



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA – *CAMPUS* SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ELAINE DE FÁTIMA FURTADO

**ANÁLISE DAS PROPRIEDADES ANTIFOULING DE FIOS DE SUTURA
REVESTIDOS COM EUGENOL SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE
Streptococcus mutans ATCC 25175**

SOBRAL

2017

ELAINE DE FÁTIMA FURTADO

ANÁLISE DAS PROPRIEDADES ANTIFOULING DE FIOS DE SUTURA
REVESTIDOS COM EUGENOL SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE
Streptococcus mutans ATCC 25175

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.

SOBRAL

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F987a Furtado, Elaine de Fátima.
Análise das Propriedades Antifouling de Fios de Sutura Revestidos com Eugenol Sobre a Formação de Biofilmes de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 / Elaine de Fátima Furtado. – 2017. 84 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.

Coorientação: Prof. Dr. Francisco Eduardo Aragão Catunda Júnior

1. Eugenol; Antibiofilme; Antiadesão; *Streptococcus mutans*. I. Título.

CDD 660.6

ANÁLISE DAS PROPRIEDADES ANTIFOULING DE FIOS DE SUTURA REVESTIDOS
COM EUGENOL SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *Streptococcus mutans*
ATCC 25175

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.

Aprovada em: / / 2017.

BANCA
EXAMINADORA

Prof. Dr. Victor Alves Carneiro (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Thiago Ferreira de Araújo

Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA)

À Deus, fonte de toda a inspiração e ao meu
esposo Jean Carlos, principal incentivador para
a conquista deste projeto.

AGRADECIMENTOS

Um sonho para se tornar real em nossas vidas nasce primeiro no coração de Deus e em seguida no nosso. É Ele quem nos capacita, fazendo surgir em nós o desejo e a força necessária para alcançar os objetivos, cumprindo em nós a Sua vontade.

Sinto-me eternamente grata, ao recordar a trajetória percorrida e observar as oportunidades vividas, o conhecimento adquirido e conseqüentemente, crescimento, maturidade e aperfeiçoamento do saber. Diante disso, busco as mais singelas palavras para tentar expressar o agradecimento a Deus, que hoje me proporciona uma benção especial com a finalização de mais uma etapa acadêmica, que certamente amanhã me fará colher os frutos das sementes plantadas com tanta dedicação.

Sou grata à minha mãe Fátima, pelo dom da vida, pela criação e educação a mim proporcionadas, aos meus irmãos Elieldes, Elizeldes, Elielson, Elinete, Elivonete e Francineide pelo carinho e pela grande ajuda que recebi de cada um nas diferentes fases da vida. De forma geral, aos de perto e aos de longe, agradeço a admiração e o respeito de cada membro da minha família.

Ao meu esposo Jean Carlos, companheiro, cúmplice, amigo. Sou grata pelo seu apoio, compreensão, ajuda, ao longo deste percurso e, em especial, por todo o incentivo, certamente sem o qual eu não seria a mesma.

Aos meus amigos e colegas do curso de Química e os novos amigos da turma de mestrado, onde nos conhecemos e criamos um elo de amizade neste intervalo de tempo, obrigada pela companhia e amizade.

A todos os meus professores e orientadores, que ao longo desta carreira estudantil desempenharam brilhantemente seus papéis de mediadores do conhecimento como verdadeiros Mestres, oferecendo à minha vida aprendizagens que vão muito além dos preceitos técnicos científicos, ofereceram a mim peças fundamentais para a minha história como pessoa e como profissional.

A todos os integrantes do grupo Biofilmes, Rafaela que como técnica me ensinou a dá os primeiros passos experimentais. Ao Rondinely, Heloísa, Victor e Júnior como companheiros de pesquisa e a todos os alunos de Iniciação Científica em especial Láina, Andressa e Marcelo pelo apoio, ajuda e amizade. Obrigada a todos pela nossa convivência diária, vocês me proporcionaram a troca de conhecimento, aprendizagem de novas técnicas

experimentais e fortaleceram sobretudo nossa relação mútua como uma família de verdadeiros pesquisadores.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Victor Alves Carneiro, por conduzir-me pacientemente à realização deste trabalho, analisando e orientando cada passo dado no caminho desta pesquisa, sempre em busca do aprimoramento do saber e da contribuição de novos conhecimentos científicos. Sou grata pela confiança e oportunidade concedidas!

À profa. Dra. Queli Cristina Fidelis e ao prof. Dr. Francisco Eduardo Aragão Catunda Júnior por me cederem os compostos utilizados nos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e a Universidade Federal do Ceará pela oferta e oportunidade de desenvolvimento acadêmico e profissional. E aos professores do Curso do Mestrado pela disponibilidade em repassar-nos seus conhecimentos.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FUNCAP pelo apoio financeiro prestado a este projeto.

Que todos sejam alcançados com o meu muito obrigada!

“Os teus olhos me viram a substância ainda informe, e no teu livro foram escritos todos os meus dias, cada um deles escrito e determinado, quando nem um deles ainda havia.” Salmos 139: 16

RESUMO

Biofilmes são comunidades microbianas que se encontram aderidas a superfícies bióticas ou abióticas. A presença dessas comunidades em dispositivos biomédicos e odontológicos tem sido uma das causas crescentes de infecções hospitalares, sendo denominadas *infecções associadas a biomateriais*. *Streptococcus mutans* é uma bactéria Gram-positiva, membro da microbiota oral, com características acidogênica e acidúrica. Destaca-se como a principal responsável pela progressão da cárie e outras doenças bucais, podendo também ocasionar infecções no endocárdio e intra-abdominais. As suturas fazem parte de um procedimento essencial na prática odontológica. São materiais que tendem a atrair bactérias, formando biofilmes, agravando conseqüentemente infecções de sítio cirúrgico. O desenvolvimento de superfícies antiadesivas, por revestimento com substâncias bioativas, tem se destacado entre as estratégias que impedem a colonização microbiana e posterior estabelecimento do biofilme. Nesse contexto, os produtos naturais têm sido crescentemente estudados e aplicados como ferramentas biotecnológicas promissoras. O eugenol, popularmente chamado de óleo de cravo, é um membro dos fenilpropanóides, possui propriedades farmacológicas eficazes e ação antibacteriana contra uma ampla variedade de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do composto na atividade antimicrobiana, bem como a capacidade de interação com sutura de algodão em impedir a adesão e formação de biofilme por *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Foi verificada a concentração inibitória mínima (CIM), a concentração bactericida mínima (CBM), assim como ensaios antibiofilme do eugenol, realizado para vários microrganismos Gram-positivos do gênero *Streptococcus*, separadamente. Diante do obtido, todos os microrganismos testados demonstraram ser suscetíveis ao composto, sendo *S. mutans* ATCC 25175 o mais relevante, e por isso selecionado para os testes antiadesão. Sobre esses ensaios, o eugenol apresentou propriedades antiadesivas por reduzir pela metade a viabilidade de células inicialmente aderidas ao fio. A biomassa e o metabolismo do biofilme formado na sutura também sofreram reduções expressivas de aproximadamente um terço e cinquenta por cento, respectivamente. Esses dados corroboram a eficácia do eugenol encontrados na literatura em diferentes estratégias. Em conclusão, estes resultados demonstram que o composto possui grande potencial de ação antimicrobiana, podendo ser aplicado como revestimento de superfícies, trazendo perspectivas para a prevenção de doenças associadas à biomateriais.

PALAVRAS-CHAVE: Eugenol; Antibiofilme; Antiadesão; *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

Biofilms are microbial communities that are attached to biotic or abiotic surfaces. The presence of these communities in biomedical and dental devices has been one of the growing causes of nosocomial infections, being called infections associated with biomaterials. *Streptococcus mutans* is a Gram-positive bacterium, member of the oral microbiota, with acidogenic and acidic characteristics. It stands out as the main responsible for the progression of caries and other oral diseases, and may also cause infections in the endocardium and intraabdominal. Sutures are part of an essential procedure in dental practice. They are materials that tend to attract bacteria, forming biofilms, consequently worsening surgical site infections. The development of antiadhesive surfaces, by coating with bioactive substances, has stood out among the strategies that prevent the microbial colonization and subsequent establishment of the biofilm. In this context, natural products have been increasingly studied and applied as promising biotechnological tools. Eugenol, popularly called clove oil, is a member of the phenylpropanoids, has effective pharmacological properties and antibacterial action against a wide variety of gram-positive and gram-negative microorganisms. Thus, the objective of this work was to evaluate the influence of the compound on the antimicrobial activity, as well as the capacity of interaction with cotton suture to prevent adhesion and biofilm formation by *Streptococcus mutans* ATCC 25175. A minimum inhibitory concentration (MIC), minimal bactericidal concentration (MBC), as well as eugenol antibiofilm assays were performed for several Gram-positive microorganisms of *Streptococcus* genus separately. Before the obtained, all the microorganisms tested demonstrated to be susceptible to the compound, being *S. mutans* ATCC 25175 the most relevant, and therefore selected for the antiadhesion tests. On these assays, eugenol showed antiadhesive properties by halving the viability of cells initially adhered to the yarn. The biomass and metabolism of the biofilm formed in the suture also experienced significant reductions of approximately one third and fifty percent, respectively. These data corroborate the eugenol efficacy found in the literature in different strategies. In conclusion, these results demonstrate that the compound has great potential of antimicrobial action, being able to be applied as a coating of surfaces, bringing perspectives for the prevention of diseases associated with biomaterials.

Keywords: Eugenol; Antibiofilm; Antiadhesion; *Streptococcus mutans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Interações envolvidas na adesão reversível de células bacterianas planctônicas à superfície abiótica.....	24
Figura 2 –	Estágios do desenvolvimento dos biofilmes.....	25
Figura 3 –	Adesão bacteriana direta e via filme condicionante.....	26
Figura 4 –	Principais alvos para combate aos biofilmes microbianos.....	37
Figura 5 –	Biossíntese de fenilpropanóides.....	41
Figura 6 –	Estrutura química do Eugenol.....	42
Figura 7 –	Representação esquemática do preparo da solução de eugenol para os ensaios antimicrobiano e antiadesão.....	47
Figura 8 –	Representação esquemática das cepas bacterianas e condições de crescimento dos microrganismos.....	48
Figura 9 –	Representação esquemática da metodologia utilizada para determinação de CIM e CBM.....	49
Figura 10 –	Representação esquemática da metodologia de quantificação de biofilme.....	50
Figura 11 –	Representação esquemática do processo de revestimento dos fios de sutura com solução de eugenol.....	51
Figura 12 –	Representação esquemática do efeito antiadesivo do revestimento dos fios de sutura com eugenol através da Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs).....	51
Figura 13 –	Representação esquemática do efeito do revestimento dos fios de sutura no desenvolvimento do biofilme através da Quantificação da biomassa.....	52
Figura 14 –	Representação esquemática do efeito do revestimento dos fios de sutura no metabolismo do biofilme através do ensaio XTT.....	53

Figura 15 – Avaliação da atividade antibiofilme do eugenol em diferentes concentrações sobre formação do biofilme de <i>Streptococcus</i> orais.....	58
Figura 16 – Efeito antiadesivo através das unidades formadoras de colônias de <i>S. mutans</i> inicialmente aderidas ao fio de sutura revestidos com eugenol	61
Figura 17 – Efeito antiadesivo através da quantificação da biomassa de <i>S. mutans</i> formada sobre a superfície de fios de sutura revestidos com eugenol.....	63
Figura 18 – Efeito antiadesivo através da quantificação da atividade metabólica de <i>S. mutans</i> formada sobre superfície de fios de sutura revestidos com eugenol...	65
Figura 19 – Representação esquemática da desprotonação do eugenol com solução de PBS pH 12.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados obtidos de MIC e MBC do eugenol sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas do gênero <i>Streptococcus</i>	56
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPs	Peptídeos Antimicrobianos
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAI	<i>Biomaterials-associated Infections</i>
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CV	Cristal Violeta
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
EPS	Extracellular Polymeric Substances
<i>et al</i>	Colaboradores
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gramma
GBP	Proteínas Ligadoras de Glucano
GTFs	Glicosiltransferases
ISC	Infecções do Sítio Cirúrgico
M	Concentração molar
MAA	Modificadores da Atividade Antibiótica
min	Minutos
mg	Miligrama
mL	Mililitro
Nd	Não Determinado
nm	Nanômetro
OZE	Óxido de Zinco e Eugenol
PBS	Tampão Fosfato Salina
PDS II	Polidioxanona
pH	Potencial Hidrogeniônico
pka	Potencial da Constante de acidez
QS	Quorum Sensing
UFCs	Unidades Formadoras de Colônias
XTT	2,3-bis-(2-Metóxi-4-Nitro-5-sulfofenil)-2H-Tetrazólio-5-Carboxanili

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
(-)	Controle negativo
H ⁺	Hídron
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
°C	Grau Celsius
h	Hora
<	Menor que
>	Maior que
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
N-	Elemento químico Nitrogênio
O-	Elemento químico Oxigênio
S-	Elemento químico Enxofre
C ₁₀ H ₁₂ O ₂	Fórmula química do Eugenol

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução

1 INTRODUÇÃO.....	19
--------------------------	-----------

Capítulo 2 – Revisão de Literatura – Biofilmes

2 BIOFILMES.....	22
2.1 Abordagem geral.....	22
2.2 Adesão bacteriana e desenvolvimento dos biofilmes.....	23

Capítulo 3 – Revisão de Literatura – Streptococcus mutans

3 Streptococcus mutans.....	28
3.1 Características gerais e fatores de virulência.....	28
3.2 Biofilmes de Streptococcus mutans.....	29

Capítulo 4 – Revisão de Literatura – Suturas

4 Suturas.....	32
4.1 Características gerais.....	32
4.2 Biofilme em suturas.....	32
4.3 Suturas antimicrobianas.....	34

Capítulo 5 – Revisão de Literatura – Estratégias de combate aos biofilmes

5 Estratégias de combate aos biofilmes.....	37
5.1 Aspectos gerais.....	37
5.2 Produtos naturais.....	38
5.3 Fenilpropanóides.....	40
5.4 Eugenol.....	41

Capítulo 6 – Objetivos

6 OBJETIVOS.....	45
6.1 Objetivo Geral.....	45
6.2 Objetivos Específicos.....	45

Capítulo 7 – Materiais e Métodos

7. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
------------------------------------	-----------

7.1 Substância teste –Preparo da solução de Eugenol.....	47
7.2 Cepas bacterianas e condições de cultivo.....	47
7.3 Ensaio da atividade antimicrobiana.....	48
7.4 Ensaio de atividade antibiofilme – Quantificação da biomassa.....	49
7.5 Processo de revestimento dos fios de sutura com eugenol.....	50
7.6 Efeito antiadesivo do revestimento dos fios de sutura com eugenol – Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs).....	51
7.7 Efeito do revestimento dos fios de sutura no desenvolvimento do biofilme – Quantificação da biomassa.....	52
7.8 Efeito do revestimento dos fios de sutura no metabolismo do biofilme – Ensaio XTT.....	52
7.9 Análise estatística.....	53
 <i>Capítulo 8 – Resultados e Discussão</i>	
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
8.1 Atividade antimicrobiana do Eugenol – CIM e CBM.....	56
8.2 Atividade antibiofilme.....	57
8.3 Efeito do revestimento dos fios de sutura na contagem das unidades formadoras de colônia.....	60
8.4 Efeito do revestimento dos fios de sutura no desenvolvimento do biofilme.....	62
8.5 Efeito antiadesivo do revestimento no metabolismo do biofilme.....	65
 <i>Capítulo 9 – Conclusão</i>	
9. Conclusão.....	70
 Referências.....	 71

Capítulo 1 – Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os biofilmes são comunidades microbianas que encontram-se aderidos a superfícies bióticas ou abióticas envoltos por uma matriz exopolimérica (MARSH, MARTIN, 2005), podendo ser mono ou multiespécie, quando diferentes microrganismos estabelecem relações de sinergismo e mutualismo, gerando benefícios cooperativos para o favorecimento da comunidade microbiana (RICKARD *et al.*, 2006; OKUDA *et al.*, 2012).

Em consequência à capacidade de interação desses biofilmes a determinadas superfícies, tem ocorrido um aumento significativo no número de infecções relacionadas a dispositivos médicos e odontológicos, sendo atualmente designadas como infecções associadas a biomateriais, os quais são considerados fatores de riscos relacionados a infecções microbianas (AZEVEDO; CERCA, 2012). Nesse contexto, suturas comumente usadas para reparo cirúrgico em odontologia tornam-se um alvo fácil para a colonização por microrganismos e formação de biofilme, resultando no aumento do número de infecções (KATHJU *et al.*, 2009).

Sabe-se que um fator crucial para a formação de biofilmes é a adesão inicial de células plactônicas a uma determinada superfície (CULLER *et al.*, 2014). Nesta fase, os microrganismos produzem substâncias poliméricas extracelulares que funcionam como um mecanismo-chave, já que constituem uma base para o crescimento do biofilme, facilitando a adesão inicial das células de forma irreversível (JOO & OTTO, 2012).

Visto que as infecções são consequências diretas da adesão do microrganismo, estratégias que visam prevenir essa etapa do processo são atualmente o foco de estudos no combate a formação de biofilmes (FUX *et al.*, 2003; LYNCH & ROBERTSON, 2008).

Uma das abordagens mais promissoras consiste na produção de superfícies antiadesivas seja através de alterações nas características superficiais, modificação físico-química (hidrofobicidade, carga elétrica, natureza química), ou através de revestimento da superfície com substâncias bioativas, que impeçam a colonização microbiana prevenindo o estabelecimento do biofilme (PONCIN-EPAILLARD & LEGEAY, 2003; BAZAKA *et al.*, 2011).

Surge então um interesse especial aos antimicrobianos derivados de plantas, baseado em sua capacidade endógena, em busca de descobrir compostos com atividades farmacológicas favoráveis ao tratamento de agentes infecciosos (CUNHA, 2010; YAMADA-OGATTA, *et al.*, 2015), com menor toxicidade, biocompatibilidade, prevenção de doenças, e economicamente viáveis à população (CASTILHO; MURATA & PARDI, 2007).

Neste trabalho foi utilizado um composto natural, o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), substância aromática que destaca-se como principal constituinte de cravos, canela, sassafrás e mirra (SANABE; GIORGETTI; CRUZ *et al.*, 2009).

Comumente usado em diversas técnicas odontológicas, consiste em analgésico, anestésico local, anti-séptico, e quando associado ao óxido de zinco, compõe os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol (OZE). Em virtude de seu efeito inibidor e bactericida contra um amplo espectro de bactérias, os cimentos odontológicos possuem acentuada inibição contra *Streptococcus mutans*, prevenindo desta forma lesões cariosas (MOURA; RABELLO & PEREIRA, 2013).

Estratégias que possibilitem o tratamento ou prevenção de infecções já estabelecidas, através do revestimento de superfícies, possuem grande relevância, visto a capacidade que os microrganismos apresentam de estabelecer interações e colonizar diversas superfícies de biomateriais (DUARTE, 2016).

Desta maneira, a obtenção de uma sutura de algodão revestida com uma substância bioativa, apresentando efetiva atividade antiadesiva, impedindo a colonização microbiana e sequente estabelecimento do biofilme, é considerada uma ferramenta promissora como alternativa no combate aos biofilmes.

Capítulo 2 – Revisão de literatura

Biofilmes

2. BIOFILMES

2.1 Abordagem geral

Os seres humanos e seus microrganismos comensais evoluíram conjuntamente ao longo dos últimos dois milhões de anos e tornaram-se dependentes uns dos outros gradativamente (LEY *et al.*, 2008). Registros fósseis apontam que os microrganismos formavam comunidades espacialmente organizadas há 3,25 bilhões de anos aproximadamente (ALLWOOD *et al.*, 2006). Essas comunidades denominadas biofilmes, possuem um modo predominante de crescimento em diversos ambientes, assim o modo de vida microbiano pode ser dividido em dois estados básicos: células planctônicas, também chamadas como células de “vida livre” e células sésseis, que são os biofilmes (TRENTIN; GIORDNI; MACEDO, 2013).

As comunidades microbianas que os formam caracterizam-se pela presença de células ligadas a um substrato, composta de material protéico, exopolissacarídeos, DNA extracelular, e suplementos celulares comumente citadas como EPS, *Extracellular Polymeric Substances*, com ação primordial de revestir as células agindo como uma camada protetora (ZIMMER *et al.*, 2014). Uma vez produzida pelos próprios microrganismos, a matriz exopolimérica permite às células do biofilme um fenótipo distinto comparado aos seus homólogos planctônicos (DONLAN *et al.*, 2002; BATONI *et al.* 2011).

A forma de vida em comunidade multicelular promove inúmeros benefícios às células sésseis, como, viabilidade celular, melhor adaptação a novos ambientes, capacidade de colonização e potencial metabólico elevados, propiciando a transferência de informações genéticas, e a disseminação da resistência a antibióticos (DUARTE, 2016). Promove ainda aumento e proteção às células microbianas contra situações adversas do ambiente, como, predadores, dessecação e estresse osmótico (WARGO & HOGAN, 2006). E pode tornar-se a maior causa de contaminações recorrentes em virtude das vantagens adquiridas com a relação cooperativa (RICKARD *et al.*, 2006; BENDAOU *et al.*, 2011; OKUDA *et al.*, 2012).

Em se tratando dessa vantagem, a propriedade mais relevante do biofilme é a resistência adquirida que pode ser até 1000 vezes maior em relação às células planctônicas (NETT *et al.*, 2007). Este modo de vida torna o controle do ambiente médico amplamente difícil, e até mesmo impossível de ser controlado, já que esta resistência é uma consequência de mudanças metabólica, fenotípica e genotípica, contribuindo para a sobrevivência frente a fatores adversos, incluindo os agentes antimicrobianos e o sistema imune do hospedeiro (LEWIS, 2008; TRETER *et al.*, 2014).

A microbiota oral constitui um exemplo de uma das organizações microbianas mais complexas do corpo humano, composta por aproximadamente 700 espécies bacterianas (AAS *et al.*, 2005) e em menor proporção, fungos, vírus, micoplasmas e protozoários (MARSH; MOTER; DEVINE, 2011). A temperatura e umidade presentes na cavidade oral propiciam a formação de biofilmes assim também como, o esmalte dental, células epiteliais, colonizadores primários e até mesmo superfícies de materiais ortodônticos que se encontram na cavidade (JENKINSON; LAMONT, 2005). Dentre as espécies mais presentes na cavidade oral, pode-se citar o gênero *Streptococcus* predominante com cerca de 80% dos colonizadores primários na região bucal (KOLEMBRANDER; WILLIAMS, 1983). Os microrganismos preferem viver aderidos a uma superfície formando biofilmes, sobretudo pelas vantagens que esta comunidade oferece (SUN *et al.*, 2013).

Em virtude disso, nos últimos anos, setores industrial, clínico e científico, têm voltado a atenção ao crescente número de ocorrências de contaminação gerados por intermédio de produtos e equipamentos (BUSSCHER *et al.*, 2012; PRIMO *et al.*, 2012). Essas infecções envolvem ainda dispositivos biomédicos e odontológicos, denominados atualmente como Infecções Associadas a Biomateriais, *biomaterials-associated infections* (BAI), visto a capacidade de interação e colonização dos microrganismos a superfícies bióticas ou abióticas (BUSSCHER *et al.*, 2012; ARCIOLA *et al.* 2012).

De tal modo, pesquisas sobre o crescimento microbiano vêm sendo realizadas nos últimos anos e mostram o impacto negativo da relação dos biofilmes em várias atividades humanas, especialmente no que diz respeito à saúde pública (SUN *et al.*, 2013).

2.2 Adesão bacteriana e desenvolvimento dos biofilmes

O passo inicial para a formação do biofilme se dá através da ligação de bactérias às superfícies hidrofóbicas. Uma vez aderida, um processo de múltiplas etapas é iniciado, resultando em uma comunidade microbiana unificada em uma matriz autoproduzida (TRETER *et al.*, 2014).

A formação do biofilme é um processo complexo que envolvem riquezas de detalhes, marcada por duas fases principais: a adesão microbiana e uma contínua acumulação celular. Todavia, estas duas fases caracterizam-se por diferentes sequências: (i) superfície onde as células planctônicas estão presentes; (ii) adesão à superfície; (iii) formação de microcolônias para a proliferação; (iv) maturação e desenvolvimento da comunidade microbiana; (v)

diferenciação e dispersão das células para proliferação de outros ambientes dando sequência a um ciclo vicioso (CHEN & WEN, 2011; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; JOO; OTTO, 2012; ZIMMER *et al.*, 2013).

Assim, a adesão bacteriana que consiste o estágio inicial para formar o biofilme, se destaca como a etapa crucial e determinante para o estabelecimento de toda a estrutura. Este processo é determinado pela interação entre moléculas específicas da superfície condicionante e a presença de adesinas, como o flagelo, o pili, assim também como polissacarídeos e componentes de membranas bacterianas (JOO; OTTO, 2012).

Considerando um meio abiótico, a atração inicial das células planctônicas à superfície ocorre aleatoriamente, através do movimento browniano, estimulado pela força gravitacional ou, de modo conduzido, via mobilidade ou quimiotaxia (O'TOOLE; KOLTER, 1998).

Como regra geral o estágio de adesão em superfícies abióticas é elucidado através de dois tipos de aderência: primária e secundária. A primeira consiste em uma adesão reversível, onde colonizadores iniciais se unem a superfície por meio de interações físico-químicas de longo alcance, do tipo: forças de Van der Waals e hidrodinâmicas, interações hidrofóbicas ou eletrostáticas (figura 1). Porém, a adesão em materiais bióticos a ligação se dá através de interações moleculares mais específicas, do tipo receptor-ligante. (DUNNE, 2002; PAVITHRA; DOBLE, 2008).

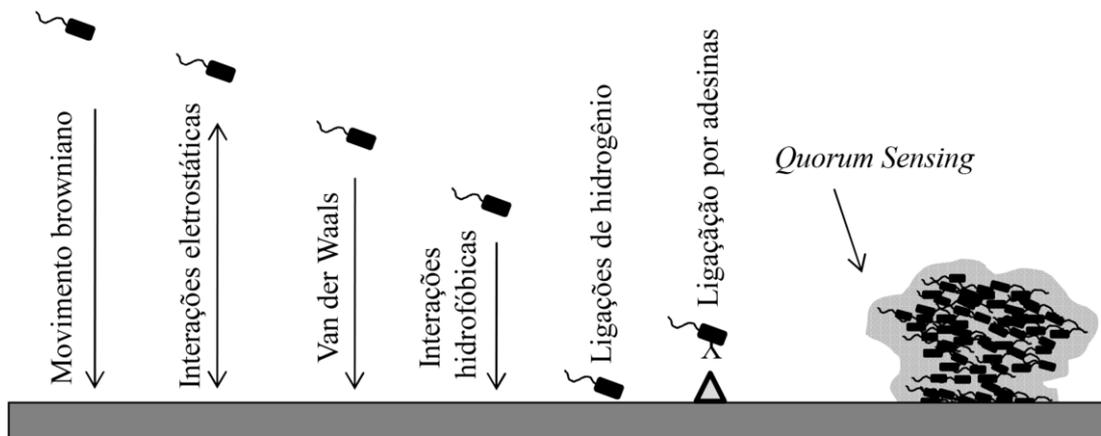


Figura 1: Interações envolvidas na adesão reversível de células bacterianas planctônicas à superfície abiótica (TRENTIN; GIORDNI; MACEDO, 2013).

A segunda etapa da adesão bacteriana se caracteriza por ser irreversível. Nesse momento, os microrganismos ligam-se fracamente à superfície consolidando o processo de

adesão com a produção de EPS. Durante essa fase de adesão, os microrganismos são capazes de se ligar a células ou colonizadores secundários da mesma ou de diferentes espécies, formando agregados que vão estar firmemente ligados à superfície, desencadeando etapas posteriores que darão origem e estabelecimento à estrutura do biofilme, para posterior liberação de células (STOODLEY *et al.*, 2002; TRENTIN; GIORDNI; MACEDO, 2013). A figura 2 ilustra o processo da formação de biofilme, destacando a progressiva produção de EPS.

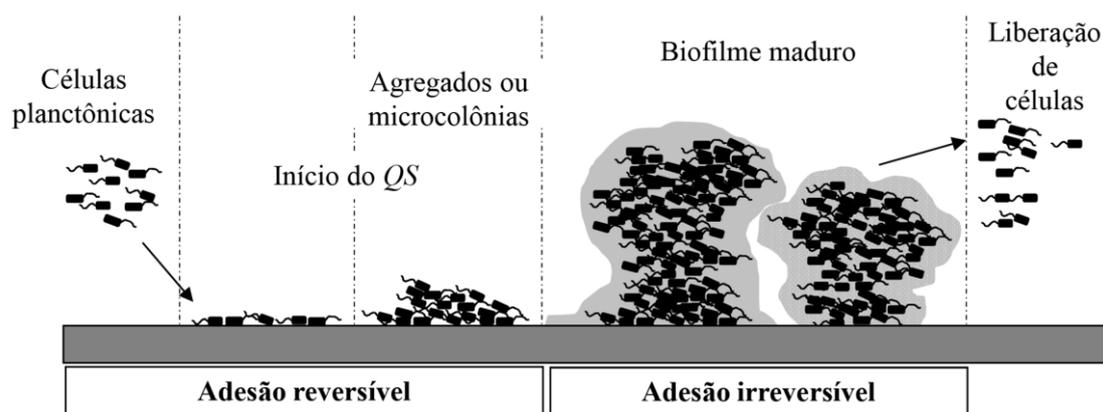


Figura 2: Estágios do desenvolvimento dos biofilmes: adesão reversível com a formação de microcolônias, a adesão irreversível com a produção de EPS e formação de estruturas com formato típico de cogumelos e, por fim, a ruptura dos biofilmes (TRENTIN; GIORDNI; MACEDO, 2013).

Quando o organismo e a superfície alcançam a iminência da proximidade (em torno de 1 nm), o que determina a adesão final é o somatório das forças de atração ou repulsão gerada entre as duas superfícies. Como a maioria das bactérias e superfícies inertes é carregada negativamente, essas interações eletrostáticas tendem a favorecer a repulsão; em contrapartida, as interações hidrofóbicas parecem apresentar maior influência sobre o resultado da adesão primária. Todavia, as interações do tipo ligações de hidrogênio ou interações moleculares específicas, podem superar a repulsão entre duas superfícies através da mediação de adesinas, como o pili (TRENTIN; GIORDNI; MACEDO, 2013) (figura 1).

Estudos indicam que, após a adesão de células bacterianas, ocorre um aumento na produção, liberação e detecção de moléculas sinalizadoras autoindutoras que regulam a formação de biofilme (DAVIES *et al.*, 1998; BJARNSHOLT; GIVSKOV, 2007; HODGKINSON; WELCH; SPRING, 2007). À medida que aumenta a densidade bacteriana, essas moléculas autoindutoras acumulam e induzem a transcrição de genes característicos para regular as diferentes funções como motilidade, virulência, produção de matriz

exopolissacarídica (EPS) e consequente formação de biofilmes. Esse processo de comunicação encontrado em muitas bactérias patogênicas, que conecta a transcrição de genes específicos com a densidade celular bacteriana, é chamado de *Quorum sensing (QS)* (RUTHERFORD; BASSLER, 2012).

Considerando que a adesão a um material inanimado seja a superfície de um dispositivo biomédico ou odontológico (como próteses, cateteres urinários e venosos, tubos endotraqueais, válvulas cardíacas e fios de sutura) e que esse dispositivo será implantado em um hospedeiro, será possível reverter a primeira fase da adesão entre a bactéria e a superfície através de um filme condicionante (HERRMANN *et al.*, 1988; GOTTENBOS *et al.*, 2002; ROCHFORD; RICHARDS; MORIARTY, 2012).

Uma vez que a propriedade de uma superfície foi alterada, a afinidade de um microrganismo por uma superfície original ou condicionada implica em diferenças significativas, evidenciando a dificuldade imposta, para controlar a adesão bacteriana às superfícies abióticas (TRENTIN; GIORDNI; MACEDO, 2013) (figura 3). A adesão bacteriana direta ocorre no momento ou próximo do momento da inserção de um implante, enquanto que a adesão via filme condicionante ocorre mais tarde, dias depois da inserção do implante.

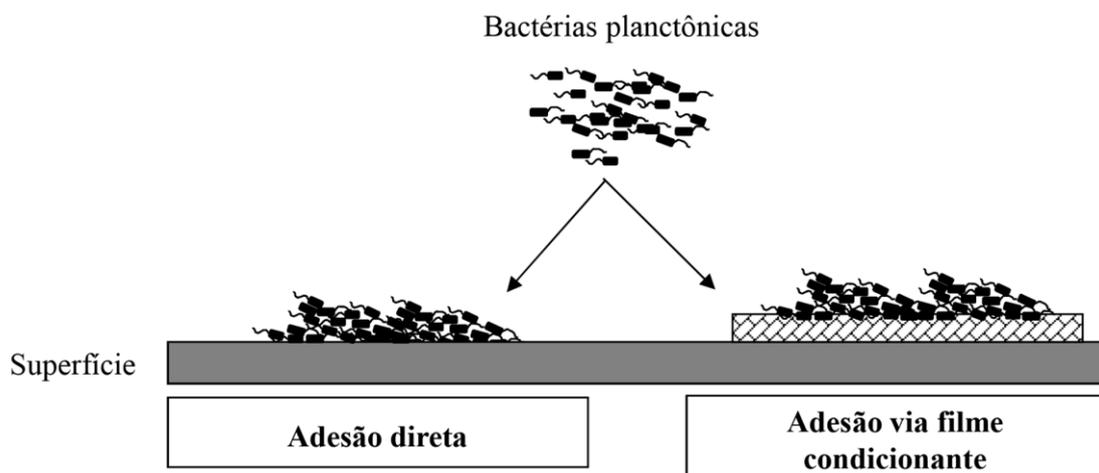


Figura 3: Adesão bacteriana direta e via filme condicionante (TRENTIN; GIORDNI; MACEDO, 2013).

Capítulo 3 – Revisão de literatura
Streptococcus mutans

3. *Streptococcus mutans*

3.1 Características gerais e fatores de virulência

Streptococcus mutans é um membro da microbiota oral, bactéria gram-positiva com morfologia de coco ovalada, medindo aproximadamente 0,5 a 0,75 µm de diâmetro, podendo se agrupar aos pares ou em cadeias (TORTORA, FUNKE, CASE, 2010; BASTOS *et al.*, 2013). São bactérias anaeróbias facultativas, capazes de metabolizar uma grande variedade de açúcares (BALLINI, 2011). Encontra-se inserida no grupo mutans, formado por 8 sorotipos (*a-h*), de acordo com a especificidade sorológica e antígenos de carboidratos localizados na parede celular (MARSH; MARTIN, 2005; NAKANO; OOSHIMA, 2009; BASTOS *et al.*, 2013).

S. mutans desempenha um papel primordial na deterioração dentária, a composição da microflora oral tem um impacto significativo sobre este problema, porém esse microrganismo se destaca como o principal responsável da progressão da cárie, podendo também colonizar a orofaringe, o trato gastrointestinal, o trato urinário, além de ocasionar infecções no endocárdio e infecções intra-abdominais (MATSUI; CVITKOVITCH, 2010).

No caso da endocardite, a *S. mutans* como agente etiológico pode gerar uma doença grave e em muitos casos relacionada à prática odontológica. Esta infecção pode ocorrer mesmo durante as atividades do cotidiano de um indivíduo como: escovação, uso de fio dental e mastigação. Estima-se que 40% dos casos de endocardite infecciosa tenha origem na cavidade bucal (SILVA, 2001; NOGUEIRA, 2016).

Em relação às propriedades de virulência, *S. mutans* é uma bactéria que é primeiramente adquirida por crianças logo após seu primeiro dente, com a mãe sendo identificada como a principal fonte (CAUFIELD; CUTTER; DASANAYAKE, 1993). Uma vez adquirida, a consequência será uma flora cariogênica com alterações na ecologia da placa dentária, impulsionadas por uma drástica queda no pH, devido o consumo de carboidratos alimentares fermentáveis resultando em produtos metabólicos ácidos (JENSEN; POLANSKY; SCHACHTELE, 1982; LOESCHE, 1986).

A caracterização das propriedades expressas por *S. mutans* revela que essa mudança no ambiente pode favorecer sua propagação e explica a capacidade de se estabelecer em um lugar que muitas bactérias orais concorrentes se encontram (SVENSATER *et al.*, 1997). Em geral, três principais fatores de virulência exibidos por este organismo incluem adesão,

acidogenicidade (a capacidade para produzir ácido) e aciduricidade (a capacidade de tolerar ácido) (BANAS, 2004).

A capacidade de produzir ácidos a partir do metabolismo de carboidratos seria suicida, se não fosse sua notável tolerância a ele (LOESCHE, 1986). Isso significa um aspecto crucial de virulência (HAMILTON; BUCKLEY, 1991). As alterações de pH influenciadas fortemente pela ingestão de determinados alimentos, resultam em níveis que pode cair de pH neutro 7,0 para valores ácidos abaixo de pH 3,0 em menos de 20 min (JENSEN; POLANSKY; SCHACHTELE, 1982; JENSEN, WEFEL, 1989). Para suportar a acidez contínua de um ambiente ácido, *S. mutans* desenvolveu um repertório de mecanismos que se enquadram em duas categorias distintas: mecanismos constitutivos e mecanismos indutíveis por ácido (BURNE, 1998), definido e também conhecido como a resposta de tolerância ácida (RTA), promovendo proteção e reparação de macromoléculas (SVENSATER *et al.*, 1997).

Esse mecanismo é definido como a capacidade de adaptação do microrganismo ao estresse ácido por exposição prévia. Inicialmente a um pH baixo, sub-letal de aproximadamente 5,5, a indução de um estímulo (expressão de certos genes) aumenta a sobrevivência a um pH tão baixo quanto o pH 3,0 (HAMILTON; BUCKLEY, 1991; BELLI; MARQUIS, 1991).

3.2 Biofilmes de *Streptococcus mutans*

A composição estrutural de um biofilme é formado em sua maioria pela matriz polimérica extracelular (EPS), onde apenas cerca de 5 a 35% é relativo a fração de células microbianas (TRENTIN; GIORDNI; MACEDO, 2013). A EPS representa uma camada gelatinosa que recobre toda a estrutura “multicelular” promovendo proteção, estabilidade e mecanismos de sobrevivência que vão desde a fixação das células a armazenamento de água e nutrientes como fonte energética (AZEVEDO; CERCA, 2012).

S. mutans é um dos principais contribuintes para a formação da EPS em biofilmes em que esteja envolvida. A ligação de células bacterianas à superfícies (bióticas ou abióticas) e a formação de microcolônias dentro de uma matriz extracelular são passos críticos para o desenvolvimento de biofilmes patogênicos (LAWRENCE *et al* 2007; JOHNSON 2008). As células de *S. mutans* podem se anexar a diferentes superfícies por meio de mecanismos, independentes da presença de sacarose, mediadas principalmente por interações específicas entre películas protéicas e adesinas bacterianas (GIBBONS, 1996).

A formação dos domínios específicos da EPS pode ser explicado pela presença de glicosiltransferases (GTFs) enzimaticamente ativas e proteínas específicas de ligação não enzimática denominadas, proteínas ligadoras de glucano (GBPs) secretadas pela *S. mutans*, uma vez aderidas a superfície do material. Algumas Gbps são ligadas covalentemente a parede celular bacteriana, enquanto que na *S. mutans* estão ligadas à sua superfície por ligações não covalentes (SCHILLING & BOWEN, 1988; VENKITARAMAN *et al.*, 1995; VACCA-SMITH & BOWEN, 1998; BANAS & VICKERMAN, 2003; HANNIG *et al.*, 2008; SPOLIDORIO; DUQUE, 2013).

A produção de EPS por GTFS é um mecanismo altamente eficiente pelo qual *S. mutans* coloniza a superfície e mantém a estrutura tridimensional da microcolônia, permitindo conservar-se na superfície do material por longo período, seja em um ambiente mono ou multi-espécies (KRETH *et al.*, 2008).

Além disso, a EPS estruturada com microdomínios dentro e circundante em toda a profundidade do biofilme influencia sua biofísica mecânica, conferindo maior proteção tanto de influências hostis de agentes antimicrobianos, agressões ambientais, como também de gradientes químicos que surgem devido à difusão de nutrientes e produtos metabólicos diferenciados, que possam afetar as condições do microambiente em biofilmes, tais como o pH (LEWIS, 2001; HUNTER & BEVERIDGE, 2005; KRETH *et al.*, 2008).

Considerando o potencial de *S. mutans* para formação de biofilme, Ribeiro *et al* (2004) constataram que a fixação de aparelho ortodôntico pode elevar em 20% o número de pacientes com cárie classificados como alto risco. Detectaram ainda altos níveis da mesma bactéria durante a fase ativa de tratamento bucal e demonstraram em suas investigações um aumento significativo desse microrganismo logo após a inserção de fios ortodônticos na cavidade oral, destacando as características peculiares de *S. mutans* como bactéria cariogênica e sua capacidade de adesão a diversas superfícies de materiais.

Capítulo 4 – Revisão de literatura

Suturas

4. SUTURAS

4.1 Características gerais

Sutura, conhecida popularmente como pontos cirúrgicos, são ligações feitas por médicos, dentistas e médicos veterinários em pele, mucosas, músculos, vasos sanguíneos e órgãos com a finalidade de mantê-los unidos ou fechados, após cirurgia ou ferimento. A sutura ainda faz parte de um procedimento essencial na prática odontológica. Dentistas a utilizam em diversas áreas, tais como periodontia, endodontia, implantodontia e cirurgia maxilofacial e oral (MELDAU, 2014).

Os materiais de sutura utilizados há mais de 2000 a.C. para o tratamento de feridas eram originalmente materiais naturais, tais como, fibras de algodão, barbantes e tendões de animais. Desde então, diferentes materiais passaram a ser explorados, sendo empregados na produção de fios para procedimentos cirúrgicos, como, por exemplo, seda, intestino de animais, crina de cavalo, entre outros (PELZ, 2015).

O aprimoramento dos materiais usados na fabricação das suturas levou a um desenvolvimento de fios específicos para cada procedimento, amenizando as dificuldades enfrentadas pelos cirurgiões no passado e reduzindo de forma significativa as infecções no período pós-operatório (MELDAU, 2014).

Atualmente, o fio de sutura contém uma estrutura flexível, de formato circular e pequeno diâmetro. As suturas são classificadas em dois grandes grupos: absorvíveis, aqueles que sofrem degradação rapidamente, perdendo sua tensão de estiramento em até 60 dias, podendo ser absorvidos pelo organismo, e, deste modo, desaparecendo do ponto onde foram suturados. Este processo varia em tempo e modo de absorção, de acordo com o fio utilizado; não-absorvíveis ou inabsorvíveis, o material que compõe estes fios não é absorvido pelo organismo, retêm a força de tensão por mais de 60 dias, permanecendo no local onde foi colocado por tempo indefinido ou até sua remoção mecânica (MELDAU, 2014).

4.2 Biofilme em suturas

Materiais de sutura têm se tornado fatores de risco para a reparação da ferida cirúrgica, apesar de avanços contínuos em princípios de assepsia e melhoria da técnica cirúrgica esterilizada, as suturas ainda são materiais que tendem a atrair bactérias e a associação entre

biofilmes e infecções de sítio cirúrgico continuam se desenvolvendo de forma intensa (ROTHENBURGER *et al.*, 2002; ANTONIO *et al.*, 2011; NETO *et al.*, 2015).

Desta forma, o fio de sutura tem sido o objeto de especulação entre os cirurgiões desde os anos 1960 (ALEXANDER *et al.*, 1967; KATZ *et al.*, 1981; MINGMALAIRAK, 2011). A aderência microbiana à superfície deste material tem sido relatado na literatura durante muitos anos. Foi descoberto que, na presença desses fios, apenas 100 unidades formadoras de colônias (CFU)/mg são necessárias para produzir infecção (GOMEZ-ALONSO *et al.*, 2007; MINGMALAIRAK, 2011). Uma variedade de bactérias podem contaminar não só o tecido da ferida cirúrgica, mas também o material que compõe a sutura. Uma vez que ela torna-se contaminada, mecanismos locais de descontaminação tornam-se ineficazes (UFF *et al.*, 1995; MINGMALAIRAK, 2011).

Gristina *et al.*, (1985), relataram que os fios em superfície da pele foram colonizadas por estirpes de *S. epidermidis*. Gomez-Alonso e colaboradores (2007), mostraram a presença de biofilmes após 60 minutos de contaminação, e este apresentou-se aderido ao material três horas após o contato com a bactéria (MINGMALAIRAK, 2011).

Como consequência, a infecção da ferida cirúrgica e das suturas têm se tornado uma ameaça ao sucesso das intervenções cirúrgicas, causando complicações aos pacientes. Como os biofilmes são seres ubíquos e possuem um modo dominante de crescimento, qualquer material, seja de composição natural ou sintética, de mono ou multifilamento é susceptível a fixação e colonização bacteriana, (SOARES *et al.*, 2001; DONLAN; COSTERTON, 2002; PELZ; TODTMANN; OTTEN, 2015).

Após a inserção, a superfície inerte é rapidamente revestida com proteínas de tecido, incluindo o fibrinogênio, a fibronectina, o colágeno, e outros substratos solúveis, os quais facilitam a fixação microbiana. A presença desses fios, especialmente na cavidade oral, facilitam a adesão bacteriana e subsequente contaminação (AAS *et al.*, 2005; MINGMALAIRAK, 2011; EKE *et al.*, 2012).

As suturas de algodão e de seda são as mais utilizadas em cirurgia dento-alveolar. O fio de algodão, por ser multifilamentar, constituído de celulose com alto grau de absorção, facilita o acúmulo de fluidos, os quais constituem um meio propício ao desenvolvimento microbiano. Lilly (1968) salientou as propriedades adsorventes deste fio, indagando a facilidade de penetração de microrganismos no interior da ferida cirúrgica, assim como a produção de reações inflamatórias locais. Liedke e colaboradores (1975), em uma análise comparativa de fios de algodão, seda, linho, poliéster, catgut e nylon, empregados em feridas

de extração dental, constataram que o algodão foi o que apresentou maior número de colônias bacterianas interferindo negativamente na cicatrização dos tecidos.

Dentre as principais complicações dos pacientes submetidos a cirurgia, 77% das mortes estão diretamente ligadas à infecção de sítio cirúrgico, a permanência hospitalar é cerca de 20 vezes maior, o custo total aumenta aproximadamente 5 vezes, a permanência na internação cria custos que podem ser estimadas em 1,5 bilhões USD anualmente (SEAL; PAUL-CHEADLE, 2004; MINGMALAIRAK, 2011).

Perante o risco de infecção, investigações nesta área tem se centrado em busca de evitar a colonização bacteriana de biomateriais, especialmente pelo uso de revestimento antibacteriano. Assim, o desenvolvimento de suturas com tais características tem causado impacto significativo na prevenção de infecções pós-operatória (CHEN *et al.*, 2015; MEGHIL *et al.*, 2015).

4.3 Suturas antimicrobianas

O papel das suturas antimicrobianas foi registrado há anos quando Fowler (1965) recomendou que todos os materiais de sutura fossem mergulhados em uma solução de clorexidina antes da manipulação, esta ação segundo ele, reduzia infecções da ferida operatória (MINGMALAIRAK, 2011).

Suturas revestidas com agentes antibacterianos têm sido desenvolvidas desde o início de 1980, numa tentativa de reduzir a aderência bacteriana a estes materiais (GOMEZ-ALONSO, 2007; PETHILE *et al.*, 2014). As estratégias preventivas incluíam clorexidina, antibióticos profiláticos e antissépticos potenciais para revestimento de superfícies visando prevenir a colonização dos biofilmes.

Vários estudos têm demonstrado que a produção de suturas com boas propriedades antibacterianas mostra a possibilidade de inibir o crescimento bacteriano em feridas e aponta para redução da taxa de infecção, sendo vital para cura do paciente (LEAPER *et al.*, 2010; ALEXANDER *et al.*, 2011; PETHILE *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2015).

Uma vez que foram desenvolvidas com sucesso, novos tipos foram sendo estabelecidas: sutura com monofilamento (monocryl: poliglecaprona e PDS II: polidioxanona), passou a ser usada em vez da entrelaçada (Vicryl)®, para diminuição do efeito capilar do fio trançado, e mais recente, com triclosan (monocryl plus e PDS plus), visando a diminuição das taxas de Infecções do Sítio Cirúrgico (ISC) (MING *et al.*, 2007; MINGMALAIRAK, 2011).

Uma meta-análise mostrou o benefício significativo de sutura trançada (poliglactina 910) revestida com triclosan na avaliação à adesão e a atividade antibacteriana contra uma seleção de gram-positivos e gram-negativos (EDMISTON *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2013). No entanto, a existência de múltiplas drogas com a presença do triclosan, proporciona um aumento da resistência bacteriana em virtude do seu sistema de efluxo, gerando grande preocupação (COPITCH; WHITEHEAD; WEBBER, 2010).

Além disso, sua ampla utilização em cuidados de saúde, lar e itens de cosméticos, reforça a resistência bacteriana ao medicamento já que tem sido frequentemente relatada em relação a *S. aureus*, um patógeno comum em infecções de feridas (YAZDANKHAH *et al.*, 2006; OBERMEIER *et al.*, 2015). Testes realizados entre 2003 e 2004 já demonstraram detecção do triclosan na urina de 74,6% dos cidadãos dos Estados Unidos (MATL *et al.*, 2009; OBERMEIER *et al.*, 2015).

Como a situação demanda coberturas alternativas, recentemente, o revestimento de superfícies em biomateriais tem sido investigado através da imobilização de peptídeos antimicrobianos (AMPs), isolados de animais, plantas, bactérias, fungos e vírus. Esses peptídeos exibem propriedades bactericidas e fungicidas em concentrações muito baixas, apresentando menor propensão à resistência e alta estabilidade às mudanças de temperatura e pH, mesmo quando imobilizados (COSTA *et al.*, 2011).

Também está sendo averiguado o recobrimento de superfícies com produtos naturais, onde um dos principais desafios é a conservação da atividade biológica do composto ou extrato de plantas uma vez retido a uma determinada superfície (BAZAKA *et al.*, 2010).

Capítulo 5 – Revisão de literatura
Estratégias de combate aos biofilmes

5. ESTRATÉGIAS DE COMBATE AOS BIOFILMES

5.1 Aspectos gerais

A abordagem acerca do tratamento e controle de biofilmes tem obtido crescente valorização em função do resultado que desempenham na medicina moderna. Considerando o modo de combate aos biofilmes, o sucesso das estratégias pode ser alcançado através de dois alvos distintos para inibição do crescimento bacteriano: pelo uso de compostos bactericidas ou bacteriostáticos, que promovem o rompimento da comunicação celular (*Quorum sensing*), erradicando assim os biofilmes formados, ou, por meio do bloqueio da adesão bacteriana a uma determinada superfície, impedindo conseqüentemente a formação de um novo biofilme. Os principais alvos para intervenção são ilustrados na etapa 1 e 2 da figura 4 (TRENTIN; GIORDNI; MACEDO, 2013).

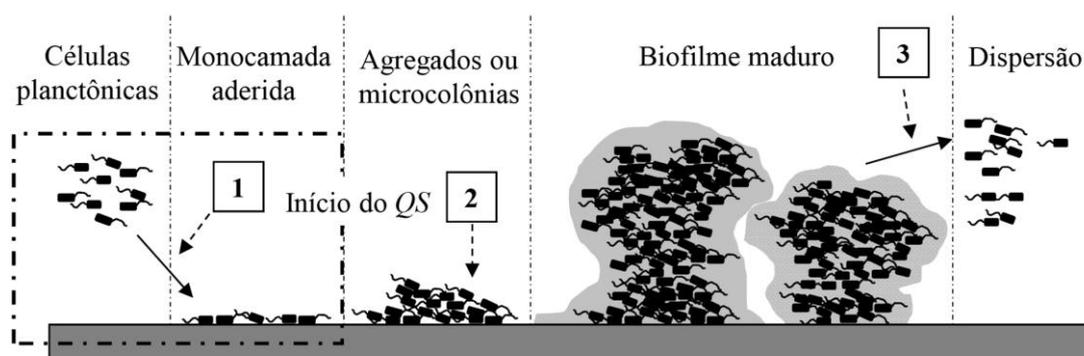


Figura 4: Principais alvos para combate aos biofilmes microbianos: a inibição da formação de biofilmes via bloqueio da adesão bacteriana à superfície (etapa 1) ou o rompimento da comunicação celular bacteriana - *Quorum sensing* (etapa 2) e erradicação ou tratamento de biofilmes já formados (etapa 3) (TRENTIN; GIORDNI; MACEDO, 2013).

Este último conceito de terapia envolve uma característica marcante: as terapias antivirulência, esta via não abrange a morte bacteriana, seu princípio é explorar novos mecanismos de ação a partir dos compostos, visando dificultar o desenvolvimento acelerado da resistência bacteriana. Uma vez que mantém as células em estado planctônico, pois não afeta o crescimento das bactérias, a inibição de fatores de virulência (como a formação de biofilmes) deve torná-lo mais suscetível ao sistema imunológico e aos antimicrobianos utilizados na prática clínica (CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007; RASKO; SPERANDIO, 2010).

Em relação a substratos abióticos, algumas terapias foram desenvolvidas como: alteração das características físicas e desenvolvimento de novas superfícies com propriedade antiaderente, impedindo as interações físico-químicas que medeiam a adesão primária ao substrato; o recobrimento de superfícies incluindo os mais diversos compostos (antibióticos, peptídeos antimicrobianos, compostos isolados de plantas) e moléculas inibidoras do sistema *QS* (TRENTIN; GIORDNI; MACEDO, 2013).

Alternativas preventivas à formação de biofilmes fazem uso de antibióticos profiláticos e biocidas (incluindo revestimentos de dispositivos biomédicos) seja por imersão do dispositivo ou por lavagem do sítio cirúrgico com soluções antibióticas, embora o uso da profilaxia antimicrobiana tenha baixa eficácia em relação ao tempo, essa prática é cada vez mais comum em grupos de pacientes de alto risco (LYNCH; ROBERTSON, 2008).

Entretanto, o uso da profilaxia antibiótica se torna controverso por apresentar rápida liberação, eficácia com curta duração e potencial para aumentar a resistência aos antimicrobianos (VON EIFF *et al.*, 2005). Isso requer coberturas alternativas, com moléculas bioativas e antiadesão bacteriana por acessos que não envolvam a inibição do crescimento e morte bacteriana (TRENTIN, 2013).

5.2 Produtos naturais

Desde tempos remotos, mesmo antes de a humanidade ter conhecimento da existência dos microrganismos, já existia o hábito de usar certas plantas para tratar enfermidades por possuírem poderes de cura. A medicina tradicional existe há milhares de anos e tem como base sistemas de uso de plantas fornecendo à humanidade novos medicamentos (FÃO, *et al* 2012).

Uma planta pode ser classificada como medicinal quando esta possui substâncias com ação farmacológica, destacando a sua importância terapêutica ao apresentarem um princípio ativo atuando em pontos específicos do organismo (CZELUSNIAK, *et al* 2012). Mediante a eficácia desses produtos naturais e seus derivados os mesmos representam hoje mais de 50% de todos os fármacos em uso clínico no mundo (MALHEIROS, 2012). Assim, o interesse por agentes com potenciais quimioterápicos de origem natural tem aumentado significativamente nos últimos anos tendo como base os inúmeros trabalhos realizados (CARNEIRO, *et al* 2014).

O desenvolvimento histórico da Química Orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX onde foram registrados os primeiros estudos com base científica a respeito das mesmas, resultando no isolamento de alguns metabólitos já então conhecidos como medicinais (MONTANARI *et al.*, 2001). Além da química, a comunidade científica também tem sido impulsionada a pesquisar nas áreas de farmacologia e microbiologia tendo como objetivo a busca de novos agentes terapêuticos (CECHINEL FILHO, 2000; MACIEL *et al.*, 2002). De forma geral, a natureza é responsável pela produção da maioria das substâncias já conhecidas, e o reino vegetal é o maior contribuinte com substâncias úteis para o tratamento de doenças de forma mais expressiva (MONTANARI *et al.*, 2001).

Os compostos de origem natural satisfazem quatro papéis importantes na medicina moderna: (i) fornecem medicamentos extremamente úteis, onde a produção e comercialização de sua forma sintética são difíceis, tornando-se até mesmo impraticável, a exemplo temos algumas espécies de alcalóides como a vimblastina e vincristina (BRANDÃO, *et al* 2010); (ii) é possível extrair de fontes naturais compostos básicos que permitem leve alteração por meio de reações químicas tornando-os menos tóxicos e conseqüentemente mais eficazes como é o caso das derivações estruturais da morfina (GUIMARÃES *et al*, 2010); (iii) a sua utilidade como moldes para a produção de medicamentos sintéticos que desempenham atividades fisiológicas de maneira semelhante às dos originais (ROBBERS, *et al* 1997; CUNHA, 2010); (iv) podem ser usados como matéria-prima, até mesmo os compostos que apresentam pouca ou nenhuma atividade, pois devido à facilidade de obtenção, pode ser usado como molécula-base para produzir potentes drogas através de ensaios químicos ou biológicos. É o caso do estigmasterol, abundante no óleo de soja e por meio dele é possível produzir em larga escala a hidrocortisona ou corticosteróides afins, substâncias que ocorrem em quantidades minoritárias na natureza (GUIMARÃES *et al*, 2010).

Além desses quatro benefícios, os compostos naturais ainda apresentam uma atividade particular denominada de Modificadores da Atividade Antibiótica (MAA), cuja ação primordial é alterar o efeito de antibióticos, seja aumentando a atividade antibiótica através do sinergismo ou revertendo a resistência do microrganismo aos antibióticos convencionais (LEITE, *et al* 2014).

O emprego de tais compostos com princípio ativo representa um progresso contra os mecanismos de resistência que tem causado a inativação dos antibióticos, e pode ainda prevenir o contato destes microrganismos com os antibióticos, diminuindo o risco de

desenvolvimento de novos e melhores mecanismos de resistência bacteriana (OLIVEIRA, *et al* 2012; ALENCAR, 2014).

Estudos têm demonstrado que algumas características são predominantes na estrutura de compostos naturais como, elevadas massas moleculares, distribuição de heteroátomos com diferentes grupos contendo O- majoritariamente, N-, S- e halogênios de forma minoritária (HENKEL *et al.*, 1999; MASSI *et al* 2013). Contendo expressivamente mais centros quirais e anéis aromáticos. Conseqüentemente esses grupos bioativos caracterizam de forma significativa as propriedades farmacocinéticas, evidenciando a diversidade natural desses compostos em virtude de sua importância farmacológica (GONÇALVES *et al*, 2015).

Nesse contexto, nosso país se destaca com a maior diversidade vegetal do mundo, abrange cerca de 49.520 espécies vegetais catalogadas, enfatiza de forma relevante a vasta produção de compostos advindos de fontes naturais, já que reúne o maior número de metodologias cada vez mais recentes e modernas de isolamento e identificação, propiciando um crescente aumento de novas substâncias bioativas para fins de uso terapêutico e farmacológico (BRANDÃO *et al.*, 2010).

5.3 Fenilpropanóides

Os fenilpropanóides consistem em um grande grupo de compostos orgânicos produzidos metabolicamente pelas plantas, destacam-se por se tratarem de substâncias naturais difundidas nos vegetais com a finalidade de protegê-los de infecções, irradiação ultravioleta, herbívoros, entre outros (SILVA *et al.*, 2014). São constituídos por uma cadeia de três carbonos unidos a um anel aromático, derivados da via biossintética do ácido chiquímico (CUNHA *et al.*, 2012; SIMÕES *et al.*, 2016).

Os óleos essenciais de certas espécies contêm concentrações significativas de fenilpropanóides, embora tais constituintes não estejam entre os mais comuns nos óleos essenciais de plantas. Porém, quando ocorrem, sua classe e suas propriedades promovem alterações expressivas às características do óleo, fornecendo sabor e odor indispensáveis (CUNHA *et al.*, 2012). Dentre os compostos desta classe, os principais são: eugenol, metil-eugenol, apiol, dilapiol, anetol, estragol (SANGWAN *et al.* 2001).

A formação dos fenilpropanóides se dá através do metabolismo secundário das plantas. O ácido chiquímico é constituído pela via de dois metabólitos da glicose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fostato, quando ocorre a junção do ácido chiquímico com a molécula de fosfoenolpiruvato resulta na formação do ácido corísmico (PERES, 2004). Este

por sua vez é o responsável por originar aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina, a tirosina e o triptofano, precursores de diversos alcalóides. Após sofrerem ação enzimática esses aminoácidos produzem o ácido cinâmico ou ao ácido p-cumárico, ainda chamado de p-hidroxicinâmico (LORENZO *et al.*, 2002). Uma vez formado, o ácido cinâmico dará origem a compostos fenólicos simples nomeados fenilpropanóides como ilustra a figura 5. Esses compostos possuem comportamento volátil, semelhantemente aos monoterpenos encontrados nos óleos essenciais (PERES, 2004).

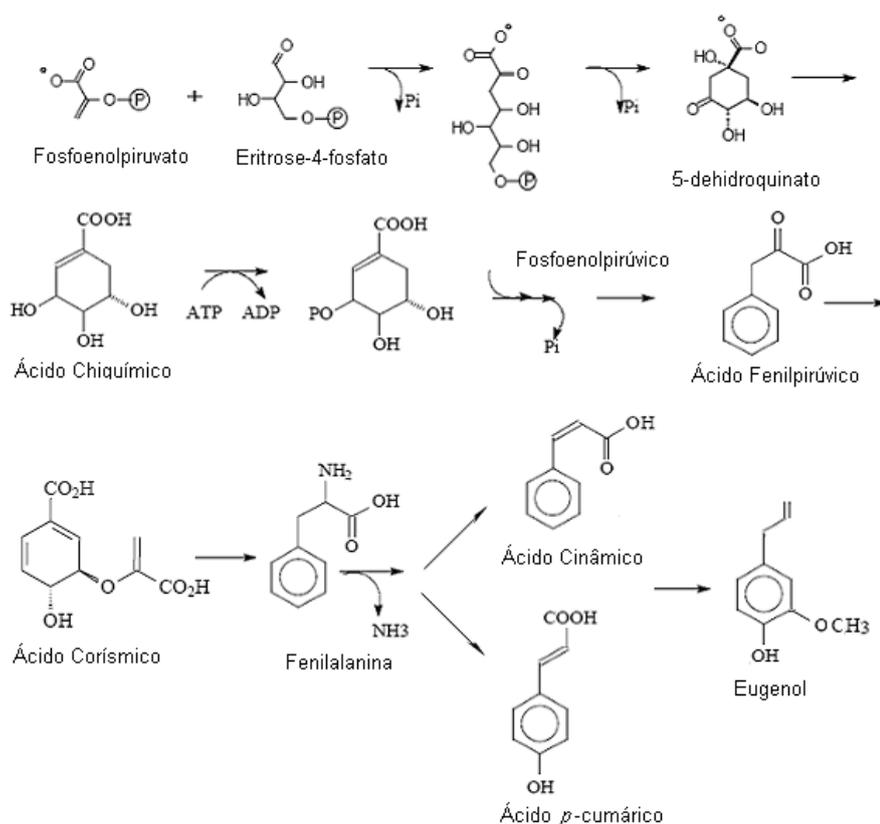


Figura 5: Biossíntese de fenilpropanóides (LORENZO *et al.*, 2002; PERES, 2004).

5.4 Eugenol

O eugenol (Figura 5) quimicamente designado como 4-alil-2-metóxi-fenol, também chamado de ácido eugênico, cuja fórmula molecular é $C_{10}H_{12}O_2$, com uma cadeia lateral alílica (MORRISON & BOYD, 1961; RODRIGUES, 2014). É um membro dos fenilpropanóides, recebeu nome popular de óleo de cravo, por ser encontrado em quantidade abundante e como composto majoritário na planta que o compõe (ESCOBAR, 2002).

Pode ser encontrado no cravo, canela, noz-moscada, folha de louro, sassafrás, mirra entre outros (KIM *et al.*, 1997; YOGALAKSHMI *et al.*, 2010). No óleo essencial e extrato aquoso do cravo-da-índia, *Eugenia caryophyllata*, este composto representa cerca de 89,5% e 98% da sua composição química, respectivamente (ESCOBAR, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2009). Também pode ser extraído do *Croton zenhtneri*, também conhecido como canela-de-cunhã (CRAVEIRO *et al.*, 1981; WU *et al.*, 1994) e da alfavaca, *Ocimum gratissimum*, a qual é muito empregada na cura de distúrbios intestinais, sendo facilmente localizada na região Nordeste (MADEIRA *et al.*, 2005).

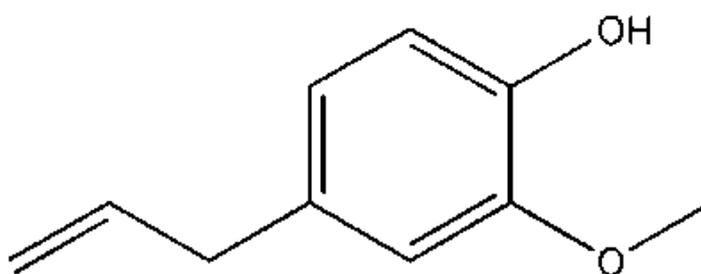


Figura 6: Estrutura química do eugenol (RAHIMI; ASHNAGAR; NIKOEI, 2012).

Sua rota metabólica se dá pela via dos fenilpropanóides, sendo sintetizado a partir do aminoácido fenilalanina (SENANAYAKE, 1977; KOEDUKA, 2006). Quanto as suas propriedades físicas, possui consistência líquida e oleosa, de cor amarelada, com odor peculiar e sabor ardente, picante. Tem uma massa molecular de $164,20 \text{ g.mol}^{-1}$, os pontos de fusão e ebulição são $-7,5$ e 254°C , respectivamente. Apresenta uma densidade igual a $1,06 \text{ g/cm}^3$ e um pK_a de 10,19 (a 25°C) (RODRIGUES, 2014). Pode ser instável quando em contato com o ar, tornando-se viscoso e cor avermelhada com tonalidade escurecida (ALMEIDA, 2004).

Em relação à interação química, é altamente lipossolúvel, o que lhe permite fácil absorção através das membranas celulares, podendo alcançar rapidamente o local de ação, e específicos alvos celulares (ESCOBAR *et al.*, 2002; USTA *et al.*, 2002).

As propriedades farmacológicas do eugenol são diversas, eficazes e comprovadas. O composto é empregado em diversas técnicas odontológicas, o seu uso consiste em analgésico, anestésico local, antisséptico, e na produção de cimentos obturadores de canais (NAGABABU; LAKSHMAIH, 1994; ESCOBAR, 2002). O seu uso consiste ainda em inflamações da boca e faringe, cáries dentárias e otites além de ser utilizado no tratamento de certas doenças infecciosas da cavidade bucal (FU *et al.*, 2007, NAVEED *et al.*, 2013).

O eugenol possui grande potencial de ação antibacteriana contra a maioria das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, seu principal mecanismo farmacológico acerca do efeito bactericida, é devido a sua alta penetrabilidade na membrana citoplasmática, causando seu rompimento e aumento da permeabilidade, gerando um extravasamento do conteúdo celular e posterior morte da bactéria (AFFONSO *et al.*, 2012).

Possui também atividade inseticida, antidiabética, antitumoral, antiúlcera, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, antifúngica (AFFONSO *et al.*, 2012), e ação antinociceptiva e antiedematogênica (WRIGHT *et al.*, 1995; JIROVETZ *et al.*, 2006). No tecido nervoso impede a condução do potencial de ação em nervos periféricos e na junção neuromuscular, com ação anestésica geral (CRUZ, 2001).

Neste contexto o estudo de metabólitos de origem vegetal tem apresentado amplas perspectivas (CUNHA, 2010). E mediante as características apresentadas, o uso do eugenol comporta uma investigação em processos farmacológicos ainda não estudados, tendo em vista novas terapias e caminhos alternativos ou complementares à tradicional antibioticoterapia, baseado em diferentes alvos e novos mecanismos de ação.

Capítulo 6 – Objetivos

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo Geral

Verificar a influência do eugenol na formação e desenvolvimento de biofilme de *Streptococcus mutans* em fios de suturas de algodão.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a atividade antibacteriana do eugenol sobre o crescimento planctônico de cepas de *Streptococcus* (estabelecimento de CIM e CBM);
- ✓ Avaliar a atividade antibiofilme do eugenol em cepas de *Streptococcus* por meio do método de quantificação da biomassa em placas de poliestireno (CV);
- ✓ Analisar o efeito antiadesivo do eugenol através do revestimento de suturas de algodão em diferentes concentrações;
- ✓ Verificar a viabilidade, por contagem das Unidades Formadoras de Colônia – UFC, de *S. mutans* expostas ao fio de algodão revestido com eugenol;
- ✓ Quantificar a biomassa e o metabolismo do biofilme já formado em fios de algodão revestidos com eugenol durante o crescimento bacteriano.

Capítulo 7 – Materiais e Métodos

7. MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Substância teste –Preparo da solução de Eugenol

O eugenol utilizado nesse estudo foi adquirido comercialmente pela Sigma-aldrich (São Paulo, Brasil). Foi preparada uma solução mãe com DMSO (Dimetilsulfóxido) 8% e meio Brain Heart Infusion (BHI; Difco, Detroit, MI), numa concentração final de 0,2%. A solução foi diluída seriadamente a fim de obter novas concentrações para o teste de atividade antimicrobiana. Para o ensaio antiadesão foi usado DMSO 8% e tampão fosfato salina (PBS pH 12) com a finalidade de ionizar o composto.

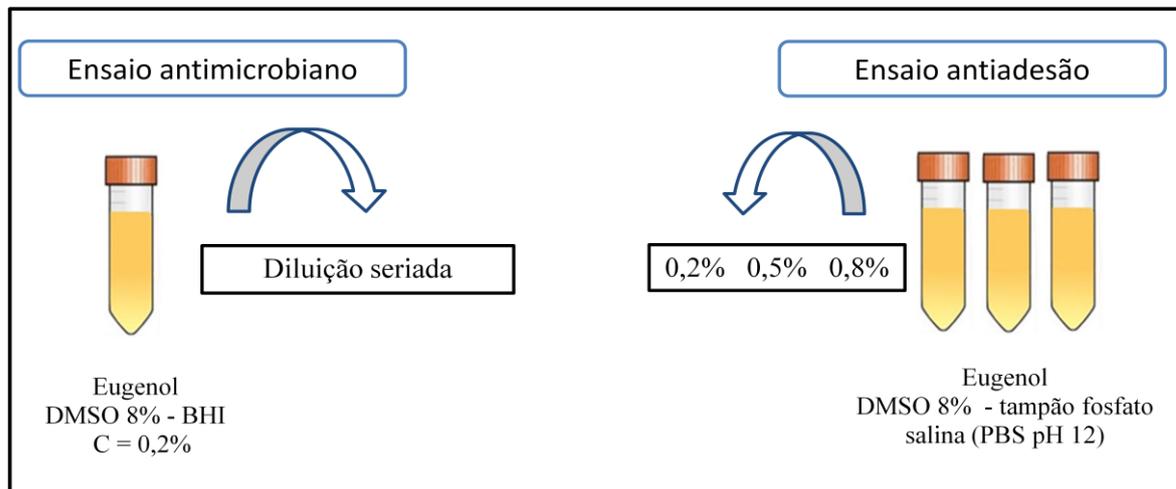


Figura 7 – Representação esquemática do preparo da solução de eugenol para os ensaios antimicrobiano e antiadesão (AUTOR).

7.2 Cepas bacterianas e condições de cultivo

Foram utilizadas cepas bacterianas padrão comercializáveis de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *S. oralis* ATCC 10517, *S. parasanguinis* ATCC 503, *S. pyogenes* ATCC 19615, *S. salivarius* ATCC 7073 e *S. sp* ATCC 15300 gentilmente cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ Rio de Janeiro, Brazil). Armazenadas em freezer -80 °C (INDREL) em meio Brain Heart Infusion (BHI; Difco, Detroit, MI) caldo com 20% de glicerol.

Para ativação, uma alíquota de 50 µL foi inoculada em 5 mL de meio BHI caldo estéril e incubada a 37 °C por 24 h em uma estufa (Shel Lab - TC2123-2E) com 5% de CO₂. Após as 24 h, as culturas foram renovadas inoculando-se uma alíquota de 50 µL em 5 mL de meio

BHI caldo estéril, sob manutenção das mesmas condições de crescimento, por 18 h. Nesse período as células atingem a fase de crescimento exponencial de acordo com a curva de crescimento previamente estabelecida para cada microrganismo.

Para serem usadas nos ensaios biológicos, as células bacterianas na fase de crescimento exponencial foram colhidas por centrifugação (VS-15000CFNII, VISION) a 5000 rpm, durante 5 min, a 4 °C, e ressuspensas em meio de cultura BHI caldo estéril. Foi ainda verificado a densidade óptica (DO) com o auxílio de um espectrofotômetro (Biotrak II Reater - Amersham Biosciences) a $\lambda = 620$ nm, a partir do qual pôde-se ajustar a concentração para $1-2 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹.

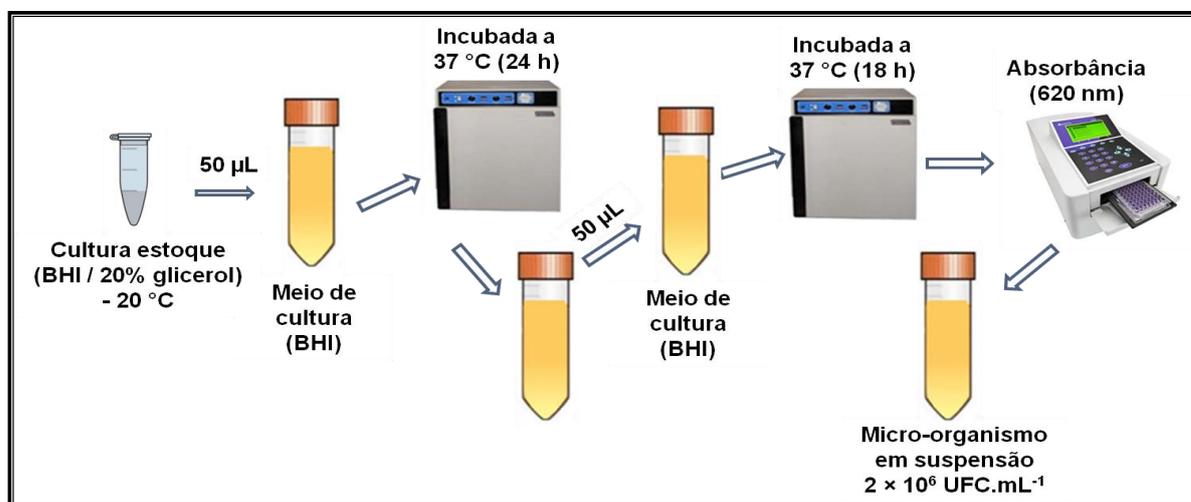


Figura 8 – Representação esquemática das cepas bacterianas e condições de crescimento dos microrganismos (DUARTE, 2016).

7.3 Ensaio da atividade antimicrobiana –CIM e CBM

A atividade antibacteriana do eugenol foi verificada segundo o teste de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços, padronizada segundo a *Metodologia para Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos por Diluição para Bactérias de Crescimento Aeróbico* (CLSI, 2015).

Foram feitas diluições seriadas na base dois para obtenção de diferentes concentrações com um volume de 100 µL. Em seguida 100 µL de bactéria 2×10^6 UFC.mL⁻¹ foram adicionados aos poços da placa obtendo um volume final de 200 µL, com uma concentração bacteriana final de 1×10^6 UFC.mL⁻¹. Os poços que continham apenas inóculo e meio de cultura BHI caldo estéril foram utilizados como controle de crescimento bacteriano.

A placa foi incubada durante 24 h; 37° C; 5% de CO₂ (Shel Lab - TC2123-2E), para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) de cada substância. Foi considerada CIM, a menor concentração de eugenol capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano após 24 h de incubação. Além disso, a inibição do crescimento planctônico foi visualizada através de leitura espectrofotométrica de DO sob $\lambda = 620$ nm (Biotrak II Reater - Amersham Biosciences). Para determinar a CBM, 10 μ L dos poços onde não houve crescimento microbiano visível foram inoculados em placas de petri contendo meio de cultura BHI ágar estéril. Após um período de 24 h de incubação a 37 °C em condições aeróbicas. Foi considerado CBM a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano na superfície de ágar.

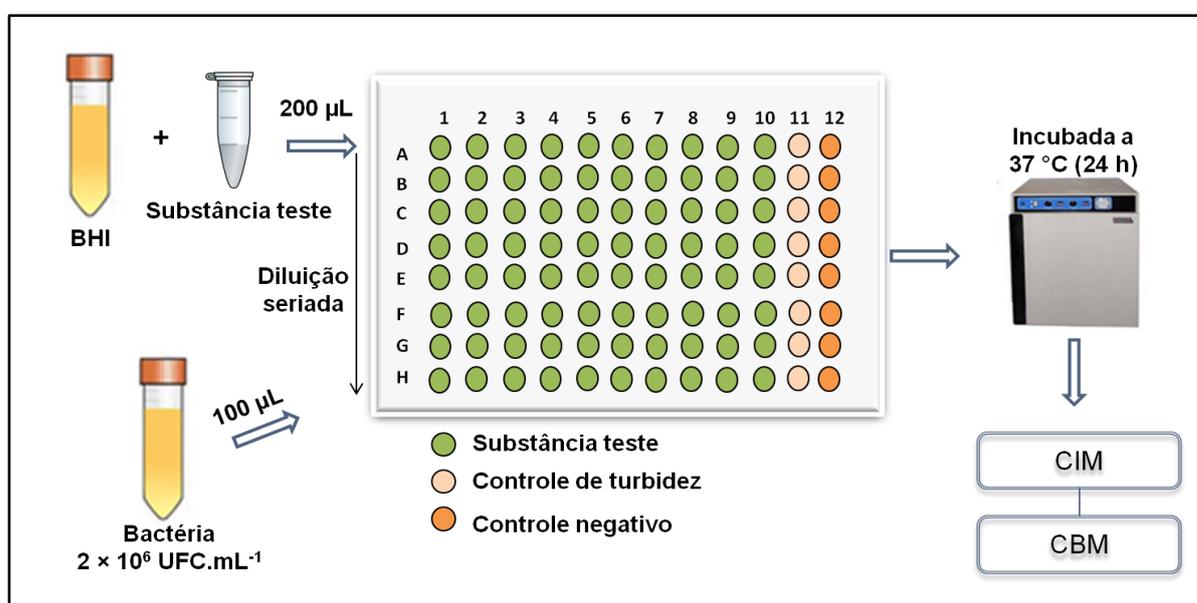


Figura 9 – Representação esquemática da metodologia utilizada para determinação de CIM e CBM (DUARTE, 2016).

7.4 Ensaio de atividade antibiofilme –Quantificação da biomassa

Para a quantificação da biomassa, as bactérias planctônicas foram removidas e os poços lavados com água destilada. Após secagem da placa a temperatura ambiente, 200 μ L de álcool metílico PA foram adicionados e deixados por 15 minutos para fixação das células aderidas. Após a remoção do metanol, 200 μ L de CV 0,1% foram adicionados por 10 minutos para permitir uma quantificação indireta da biomassa através da coloração. Em seguida o CV foi removido e repetido o processo de lavagem e secagem da placa. Em seguida foram adicionados 200 μ L de ácido acético 33% por 10 minutos para dissolução do corante preso ao

biofilme. A suspensão obtida em cada poço foi transferida para uma nova placa de 96 poços onde foi realizada a medição da absorbância em um leitor de microplacas a 590 nm (Biotrak II Reater - Amersham Biosciences).

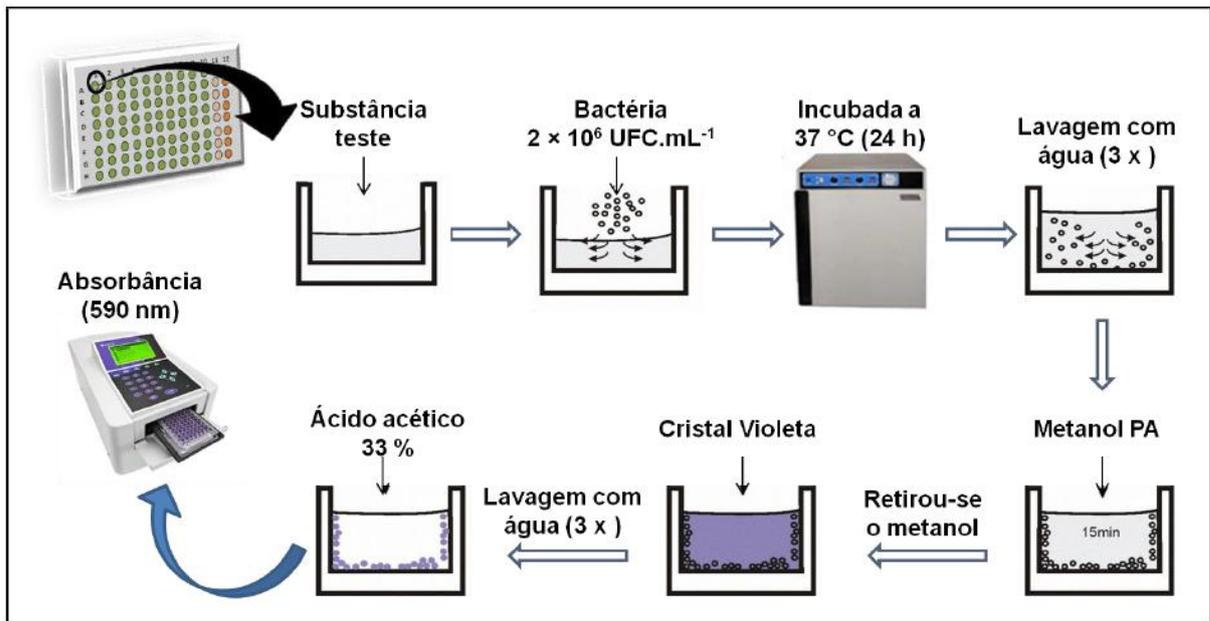


Figura 10 – Representação esquemática da metodologia de quantificação de biofilme das cepas bacterianas, gerado em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (DUARTE, 2016).

7.5 Processo de revestimento dos fios de sutura com eugenol

Nesse estudo foram usados fios de algodão (*Technofio 3-0*)®, cortados em tamanho padrão de 1cm e esterilizados. Em seguida, submergidos em solução de Eugenol/DMSO (8%) /tampão fosfato salina (PBS pH 12) nas concentrações de 0,2, 0,5 e 0,8%. Posteriormente incubados em agitação orbital (overnight 37°C , 100 rpm) (MARCONI - MA 410). Após esse período, os fios foram removidos da solução de eugenol e submetidos ao processo de secagem por cerca de 1h e 30 minutos em temperatura ambiente.

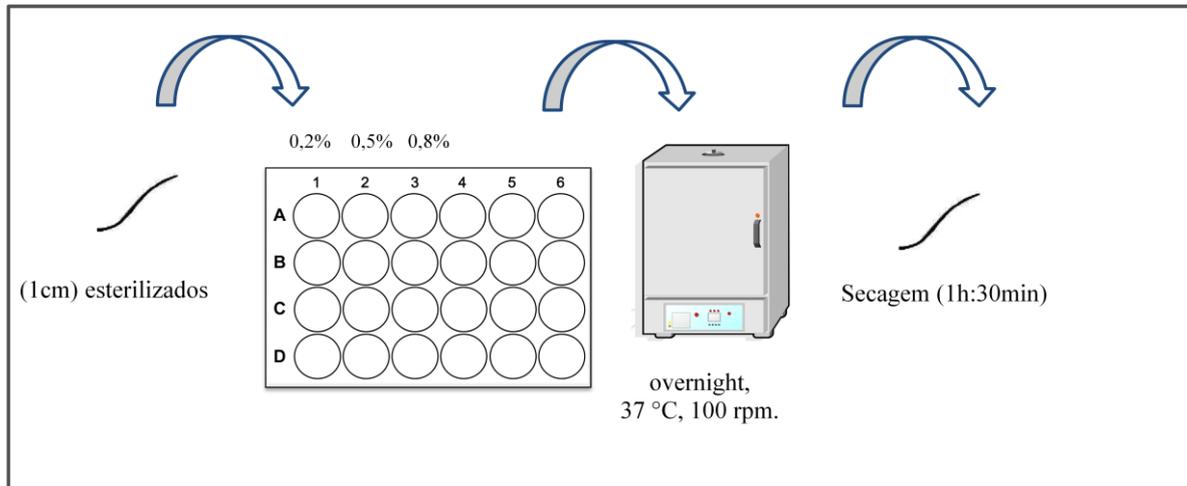


Figura 11 – Representação esquemática do processo de revestimento dos fios de sutura com solução de eugenol (AUTOR).

7.6 Efeito antiadesivo do revestimento dos fios de sutura com eugenol – *Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)*

Depois de secos, os fios foram colocados em contato com o microrganismo (1×10^6 UFC/mL) por 6 h (37 °C, 100 rpm). Para análise das bactérias aderidas, os fios foram lavados duas vezes com tampão PBS (pH 7,0) e submetidos ao processo de sonicação (CRISTÓFOLI Ultrasonic Cleaner) durante 360 segundos em 1 mL do mesmo tampão. As células desprendidas foram diluídas seriadamente na base 10, aliquotadas em meio BHI ágar e incubadas por 24 h (37 °C; 5% de CO₂), e posteriormente realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônias - UFC.

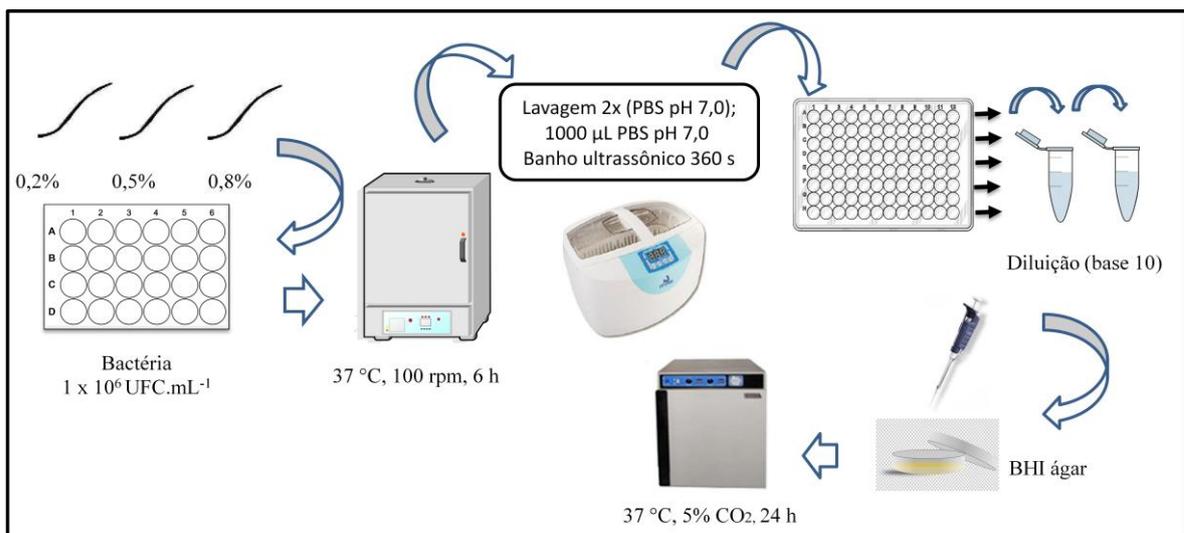


Figura 12 – Representação esquemática do efeito antiadesivo do revestimento dos fios de sutura com eugenol através da Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) (AUTOR).

7.7 Efeito do revestimento dos fios de sutura no desenvolvimento do biofilme – *Quantificação da biomassa*

Os fios de sutura revestidos com eugenol foram colocados em uma placa 24 poços em contato com 1000 μL de suspensão bacteriana de *S. mutans* previamente ajustada na concentração de 1×10^6 UFC/mL durante 6 h (37 °C; 100 rpm) proporcionando a adesão inicial.

Os fios destinados à análise de diferentes etapas de maturação do biofilme continuaram na estufa com rotação durante 48 h. Há cada intervalo de 12 h os fios em contato com o inóculo foram submetidos a duas lavagens em PBS (pH 7,0) e na sequência transferidos a novos poços com meio de cultura esterilizado. Este procedimento foi repetido nos intervalos de 12, 24, 36 e 48 h após 6 h de adesão inicial.

Depois de cada período de contato os fios foram retirados e lavados com água destilada (up and down) para quantificação de biomassa (vide item 7.4).

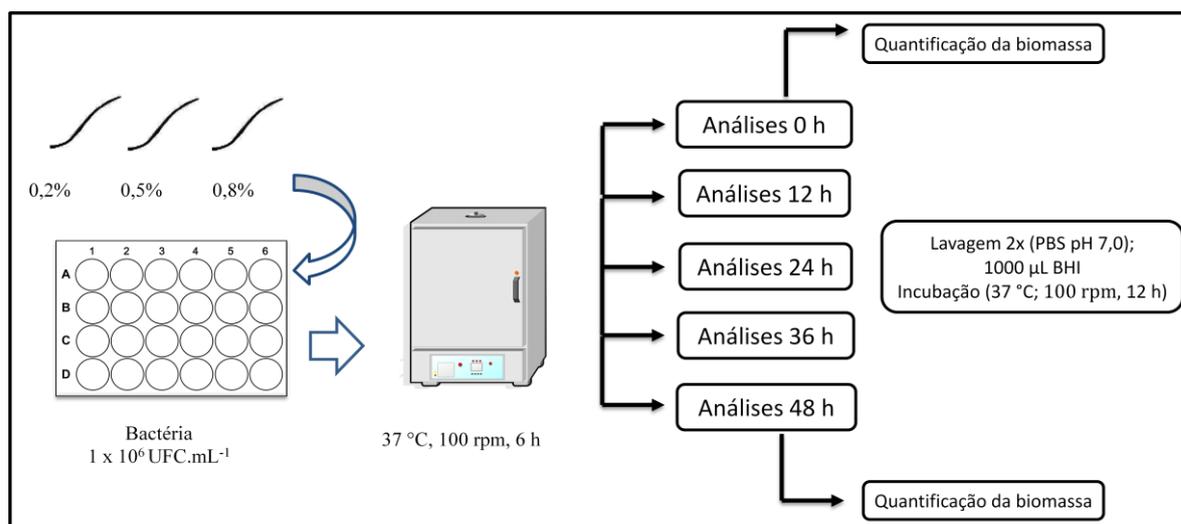


Figura 13 – Representação esquemática do efeito do revestimento dos fios de sutura no desenvolvimento do biofilme através da Quantificação da biomassa (AUTOR).

7.8 Efeito do revestimento dos fios de sutura no metabolismo do biofilme – *Ensaio XTT*

Os fios de sutura revestidos com eugenol foram colocados em uma placa 24 poços em contato com 1000 μL de suspensão bacteriana de *S. mutans* previamente ajustada na concentração de 1×10^6 UFC/mL durante 6 h (37 °C; 100 rpm) proporcionando a adesão inicial.

Os fios destinados à análise de diferentes etapas de maturação do biofilme continuaram na estufa com rotação durante 48 h. Há cada intervalo de 24 h os fios em contato com o inóculo foram submetidos a duas lavagens em PBS 0,1 M estéril (pH 7,0) e na sequência transferidos a novos poços para o ensaio XTT onde foi avaliado a diminuição da atividade metabólica de células viáveis.

O preparo da solução de PBS/XTT/Menadiona foi dissolvido nas seguintes proporções: 790/200/10 μL por poço utilizado em uma placa de poliestireno (24 poços), levando-se em consideração o volume de 1000 μL em cada poço. Em seguida, a placa foi incubada em uma estufa (Shel Lab - G2545A) por 5 h a 37 °C. Após o tempo transcorrido foi feito a medição de absorbância em um leitor de microplacas a 492 nm. Este procedimento foi repetido nos intervalos de 24 e 48 h após 6 h de adesão inicial.

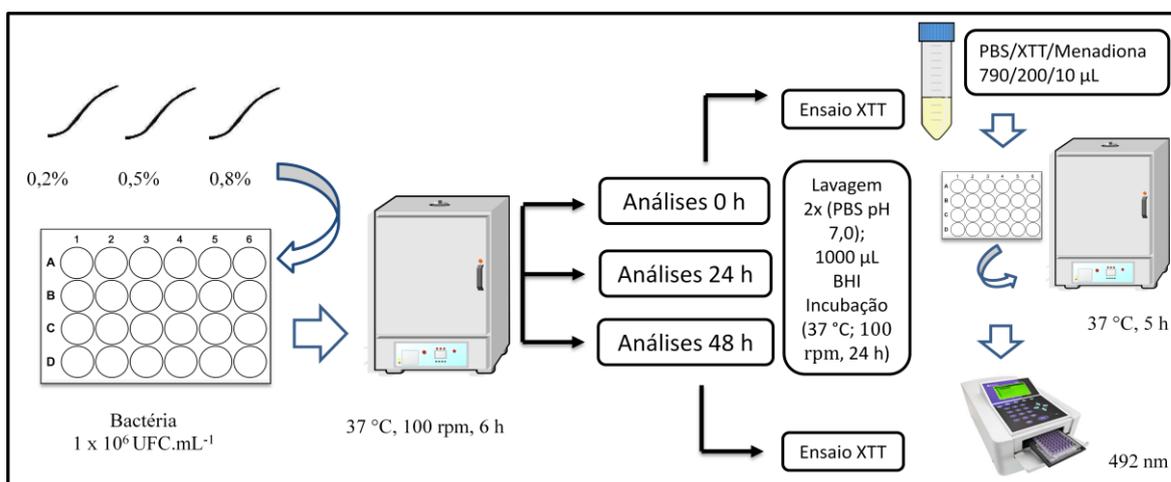


Figura 14 – Representação esquemática do efeito do revestimento dos fios de sutura no metabolismo do biofilme através do ensaio XTT (AUTOR).

7.9 Análise estatística

Os resultados dos respectivos testes foram categorizados em Microsoft Excel (Versão 2012 para Windows) e posteriormente analisadas no software GraphPad Prism (Versão 5.0 para Windows, San Diego California USA). As diferenças significativas entre os grupos foram verificadas através da aplicação do teste One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni e pós-teste Tukey. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,01$.

Capítulo 8 – Resultados e Discussão

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos grandes desafios atuais da saúde pública são as infecções causadas por agentes etiológicos amplamente resistentes aos antimicrobianos. Essas contaminações ocasionam aumento no tempo de internação, nos gastos do sistema de saúde e, sobretudo altas taxas de morbi-mortalidade (NEIDELL *et al.*, 2012). Com o surgimento dos biomateriais e sua crescente utilização a expectativa de vida humana tem se elevado.

O uso desses materiais implantáveis vem re-estabelecendo inúmeras funções vitais, porém, tem aumentado simultaneamente o problema das infecções, já que passaram a ser associadas à biomateriais e assim reconhecidas como um dos maiores problemas clínicos (BUSSCHER *et al.*, 2012). De acordo com o órgão norte-americano “National Institutes of Health”, cerca de 80% de todas as contaminações mundiais estão relacionadas a biofilmes, envolvendo especialmente biomateriais (TRENTIM, 2013).

A adesão, a diversidade metabólica e a capacidade de adaptação a estresses ambientais são características fundamentais dos microrganismos que compõem o biofilme. Deste modo os dispositivos biomédicos são facilmente colonizados por eles após a sua implantação. Assim, o material usado na produção desses dispositivos certamente pode interferir na propensão da aderência bacteriana (ROCHFORD; RICHARDS; MORIARTY, 2012).

As respostas biológicas aos materiais dependem essencialmente da composição das superfícies, assim como das interações químicas tornando fundamental a modificação na superfície de materiais (BAZAKA *et al.*, 2012). Uma vez que as superfícies irregulares e texturizadas favorecem a aderência microbiana em relação às superfícies regulares e lisas.

Deste modo a alteração de superfícies tem recebido destaque por promover mudanças na biocompatibilidade material-substrato dificultando a adesão e colonização microbiana. Já que mantém inalteradas as propriedades mecânicas, o volume e as funcionalidades desejáveis, além de introduzir sítios superficiais no material para a imobilização de moléculas ativas (GODDARD; HOTCHKISS, 2007).

Apesar das diferentes interações superficiais (bióticas, abióticas, com ou sem filme condicionante), e distinção celular (bactérias, fungos, células humanas) apresentarem complexidade frente a tantas variáveis, a aplicação prática vem estimulando contínuos esforços neste campo de estudo multidisciplinar (TRENTIM, 2013).

Assim o revestimento superficial com os mais diversos compostos bioativos passou a ser intimamente investigado visando a prevenção da formação de biofilmes em biomateriais.

8.1 Atividade antimicrobiana do Eugenol – CIM e CBM

A atividade antibacteriana do eugenol foi realizada com seis cepas de bactérias orais Gram-positivas (tabela 1). A atividade do composto foi avaliada através do método de microdiluição em caldo utilizando placas de poliestireno de 96 poços (CLSI, 2015) para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Essa atividade pode ser definida como a menor concentração do agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo.

No que se refere a ação do composto, o eugenol obteve resultados relevantes para bactérias Gram-positivas do gênero *Streptococcus* (Tabela 1). Os dados de CIM (Concentração Inibitória Mínima) mostram que o eugenol inibiu o crescimento visível de todos os *Streptococcus* nas concentrações de 0,02 a 0,10%. Dentre eles destaca-se a inibição de *S. mutans*, que apresentou a menor concentração do composto. Já nos resultados de CBM (Concentração Bactericida Mínima) foram praticamente os mesmos para todas as cepas, diferenciando apenas a *S. parasanguinis* com 0,05% e *S. pyogenes* que não foi determinado.

Tabela 1: Dados obtidos de CIM e CBM do eugenol sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas do gênero *Streptococcus*. *Nd- Não determinado.

Microrganismos	CIM	CBM
	Eugenol (%)	
<i>Streptococcus sp. ATCC 15300</i>	0,05	0,10
<i>Streptococcus salivarius ATCC 7073</i>	0,10	0,10
<i>Streptococcus oralis ATCC 10517</i>	0,05	0,10
<i>Streptococcus mutans ATCC 25175</i>	0,02	0,10
<i>Streptococcus parasanguinis ATCC 503</i>	0,05	0,05
<i>Streptococcus pyogenes ATCC 19615</i>	0,10	Nd*

Fonte: autor.

Os compostos derivados de plantas têm sido amplamente utilizados na terapia contra diversos microrganismos, como fungos e bactérias, que estão direta ou indiretamente envolvidos em alguma patologia (MARCOS-ARIAS; CRISTINA *et al.*, 2011). Um dos principais motivos que levam ao estudo desses compostos é o surgimento cada vez mais preocupante de novos microrganismos resistentes ao tratamento convencional por antibióticos.

O eugenol é um fenilpropanóide bastante usado na medicina e na odontologia por apresentar propriedades antisséptica, antimicrobiana, anestésica, analgésica, antioxidante e anti-inflamatória (DE PAULA *et al.*, 2014). Tendo em vista a vasta atividade biológica deste composto, buscou-se aprofundar as propriedades antimicrobianas sobre bactérias orais.

O CIM e CBM do eugenol no presente estudo variaram de 0,02 a 0,10% e 0,05 a 0,10% respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Yadav e colaboradores (2013) com *Streptococcus pneumoniae*, no qual se obteve inibição do crescimento planctônico em concentrações de 0,06 a 0,12%. Outros achados mostram sua atividade inibitória nas concentrações de 0,01 a 0,08% contra *S. sobrinus*, *S. sanguinis* e *S. mutans*, confirmando assim, seu efeito sobre bactérias orais (MOON; KIM; CHA, 2011).

O eugenol possui propriedade lipofílica, assim como os óleos essenciais, que facilita sua interação com a membrana plasmática alterando a estrutura dos polissacarídeos e fosfolipídios presentes (DEVI *et al.*, 2010). Além disso, essa interação acarreta a expansão, aumento e permeabilidade da membrana, podendo ainda, afetar o processo de respiração e transporte iônico da célula.

8.2 Atividade antibiofilme

De acordo com o conhecimento atual, os biofilmes são a principal causa de doenças infecciosas crônicas. Um biofilme dental maduro é de natureza polimicrobiana e pode consistir em até 100 diferentes espécies. Os colonizadores primários que predominam são *Streptococcus* orais, e o ponto crucial para sua formação é a adesão inicial dessas bactérias às superfícies dentárias. O estabelecimento dessa adesão se dá através de pares de adesinas e receptores de glicoproteína na película adquirida (LARSEN & FIEHN, 2017).

Deste modo, buscou-se avaliar a atividade antibiofilme do eugenol através de ensaios em placas de poliestireno com a produção e desenvolvimento de biofilmes monoespécie de *Streptococcus* orais com 24 h de crescimento.

Os resultados preliminares indicam que o eugenol promove diminuição da formação dos biofilmes, havendo uma redução significativa da biomassa formada para todas as bactérias testadas.

Para *Streptococcus sp* a diminuição foi relevante nas duas primeiras concentrações (0,10% e 0,05%), para *S. salivarius* apenas na primeira (0,10%) e significativo na segunda (0,05%). Para *S. oralis*, a inibição foi completa nas duas primeiras concentrações (0,10% e 0,05%) e significativa na terceira (0,025%). Os resultados mais promissores dão ênfase a *S.*

mutans, *S. parasanguinis* e *S. pyogenes* os quais demonstraram inibição em todas as concentrações testadas apesar de apresentarem um CIM em concentrações de (0,025%, 0,05% e 0,10%) respectivamente. Provando a eficiência do composto mesmo em concentrações sub-inibitórias no ensaio com células planctônicas (Figura 15).

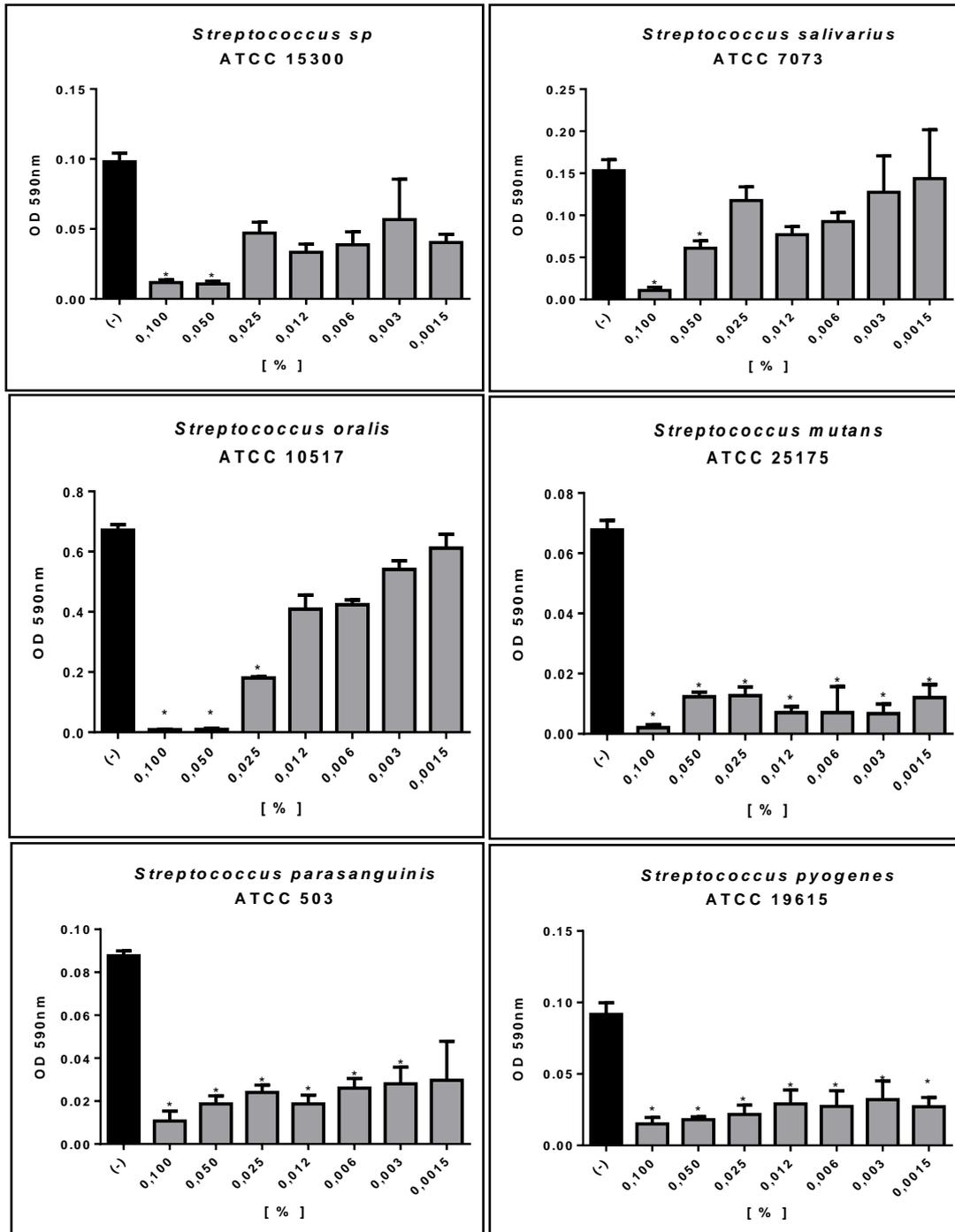


Figura 15: Avaliação da atividade antibiofilme do eugenol em diferentes concentrações sobre formação do biofilme de *Streptococcus* orais. Barra cinza = concentrações da substância teste; Barra preta = controle negativo (-). * $p < 0,01$ em relação ao (-) (AUTOR).

Outro ponto relevante são os baixos valores na densidade óptica para algumas bactérias testadas. Todavia podem ser justificados pela ausência de sacarose nos ensaios realizados e, contudo não demonstrando interferência na formação dos biofilmes.

Khan & Ahmad (2012) avaliaram o efeito de vários fitocompostos, entre eles o eugenol, contra biofilme de *Cândida albicans*. Seus resultados mostraram atividade inibitória com concentrações sub-MIC mesmo após 48 h de tratamento.

He, Du, Fan & Bian (2007) relataram a atividade *in vitro* do eugenol contra biofilme de *Candida albicans* e comprovaram sua atividade fungicida contra suas células sésseis. Os resultados indicam que o efeito do eugenol sobre a aderência inicial das células e formação do biofilme foi dependente do tempo e da concentração do composto. Além da atividade contra biofilmes *in vitro* de *C. albicans*, apresenta ainda baixa citotoxicidade e, portanto, tem potencial terapêutico que pode ser aplicado em biofilmes associados a infecções fúngicas.

Foi relatado por Li e colaboradores (2010) que o eugenol causa erradicação do biofilme relacionado à cárie em modelo de boca artificial com bactérias orais do gênero *Streptococcus*, dentre elas *S. mutans* e *S. sobrinus*. Neste estudo foi demonstrada que as glicosiltransferases (GTFs) catalizam a síntese de glucanos a partir da sacarose. Estes glucanos estão associados a uma aderência mais consistente à superfície do dente desempenhando uma atividade essencial na formação do biofilme. Os resultados exibiram redução significativa do glucano sugerindo ainda que o composto apresente um potencial de ação anticariogênica como um agente antiplaca.

Adil *et al* (2014) desenvolveram um estudo onde o eugenol induziu a supressão de genes formadores de biofilme de *Streptococcus mutans*. Foi demonstrado que o composto possui efeito inibidor na formação do biofilme mesmo em concentrações sub-MIC, reforçando os resultados do presente estudo.

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) é o componente majoritário de diferentes óleos essenciais extraídos a partir de folhas de plantas, como louro (*Laurus nobilis*) e de botões de cravo (*Eugenia caryophyllata*). Pode ser usado como analgésico em odontologia, possui vasta atividade antimicrobiana, além de ser usado na medicina popular contra diarreia e infecções de ferimentos (BURT, 2004).

No atual estudo, o eugenol causou uma redução significativa na adesão e formação de biofilme de todos os *Streptococcus* testados em placas de poliestireno. É provável que na presença do composto as bactérias foram incapazes de atingir o limiar necessário, ou seja, não houve um estímulo mínimo para que se transformasse em uma resposta e houvesse formação dos biofilmes (YADAV *et al.*, 2013).

Estes resultados sugerem que o eugenol pode interferir na formação de biofilmes por apresentar propriedades antiadesivas. Em conjunto, os achados aqui relatados corroboram a eficácia do eugenol contra as células planctônicas e sésseis, reforçando o potencial deste composto como antibacteriano, indicando que este fenilpropanóide pode ter um efeito benéfico adicional no tratamento da cárie dentária e outras doenças orais.

8.3 Efeito do revestimento dos fios de sutura na contagem das unidades formadoras de colônia

Os microrganismos apresentam uma aptidão congênita em colonizar diferentes superfícies, onde estabelecem agregados celulares complexos denominados biofilmes. Estas comunidades têm se desenvolvido ao longo dos anos, alastrando-se naturalmente do meio ambiente ao meio social, tornando-se uma causa preocupante de infecções hospitalares (CABOT *et al.*, 2016).

O problema das infecções associadas a biofilmes está vinculado, sobretudo ao uso de dispositivos médicos, especialmente, aqueles inseridos ou implantados por longos períodos. Em sua grande maioria, a superfície abiótica desses materiais constitui características, tais como, hidrofobicidade, carga potencialmente negativa, rugosidade que propiciam a adesão microbiana e conseqüente formação, desenvolvimento e estabelecimento do biofilme (TRETER *et al.*, 2014).

Diante disso, nos últimos anos, a comunidade científica tem empenhado intensos esforços para melhorar as propriedades antiaderentes das superfícies existentes. Esse melhoramento propõe aplicação de revestimentos com base em substâncias bioativas ou modificação e/ou alteração na arquitetura da superfície, todavia, preservando a funcionalidade do biomaterial.

Para continuarmos os estudos visando o revestimento da superfície de uma sutura de algodão, escolhemos avaliar o potencial antiadesão do eugenol. Nestas análises, as concentrações do composto chegaram a ser até oito vezes maior em relação à concentração com efeito bactericida, variando de 0,2 a 0,8%, após 6 horas de adesão inicial. E ainda em virtude do papel de *S. mutans* na deterioração dentária, a mesma foi selecionada para dá continuidade aos ensaios antiadesão, onde foi verificado o efeito antiadesivo do eugenol através das unidades formadoras de colônia.

Os resultados demonstraram um efeito inibitório significativo do composto testado quanto ao número de células viáveis de *S. mutans* aderidas ao fio. Apesar da presença de

células viáveis observado em todas as condições de tratamento, as contagens de UFCs demonstraram uma diminuição de 50%, já que foram reduzidas pela metade em relação ao controle negativo (Figura 16). É notável ainda que a taxa de inibição no que diz respeito a adesão bacteriana ao fio ocorreu de modo independente da concentração.

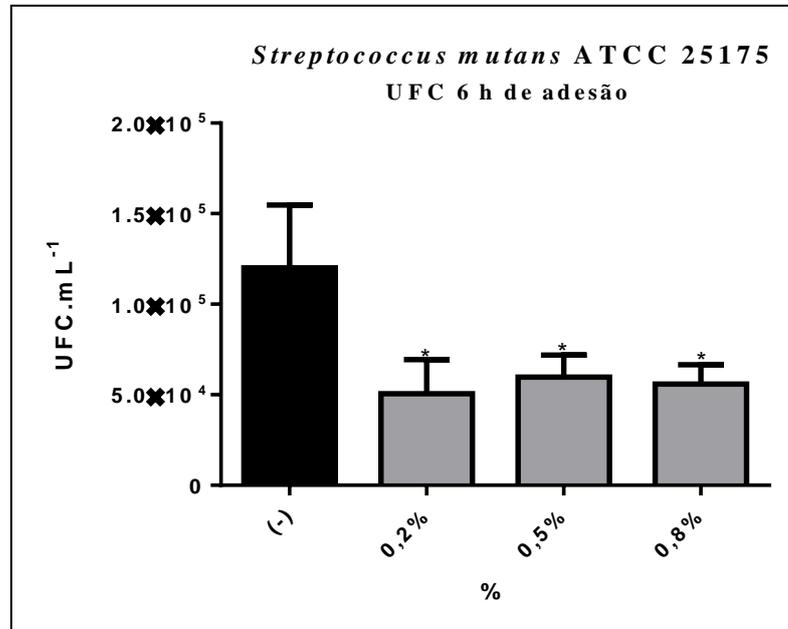


Figura 16: Efeito antiadesivo através das unidades formadoras de colônias de *S. mutans* inicialmente aderidas ao fio de sutura. (-) Controle bacteriano sem interferência do composto; (0,2, 0,5 e 0,8%) bactéria encubada com o fio de sutura revestido com diferentes concentrações de eugenol, ($p < 0,01$) (AUTOR).

A adesão bacteriana a materiais sintéticos tais como fios de sutura, próteses e enxertos têm sido objetos de estudo de muitos pesquisadores (NETO *et al.*, 2015). Sabe-se que o biofilme formado em suturas pode atuar como foco da infecção e gerar um risco potencial para cicatrização de feridas (VENEMA *et al.*, 2011). Além disso, os fios que induzem a inflamação tendem a causar edema em torno da ferida acarretando a abertura das suturas (NETO, 2015). Portanto, esforços são determinantes para minimizar a adesão bacteriana aos fios pelo uso concomitante de agentes antimicrobianos.

A atuação de *S. mutans* além de bem caracterizado é crucial para o desenvolvimento de infecções humanas assim como em implantes biomédicos, de acordo com o sítio de infecção. Entre elas estão cáries dentárias, periodontite, endocardite infecciosa, e uma série de infecções nosocomiais (STOODLEY *et al.*, 2002). Esse microrganismo comumente associado à cárie tornou-se o principal alvo nos estudos de prevenção dessa doença.

Sabe-se que a cárie se trata de uma doença infectocontagiosa, crônica, causada pelo processo de desmineralização da superfície dental. Isto se deve a capacidade de *S. mutans* em

produzir ácidos orgânicos (acidogenicidade), de viver em pH baixo (aciduricidade) e de sintetizar glucanos para aderir firmemente à superfície do dente, os quais são condições necessárias na formação e manutenção do biofilme dentário (BOWEN; KOO, 2011).

Diferentes agentes antimicrobianos foram testados contra a formação e maturação do biofilme deste microrganismo. O uso deles até reduz o número de microrganismos viáveis na flora oral e embora eficazes essas terapias antibacterianas produzem vários efeitos secundários indesejáveis (ADIL *et al.*, 2014).

A fim de desenvolver uma abordagem quimioterapêutica eficaz (diferente de microbicidas) contra biofilmes dentais, o uso de plantas tem sido uma maneira promissora de frustrar a patogênese de infecções orais.

Adil e colaboradores (2014) desenvolveram um estudo tendo como foco a supressão de genes formadores de biofilmes de *Streptococcus mutans* induzida a partir do eugenol. Sabe-se que a capacidade de sintetizar glucanos utilizando GTFs é essencial para a adesão, coesão e acumulação desse microrganismo na superfície do dente e fornece integridade estrutural para a matriz de biofilmes (XIAO; KOO, 2010). Desta forma a supressão de moléculas relacionadas à adesão é o passo inicial contra a formação de biofilmes por *S. mutans* e representam uma alternativa promissora na prevenção da formação de biofilmes.

No mesmo estudo o eugenol reduziu significativamente a adesão da bactéria em comparação ao controle, bem como a atividade de GTFs e sua biomassa, apenas sua viabilidade não foi afetada. Na presença do mesmo, *S. mutans* foi incapaz de formar um biofilme e os dados confirmam que seu efeito atua inibindo traços de virulência sem afetar a viabilidade (ADIL *et al.*, 2014).

Outras pesquisas como a de Yadav e colaboradores (2013), já mencionado, reforçam os resultados da presente pesquisa. Pela contagem das UFCs tratadas com eugenol verificou-se a presença de células viáveis no número de colônias formadas. E embora o biofilme de *S. pneumoniae* tenha se mostrado tolerante ao composto houve uma redução das UFCs pelo tratamento com concentrações acima da CIM e CBM.

8.4 Efeito do revestimento dos fios de sutura no desenvolvimento do biofilme

Foram realizados ensaios de quantificação da biomassa para análises sobre sua produção, após o tratamento da superfície nas diferentes condições pré-estabelecidas.

Após 6 h de adesão inicial, a biomassa formada no intervalo de 0 h não apresenta diferenças em relação ao controle negativo. Passam a ser notadas, somente, a partir do

intervalo de 12 h, se tornam mais evidentes com 24 h e estabelece diferenças expressivas nos intervalos de 36 e 48 h (Figura 17).

Ao fim do processo de maturação do biofilme, o controle negativo tem formado uma espessa camada de biomassa observada nitidamente por meio dos valores de densidade óptica. O que torna as diferenças ainda mais significativas entre este controle e as amostras tratadas.

Vale ressaltar novamente que o presente resultado não demonstra dependência das concentrações testadas. Porém é plausível considerar que na presença de diferentes tratamentos de eugenol a produção de biomassa diminui gradualmente em relação ao controle negativo.

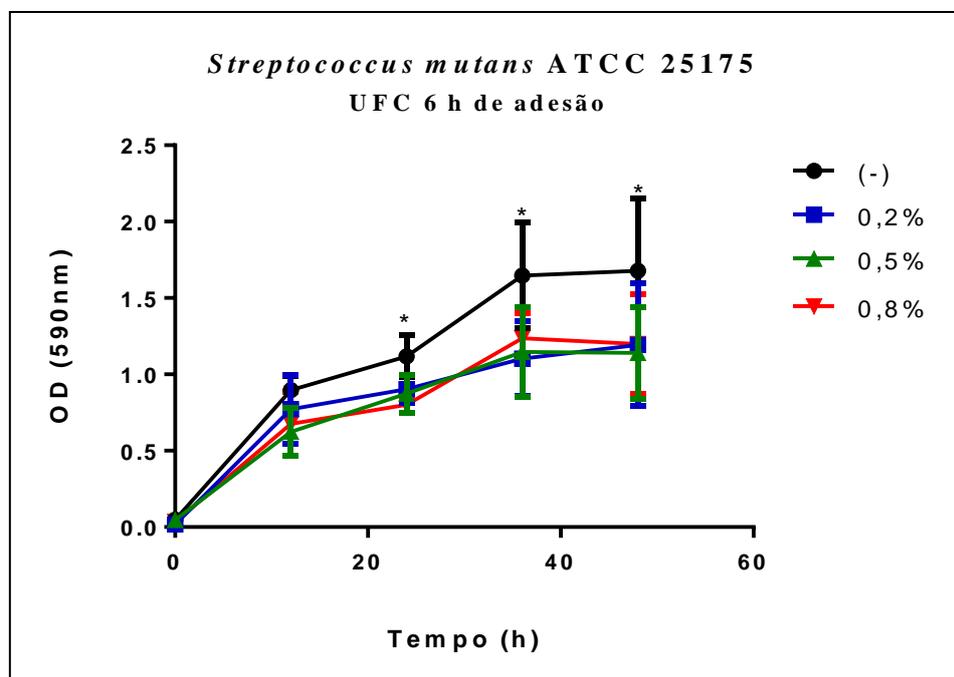


Figura 17: Efeito antiadesivo através da quantificação da biomassa de *S. mutans* formada sobre superfície de fios de sutura revestidos com eugenol em diferentes concentrações durante 48 h de desenvolvimento com intervalos de 12 h, ($p < 0,01$) (AUTOR).

A aderência microbiana à superfície dos substratos consiste o passo inicial para a formação de biofilme. Como as células medeiam a primeira interação entre o microrganismo e o ambiente, é neste momento que pode ocorrer a ligação irreversível com a produção de elementos que favorecem a transição do modo de vida planctônico para a forma sésil (PETROVA; SAUER, 2012).

Uma vez aderido dá-se início a produção de biomassa do biofilme que é rica em polissacarídeos sintetizados por glicosiltransferases (GTFs) e fornecem locais de ligação

específicos para colonização de bactérias entre si e na superfície do dente (XIAO; KOO, 2010).

A elevada quantidade de exopolissacarídeos (EPS) promove estabilidade e integridade estrutural ao biofilme, além de fornecer proteção às células bacterianas de influências ambientais hostis e de agentes antimicrobianos (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007).

A EPS e acidificação encontram-se intimamente relacionadas, já que a persistência de um ambiente ácido leva à seleção de bactérias altamente tolerantes a acidez. Isso resulta na dissolução do esmalte, iniciando o processo da cárie dentária (MARQUIS; CLOCK; MOTA-MEIRA, 2003). Desta forma, o controle da biomassa do biofilme requerem metas primárias para intervenção quimioterápica.

Tendo em vista os elevados efeitos prejudiciais dos biofilmes, juntamente com os efeitos colaterais associados aos agentes terapêuticos, intensos esforços tem sido empenhado para encontrar novos agentes para controlar e diminuir a patogenicidade desses microrganismos.

Marks *et al* (2012) relataram em sua pesquisa que células de *Streptococcus pneumoniae* em biofilmes são difíceis de erradicar, sendo necessário maiores quantidades de antibióticos.

Já no estudo de Yadav e colaboradores (2013), as concentrações de eugenol necessárias para erradicar biofilmes do mesmo microrganismo pré-estabelecidos eram semelhantes as que foram necessárias para inibir o crescimento de células planctônicas. Este resultado indica atividade antibacteriana do eugenol e demonstra seu forte efeito contra *S. pneumoniae* em biofilmes.

Adil e colaboradores (2014) indicam que o eugenol pode exercer atividade semelhante aos antibióticos em biofilmes pré-formados sobre a supressão de genes formadores de biofilme induzida por *Streptococcus mutans*.

A prevenção de biofilmes precoce juntamente com a inibição de biofilmes é considerado o tratamento mais eficaz contra a periodontite (WEI; CAMPAGNA; BOBEK, 2006).

Outra importante propriedade do eugenol é que ele interage principalmente com a membrana citoplasmática da bactéria, fazendo com que a célula se torne hiperpermeável tornando as bactérias mais susceptíveis a outros antimicrobianos (YADAV, 2013).

8.5 Efeito antiadesivo do revestimento no metabolismo do biofilme

Uma vez revestido com diferentes concentrações de eugenol e colocados com o inóculo para adesão inicial, os fios de sutura foram submetidos ao ensaio XTT para avaliar a atividade metabólica de células que compõem o biofilme durante 48 h de crescimento, com intervalos de 24 h.

Ficou evidenciada uma diminuição expressiva do metabolismo celular presente nos fios revestidos com eugenol. O controle bacteriano apresenta atividade metabólica progressivamente mais elevada e proporcional ao tempo de maturação estabelecido, enquanto os fios tratados com eugenol reduz a atividade com diferenças significativas (figura 18).

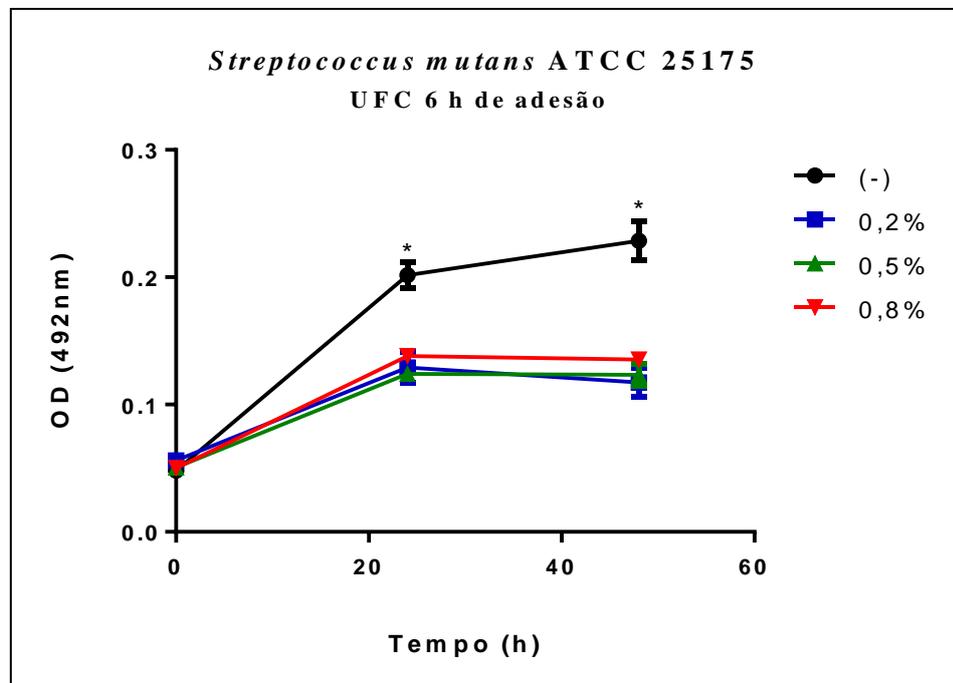


Figura 18: Efeito antiadesivo através da quantificação da atividade metabólica de *S. mutans* formada sobre a superfície de fios de sutura revestidos com eugenol em diferentes concentrações durante 48 h de desenvolvimento com intervalos de 24 h, ($p < 0,01$) (AUTOR).

As células sésseis em um biofilme diferem fisiológica e metabolicamente de suas contrapartes planctônicas e por isso expõe diferentes resistências aos antibióticos (YADAV *et al.*, 2013).

Estudos anteriores relatados na literatura por De Paula *et al* (2014) sobre a determinação da atividade do eugenol sobre *Cândida albicans* mostraram uma redução dose-dependente na atividade metabólica de biofilme formado sobre superfície de poliestireno tratada com eugenol por 48 h. De acordo com os autores na

presença de 0,05 e 0,20 % de eugenol, foram detectados redução de 50% e mais de 80%, respectivamente.

Khan & Ahmad (2012) analisaram o efeito de alguns compostos sobre a formação de biofilme de *Cândida albicans* em placas de poliestireno. Foi demonstrado que o eugenol não só inibiu sua formação, como também sua atividade metabólica, de forma dose dependente, reforçando sua capacidade de inibição metabólica não apenas bacteriana como demonstra o presente estudo, mas também fúngica.

Um fator relevante para a discussão sobre o metabolismo de *S. mutans* são as alterações nas condições ambientais que resultam em uma diminuição do pH local. Estudos realizados por Stephan na década de 1940 evidencia definitivamente a ligação entre o metabolismo bacteriano à acidificação do ambiente, podendo cair para valores de pH muito baixos em detrimento de uma atividade metabólica ativa (MATSUI & CVITKOVITCH, 2010).

Em se tratando de *S. mutans* a acidogênese é uma característica relevante desse microrganismo. Drogas antimicrobianas usadas, como a clorexidina, interferem em seu metabolismo, fato evidenciado com a manutenção do pH do meio (ELEY, 1999).

Devi *et al*, (2010) demonstrou que o eugenol atua como um agente antibacteriano contra *Salmonella typhi* por ruptura da membrana celular. Seu efeito provoca alterações nos grupos funcionais éster de lipídios e grupos ácidos das proteínas e ácidos nucleicos. Além disso, foi observado uma deformação dos fosfolípidos presentes na membrana, causando sua desintegração. Outro efeito notável no mesmo estudo acerca do eugenol é que sua atividade antibacteriana foi exibido nas taxas mais elevadas de pH. A atividade do composto aumentou gradualmente em proporção ao aumento alcalino do meio.

Dessa maneira, a adesão bacteriana é um processo de multifacetado que envolve três elementos: a bactéria, a superfície (biótica ou abiótica) e o microambiente em que se encontram (DAROUICHE, 2001; TRENTIN; GIORDNI; MACEDO, 2013).

Nesse sentido, diversas variáveis influenciam esse processo, dentre eles se destacam: o pH, tempo de exposição, filme condicionante e disponibilidade nutricional como principais fatores do microambiente. No que diz respeito à superfície: carga elétrica, hidrofobicidade, grupos funcionais químicos e textura são as principais variáveis. Em relação à bactéria: espécie e cepa, hidrofobicidade e carga elétrica, composição da superfície, adesinas, sistema QS (TRENTIN; GIORDNI; MACEDO, 2013).

Os microrganismos possuem a capacidade de dissolver por si mesmo um biofilme, uma vez que as condições ambientais em que se encontrem sejam desfavoráveis, como

mudanças de pH e privação nutricional. Para isso, eles coordenam o próprio comportamento a fim de converter-se ao estado planctônico. Deste modo, o conhecimento de moléculas, as quais estimulam o mecanismo natural de dispersão de biofilmes, auxilia a busca de compostos para a erradicação de biofilmes (MACEDO; ABRAHAM, 2009; OTTO, 2013).

Ainda se tratando do presente estudo, o resultado anterior acerca do ensaio antiadesão para análise do metabolismo de *S. mutans*, também não aponta diferenças significativas entre as concentrações de eugenol pré-estabelecidas. Isto indica que ocorre um limite na interação entre o composto e a superfície do fio, possivelmente gerado por uma questão de solubilidade ou interações físico-química não específica.

O eugenol por ter em sua estrutura um grupo fenol é levemente ácido (pka 10,19 à 25 °C) e pode ser desprotonado por solução de NaOH. Com efeito, em meio básico, o eugenol perde seu próton H^+ e o íon fenolato correspondente é solúvel em água (figura 15). Por apresentar esta propriedade era comum utilizá-la para a separação de outros constituintes orgânicos do óleo de cravo (RAHIMI; ASHNAGAR; NIKOEI, 2012).

Desta forma, a solução de eugenol interage com o fio de algodão que por sua vez encontra-se eletricamente neutro. Sua estrutura permite uma eletrização por contato (SAID, 2013) e por isso adquiriu carga elétrica ao entrar em contato com a solução de eugenol ionizada.

Porém, por se tratar de um óleo possui características lipofílicas e conseqüentemente comportamento instável em solução aquosa (ATSUMI *et al.*, 2001). Isso certamente justifica a interação limitada com o fio de algodão, já que os resultados não apontam diferenças significativas entre as concentrações testadas.

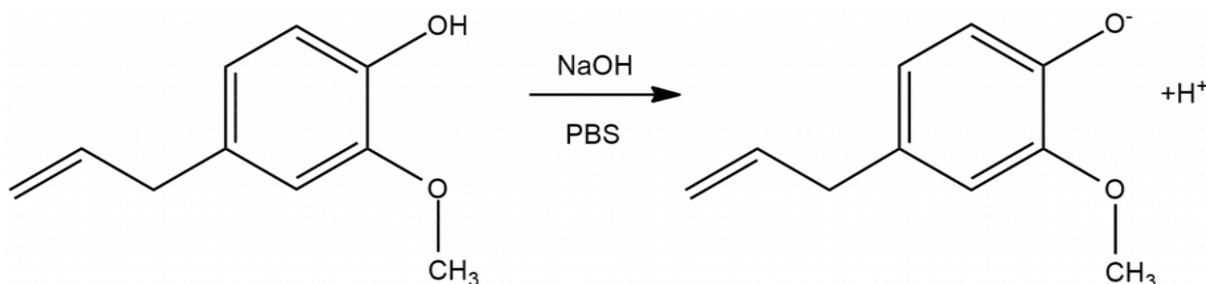


Figura 19 – Representação esquemática da desprotonação do eugenol com solução de PBS pH 12 (AUTOR).

Deste modo nossos resultados comprovam a atividade antibiofilme, por reduzir a viabilidade, a biomassa e o metabolismo de células aderidas a um biomaterial.

Um revestimento na superfície com um composto bioativo tornou o biofilme mais susceptível, trazendo perspectivas de uma provável solução contribuindo para o bloqueio de resistência a antimicrobianos.

Portanto, podemos dizer que o eugenol exibe efeitos promissores contra *S. mutans* destacando suas propriedades antiaderência e antibiofilme, dando-nos um conceito sobre o modo pelo qual expressa sua propriedade de ação, prevenindo doenças e infecções orais.

9. Conclusão

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, o eugenol representa um importante agente biotecnológico no que se refere ao favorecimento das atividades antimicrobiana, antibiofilme e antiadesiva. Dada sua aplicabilidade, pode ser útil integrado ao fio de sutura de algodão via revestimento de superfície para minimizar ou evitar infecções bacterianas associadas a sítio cirúrgico.

REFERÊNCIAS

AAS, J. A.; PASTER, B. J.; STOKES, L. N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. **J. Clin. Microbiol.** 43:5721–5732. 2005.

ADIL, M. et al., Eugenol-induced suppression of biofilm-forming genes in *Streptococcus mutans*: an approach to inhibit biofilms. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, n. 4, p. 286-292, 2014.

AFFONSO, R. da S. et al. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Rev Virtual Quim**, v. 4, n. 2, p. 146-161, 2012.

ALENCAR, L. F. A ação de extratos de plantas regionais de coari-amazonas no combate de gengivites. 2014.

ALEXANDER, J. W.; KAPLAN, J. Z.; ALTEMEIER, W. A. Role of suture materials in the development of wound infection. **Annals of surgery**, v. 165, n. 2, p. 192, 1967.

ALEXANDER, J. W.; SOLOMKIN, J. S.; EDWARDS, M. J. Updated recommendations for control of surgical site infections. **Annals of surgery**, v. 253, n. 6, p. 1082-1093, 2011.

ALLWOOD, A. C. et al., Stromatolite reef from the Early Archaean era of Australia. **Nature**, v. 441, n. 7094, p. 714-718, 2006.

ALLWOOD, J. M. et al., Well Dressed? The Present and Future Sustainability of Clothing and Textiles in the United Kingdom (Cambridge, UK: University of Cambridge Institute for Manufacturing), 2011.

ALMEIDA, M. A. Efeitos do eugenol sobre o músculo liso traqueal de cobaio. Fortaleza, 2004. 127p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará.

ANTONIO, A. G. et al., Inhibitory properties of *Coffea canephora* extract against oral bacteria and its effect on demineralisation of deciduous teeth. **Archives of oral biology**, v. 56, n. 6, p. 556-564, 2011.

ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; SPEZIALE, P.; MONTANARO, L.; COSTERTON, J. W. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**; v.33, n.26, p. 5967-5982, 2012.

ATSUMI, T.; IWAKURAB, I.; FUJISAWAC, S.; UEHA, T. Reactive oxygen species generation and photo-cytotoxicity of eugenol in solutions of various pH. **Biomaterials** 22, 1459–1466. 2001.

AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. (Org.). **Biofilmes**: Na Saúde, no Ambiente, na Indústria. Braga/Porto: Publindústria, cap. 24, p. 254-256, 2012.

- BALLINI, M. B. **Estudo de fatores de virulência de *Streptococcus mutans* e componentes da saliva na susceptibilidade à cárie em crianças**. 2011. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de São Francisco, Bragança Paulista, 2011.
- BANAS, J. A.; VICKERMAN, M. M. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. **Crit Rev Oral Biol Med**14, 89–99. 2003.
- BANAS, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Front. Biosci**; 9:1267–1277. [PubMed: 14977543]. 2004.
- BASTOS, R. M.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; ARRUDA, F. V. S.; TEIXEIRA, E. H. Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos isolados da planta *Mitracarpus Baturitensis* frente à *Streptococcus mutans*. Universidade Federal do Ceará, 2013.
- BATONI, G. et al., Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 2, p. 256-279, 2011.
- BAZAKA, K.; JACOB, M. V.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Plasma-assisted surface modification of organic biopolymers to prevent bacterial attachment. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 2015-2028, 2011.
- BELLI, W. A.; MARQUIS, R. E. Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. **Appl. Environ. Microbiol** 1991;57(4):1134–1138. [PubMed: 1829347]
- BENDAOUD, M. et al., Broad-spectrum biofilm inhibition by *Kingella kingae* exopolysaccharide. **Journal of bacteriology**, v. 193, n. 15, p. 3879-3886, 2011.
- BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 409-414, 2007.
- BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries research**, v. 45, n. 1, p. 69-86, 2011.
- BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. 2010.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- BUSSCHER, H. J. et al., Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface. **Sci Transl Med**; v.4, n.153, p. 1-10, 2012.
- CABOT, G.; ZAMORANO, L.; MOYÀ, B.; JUAN, C.; NAVAS, A.; BLÁZQUEZ, J.; OLIVER, A. Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Antimicrobial Resistance and Fitness under Low and High Mutation Rates. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.60, n.3, p.1767-78, 2016.

- CARNEIRO, F. M. et al. Tendências dos estudos com Plantas Medicinais no Brasil. **Rev Sapiê: Soc Sab Prát Educ**, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.
- CASTILHO, A. R.; MURATA, R. M.; PARDI, V. Produtos Naturais em Odontologia. **Revista Saúde**, v. 1, n. 1, p. 11-19, 2007.
- CAUFIELD, P. W.; CUTTER, G. R.; DASANAYAKE, A. P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. **J. Dent. Res** 1993;72:37–45. [PubMed: 8418105]
- CECHINEL, F. V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/Univali. **Quim. Nova**, v. 23, n. 5, p. 680-685, 2000.
- CHEN, L.; WEN, Y. M. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. **International journal of oral science**, v. 3, n. 2, p. 66-73, apr. 2011.
- CHEN, X. et al. Antibacterial surgical silk sutures using a high-performance slow-release carrier coating system. **ACS applied materials & interfaces**, v. 7, n. 40, p. 22394-22403, 2015.
- CLATWORTHY, A. E.; PIERSON, E.; HUNG, D. T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. **Nature Chemical Biology**, v. 3, p. 541–548, 2007.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-Fifth Informational Supplement. Document M100-S25. Wayne, PA: CLSI, 35, (3), 2015.
- COPITCH, J. L.; WHITEHE, A. D.; REBEKAH, N.; WEBBER, M. A. Prevalence of decreased susceptibility to triclosan in *Salmonella enterica* isolates from animals and humans and association with multiple drug resistance. **International journal of antimicrobial agents**, v. 36, n. 3, p. 247-251, 2010.
- COSTA, F. et al. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 1431-1440, 2011.
- CRAVEIRO, A. A. et al. Essential oils from Brazilian Verbenaceae. Genus *Lippia*. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 5, p. 598-601, 1981.
- CRUZ, G. M. P. **Efeito do eugenol e do metil-eugenol sobre o potencial composto do nervo ciático do rato**, Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Ceará, 2001.
- CULLER, H. F. et al. Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains form Biofilm on Abiotic Surfaces Regardless of Their Adherence Pattern on Cultured Epithelial Cells. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
- CUNHA, F. A. B. Avaliação antibacteriana de extratos etanólicos e metanólicos de *Costus cf. arabicus* L – Crato, 2010.
- CUNHA, A. P. et al., *Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais Composição e Aplicações*, Lisboa. 2012.

CZELUSNIAK, K. E. et al., Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.

DAROUCHE, R. Device-associated infections: a macroproblem that starts with a microadherence. **Clinical Infectious Disease**, v. 33, p. 1567-1572, 2001.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 114-122, 2003.

DAVIES, D. G. *et al.*, The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, p. 295-298, 1998.

DE PAULA, S. B. et al., Effect of eugenol on cell surface hydrophobicity, adhesion, and biofilm of *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis* isolated from oral cavity of HIV-infected patients. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

DEVI, K. P. et al., Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107-115, 2010.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DUARTE, H. S. **Potencial antifouling da associação entre o peptídeo Lys-a1 e ciprofloxacina**. 2016. 64 páginas. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Ceará, Sobral, CE. 2016.

DUNNE, J. R. W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 155-166, 2002.

EDMISTON, C. E. et al., Bacterial adherence to surgical sutures: can antibacterial-coated sutures reduce the risk of microbial contamination?. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 203, n. 4, p. 481-489, 2006.

EKE, P. I. et al., Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. **Journal of dental research**, v. 91, n. 10, p. 914-920, 2012.

ELEY, B. M. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque – a review. **Brit. Dent. Journ**, v.186, p.286-296, 1999.

ESCOBAR, R. G. Eugenol: Propriedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 39, 2002.

FÃO, F. et al., Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Müll. Arg), no Estado de Rondônia, Amazônia Ocidental. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 1, 2012.

FLEMMING, H. C.; NEU, T. R.; WOZNIAC, D. J. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 7945-7947, 2007.

- FU, Y. et al., Antimicrobial Activity of Clove and Rosemary Essential Oils Alone and in Combination. **Phytotherapy Research**, 21, pp.989-994. 2007.
- FUX, C. A. et al., Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 1, n. 4, p. 667-683, 2003.
- GIBBONS, R. J. Role of adhesion in microbial colonization of host tissues: a contribution of oral microbiology. **J Dent Res** 75, 866–870. 1996.
- GODDARD, J.; HOTCHKISS, J. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 698-725, 2007.
- GOMEZ-ALONSO, A. et al., Study of the efficacy of Coated VICRYL Plus® Antibacterial suture (coated Polyglactin 910 suture with Triclosan) in two animal models of general surgery. **Journal of Infection**, v. 54, n. 1, p. 82-88, 2007.
- GONÇALVES, J. M. et al., Atividades biológicas e composição química dos óleos essenciais de *Achyrocline satureoides* (Lam) DC. e *Ageratum conyzoides* L. encontradas no semiárido baiano. 2015.
- GOTTENBOS, B. et al., Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v. 13, p. 717-722, 2002.
- GRISTINA, A. G. et al., Bacterial colonization of percutaneous sutures. **Surgery**, v. 98, n. 1, p. 12-19, 1985.
- GUENETTE, S. A. et al., Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague–Dawley rats. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 29, p. 265–270, 2006.
- GUIMARÃES, D. O; MOMESSO, L. S; PUPPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**. 33: 667-679. 2010.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial Biofilms: from the Natural Environment to Infectious Diseases. **Nature Reviews/Microbiology**, v.2, p.95-108, 2004.
- HAMILTON, I. R.; BUCKLEY, N. D. Adaptation by *Streptococcus mutans* to acid tolerance. **Oral Microbiol. Immunol**; 6:65–71. [PubMed: 1658715]. 1991.
- HANNIG, C.; RUGGERI, A.; AL-KHAYER, B.; SCHMITZ, P.; SPITZMÜLLER, B.; DEIMLING, D.; HUBER, K.; HOTH-HANNIG, W. et al., Electron microscopic detection and activity of glycosyltransferase B, C, and D in the in situ formed pellicle. **Arch Oral Biol**. 53, 1003–1010. 2008.
- HE, M. et al., In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia**, v. 163, n. 3, p. 137-143, 2007.

- HENKEL, T. et al., Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 5, p. 643-647, 1999.
- HERRMANN, M. et al., Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. **The Journal of Infectious Disease**, v. 158, p. 693-701, 1988.
- HODGKINSON, J. T.; WELCH, M.; SPRING, D. R. Learning the language of bacteria. **ACS Chemical Biology**, v. 2, p. 715-717, 2007.
- HUNTER, R. C. AND BEVERIDGE, T. J. Application of a pH-sensitive fluoroprobe (C-SNARF-4) for pH microenvironment analysis in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Appl Environ Microbiol.** 71, 2501–2510. 2005.
- JENKINSON, H. F.; LAMONT, R. J. Oral microbial communities in sickness and in health. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 12, p. 589-595, 2005.
- JENSEN, M. E.; WEFEL, J. S. Human plaque pH responses to meals and the effects of chewing gum. *Br. Dent. J.*;167:204–208. [PubMed: 2789898]. 1989.
- JENSEN, M. E.; POLANSKY, P. J.; SCHACHTELE, C. F. Plaque sampling and telemetry for monitoring acid production on human buccal tooth surfaces. **Arch. Oral Biol.** 27:21–31. [PubMed: 6951525]. 1982.
- JIROVETZ, L. et al., Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 54, p. 6303–6307, 2006.
- JOHNSON, L. R. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. **J Theor Biol.** 251, 24–34. 2008.
- JOO, H. S.; OTTO, M. Molecular basis of *in vivo* biofilm formation by bacterial pathogens. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 12, p. 1503-1513, dec. 2012.
- KATHJU, S.; NISTICO, L.; HALL-STOODLEY, L. et al., Chronic surgical site infection due to suture-associated polymicrobial biofilm. **Surg Infect (Larchmt)**. 10(5):457-461. 2009.
- KATZ, S.; IZHAR, M.; MIRELMAN, D. Bacterial adherence to surgical sutures. A possible factor in suture induced infection. **Annals of surgery**, v. 194, n. 1, p. 35, 1981.
- KHAN, M. S.; AHMAD, I. “Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms,” **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 67, no. 3, Article ID dkr512, pp. 618–621, 2012.
- KIM, H. M. et al., Antianaphylactic properties of eugenol. **Pharmacological research**, v. 36, n. 6, p. 475-480, 1997.
- KOEDUKA, T. et al., Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. **PNAS**, v. 103, n. 26, p. 10128–10133, 2006.

- KOLENBRANDER, P. E.; WILLIAMS, B. L. Prevalence of viridans streptococci exhibiting lactose-inhibitable coaggregation with oral actinomycetes. **Infection and immunity**, v. 41, n. 2, p. 449-452, 1983.
- KRETH, J.; ZHU, L.; MERRITT, J.; SHI, W.; QI, F. Role of sucrose in the fitness of *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiol Immunol.** 23, 213–219. 2008.
- LARSEN, T.; FIEHN, N. E. Dental biofilm infections—an update. **APMIS**, v. 125, n. 4, p. 376-384, 2017.
- LAWRENCE, J. R.; SWERHONE, G. D.; KUHLCHE, U.; NEU, T. R. In situ evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies. **Can J Microbiol.** 53,450–458. 2007.
- LEAPER, D. et al., Healthcare associated infection: novel strategies and antimicrobial implants to prevent surgical site infection. **The Annals of The Royal College of Surgeons of England**, v. 92, n. 6, p. 453-458, 2010.
- LEITE, L. H. I. et al., Composição química e estudo da atividade antibacteriana de *Bowdichia virgilioides* Kunth (Sucupira)—Fabaceae—Papilionoidae. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 5, 2014.
- LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrob Agents Chemother.** 45, 999–1007. 2001.
- LEWIS, K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** v.322, p.107–131, 2008.
- LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. **Nat. Rev. Microbiol.** 6: 776–788. 2008.
- LI, M. Y. et al., The inhibition of eugenol on glucan is essential for the biofilm eradication effect on caries-related biofilm in an artificial mouth model. **Natural product research**, v. 26, n. 12, p. 1152-1155, 2012.
- LIEDKE, E. D.; SANTOS, J. O. S.; CARVALHO, M. S. Fios de sutura e presença de placa microbiana. **Rev Gaúcha Odontol**, v. 23, n. 2, p. 105-06, abr./jun. 1975.
- LILLY, G. E. Reaction of oral tissues to suture materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 26, n. 1, p. 128-133, July 1968.
- LYNCH, A. S.; ROBERTSON, G. T. Bacterial and fungal biofilm infections. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 415-428, 2008.
- LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol. Rev**;50:353–380. [PubMed: 3540569] Historical review describing in detail the prevalence of caries on specific surfaces on the tooth and the etiology of caries formation. 1986.

LORENZO, D.; GONZALEZ, G.; ROSSINI, C. Farmacognosia y Productos Naturales. Contenido del curso teórico, Apostila 04: Aceites Esenciales. Universidad de la Republica do Uruguay. Montevideo, p. 14-18. 2002.

LYNCH, A. S.; ROBERTSON, G. T. Bacterial and Fungal Biofilm Infections. *Annu. Rev. Med.*, v. 59: p. 415–28, 2008.

MACEDO, A. J.; ABRAHAM, W. R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 517-528, 2009.

MACIEL, M. A. M. et al., Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACHADO, A.; SALGUEIRO, D.; HARWICH, M.; JEFFERSON, K. K.; CERCA, N. Quantitative analysis of initial adhesion of bacterial vaginosis-associated anaerobes to ME-180 cells. **Anaerobe**, v. 23, p. 1-4, 2013.

MADEIRA, S. V. F. et al., Temporal variation of chemical composition and relaxant action of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) on guinea-pig ileum. **Phytomed.**, v. 12, p.506-509, 2005.

MALHEIROS, S. G. L. et al., Estudo farmacobotânico de seis espécies de uso medicinal no nordeste brasileiro. 2012.

MARCOS-ARIAS, C. et al., In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, n. 1, p. 119, 2011.

MARKS, L. R.; PARAMESWARAN, G. I.; HAKANSSON, A. P. Pneumococcal interactions with epithelial cells are crucial for optimal biofilm formation and colonization in vitro and in vivo. **Infect Immun.** 80:2744–60. 2012.

MARQUIS, R. E.; CLOCK, S. A.; MOTA-MEIRA, M. Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology FEMS. **Microbial Rev.**26:493-510. 2003.

MARSH, P.; MOTER, A.; DEVINE, DEIRDRE, A. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. **Periodontology 2000**, v. 55, n. 1, p. 16-35, 2011.

MARSH, P.; MARTIN, M. V. **Microbiologia Oral**. 4. ed. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2005.

MASSI, L.; CERRUTTI, B. M.; QUEIROZ, S. L. Metodologia de ensino jigsaw em disciplina de química medicinal. **Quim. Nova**, v. 36, n. 6, p. 897-904, 2013.

MATL, F. D. et al., New anti-infective coatings of surgical sutures based on a combination of antiseptics and fatty acids. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 20, n. 10, p. 1439-1449, 2009.

MATSUI, R.; CVITKOVITCH, D. Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. **Future microbiology**, v. 5, n. 3, p. 403-417, 2010.

MELDAU, D. C. Suturas, infoescola, <http://www.infoescola.com/medicina/suturas/> 2014.

MEGHIL, M. M. et al., Novel coating of surgical suture confers antimicrobial activity against *Porphyromonas gingivalis* and *Enterococcus faecalis*. **Journal of periodontology**, v. 86, n. 6, p. 788-794, 2015.

MING, X.; ROTHENBURGER, S.; YANG, D. In vitro antibacterial efficacy of MONOCRYL plus antibacterial suture (Poliglecaprone 25 with triclosan). **Surgical infections**, v. 8, n. 2, p. 201-208, 2007.

MINGMALAIRAK, C. Antimicrobial sutures: New strategy in surgical site infections. **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances: Formatex Research Center**, p. 313-23, 2011.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MOON, S. E.; KIM, H. Y.; CHA, J. D. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. **Archives of oral biology**, v. 56, n. 9, p. 907-916, 2011.

MORRISON, R.; BOYD, R. Organic Chemistry. Allyn and Bacon, **Inc., Boston**, 1961.

MOURA, I. R.; RABELLO, T. B.; PEREIRA, K. F. A influência do eugenol nos procedimentos adesivos. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 70, n. 1, p. 28-32, 2013.

NAGABABU, E; LAKSHMAIAH, N. Inhibition of microsomal lipid peroxidation and monooxygenase activities by eugenol. *Free Radical Research*, v. 20, p. 235–266, 1994.

NAKANO, K.; OOSHIMA, T. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. **Future Microbiology**, London, v.4, n.7, p. 891-902, set. 2009.

NAVEED, R., et al. Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria. **Complementary and Alternative Medicine**, 13, pp.1-10. 2013.

NEIDELL, M. J. et al., Costs of healthcare-and community-associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible organisms. **Clinical Infectious Disease**, v. 55, p. 807-815, 2012.

NETO, O. C. C. et al., Oral bacteria adherence to suture threads: An in vitro study. **Oral and maxillofacial surgery**, v. 19, n. 3, p. 275-280, 2015.

NETT, J. et al., Putative role of β -1, 3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 510-520, 2007.

- NOGUEIRA, et al., *Streptococcus mutans* relação cárie e endocardite utilizando métodos moleculares avançados de indentificação. **Journal of Medicine and Health Promotion**. 2016.
- OBERMEIER, A. et al., In vitro evaluation of novel antimicrobial coatings for surgical sutures using octenidine. **BMC microbiology**, v. 15, n. 1, p. 186, 2015.
- OKUDA, T.; OKUDA, K.; KOKUBU, E.; KAWANA, T.; SAITO, A.; ISHIHARA, K.. Synergistic effect on biofilm formationa between *Fusobacterium nucleatum* and *Capnocytophaga ochracea*. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 157-161, fev. 2012.
- OLIVEIRA, E. A. **Atividade antimicrobiana “in vitro” do decocto de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (Asteraceae) frente à cepa de referência de interesse em medicina veterinária – *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- OLIVEIRA, S. T. **Uso do peptídeo sintético Lys-a1 no favorecimento da atividade antimicrobiana de ciprofloxacina contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027**. 2014. 89 páginas. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Ceará, Sobral, CE. 2014.
- OTTO, M. Staphylococcal infections: mecha-nisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annual Review of Medicine**, v. 64, p. 175- 188, 2013.
- O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, p. 295-304, 1998.
- PAVITHRA, D.; DOBLE, M. Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants-issues and prevention. **Biomedical Materials**, v. 3, p. 1-13, 2008.
- PELZ, K.; TODTMANN, N.; OTTEN, J. E. Comparison of antibacterial-coated and non-coated suture material in intraoral surgery by isolation of adherent bacteria. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 22, n. 3, 2015.
- PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, p. 1-10. 2004.
- PETHILE, S. et al., Effect of changing coating process parameters in the preparation of antimicrobial-coated silk sutures: An in vitro study. **Fibers and Polymers**, v. 15, n. 8, p. 1589-1595, 2014.
- PETROVA, O. E.; SAUER, K. Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 10, p. 2413-2425, 2012.
- PONCIN-EPAILLARD, F. A. L. G.; LEGEAY, G. Surface engineering of biomaterials with plasma techniques. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 14, n. 10, p. 1005-1028, 2003.

PRIMO, M. G.; GUILARDE, A. O.; MARTELLI, C. M.; BATISTA, L. J.; TURCHI, M. D. Healthcare-associated *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: length of stay, attributable mortality, and additional direct costs. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 16, p. 503-509, 2012.

RAHIMI, A. A.; ASHNAGAR, A.; NIKOEI, H. Isolation and characterization of 4-allyl-2-methoxyphenol (eugenol) from clove buds marketed in Tehran city of Iran. **International Journal Of ChemTech Research**. 4(1):105-108. 2012.

RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p. 117-128, 2010.

RIBEIRO, M. A.; MIRANDA, A. E.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. Prevalence and exoenzymes secretion by *Candida albicans* isolates from oral and vaginal mucosae of HIV infected women. **Mycopathol**. 157: 255-261. 2004.

RICKARD, A. H.; PALMER JR, R. J.; BLEHERT, D. S.; CAMPAGNA, S. R.; SEMMELHACK, M. F.; EGLAND, P. G.; BASSLER, B. L.; KOLENBRANDER, P. E. Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1446-1456, June 2006.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Farmacognosia e farmacobiocologia. 1. ed. em Português. **Editorial Premier**. 372 p. 1997.

ROCHFORD, E. T.; RICHARDS, R. G.; MORIARTY, T. F. Influence of material on the development of device-associated infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 1162-1167, 2012.

RODRIGUES, T. G. et al., M. In vitro and in vivo effects of clove on pro-inflammatory cytokines production by macrophages. **Natural product research**, v. 23, p. 319-326, 2009.

RODRIGUES, J. Eugenol – Molécula da Semana.

<http://www.fcencias.com/2014/02/06/eugenol-molecula-da-semana>, 2014.

ROTHENBURGER, S. et al., In vitro antimicrobial evaluation of Coated VICRYL* Plus Antibacterial Suture (coated polyglactin 910 with triclosan) using zone of inhibition assays. **Surgical Infections**, v. 3, n. S1, p. s79-s87, 2002.

RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. **Cold Spring Harbor**. 2012.

SAID, V.; CANABRAVA, V.; HENRIQUE, T., Relatório: Fenômenos e atuação eletrostática. **Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia**, 2013.

SANABE, M. E.; GIORGETTI, A. P. O.; CRUZ, A. R. et al., Influência da contaminação da dentina por cimentos temporários na resistência da união de sistemas adesivos. **RGO**; 57 (1): 33-9. 2009.

SANGWAN, N. S. et al., Regulation of essential oil production in plants. **Plant growth regulation**, v. 34, n. 1, p. 3-21, 2001.

SCHILLING, K. M.; BOWEN, W. H. The activity of glucosyltransferase adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. *J Dent Res* 67, 2–8. 1988.

SEAL, L. A.; PAUL-CHEADLE, D. A systems approach to preoperative surgical patient skin preparation. *American journal of infection control*, v. 32, n. 2, p. 57-62, 2004.

SENANAYAKE, U. M; WILLS, B. H; LEE, T. H. Biosynthesis of eugenol and cinnamic aldehyde in *Cinnamomum zeylanicum*. *Phytoch.*, v.16, p-2032-2033, 1977.

SILVA, R. C. Plantas Medicinais na Saúde Bucal. Vitória: Artgraf; 2001.

SILVA, L. O.; SOUZA, J. P. A.; CRESPIAN, E. R.; ROMERO, R. B.; ROMERO, A. L. **Avaliação de fenilpropanóides naturais frente a enzimas HIV-1 protease e HIV-1 integrase: um estudo utilizando ferramentas de quimioinformática.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2014.

SIMÕES, C. M. O. et al., **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento.** Artmed Editora, 2016.

SOARES, U. N.; ITO, I. Y.; DA ROCHA, B. V. M. Efeito da anti-sepsia da ferida cirúrgica alveolar sobre o crescimento bacteriano em fios de sutura de algodão Effect of the antiseptis of the alveolar surgical wound on bacterial growth over cotton suture threads. *Pesqui Odontol Bras*, v. 15, n. 1, p. 41-46, 2001.

SPOLIDORIO, D. M. P.; DUQUE, C. **Microbiologia e imunologia geral e odontológica.** São Paulo: Artes Médicas, 144p. v. 1. (Série Abeno: Odontologia Essencial - Parte Básica). 2013.

STOODLEY, P. et al., Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, v. 56, p. 187-209, 2002.

SUN, F.; QU, F.; LING, Y.; MAO, P.; XIA, P.; CHEN, H.; ZHOU, D. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. *Future microbiology*, v. 8, n. 7, p. 877-886, July 2013.

SVENSATER, G.; LARSSON, U. B.; GREIF, E. C.; CVITKOVITCH, D. G.; HAMILTON, I. R. Acid tolerance response and survival by oral bacteria. *Oral Microbiol. Immunol*;12:266–273. [PubMed: 9467379] 1997.

SVENSÄTER, G. et al., Acid tolerance response and survival by oral bacteria. *Molecular Oral Microbiology*, v. 12, n. 5, p. 266-273, 1997.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 10ª ed. Artmed, 2010.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato*, Novo Hamburgo, v.14 n.22, p.113-238, 2013.

TRETER et al., Washing-resistant surfactant coated surface is able to inhibit pathogenic bacteria adhesion. *Applied Surface Science*, v.303, p.147–154, 2014.

- UFF, C. R. et al., Influence of soluble suture factors on in vitro macrophage function. **Biomaterials**, v. 16, n. 5, p. 355-360, 1995.
- USTA, J. et al., In vitro effect of eugenol and cinnamaldehyde on membrane potential and respiratory chain complexes in isolated rat liver mitochondria. **Food and Chemical Toxic.**, v. 40, p.935-940, 2002.
- VACCA-SMITH, A. M.; BOWEN, W. H. Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. **Arch Oral Biol.** 43, 103–110. 1998.
- VENEMA, S.; ABBAS, F.; VAN, B. G. E.; DER, M. V.; BUSSCHER, H.; HOOGMOED, C. In vitro oral biofilm formation on triclosancoated sutures in the absence and presence of additional antiplaque treatment. **J Oral Maxillofac Surg** 69:980–985. 2011.
- VENKITARAMAN, A. R.; VACCA-SMITH, A. M.; KOPEC, L. K.; BOWEN, W. H. Characterization of glucosyltransferaseB, GtfC, and GtfD in solution and on the surface of hydroxyapatite. **J Dent Res.** 74, 1695–1701. 1995.
- VON EIFF, C. et al., Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. **Drugs**, v. 65, p. 179- 214, 2005.
- WANG, Z. X. et al., Systematic review and meta-analysis of triclosan-coated sutures for the prevention of surgical-site infection. **British Journal of Surgery**, v. 100, n. 4, p. 465-473, 2013.
- WARGO, M. J.; HOGAN, D. A. Fungal—bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 4, p. 359-364, 2006.
- WEI, G. X.; CAMPAGNA, A. N.; BOBEK, L. A. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 1100-1109, 2006.
- WRIGHT, S. E.; BARON, D. A.; HEFFNER, J. E. Intravenous eugenol causes hemorrhagic lung edema in rats: proposed oxidant mechanisms. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 125, n. 2, p. 257-264, 1995.
- WU, B. N.; HWANG, T. L.; LIAO, C. F.; CHEN, M. I. J. Vanimolol: a new selective beta B-adrenergic antagonist derived from vanillin. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, p. 101-109, 1994.
- XIAO, J.; KOO, H. Structural organization and dynamics of exopolysaccharide matrix and microcolonies formation by *Streptococcus mutans* in biofilms. **Journal of applied microbiology**, v. 108, n. 6, p. 2103-2113, 2010.
- YADAV, M. K. et al., Antimicrobial activities of *Eugenia caryophyllata* extract and its major chemical constituent eugenol against *Streptococcus pneumoniae*. **Apmis**, v. 121, n. 12, p. 1198-1206, 2013.

YAMADA-OGATTA, S. F.; NAKAZATO, G.; FURLANETO, M. C.; NOGUEIRA, M. A. Tópicos Especiais em Microbiologia. Livro Eletrônico: Universidade Estadual de Londrina, 1ed., pg. 45-70, 2015.

YAZDANKHAH, S. P. et al., Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview. **Microbial drug resistance**, v. 12, n. 2, p. 83-90, 2006.

YOGALAKSHMI, B.; VISWANATHAN, P.; ANURADHA, C. V. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. **Toxicology**, v. 268, n. 3, p. 204-212, 2010.

ZIMMER, A. et al., QTL dissection of lag phase in wine fermentation reveals a new translocation responsible for *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to sulfite. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86298, 2014.

ZIMMER, K. R; MACEDO, A. J; NICASTRO, G. G; BALDINI, R. L; TERMIGNONI, C. Egg wax from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.4, p.366– 376, 2013.