3 PUBLICAÇÃO 1

Terpinen-4-ol inibe a expressão do gene *gbpA* e a formação de biofilme de *Streptococcus mutans**

Ester Alves Ferreira BORDINI^a *, Renata Serignoli FRANCISCONI^a, Caroline Coradi TONON^a, Patrícia Milagros Maquera HUACHO^a, Fernando Augusto Cintra Magalhães^a, Telma Blanca Lombardo Bedran^b, Sebastião PRATAVIEIRA^c, Vanderlei Salvador BAGNATO^c, Denise Madalena Palomari SPOLIDORIO^a

^a Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil.

^b Departamento de Periodontia, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, Rua Vergueiro, 235, São Paulo, SP, Brasil.

^c Instituto de Física, Universidade de São Paulo, USP, Avenida Trabalhador São Carlense, 400, São Carlos, SP, Brasil.

* Autor para Correspondência

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Depart. de Fisiologia e Patologia / Lab. de Microbiologia e Biologia Molecular

Rua Humaitá, 1680 - CEP: 14.801-903, Araraquara, SP - Brasil

Fone: + 55 (16) 3301-6472 / FAX: + 55 (16) 3301-6488

e-mail: esterbordini@gmail.com

*O artigo foi formatado segundo as normas do periódico *Archives of Oral Biology*.

Resumo

Objetivo: Avaliar a atividade antimicrobiana do Terpinen-4-ol sobre *S. mutans* em cultura planctônica e biofilme cariogênico desenvolvido sobre esmalte e dentina e sua influência na expressão do gene *gbpA*.

Design: Método de microdiluição em caldo (CIM e CBM) foi utilizado para avaliação do potencial antimicrobiano do Terpinen-4-ol (0.059 % - 0.95 %) em cultura planctônica. A viabilidade celular do biofilme desenvolvido sobre esmalte e dentina após 60 segundos da aplicação dos colutórios Terpinen-4-ol (0.24 % e 0.95 %) e Clorexidina (CHX 0.12 %) foram avaliados por hidróxido de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil) -2H-tetrazólio-5-caboxanilide (XTT) e por Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL). A análise da expressão do gene *gbpA* foi investigada por RT-PCR quantitativo após aplicação do Terpinen-4-ol e CHX por 15 e 30 minutos. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) complementado pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Resultados: Terpinen-4-ol 0.24 % demonstrou inibição de *S. mutans* na forma planctônica e em biofilme desenvolvido em placa e sobre esmalte após avaliação por XTT e MCVL. Para biofilme em dentina Terpinen-4-ol 0.95 % apresentou maior atividade antimicrobiana. Em ambas as concentrações de Terpinen-4-ol sua atividade antimicrobiana foi semelhante a CHX 0.12 %. Na análise da expressão gênica verificou-se que Terpinen-4-ol diminuiu a expressão de *gbpA*, enfatizando a capacidade terapêutica do Terpinen-4-ol em diminuir a colonização da cavidade oral por *S. mutans*.

Conclusão: O potencial antimicrobiano e antibiofilme do Terpinen-4-ol pode modular a expressão de genes específicos, como o gene *gbpA*, responsável pela adesão ao biofilme cariogênico.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*, biofilme, expressão gênica

1. Introdução

Terpinen-4-ol (3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, (R)-) é um terpeno considerado o principal agente ativo do óleo de *Melaleuca alternifolia* – TTO e também pode ser encontrado em outras plantas como *Hajeb Layoun arboreta* (Tunisia) e *Alpinia zerumbet*. Se destaca por suas excelentes propriedades medicinais, com ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antifúngica e efeito anti-tumoral.¹⁻⁴ Possui amplo espectro de ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, microrganismos multi-resistentes.⁵ Mais especificamente é um biocida membrana-ativo que atua na indução da perda da membrana, interfere na integridade e na fisiologia da célula do microrganismo.⁶

A atividade antimicrobiana do Terpinen-4-ol acontece por diversos mecanismos e é atribuída a um conjunto de multicomponentes que afetam principalmente a parede celular bacteriana, a desnaturação proteica e alteração da estrutura e função da membrana celular.⁷⁻⁹

Por ser um agente antimicrobiano, o Terpinen-4-ol tem sido incluído em produtos para higiene oral como colutórios e pastas de dentes e mostrou-se eficaz na inibição do crescimento e adesão bacteriana ao biofilme dentário, principalmente em bactérias cariogênicas como *S. mutans*.¹⁰ Em função disso, ele pode ser eficaz no tratamento de cárie dentária, uma doença infecciosa crônica associada a uma destruição progressiva das estruturas dentárias (esmalte, dentina e cimento) devido a formação de glucanos a partir de sacarose,¹¹ com características acidúricas e acidogênicas.¹² Dentre os glucanos sintetizados pelo *S. mutans* são conhecidos os GbpA, GbpB, GbpC, e GbpD que são proteínas que influenciam na manutenção e arquitetura do biofilme dentário pela união das bactérias com moléculas extracelulares de glucano.¹³ O GbpA foi o primeiro glucano a ser descoberto e sua ação está relacionada com a fase de adesão, estrutura e acúmulo de microrganismos no biofilme durante o processo de desenvolvimento da cárie,¹⁴ contribuindo com a arquitetura sacarose-dependente do biofilme levando ao seu aumento.¹⁵

Embora, muitos estudos avaliem a ação do Terpinen-4-ol sobre várias espécies bacterianas e relatem que ele é capaz de modular as características biológicas destes microrganismos, pouco se sabe sobre sua atuação em biofilmes cariogênicos e principalmente sobre sua influência na expressão dos fatores de virulência. Assim, neste estudo investigamos o efeito do Terpinen-4-ol na formação do biofilme cariogênico e a expressão do gene *gbpA* envolvido na aderência do *S. mutans*.

2. Material e Métodos

2.1 Bactéria e condições de crescimento

Foi utilizada neste estudo a bactéria *S. mutans* ATCC 25175. A bactéria foi cultivada em Brain Heart Infusion (BHI) suplementado com extrato de levedura (Yeast Extract) a 37° C por 18 h. A turbidez da suspensão bacteriana foi ajustada a 600 nm (OD₆₀₀) correspondendo a 1.0x10⁷ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL).

2.2 Preparo das soluções

O componente Terpinen-4-ol foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As formulações foram preparadas nas concentrações de 0.059 % (0.59 mg/mL), 0.11 % (1.1 mg/mL), 0.24 % (2.4 mg/mL), 0.47 % (4.7 mg/mL) e 0.95 % (9.5 mg/mL) em meio BHI com DMSO 0.4 % (4.0 mg/mL - Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) utilizado como um agente solubilizante.³ A Clorexidina utilizada como controle na concentração 0.12 % (1.2 mg/mL) foi adquirida e manipulada pela Farmácia-Escola UNESP/Araraquara.

2.3 Determinação dos valores da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) em cultura planctônica

A atividade antimicrobiana do Terpinen-4-ol em *S. mutans* foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, usando placa de microtitulação de 96 poços (TPP, Switzerland).¹⁶ As diferentes concentrações foram distribuídas nos poços e em seguida a suspensão microbiana previamente ajustada foi adicionada, resultando numa concentração final de 1.0 x 10⁵ UFC/mL. Os controles utilizados foram *S. mutans* crescido em meio BHI com DMSO 0.4 % (sem tratamento) e CHX 0.12 %. As placas foram mantidas a 37° C por 24 h e o crescimento foi avaliado por absorbância a 492 nm (Multiskan Ascent 354, Labsystems CE, Les Ulis, França).¹⁷ O MIC foi definido como a menor concentração da porção solúvel sem crescimento visível.¹⁶

Para determinação da CBM, 10 µL do inóculo foi removido dos poços sem turvação visível, plaqueado em Mitis Salivarius Ágar (MSA), e incubado a 37° C por 48 h. O número de colônias foi avaliado e a CBM definida como a menor concentração capaz de reduzir o inóculo inicial a ≥ 99.9 %.¹⁶ Todos os procedimentos foram realizados em triplicata em três momentos diferentes (Apêndice A).

2.4 Avaliação da atividade metabólica do biofilme utilizando o ensaio de XTT

Biofilme de *S. mutans* foi formado no fundo dos poços da placa de microtitulação de 96 well.¹⁸ As suspensões bacterianas (1×10^7 UFC/mL) foram distribuídas e mantidas a 37° C durante 1h30min para adesão inicial e em seguida lavadas para remoção das células não aderidas e novo meio de cultura foi adicionado e mantido a 37° C por 48 horas. Após a formação do biofilme o meio foi aspirado e as células foram tratadas durante 24 h com as formulações de Terpinen-4-ol e CHX 0.12 %. O ensaio de XTT (Sigma) foi utilizado para determinar a atividade metabólica do biofilme¹⁹ e a viabilidade celular foi avaliada com a redução relativa da absorbância em comparação com controles não tratados após 3 h de incubação.²⁰ A concentração inibitória mínima do biofilme (CIMB) foi definida como a menor concentração testada, que inibiu em 50 % a formação do biofilme.²¹

2.5 Formação de Biofilme em espécimes

Discos de esmalte e dentina (8.0 mm de diâmetro e 1.5 mm de espessura) foram obtidos a partir de incisivos bovinos como descrito por Soares et al.²² Os discos esterilizados foram colocados em placa de microtitulação de 24 well e recobertos com saliva humana estéril (CAAE: 44823115.4.0000.5416 – Comitê de Ética – Anexo A) doada por indivíduo saudável, sem lesões ativas de cárie ou doença periodontal.²³ A saliva ficou em contato com os espécimes durante 1h30min para formação da película adquirida.²⁴ Em seguida os discos foram transferidos para nova placa e a suspensão de *S. mutans* (10^7 UFC/mL) foi distribuída em cada poço, seguido de incubação por 48 h.^{25,26}

As concentrações de Terpinen-4-ol 0.24 % e 0.95 % (determinadas pela CIMB) e CHX 0.12 % como controle foram aplicadas durante 60 segundos simulando a aplicação clínica de colutório. A viabilidade celular do biofilme resultante foi avaliada pelo ensaio de XTT.

2.6 Infecção dos espécimes de dentina

Para comprovar a penetração de *S. mutans* no interior dos túbulos dentinários, incisivos bovinos foram seccionados longitudinalmente e estabilizados no interior de tubos Falcon (50 mL), deixando livre apenas a superfície que recebeu o tratamento. A suspensão de *S. mutans* (10^7 UFC/mL) foi adicionada e os tubos foram levados à centrífuga (3000, 4000, 5000 e 6000 rpm) durante 5 minutos para cada ciclo. Ao final dos ciclos, o sobrenadante foi descartado e uma nova suspensão com a mesma concentração microbiana foi adicionada, seguida de incubação por 24 h para recuperação bacteriana.²⁷

2.7 Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Após o período de formação do biofilme em esmalte e dentina, as formulações Terpinen-4-ol 0.24 % e 0.95 % foram aplicadas durante 60 segundos simulando aplicação clínica de colutório, e em seguida as células foram coradas com o kit Live/Dead BacLight - L7012 (Invitrogen) durante 15 minutos na ausência de luz. Para análise da viabilidade celular do biofilme resultante os espécimes foram avaliados por Microscopia Confocal de Varredura a Laser - MCVL (Zeiss, LSM 780 invertido).²⁵⁻²⁷ Imagens de um único plano focal do biofilme foi capturado pelo sistema do MCVL utilizando lente de 40X de aumento e abertura de 1.2. A área selecionada para análise do biofilme foi definida aleatoriamente desde que não tão perto da borda dos discos.

2.8 Análise da Expressão gênica

Para investigar o efeito do Terpinen-4-ol na expressão do gene *gbpA*, o qual está envolvido na adesão e acúmulo em biofilme, *S. mutans* foi cultivado até a fase mid-log ($DO_{600} = 0.45$) e, em seguida as concentrações de Terpinen-4-ol 0.24 % e 0.95 % foram adicionadas e o microrganismo foi incubado a 37° C durante 15 e 30 minutos. Foram utilizados como controle, culturas sem tratamento e culturas tratadas com CHX 0.12 %. Após os tempos de incubação, a cultura bacteriana foi centrifugada (5000 rpm, 5 minutos) e tratada com o reagente RNAProtect Bacteria (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). As células bacterianas foram lisadas e o RNA foi isolado e purificado usando o RNeasy minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). As quantidades de RNAm foram quantificadas com o aparelho Synergy H1 (Biotek, Winooski, VT, USA). O RNA de cada amostra (100 ng/mL) foi transcrito de forma reversa utilizando o High Capacity cDNA Reverse Transcriptions Kit (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA), seguindo as recomendações do fabricante. PCR em Tempo Real foi utilizado para a quantificação de *gbpA* e o gene 16S rRNA foi utilizado como controle interno para normalização de dados. Os primers utilizados para o RT-PCR quantitativo foram adquiridos da Life Technologies Inc. (São Paulo, SP, Brasil) e estão listadas na Tabela 1. As sequências de primers foram obtidas a partir de estudos anteriores realizados por Bedran et al.²⁸ e Arirachakaran et al.²⁹ Reações em triplicata foram preparadas com o SYBR Green Supermix (Applied Biosystems) considerado um reagente padrão para RT-PCR. O equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems) foi utilizado para a leitura da fluorescência, seguindo-se a detecção de ciclos de amplificação, que foram analisadas pelo software StepOne 2.1 (Applied Biosystems). Todas as reações foram realizadas de acordo com o procedimento proposto por Bedran et al.²⁸

Tabela 1 - Primers utilizados para a análise de RT-PCR quantitativo

Genes	Sequência de primers	Tamanho (pb)	Referência
16S rRNA <i>S. mutans</i>	5'-CCATGTGTAGCGGTGAAATGC- 3' 5' -TCATCGTTTACGGCGTGGAC- 3'	144	Bedran et al. ²⁸
<i>gfpA</i>	5'-CGCCAATAGTTCTCCAGCCGAT- 3' 5'-CGAACCAGCGACTGCTGCA- 3'	410	Arirachakaran et al. ²⁹

2.9 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism versão 6. Os dados obtidos referentes à atividade metabólica e expressão gênica do *S. mutans* foram avaliados e apresentaram distribuição normal, utilizando-se assim os testes paramétricos ANOVA One-way seguido de pós-teste de Tukey para a comparação dos tratamentos. Todos os testes estatísticos foram considerados em nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

3. RESULTADOS

3.1 Atividade antimicrobiana

A confirmação da infecção dentinária por *S. mutans* está demonstrada na Figura 1 utilizando-se a coloração de Brown & Brenn.

A atividade antimicrobiana do Terpinen-4-ol foi analisada pelo método de microdiluição em caldo obtendo CIM e CBM a partir da concentração de 0.24 % apresentando redução microbiana próxima a 100 % (Figura 2A). Em seguida, a viabilidade celular do biofilme formado em placa foi analisada pelo teste de XTT (Figura 2B), onde pode-se observar que a redução do número de microrganismos viáveis ocorreu nas mesmas concentrações testadas para o microrganismo na forma planctônica (0.24 %). Os biofilmes desenvolvidos sobre discos de esmalte (Figura 2C e 2D) foram analisados pelo teste de XTT e razão espectral entre células viáveis e não viáveis (verde/vermelho) e pode-se observar ação antimicrobiana do Terpinen-4-ol também a partir da concentração de 0.24 % sendo sua ação semelhante à CHX 0.12 %. Em biofilmes desenvolvidos sobre dentina (Figura 2C e 2D), a

concentração de Terpinen-4-ol 0.95 % apresentou maior atividade antimicrobiana. O DMSO 0.4 % não apresentou efeito tóxico e atividade inibitória contra *S. mutans* na forma planctônica ou em biofilme (dados não mostrados).

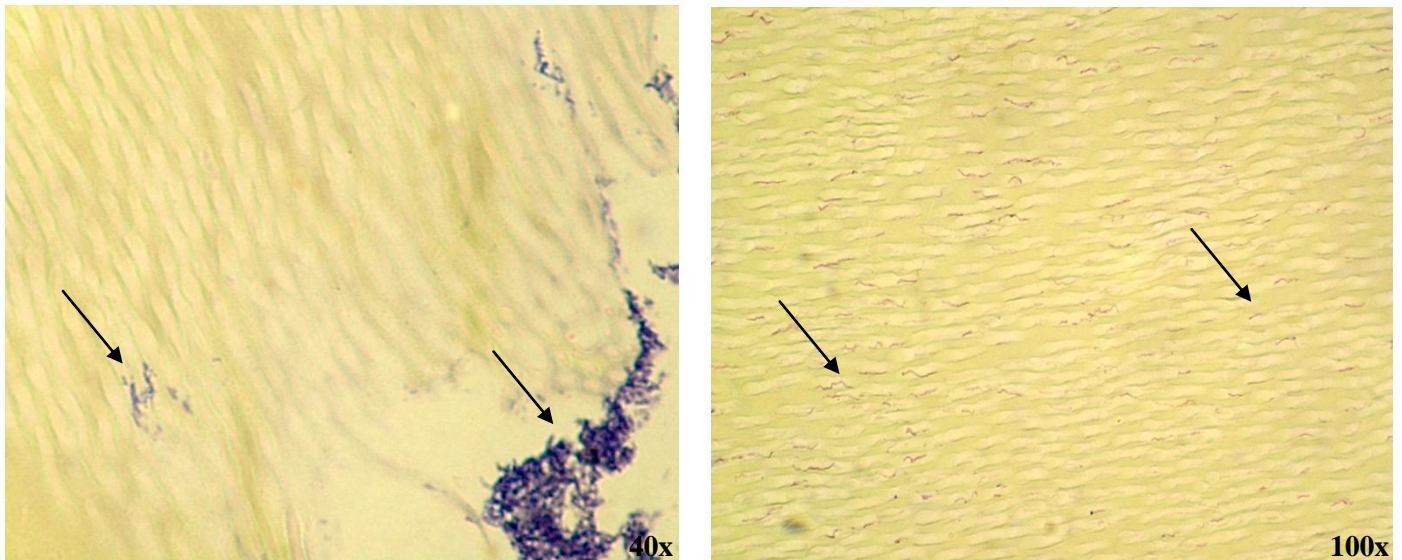
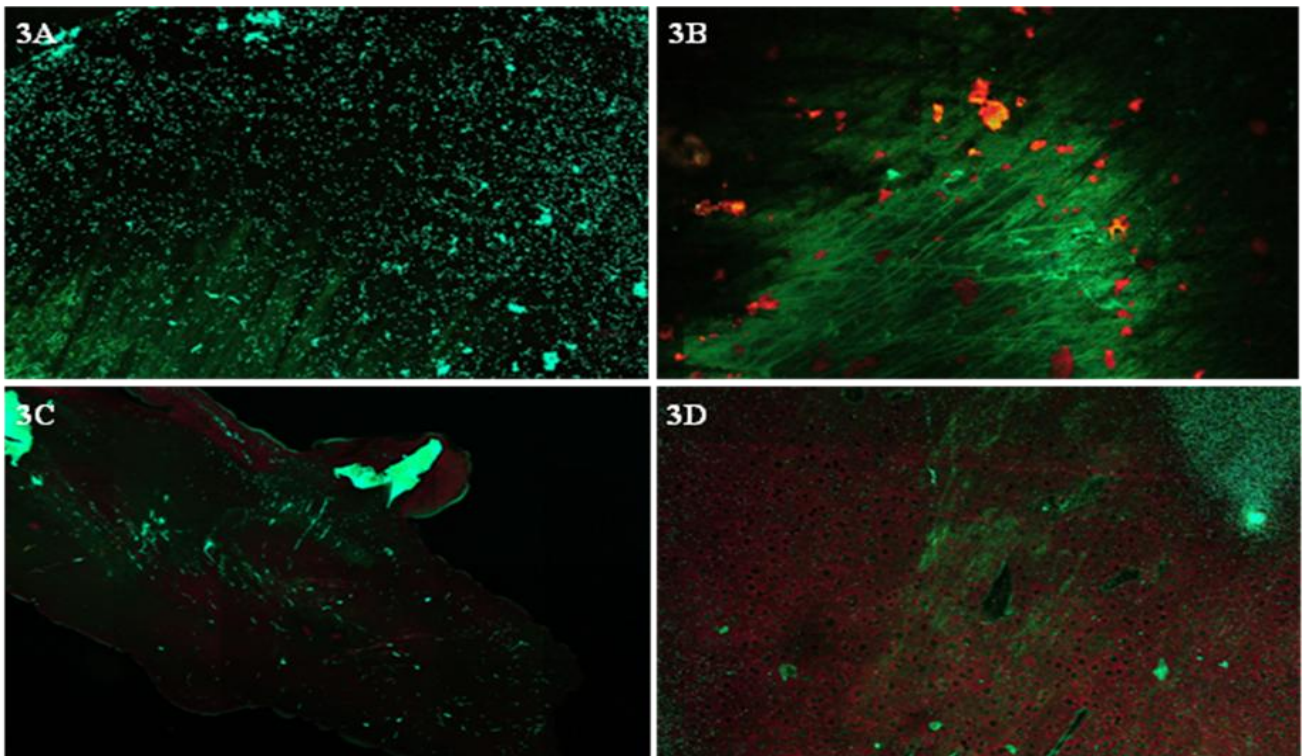
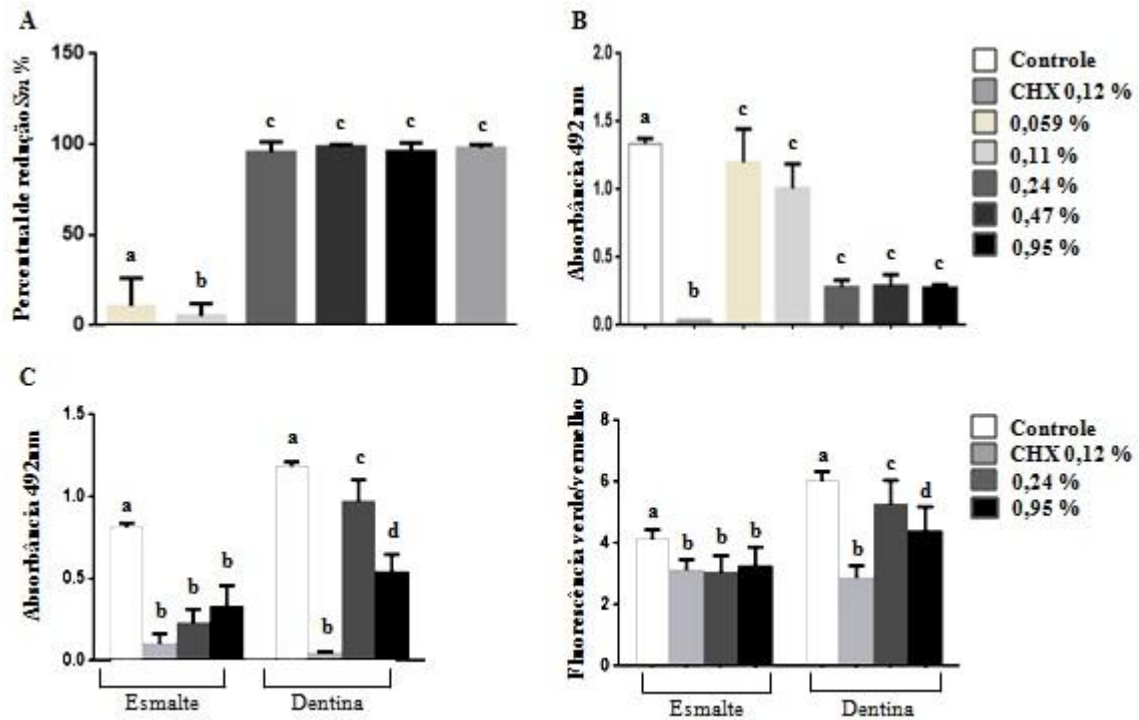


Figura 1 – Túbulos dentinários infectados com *S. mutans* (40x e 100x aprox.)

3.2 Microscopia Confocal de Varredura a Laser

A avaliação do biofilme formado em esmalte e dentina por MCVL está ilustrada nas Figuras 3 e 4 respectivamente. Os microrganismos viáveis foram corados de verde e os não-viáveis apresentaram coloração amarela-avermelhada. Pode-se observar, na Figura 3 (esmalte) que o controle (3A), apresenta massa homogênea de microrganismos viáveis. A ação da CHX (3B) e Terpinen-4-ol 0.24 % e 0.95 % (3C, 3D) apresentaram coloração amarelo-avermelhada o que significa células não-viáveis e, além disso, na maioria dos espécimes, o biofilme se apresentava com baixa densidade em algumas áreas. Confirmando os resultados obtidos nos testes anteriores e analisando as imagens (Figura 3), pode-se observar que a CHX e o Terpinen-4-ol foram eficazes na redução microbiana do biofilme de *S. mutans* em esmalte.

No biofilme de *S. mutans* desenvolvido em espécimes de dentina (Figura 4), os resultados mostram a eficácia da ação da CHX (4B) na eliminação dos microrganismos, mas houve pouca penetração do Terpinen-4-ol nos túbulos dentinários (4C e 4D).



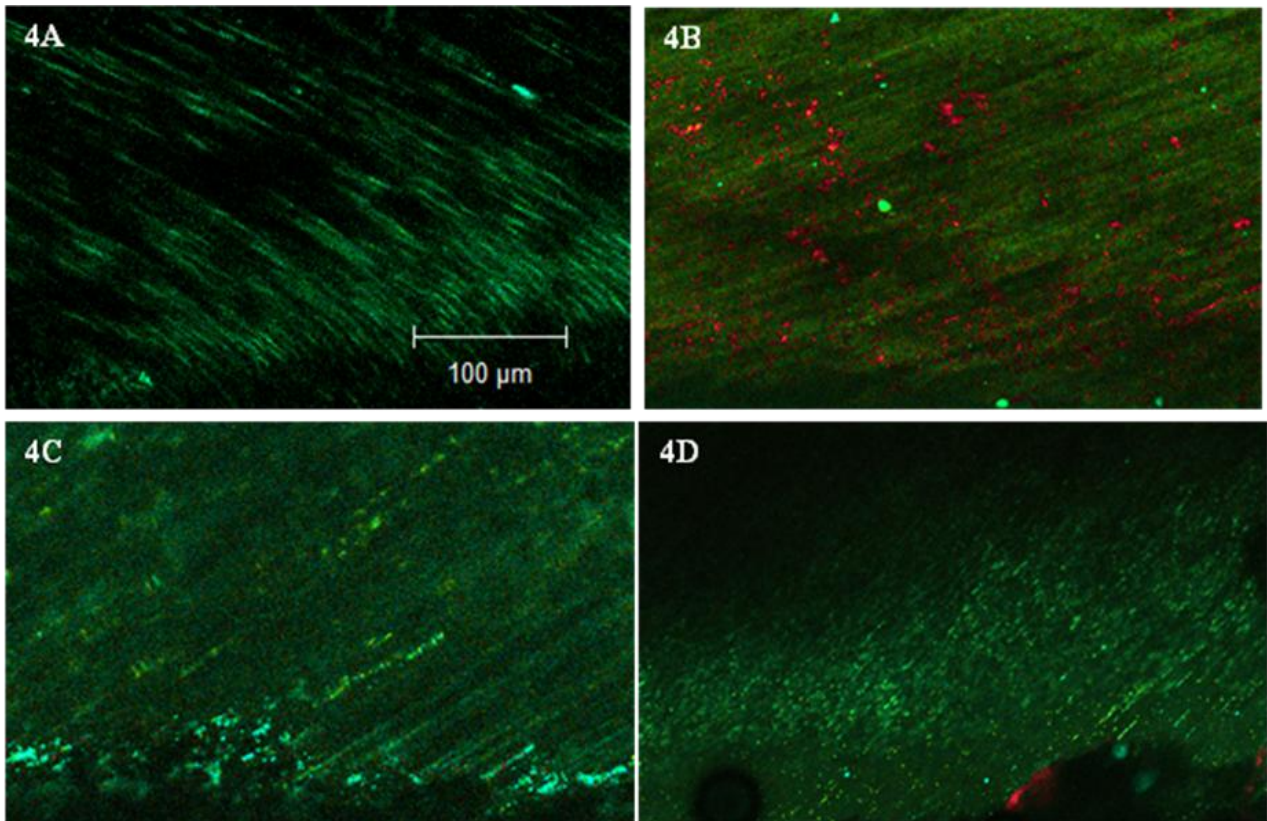


Figura 4 – Imagens de Microscopia Confocal de Varredura à Laser da ação do Terpinen-4-ol sobre biofilme de *S. mutans* ATCC 25175 desenvolvido sobre espécimes de dentina. Grupo controle negativo - BHI (A), controle positivo – CHX 0.12 % (B), Terpinen-4-ol 0.24 % (C) e Terpinen-4-ol 0.95 % (D).

3.3 Análise da Expressão gênica

O perfil da expressão do gene *gbpA* relacionado com a adesão e formação de biofilmes cariogênicos foi determinado após incubação de 15 e 30 minutos de *S. mutans*, na ausência e presença de Terpinen-4-ol 0.24 %, 0.47 % e 0.95 %. Como apresentado na Figura 5, houve redução na expressão gênica do *gbpA* (glucano de ligação de proteína A) quando em contato com todas as concentrações testadas de Terpinen-4-ol durante 15 minutos, no entanto essa expressão foi aumentada a partir da exposição durante 30 minutos. Embora a CHX apresente poder antimicrobiano elevado, ela não foi capaz de reduzir a expressão gênica de *gbpA* quando exposta ao *S. mutans* durante 15 e 30 minutos.

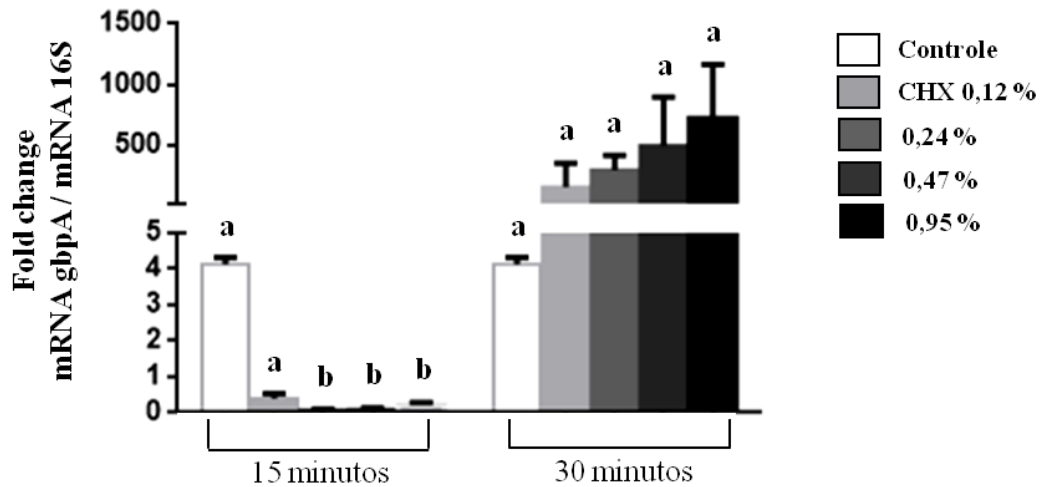


Figura 5 - Efeito do Terpinen-4-ol sobre a expressão de mRNA do gene *gbpA* envolvido na adesão e formação de biofilme cariogênico de *S. mutans*. Diferenças estatísticas estão representadas por diferentes letras para comparação entre tratamentos (ANOVA One-way seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$).

4. Discussão

Produtos naturais, tais como Terpinen-4-ol, estão se tornando promissores na área odontológica como estratégia de controle e prevenção de doenças infecciosas bacterianas como a cárie, por possuírem na sua composição substâncias com componentes biologicamente ativos que apresentam propriedades antioxidantes e antimicrobianas, proporcionando a descoberta de compostos novos e eficazes.³⁰⁻³²

A ação dos agentes antimicrobianos é, sobretudo, exercida ao nível da membrana celular da bactéria, provocando danos estruturais e funcionais como alteração da estrutura fosfolipídica da membrana celular, interrupção do sistema enzimático, comprometimento da síntese de material genético da bactéria, indução de coagulação dos constituintes citoplasmáticos, formação de compostos tóxicos, interrupção da comunicação celular (quorum sensing), além da redução do pH no interior da célula.³³

Os componentes do TTO são reconhecidos pela sua ampla gama de atividades farmacológicas, incluindo a prevenção de doenças bucais. Os monoterpenos e sesquiterpenos associados aos éteres e alcoóis são citados como os principais compostos bioativos deste produto natural e suas propriedades medicinais, incluindo citotoxicidade, atividade antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante, anticancerígena, e propriedade antiviral, têm

sido investigados nos últimos anos. Devido a isto, o presente estudo buscou avaliar *in vitro* a eficácia antimicrobiana do principal componente ativo do TTO, o Terpinen-4-ol, em microrganismo cariogênico.^{7,34,35}

Nossos resultados demonstraram que o Terpinen-4-ol possui ação antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva, *S. mutans* considerada o principal agente etiológico da cárie. Sua ação ocorreu com o microrganismo apresentado tanto na forma planctônica como em biofilmes em placa e sobre espécimes de esmalte e dentina, reduzindo sua viabilidade metabólica e esses resultados corroboram com os resultados de Hammer et al.³⁶

Segundo Marsh,³⁷ quando em biofilme, os microrganismos tornam-se mais resistentes do que na forma planctônica, pois ocorrem trocas metabólicas intra e interespecíes. Estudos na tentativa de controle do biofilme estão voltados para substâncias naturais, que têm potentes microbiocidas e atividades antibiofilme de amplo espectro e representam um baixo risco para o desenvolvimento de resistência. Há duas razões principais pelas quais os óleos essenciais não criam linhagens de bactérias resistentes, isto é justificado por serem complexos e por abrangerem numerosos compostos em proporções variáveis, dependendo do tipo químico da planta. Sendo assim, devem ocorrer múltiplas e simultâneas mutações nas bactérias para que elas possam escapar de todos os mecanismos antimicrobianos dos componentes presentes nos óleos essenciais.^{38,39}

A exposição bacteriana a baixas concentrações do Terpinen-4-ol, segundo Thomsen et al.⁵ seria responsável por promover resistência bacteriana. Entretanto foi demonstrado que todas as tentativas de indução de resistência bacteriana ao Terpinen-4-ol foram mal sucedidas.^{40,41} Além disso, esse componente possui um mecanismo de ação que consiste na capacidade de penetrar e danificar as estruturas da membrana celular de forma não específica, causando a perda do material intracelular e incapacidade de manter a homeostase.⁴²⁻⁴⁵

A redução evidente das células do biofilme com atividade metabólica medida por ensaio de XTT e razão espectral verde/vermelho são métodos que realmente tem mostrado excelente aplicabilidade, pois são capazes de avaliar um biofilme inalterado, detectando uma redução significativa da viabilidade do biofilme monoespécie após 60 segundos de exposição ao Terpinen-4-ol e ao controle positivo CHX. Estudos de tempo de morte mostraram que o Terpinen-4-ol possui ação antimicrobiana, antifúngica, antiviral, anticancerígena e antiinflamatória maior quando usado isoladamente do que quando presente no óleo⁴⁶ estando de acordo com os resultados obtidos neste estudo. Sendo assim, nossos resultados mostraram

que o Terpinen-4-ol apresenta potencial na eliminação das bactérias presentes no biofilme, sendo de grande importância no tratamento de doenças bucais, como a cárie.

S. mutans por possuir diâmetro de 0.7 – 0.9 µm tem sua penetração no interior dos túbulos dentinários (1.5 – 2.0 µm de diâmetro) facilitada.²⁷ Isto foi confirmado por cortes histológicos dos espécimes corados com Brown & Brenn (Fig. 1) e pela comparação das MCVL das dentinas infectadas e não infectadas (Fig. 4), demonstrando a validade do método de centrifugação utilizado neste estudo para infecção da dentina.²⁷ Este experimento teve como objetivo simular a presença de bactérias residuais em dentina e determinar se os colutórios (CHX e Terpinen-4-ol) foram capazes de penetrar nos túbulos dentinários e se possuem ação antimicrobiana.

A clorexidina (CHX) 0.12 % apresentou elevada atividade antimicrobiana contra *S. mutans* na forma planctônica e em biofilmes de esmalte e dentina, sendo sua ação atribuída ao seu alto poder de penetração através da membrana bacteriana, conduzindo à destruição da parede celular e extrusão dos componentes intracelulares bacterianos.⁴⁷ Terpinen-4-ol apresentou excelentes resultados nas duas concentrações estudadas na redução do biofilme de *S. mutans* nas superfícies de esmalte, no entanto não apresentou elevada redução microbiana do biofilme formado em dentina. Isso talvez tenha ocorrido devido sua apresentação ser na forma de um óleo não permitindo um bom escoamento para o interior dos túbulos dentinários.

Os Gbps são proteínas de ligação que participam na formação do biofilme permitindo a adesão de outras células bacterianas, devido sua atuação ser como receptores de superfície celular para os glucanos sintetizados a partir da sacarose.^{14,48} A formação do biofilme é influenciada pela comunicação bacteriana através do sistema de sinalização quorum-sensing.⁴⁹ Mais especificamente, em *S. mutans*, o produto do gene *gbpA* é conhecido por desempenhar um papel crítico na formação de biofilme.⁵⁰ O nosso estudo mostrou que este gene foi regulado negativamente quando *S. mutans* foi cultivado durante 15 minutos na presença do Terpinen-4-ol, concordando com estudos de Jeon et al.⁵¹ que afirmam que os antimicrobianos apresentam capacidade para reduzir a síntese de glucanos. No entanto *gbpA* foi significativamente regulado de forma positiva quando em contato com Terpinen-4-ol por mais de 30 minutos, contribuindo provavelmente para o aumento do biofilme formado sob esta condição.

Curiosamente, quando *S. mutans* foi cultivado na presença da CHX, houve uma superexpressão gênica tanto em 15 minutos de exposição quanto em 30 minutos, confirmando os resultados encontrados por Dong et al.⁵² em estudo com outros fatores de virulência

associados ao *S. mutans*. Um fato importante relatado por Pumbwe et al.⁵³ é que a superexpressão de alguns genes é uma das principais causas de resistência a antibióticos clinicamente relevantes em muitas bactérias, sendo necessários mais estudos aprofundados na tentativa de esclarecer este mecanismo.

5. Conclusão

O nosso estudo trouxe evidências de que o biofilme tratado com Terpinen-4-ol, pode ser modulado por uma diminuição (15 minutos) da expressão do gene específico, *gbpA*, responsável pela adesão de *S. mutans* no biofilme. O mesmo possui atividade antimicrobiana e antibiofilme, in vitro, contra o principal agente etiológico da cárie, o *S. mutans*, podendo ser uma alternativa para o tratamento de doenças infecciosas bucais, principalmente por não causar efeitos colaterais e resistência bacteriana.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e também pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Nº Processo 2014/23241-6).

Conflito de interesse

Nada a declarar.

Aprovação ética

Os autores confirmam que têm dado a devida atenção à proteção da propriedade intelectual associada a este trabalho e que não existem impedimentos para a publicação. Ao fazê-lo eles confirmam que têm seguido os regulamentos da nossa instituição.

Referências

1. Sun LM, Zhang CL, Li P. Characterization, antibiofilm, and mechanism of action of novel PEG-stabilized lipid nanoparticles loaded with terpinen-4-ol. *J Agric Food Chem* 2012;60(24):6150-6.
2. Wu CS, Chen YJ, Chen JJ, Shieh JJ, Huang CH, Lin PS, et al. Terpinen-4-ol induces apoptosis in human nonsmall cell lung cancer in vitro and in vivo. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012;2012:818261.

3. Nogueira MN, Aquino SG, Rossa Junior C, Spolidorio DM. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1 β , IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflamm Res* 2014;63(9):769-78.
4. Francisconi RS, Bordini EAF, Nogueira MNM, Fontana A, Bedran TBL, Correia MF, et al. Effect of *Melaleuca Alternifolia* and Its Components on *Candida Albicans* and *Candida Tropicalis*. *J US-China Med Sci* 2015;12:91-8.
5. Thomsen NA, Hammer KA, Riley TV, Belkum AV, Carson CF. Effect of habituation to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on the subsequent susceptibility of *Staphylococcus* spp. to antimicrobials, triclosan, tea tree oil, terpinen-4-ol and carvacrol. *Int J Antimicrob Agents* 2013;41(4):343-51.
6. Oliveira ACM, Fontana A, Negrini TC, Nogueira MNM, Bedran TBL, Andrade CR, et al. Use of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) oil in dentistry: perspectives on its use as alternative antimicrobial to infectious diseases of oral origin. *Rev Bras Pl Med* 2011;13(4):492-9.
7. Carson CF, Riley TV. Safety, efficacy and provenance of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. *Contact Dermatitis* 2001;45(2):65-7.
8. Cuaron JA, Dulal S, Song Y, Singh AK, Montelongo CE, Yu W, et al. Tea tree oil-induced transcriptional alterations in *Staphylococcus aureus*. *Phytother Res* 2013;27(3):390-6.
9. Falci SP, Teixeira MA, Chagas PF, Martinez BB, Loyola AB, Ferreira LM, et al. Antimicrobial activity of *Melaleuca* sp. oil against clinical isolates of antibiotics resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta Cir Bras* 2015;30(6):401-6.
10. Maggi F, Bramucci M, Cecchini C, Coman MM, Cresci A, Cristalli G, et al. Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: ideal candidate for anti-cariogenic formulations. *Fitoterapia* 2009;80(6):313-9.
11. Anita P, Sivasamy S, Madan Kumar PD, Balan IN, Ethiraj S. In vitro antibacterial activity of *Camellia sinensis* extract against cariogenic microorganisms. *J Basic Clin Pharm* 2014;6(1):35-9.
12. Ajagannavar SL, Battur H, Shamarao S, Sivakumar V, Patil PU, Shanavas P. Effect of aqueous and alcoholic licorice (*Glycyrrhiza Glabra*) root extract against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* in comparison to chlorhexidine: an in vitro study. *J Int Oral Health* 2014;6(4):29-34.

13. Lynch DJ, Fountain TL, Mazurkiewicz JE, Banas JA. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *FEMS Microbiol Lett* 2007;268(2):158-65.
14. Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral *streptococci*. *Crit Ver Oral Biol Med* 2003;14(2):89-99.
15. Shah DS, Russell RR. A novel glucan-binding protein with lipase activity from the oral pathogen *Streptococcus mutans*. *Microbiology* 2004;150(Pt 6):1947-56.
16. Kwieciński J, Eick S, Wójcik K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *Int J Antimicrob Agents* 2009;33(4):343-7.
17. Izumida FE, Moffa EB, Vergani CE, Machado AL, Jorge JH, Giampaolo ET. In vitro evaluation of adherence of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Streptococcus mutans* to an acrylic resin modified by experimental coatings. *Biofouling* 2014;30(5):525–33.
18. 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.
19. Jin Y, Yip HK, Samaranayake YH, Yau JY, Samaranayake LP. Biofilm forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high oral yeast carriage in human immunodeficiency virus-infection. *J. Clin. Microbiol* 2003;41(7):2961-7.
20. 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):1241-51.
21. Miladi H, Mili D, Ben Slama R, 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.
22. Soares DG, Ribeiro AP, da Silveira VF, Hebling J, de Souza Costa CA. Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. *Clin Oral Investig* 2013;17(8):1901–9.
23. Moura JS, da Silva WJ, Pereira T, Cury AADB, Garcia RCMR. Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. *J Prosthet Dent* 2006;96(3):205-11.

24. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Giampaolo ET, Cruz NC. Adherence in vitro of *Candida albicans* to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle. Arch Oral Biol 2010;55(10):763-70.
25. Van de Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MCDNJM, Cendi MS. An in vitro biofilm model for enamel desmineralization and antimicrobial dose-response studies. Biofouling 2011;27(9):1057-63.
26. Hahnel S, Mühlbauern G, Hoffmann J, Ionescu A, Bürgers R, Rosentritt M, Handel G, Häberlein I. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* biofilm formation and metabolic activity on dental materials. Acta Odontol Scand. 2012; 70: 114-121.
27. Hamama HH, Yiu CK, Burrow MF. Viability of Intratubular Bacteria after Chemomechanical Caries Removal. J Endod 2014;40(12):1972-6.
28. Bedran TBL, Grignon L, Spolidorio DP, Grenier D. Subinhibitory Concentrations of Triclosan Promote *Streptococcus mutans* Biofilm Formation and Adherence to Oral Epithelial Cells. PLoS One 2014;9(2):e89059.
29. Arirachakaran P, Benjavongkulchai E, Luengpailin S, Ajdić D, Banas JA. Manganese affects *Streptococcus mutans* virulence gene expression. Caries Res 2007;41(6):503-11.
30. Giacaman RA, Contzen MP, Yuri JÁ, Muñoz-Sandoval C. Anticaries effect of an antioxidant-rich apple concentrate on enamel in an experimental biofilm-demineralization model. J Appl Microbiol 2014;117(3):846-53.
31. Xu JS, Cui Y, Liao XM, Tan XB, Cao X. Effect of emodin on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans* and the development of caries in rats. Exp Ther Med 2014;8(4):1308-12.
32. Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE, et al. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. Arch Oral Biol 2006;51(1):15-22.
33. Radulović NS, Blagojević PD, Stojanović-Radić ZZ, Stojanović NM. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. Curr Med Chem 2013;20(7):932-52.
34. Hammer KA, Carson CF, Riley TV, Nielsen JB. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. Food Chem Toxicol 2006;44(5):616-25.

35. Wang M, Zhao J, Avula B, Wang YH, Chittiboyina AG, Parcher JF, et al. Quality evaluation of Terpinen-4-ol-type Australian tea tree oils and commercial products: an integrated approach using conventional and chiral GC/MS combined with chemometrics. *J Agric Food Chem* 2015;63(10): 2674-82.
36. Hammer KA, Dry L, Johnson M, Michalak EM, Carson CF, Riley TV. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18(6):389-92.
37. Marsh, P.D. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 2004;38(3):204-11.
38. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - a review. *Food Chem Toxicol* 2008;46(2):446-75.
39. Mertas A, Garbusińska A, Szliszka E, Jureczko A, Kowalska M, Król W. The influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on fluconazole activity against fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Biomed Res Int* 2015;2015:590470.
40. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Frequencies of resistance to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and rifampicin in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32(2):170-3.
41. Mondello F, DeBernardis F, Girolamo A, Salvatore G, Cassone A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and resistant human pathogenic yeasts. *J Antimicrob Chemother* 2003;51(5):1223-9.
42. Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B. Mechanism of hydrocarbons. *Microbiol Rev* 1995;59(2):201-22.
43. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol* 2000;88(1):170-5.
44. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoterpene component Terpinen-4-ol on the development of single- and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(2):909-15.
45. Thosar N, Basak S, Bahadure RN, Rajurkar M. Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An *in vitro* study. *Eur J Dent* 2013;7(Suppl 1):S71-7.
46. Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol* 2001;91(3):492-7.

47. Borges FM, de Melo MA, Lima JP, Rodrigues LK. Antimicrobial effect of chlorhexidine digluconate in dentin: In vitro and in situ study. *J Conserv Dent* 2012;15(1):22–6.
48. 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.
49. Senadheera D, Cvitkovitch DG. Quorum sensing and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Adv Exp Med Biol* 2008;631:178-88.
50. Huang R, Li M, Gregory RL. Nicotine promotes *Streptococcus mutans* extracellular polysaccharide synthesis, cell aggregation and overall lactate dehydrogenase activity. *Arch Oral Biol* 2015;60(8):1083-90.
51. Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural Products in Caries Research: Current (Limited) Knowledge, Challenges and Future Perspective. *Caries Res* 2011;45(3):243–63.
52. Dong L, Tong Z, Linghu D, Lin Y, Tao R, Liu J, et al. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39(5):390–5.
53. Pumbwe L, Skilbeck CA, Wexler HM. Induction of multiple antibiotic resistance in *Bacteroides fragilis* by benzene and benzene derived active compounds of commonly used analgesics, antiseptics and cleaning agents. *J Antimicrob Chemother* 2007;60(6):1288–97.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cárie dentária é uma doença infecciosa de origem bacteriana e, portanto uma abordagem antimicrobiana para prevenção e controle da doença, além da interferência no mecanismo de formação do biofilme é de extrema importância. Este estudo buscou avaliar o efeito antimicrobiano do Terpinen-4-ol sobre bactéria cariogênica e sua capacidade de modulação da expressão do gene *gbpA* envolvido na adesão do microrganismo em biofilme.

Na publicação 1 foi possível observar que Terpinen-4-ol é um antimicrobiano eficaz na redução de *S. mutans* apresentado tanto na forma planctônica quanto em biofilme, com ação semelhante à Clorexidina. Nosso estudo também demonstrou que Terpinen-4-ol é capaz de modular a expressão do gene *gbpA* envolvido na formação de biofilme cariogênico, reduzindo a síntese de glucanos, alcançando o objetivo final da terapia antimicrobiana que é promover um desequilíbrio ecológico no biofilme.

Dessa forma, considera-se que este componente possa ser eficaz na manutenção da saúde bucal adequada, interferindo na formação do biofilme, além de ser uma alternativa ao uso da Clorexidina, por não causar efeitos adversos indesejáveis, além de não promover resistência bacteriana.

REFERÊNCIAS*

1. Almeida PF, Franca MP, Santos SP, Moreira RS, Tunes UR. *Streptococci* microbiota associated with initial formation of dental plaque. R Ci Med Biol. 2002; 1(1): 33-41.
2. Almeida LS, Murata RM, Yatsuda R, Dos Santos MH, Nagem TJ, Alencar SM, et al. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. Phytomedicine. 2008; 15(10): 886-91.
3. Arirachakaran P, Benjavongkulchai E, Luengpailin S, Ajdić D, Banas JA. Manganese affects *Streptococcus mutans* virulence gene expression. Caries Res. 2007; 41(6): 503–11.
4. 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.
5. Barbieri DSV, Tonial F, Lopez PVA, Maia BHLNS, Santos GD, Ribas MO et al. Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol. 2014; 59(9): 887–96.
6. Bedran TB, Grignon L, Spolidorio DP, Grenier D. Subinhibitory concentrations of triclosan promote *Streptococcus mutans* biofilm formation and adherence to oral epithelial cells. PLoS One. 2014; 9(2): e89059.
7. Belibasakis GN. Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. Arch Oral Biol. 2014; 59(1): 66-72.
8. Brophy JJ, Davies NW, Southwell IA, Stiff IA, Williams LR. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). J Agric Food Chem. 1989; 37(5): 1330-5.
9. Carson CF, Riley TV. Safety, efficacy and provenance of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. Contact Dermatitis. 2001; 45(2): 65-7.
10. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(1): 50-62.
11. Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. In vitro and in vivo activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008; 105(3): 327-32.
12. Cosyn J, Wyn I, De Rouck T, Collis K, Bottenberg P, Matthijs S et al. Short-term anti-plaque effect of two chlorhexidine varnishes. J Clin Periodontol. 2005; 32(8): 899-904.
13. Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. J Appl Microbiol. 2001; 91(3): 492-7.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

14. Da Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EA, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz Dent J*. 2008; 19(4): 364-9.
15. De Soet JJ, Gruythuysen RJ, Bosch JA, Van Amerongen WE. The effect of 6-monthly application of 40% chlorhexidine varnish on the microflora and dental caries incidence in a population of children in Surinam. *Caries Res*. 2002; 36(6): 449-55.
16. Do T, Devine D, Marsh FD. Oral biofilms: molecular analysis, challenges and future prospects in dental diagnostics. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2013; 5: 11-9.
17. Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE et al. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. *Arch Oral Biol*. 2006; 51(1): 15-22.
18. 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*. 2013; 2(3): 110-6.
19. Filoche SK, Soma K, Sissons CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol Immunol*. 2005; 20(4): 221-5.
20. Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res*. 2010; 89 (1): 8-18.
21. García-Godoy F., Hicks M.J. Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *J Am Dent Assoc*. 2008; 139 Suppl: 25S-34S.
22. Groppo FC, Ramacciato JC, Simões RP, Flório FM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. *Int Dent J*. 2002; 52(6): 433-7.
23. Hahnel S, Mühlbauern G, Hoffmann J, Ionescu A, Bürgers R, Rosentritt M, et al. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* biofilm formation and metabolic activity on dental materials. *Acta Odontol Scand*. 2012; 70(2): 114-21.
24. Hamama HH, Yiu CK, Burrow MF. Viability of Intratubular Bacteria after Chemomechanical Caries Removal. *J Endod*. 2014; 40 (12): 1972-6.
25. Hammer KA, Dry L, Johnson M, Michalak EM, Carson CF, Riley TV. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. *Oral Microbiol Immunol*. 2003; 18(6): 389-92.
26. Hassan KA, Jackson SM, Penesyan A, Patching SG, Tetu SG, Eijkelkamp BA, et al. Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110(50): 20254-9.
27. Jandourek A, Vaishampayan JK, Vazquez JA. Efficacy of *Melaleuca* oral solution for the treatment of fluconazole refractory oral candidiasis in AIDS patients. *AIDS*. 1998; 12(9): 1033-7.

28. Jenkinson HF, Lappin–Scott HM. Biofilms adhere to stay. *Trends Microbiol.* 2001; 9(1): 9–10.
29. Jung JE, Pandit S, Jeon JG. Identification of linoleic acid, a main component of the n-hexane fraction from *Dryopteris crassirhizoma*, as an anti-*Streptococcus mutans* biofilm agent. *Biofouling.* 2014; 30(7): 789-98.
30. Kayalvizhi G, Subramaniyan B, Suganya G. Topical application of antibiotics in primary teeth: an overview. *J Dent Child (Chic).* 2013; 80(2): 71-9.
31. Keszei A, Hassan Y, J. Foley JW. A Biochemical interpretation of terpene chemotypes in *Melaleuca alternifolia*. *J Chem Ecol.* 2010; 36(6): 652-61.
32. Khairnar MR, Karibasappa GN, Dodamani AS, Vishwakarma P, Naik RG, Deshmukh MA. Comparative assessment of Cranberry and Chlorhexidine mouthwash on streptococcal colonization among dental students: A randomized parallel clinical trial. *Contemp Clin Dent.* 2015; 6(1): 35-9.
33. Kwieciński J, Eick S, Wójcik K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33(4): 343-7.
34. Lee SH. Antimicrobial effects of herbal extracts on *Streptococcus mutans* and normal oral streptococci. *J Microbiol.* 2013; 51(4): 484-9.
35. Legéňová K, Bujdáková H. The role of *Streptococcus mutans* in the oral biofilm. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2015; 64(4): 179-87.
36. López-Gómez SA, Villalobos-Rodelo JJ, Ávila-Burgos L, Casanova-Rosado JF, Vallejos-Sánchez AA, Lucas-Rincón SE, et al. Relationship between premature loss of primary teeth with oral hygiene, consumption of soft drinks, dental care, and previous caries experience. *Sci Rep.* 2016; 6:21147.
37. Loughlin R, Gilmore BF, McCarron PA, Tunney MM. Comparison of the cidal activity of tea tree oil and terpinen-4-ol against clinical bacterial skin isolates and human fibroblast cells. *Lett Appl Microbiol.* 2008; 46(4): 428-33.
38. Lynch DJ, Michalek SM, Zhu M, Drake D, Qian F, Banas JA. Cariogenicity of *Streptococcus mutans* glucan-binding protein deletion mutants. *Oral Health Dent Manag.* 2013; 12(4): 191-9.
39. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod.* 2011; 37(10): 1380-5.
40. Maggi F, Bramucci M, Cecchini C, Coman MM, Cresci A, Cristalli G et al. Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: ideal candidate for anti-cariogenic formulations. *Fitoterapia.* 2009; 80(6): 313-9.
41. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994; 8(2): 263–71.

42. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*. 2003; 149(Pt 2): 279–94.
43. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health*. 2006; 6 Suppl 1: S14.
44. Matsui R, Cvitkovitch D. Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiol*. 2010; 5(3): 403-17.
45. Matsumi Y, Fujita K, Takashima Y, Yanagida K, Morikawa Y, Matsumoto-Nakano M. Contribution of glucan-binding protein A to firm and stable biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol*. 2015; 30(3): 217-26.
46. Matsumoto-Nakano M, Fujita K, Ooshima T. Comparison of glucan-binding proteins in cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*. 2007; 22(1): 30-5.
47. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12(1): 147-79.
48. Mei ML, Li Q, Chu CH, Lo ECM, Samaranayake LP. Antibacterial effects of silver diamine fluoride on multi-species cariogenic biofilm on caries. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2013; 12: 4.
49. Miladi H, Mili D, Ben Slama R, 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.
50. Mohankumar KP, Priya NK, Madhushankari GS. Anti cariogenic efficacy of herbal and conventional tooth pastes - a comparative in-vitro study. *J Int Oral Health*. 2013; 5(2): 8-13.
51. Moura JS, da Silva WJ, Pereira T, Cury AADB, Garcia RCMR. Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. *J Prosthet Dent*. 2006; 96(3): 205-11.
52. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*. 2007; 70(3): 461-77.
53. Nogueira MN, Aquino SG, Rossa Junior C, Spolidorio DM. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1 β , IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflamm Res*. 2014; 63(9): 769-78.
54. Santamaria Jr M, Petermann KD, Vedovello SMS, Degan V, Lucato A, Franzini CM. Antimicrobial effect of *Melaleuca alternifolia* dental gel in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2014; 145(2): 198-202.
55. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet*. 2007; 369(9555): 51–9.
56. Shelton D, Zabarar D, Chohan S, Wyllie G, Baverstock P, Leach D, et al. Isolation and partial characterisation of a putative monoterpene synthase from *Melaleuca alternifolia*. *Plant Physiol Biochem*. 2004; 42(11): 875-82.

57. Shinno Y, Ishimoto T, Saito M, Uemura R, Arino M, Marumo K, et al. Comprehensive analyses of how tubule occlusion and advanced glycation end-products diminish strength of aged dentin. *Sci Rep.* 2016; 6: 19849. doi: 10.1038/srep19849.
58. Soares DG, Ribeiro AP, da Silveira VF, Hebling J, de Souza Costa CA. Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. *Clin Oral Investig.* 2013; 17(8): 1901–9.
59. Sun LM, Zhang CL, Li P. Characterization, antibiofilm, and mechanism of action of novel PEG-stabilized lipid nanoparticles loaded with Terpinen-4-ol. *J Agric Food Chem.* 2012; 60(24): 6150-6.
60. 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.
61. 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): 1241-51.
62. Thomsen NA, Hammer KA, Riley TV, Belkum AV, Carson CF. Effect of habituation to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on the subsequent susceptibility of *Staphylococcus* spp. to antimicrobials, triclosan, tea tree oil, terpinen-4-ol and carvacrol. *Int J Antimicrob Agents.* 2013; 41(4): 343-51.
63. Twetman, S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Res.* 2004; 38(3): 223-9.
64. Valera MC, Maekawa LE, Oliveira LC, Jorge AOC, Shygei E, Carvalho CAT. In vitro antimicrobial activity of auxiliary chemical substances and natural extracts on *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Appl Oral Sci.* 2013; 21(2): 118-23.
65. Van de Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MC, Cenci MS. An in vitro biofilm model for enamel desmineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling.* 2011; 27(9): 1057-63.
66. Vieira AR. Genetics and Caries – Perspectives. *Braz Oral Res.* 2012; 26(1): 7-9.
67. Wu CS, Chen YJ, Chen JJ, Shieh JJ, Huang CH, Lin PS, et al. Terpinen-4-ol induces apoptosis in human nonsmall cell lung cancer in vitro and in vivo. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012: 818261.
68. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Giampaolo ET, Cruz NC. Adherence in vitro of *Candida albicans* to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle. *Arch Oral Biol.* 2010; 55(10): 763-70.

APÊNDICE A

Metodologia descrita

MATERIAL E MÉTODO

Isolado bacteriano

Foi utilizada neste estudo a cepa de referência de *S. mutans* (ATCC 25175).

Reativação e Manutenção da espécie bacteriana

O microrganismo foi reativado 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. Em seguida, o material resultante teve sua turbidez ajustada com o auxílio do espectrofotômetro (Eppendorf AG, 22331 Hamburg, Germany), até atingir absorvância similar a 0.15 em 600 nm que corresponde a uma suspensão para solução de trabalho de 1×10^7 UFC / mL.

Identificação e Congelamento das amostras

Para identificação da espécie bacteriana, o microrganismo foi transferido para placa de AMS (Ágar Mitis Salivarius, Himedia, Vadhani, MB, IND) e mantido em jarra de microaerofilia por 48 h a 37° C. A partir das colônias crescidas em placa, foi realizada coloração de Gram para identificação bacteriana através de sua morfologia. O congelamento foi realizado transferindo as colônias crescidas em ágar para novo meio de cultura BHI que foram levadas em estufa para crescimento de acordo com as condições fisiológicas do microrganismo. Após o crescimento, a suspensão foi centrifugada e as células lavadas duas vezes com solução salina estéril, o sobrenadante foi descartado e o pellet com o microrganismo foi resuspenso em BHI glicerol 20 % para o congelamento das amostras em freezer a -20° C.

Reagentes

O componente solúvel do óleo de *Melaleuca alternifolia*: Terpinen-4-ol com 95 % de pureza (Sigma-Aldrich , St Louis, MO, USA) foi diluído em BHI nas concentrações 0.95 %; 0.47 %; 0.24 %; 0.11 % e 0.059 %. Solução de 0.4 % DMSO (Sigma-Aldrich, St Louis, MO,

USA) foi adicionada na maior concentração a fim de aumentar a solubilidade do óleo (Nogueira et al.⁵³, 2014). Solução de CHX 0.12 % foi preparada em meio BHI como controle positivo e como controle negativo foi utilizado apenas o meio de cultura BHI. Os grupos experimentais e controle tiveram um total de doze amostras cada (n=12).

Análise Antimicrobiana do Terpinen-4-ol em microrganismo planctônico

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima foi determinada através do método de microdiluição em caldo. Utilizando uma placa de cultura celular de 96 well, 200 µL das concentrações testadas de Terpinen-4-ol foram adicionadas aos poços e em seguida foi inoculado 2µL do *S. mutans* previamente ajustado (10^7 UFC / mL). Poços sem Terpinen-4-ol, somente com BHI e o microrganismo foram utilizados como controle negativo. Poços com o microrganismo e a CHX foram utilizados como controle positivo. As placas foram incubadas por 24 h a 37° C de acordo com as condições fisiológicas do microrganismo. Decorrido este período, os poços foram examinados visualmente e para confirmação do resultado pela inspeção visual, no mesmo momento da análise, a placa foi levada para leitura da absorbância (492nm) em leitor de ELISA (Multiskan, Ascent 354, Labsystems CE, Lês Ulis, France). A absorbância foi expressa em valores numéricos, e estes valores foram ajustados de forma a expressarem o crescimento de *S. mutans*. A CIM foi definida como a menor concentração da porção solúvel sem crescimento visível (Kwieciński et al.³³, 2009). Todos os ensaios foram realizados em triplicata em momentos diferentes.

Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Dos poços sem turvação visível, foram retirados 10 µL os quais foram plaqueados em meio de cultura MSA. As placas foram incubadas durante 48h em estufa e o número de colônias foi avaliado. A CBM foi definida como a menor concentração capaz de reduzir o inóculo inicial a $\geq 99.9\%$ (Kwieciński et al.³³, 2009).

Análise antimicrobiana do Terpinen-4-ol sobre biofilme em placa

Formação do Biofilme

O método de formação de biofilme única espécie em placa de cultura celular foi realizado segundo Thein et al.⁶¹, (2007). *S. mutans* foi crescido em meio BHI suplementado com extrato de levedura de acordo com as condições fisiológicas do microrganismo e posteriormente a absorbância foi ajustada a uma concentração de 10^7 UFC / mL. Utilizando-se técnicas assépticas, 100µL da suspensão microbiana crescida foi distribuída em diferentes poços da placa de 96 well, seguida de incubação à 37°C por 1h30 min, que corresponde à fase de adesão do microrganismo à superfície dos poços. Após o período de adesão, a suspensão microbiana foi aspirada e cada poço foi lavado duas vezes com solução salina estéril para remoção de microrganismos não-aderidos. Em seguida, 100 µL do meio de cultura específico para o microrganismo foi adicionado em cada poço e as placas foram incubadas durante 48 h para que haja a formação do biofilme.

Efeito do Terpinen-4-ol sobre biofilme em placa

Após 48 h da formação do biofilme de *S. mutans*, o meio foi aspirado e as diferentes concentrações do Terpinen-4-ol (0.95 %; 0.47 %; 0.24 %; 0.11 %; 0.059 %) foram adicionadas aos poços. Foram utilizados como controle negativo poços sem a porção solúvel e como controle positivo a CHX 0.12 %. As placas foram incubadas novamente durante 24 h. O efeito do Terpinen-4-ol sobre o biofilme foi analisado pela quantificação e análise da viabilidade celular pelo método de XTT.

Análise metabólica do biofilme

O ensaio de redução do Sal de Tetrazolium - XTT (Sigma, MO, USA) avalia a presença de microrganismos não eliminados pela ação antimicrobiana do Terpinen-4-ol por meio da atividade metabólica de células de *S. mutans*. O XTT (sal amarelo) é reduzido por bactérias metabolicamente ativas, em um produto solúvel em água – formazano, o qual é medido espectrofotometricamente (Da Silva et al.¹⁴, 2008). Após 24 h da ação do terpinen-4-ol, o meio foi aspirado e os poços foram lavados duas vezes com solução salina estéril. Em seguida 100µL da solução de XTT foi adicionada aos poços e a placa foi incubada durante 3 h protegida da luz. Após esse período avaliou-se viabilidade celular de maneira proporcional à absorbância determinada a 492nm em leitor de ELISA (Multiskan, Ascent 354, Labsystems CE, Lês Ulis, France). A concentração inibitória mínima do biofilme (CIMB) foi definida como a menor concentração testada, que inibiu em 50 % a formação do biofilme (Miladi et al.⁴⁹, 2016).

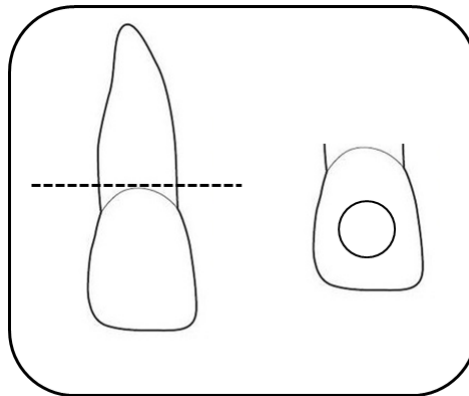
Coleta da saliva para utilização na adesão de microrganismos

Um único voluntário foi convidado a participar da pesquisa para a doação de saliva (CAAE 44823115.4.0000.5416). Voluntário sadio, que não apresentava doenças sistêmicas graves ou doenças bucais e não fazia uso de medicamentos que pudesse alterar as propriedades da saliva (Moura et al.⁵¹, 2006). A coleta da saliva foi fracionada em 10 minutos pela manhã até que o volume total necessário fosse conseguido. No momento da coleta, o voluntário estava em jejum e não tinha realizado higienização bucal durante o período da manhã. O participante recebeu um frasco estéril onde foi depositada a saliva. Após a coleta, a saliva foi centrifugada a 10000 rpm por 5 minutos a 4° C e posteriormente o sobrenadante foi aspirado e filtrado. O resultante da saliva foi imediatamente armazenado a -70° C até à utilização (Zamperini et al.⁶⁸, 2010).

Confecção dos espécimes

Discos de esmalte e dentina (8.0 mm de diâmetro) foram preparados a partir de incisivos bovinos (Figura 1). As coroas dos incisivos foram cortadas em furadeira de bancada com broca de vidro. Em seguida o esmalte foi separado da dentina com o auxílio de caneta de alta rotação e fresa diamantada MF 3099 e as superfícies dos discos foram preparadas e regularizadas com lixas d'água de granulação 250 até atingir espessura de 1.5 mm (Soares et al.⁵⁸, 2013). Os blocos foram submetidos à avaliação da rugosidade superficial (Ra) pelo rugosímetro portátil (Mitutoyo surfest SJ-401, Mitutoyo Corporation, Japão), e distribuídos em grupos experimentais e controle, a partir destes valores, por meio de aleatorização por restrição. Em seguida, a solução de EDTA 0,5M (pH 7,2) foi aplicada, por 60 segundos sobre os blocos de esmalte e 30 segundos sobre os blocos de dentina com o objetivo de limpeza superficial e remoção da *smear layer*. Em seguida os espécimes foram lavados com aplicação, por 60 segundos, de água deionizada esterilizada. Os espécimes foram esterilizados por meio de gás de óxido de etileno na empresa ACECIL - Campinas – SP.

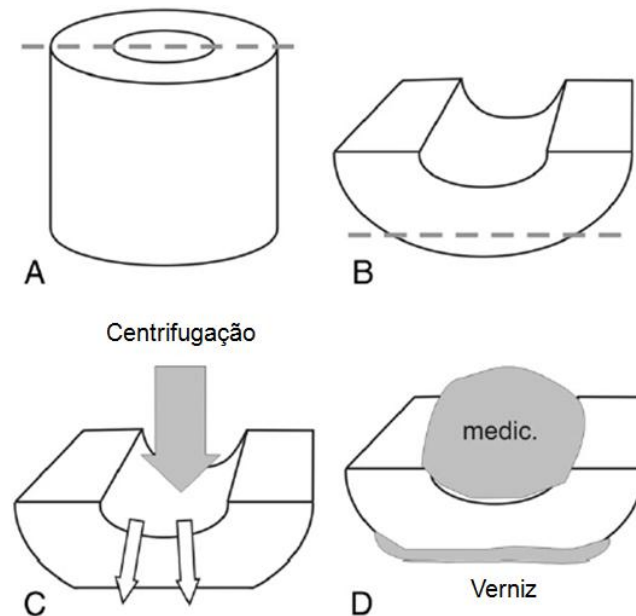
Figura 1 – Desenho esquemático da confecção dos espécimes (esmalte e dentina).



Fonte: Elaboração própria.

Para confecção de espécimes de dentina que serão analisados por MCVL, incisivos bovinos foram seccionados longitudinalmente com o auxílio da peça reta e disco flexível diamantado (KG Sorensen), obtendo-se duas metades (Figura 2). As superfícies foram regularizadas em politriz com lixas d'água de granulação 250, até obtenção de uma superfície plana. A limpeza da dentina foi realizada em ultrassom, através de imersão em hipoclorito de sódio 5.25 % durante 4 minutos, seguida de lavagem durante 2 minutos com água destilada e posterior imersão em solução de ácido cítrico 6.0 %, por mais 4 minutos (Hamama et al.²⁴, 2014). A lavagem foi realizada duas vezes seguindo este protocolo e ao final, foi aplicada solução de EDTA 0.5 M (pH 7.2) durante 1 minuto. O objetivo foi remoção da *smear layer* e limpeza dos túbulos dentinários. Os espécimes foram separados aleatoriamente em grupos experimentais e controle e embalados para serem esterilizados por meio de gás de óxido de etileno na empresa ACECIL - Campinas – SP.

Figura 2 – Desenho esquemático da preparação dos espécimes de dentina, centrifugação bacteriana e aplicação do medicamento testado.



Fonte: Ma et al.³⁹, 2011.

Desenvolvimento de biofilme em espécimes para análise por ensaio de XTT

Utilizando uma pinça esterilizada, discos de esmalte e dentina foram colocados nos poços da placa de cultura celular de 24 well. Em seguida, para aproximar este estudo das condições naturais, 700 μ L de saliva humana estéril (CAAE 44823115.4.0000.5416) foi aplicada e deixada durante 1h30 min a 37°C para a formação da película adquirida. Após este período, os blocos foram lavados com solução salina e transferidos com o auxílio da pinça para poços de uma nova placa de cultura celular. Então, 1 mL do *S. mutans* previamente ajustado foi adicionado e a placa foi levada à estufa durante 48h para que haja formação do biofilme (Van de sande et al.⁶⁵, 2011; Hahnel et al.²³, 2012).

Seguida as 48 h, o meio com microrganismos não aderidos foi aspirado delicadamente e cada poço foi lavado novamente com solução salina. As soluções de Terpinen-4-ol 0.24 % e 0.95 % (determinadas pela CIMB) e CHX 0.12 % foram aplicadas e deixadas em contato com os discos por 60 segundos, simulando a aplicação clínica de colutório. Posteriormente estes discos foram transferidos para eppendorfs contendo 500 μ L de solução salina e foram levados em ultrassom (Cristófoli, Potência 160 W / Frequência ultrassônica 42 KHz) por 20 minutos para que haja separação do biofilme dos discos, seguida de centrifugação por 10 minutos a

10.000 rpm. A viabilidade celular do biofilme resultante foi avaliada por meio do ensaio de XTT.

Desenvolvimento de biofilme em espécimes para análise por MCVL

A formação de biofilme em esmalte foi realizada como descrito anteriormente para análise por ensaio de XTT.

Para avaliação antimicrobiana do Terpinen-4-ol, superficialmente e no interior de túbulos dentinários, espécimes de dentina foram colocados individualmente, no interior de tubo falcon (50 mL) com o auxílio de pinça estéril, tendo uma de suas faces estabilizada com silicona de condensação pesada, deixando livre apenas a superfície que recebeu o tratamento. Para infecção da dentina, 500 µL da suspensão de *S. mutans* previamente ajustada (10^7 UFC/mL), foi adicionada aos tubos, e levados em centrífuga a 3000 rpm, 4000 rpm e 5000 rpm respectivamente. Cada ciclo de centrifugação teve duração de 5 minutos com duas repetições e ao final de cada ciclo o microrganismo era removido e uma nova suspensão microbiana era adicionada. Em seguida, os tubos foram incubados em microaerofilia a 37°C por 24 h para permitir a recuperação bacteriana (Hamama et al.²⁴, 2014).

Após a formação dos biofilmes (esmalte e dentina), os espécimes foram lavados com solução salina e em seguida imersos durante 60 segundos em 1mL das soluções de Terpinen-4-ol 0.24 % e 0.95 %, CHX 0.12 % e BHI (controle negativo) simulando a aplicação clínica de colutório. Posteriormente, os discos foram novamente lavados com salina e transferidos para nova placa de cultura celular de 24 well para avaliação da viabilidade bacteriana superficial e intratubular, por meio de MCVL em microscópio confocal de fluorescência (modelo Zeiss, LSM 780 invertido - FAPESP 2009/54035-4) localizado no Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo. Para isto, foi preparada uma solução estoque com 12 µL da solução A (SYTO 9) e 12µL de solução B (Iodeto de Propídio) adicionadas a 12.000 µL de PBS estéril e, após a homogeneização completa, 750 µL foi adicionado a cada poço contendo os espécimes de esmalte e dentina com biofilme a ser analisado. Após aplicação dos corantes em cada corpo de prova individualmente, a placa foi fechada e envolta em papel alumínio, com objetivo de realizar a difusão dos corantes no biofilme em temperatura de 37° C por 15 minutos. A seguir, os espécimes foram lavados com solução salina e posicionados sobre uma lamínula, de modo a deixar a superfície a ser analisada em contato com a mesma. Imagens de um único plano focal do biofilme foram capturadas pelo sistema de MCVL utilizando lente de 40X de aumento e abertura de 1.2. A área selecionada para análise do biofilme foi definida aleatoriamente desde que não tão perto da borda do bloco.

Análise da Expressão gênica

S. mutans foi cultivado até sua fase mid-log ($DO_{600} = 0.45$) em 40 mL de meio BHI suplementado com extrato de levedura e 400 μ L do microrganismo. Em seguida 5mL do microrganismo crescido foi transferido para tubos vazios esterelizados e as concentrações de Terpinen-4-ol 0.24 % e 0.95 % foram adicionadas e o microrganismo foi incubado a 37° C durante 15 e 30 minutos. Como controles foram utilizadas culturas sem tratamento e culturas tratadas com CHX 0.12 %. Após os tempos de incubação, a cultura bacteriana foi centrifugada (5000 rpm, 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e novo meio de cultura foi adicionado. Posteriormente as células bacterianas foram tratadas com o reagente RNAProtect Bacteria (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), seguido por centrifugação (5000 rpm, 10 minutos). Então as células bacterianas foram lisadas e o RNA foi isolado e purificado usando o RNeasy minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) segundo o protocolo fornecido pelo fabricante. As quantidades de RNAm foram quantificadas com o aparelho Synergy H1 (Biotek, Winooski, VT, USA) e o RNA 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.

PCR em Tempo Real foi utilizado para a quantificação de *gbpA* e o gene 16S rRNA foi utilizado como controle interno para normalização de dados. Os primers utilizados para o RT-PCR quantitativo foram adquiridos da Life Technologies Inc. (São Paulo, SP, Brasil) e estão listadas na Tabela 1. As sequências de primers foram obtidas a partir de estudos anteriores realizados por Bedran et al.⁶ (2014) e Arirachakaran et al.³ (2007). Reações em triplicata foram preparadas com o SYBR Green Supermix (Applied Biosystems) considerado um reagente padrão para RT-PCR. O equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems) foi utilizado para a leitura da fluorescência, seguindo-se a detecção de ciclos de amplificação, que foram analisadas pelo software StepOne 2.1 (Applied Biosystems). Todas as reações foram realizadas de acordo com o procedimento proposto por Bedran et al.⁶ (2014).

Tabela 1 - Primers utilizados para a análise de RT-PCR quantitativo

Genes	Sequência de primers	Tamanho (pb)	Referência
16S rRNA <i>S. mutans</i>	5'-CCATGTGTAGCGGTGAAATGC- 3' 5' -TCATCGTTTACGGCGTGGAC- 3'	144	Bedran et al. ⁶ (2014)
<i>gfpA</i>	5'-CGCCAATAGTTCTCCAGCCGAT- 3' 5'-CGAACCAGCGACTGCTGCA- 3'	410	Arirachakaran et al. ³ (2007)

Fonte: Elaboração própria

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos fatores de virulência e viabilidade celular de bactérias cariogênicas na presença do Terpinen-4-ol: estudo in vitro

Pesquisador: Denise Madalena Palomari Spolidorio

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 44823115.4.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.220.597

Apresentação do Projeto:

O projeto apresentado é relevante e a metodologia está bem apresentada. A pesquisadora responsável respondeu a todos os questionamentos emitidos no último parecer.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos do estudo serão: i) avaliar o efeito antimicrobiano do Terpinen-4-ol sobre biofilme cariogênico em esmalte e dentina com *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL); ii) avaliar os fatores de virulência expressos por essas bactérias cariogênicas na presença do Terpinen-4-ol por PCR em tempo real.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sobre os riscos, os pesquisadores incluíram informações adicionais. Assim, salientam que não há riscos sociais ou físicos para o voluntário. No entanto, para evitar qualquer desconforto durante a coleta da saliva não estimulada, ele será esclarecido quanto as condições da coleta que será realizada em sala isolada por apenas 10 minutos pela manhã, antes do período do jejum e da higienização oral. A coleta será fracionada em um período de 6 meses obtenção do volume total de 70mL. Em relação aos benefícios, descrevem que os resultados da pesquisa podem facilitar aplicação clínica de componentes antimicrobianos naturais, que não causem resistência bacteriana, para obtenção de melhores resultados no controle da cárie.

Endereço: HUMAITÁ 1680

Bairro: CENTRO

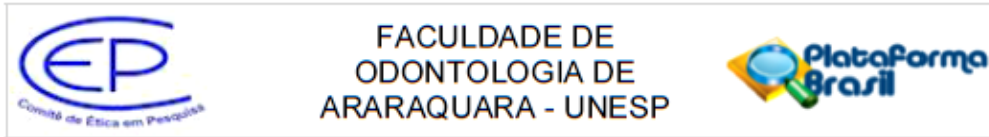
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.220.597

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

No projeto é descrito que serão coletados 70 mL de saliva não estimulada de um voluntário adulto saudável, que deverá estar em jejum e sem ter realizado higienização bucal. O voluntário receberá um frasco estéril onde será depositada a saliva.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando que foram respondidos todos os questionamentos emitidos no último parecer, o projeto está aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo APROVADO em reunião de 09 de Setembro de 2015.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Folha de Rosto	Comite de etica - Plataforma Brasil.pdf	16/04/2015 15:11:58		Aceito
Outros	termo de compromisso CEP.pdf	29/04/2015 15:22:01		Aceito
Outros	001.jpg	29/04/2015 15:28:33		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo de consentimento saliva atualizado.doc	20/07/2015 15:35:27		Aceito
Outros	Declaração de Uso do Laboratório.pdf	20/07/2015 16:09:39		Aceito
Outros	Resposta ao CEP.docx	22/07/2015 11:33:50		Aceito
Outros	Currículo Lattes (Denise Madalena Palomari).pdf	22/07/2015 11:35:58		Aceito
Outros	Currículo Lattes (Ester Alves Ferreira Bordini).pdf	22/07/2015 20:01:40		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto_FAPESP_atualizado2.pdf	02/09/2015 09:21:59	Denise Madalena Palomari Spolidorio	Aceito

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

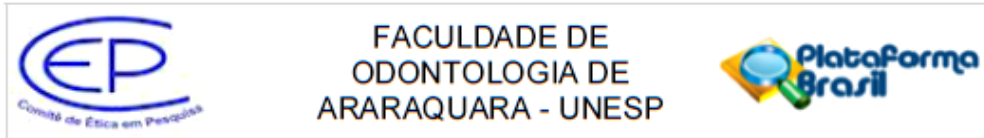
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.220.597

Investigador	Projeto_FAPESP_atualizado2.pdf	02/09/2015 09:21:59	Denise Madalena Palomari Spolidorio	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_saliva_atualizado2.doc	02/09/2015 10:48:22	Denise Madalena Palomari Spolidorio	Aceito
Outros	Resposta_ao_CEP_2.pdf	02/09/2015 10:52:04	Denise Madalena Palomari Spolidorio	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_445351.pdf	02/09/2015 10:53:03		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 09 de Setembro de 2015

Assinado por:
Ligia Antunes Pereira Pinelli
(Coordenador)

Endereço: HUMA/TA 1680
 Bairro: CENTRO CEP: 14.801-903
 UF: SP Município: ARARAQUARA
 Telefone: (16)3301-6459 E-mail: cep@foar.unesp.br

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 23 de março de 2018.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 23 de março de 2016.

ESTER ALVES FERREIRA BORDINI