



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

**ÉRICA DE MENEZES RABELO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO ETANÓLICO  
E FRAÇÕES OBTIDAS DE *Guettarda sericea* Müll. Arg. (RUBIACEAE)**

**SOBRAL**

**2013**

RABELO      AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO ETANÓLICO  
E FRAÇÕES OBTIDAS DE *Guettarda sericea* Müll. Arg. (RUBIACEAE)

2013

ÉRICA DE MENEZES RABELO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO ETANÓLICO  
E FRAÇÕES OBTIDAS DE *Guettarda sericea* Müll. Arg. (RUBIACEAE)**

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. Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.  
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Rose Jane R. Albuquerque.

SOBRAL

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Faculdade de Medicina – *Campus* de Sobral

- 
- R114a Rabelo, Érica de Menezes.  
Avaliação do potencial antimicrobiano do extrato etanólico e frações obtidas de *Guettarda sericea* Müll. Arg. (Rubiaceae). / Érica de Menezes Rabelo. – 2013.  
83 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2013.  
Área de Concentração: Biotecnologia e microbiologia.  
Orientação: Prof. Dr. Edson de Holanda Teixeira.  
Coorientação: Profa. Dra. Maria Rose Jane R. Albuquerque.

1. *Streptococcus oralis*. 2. Rubiaceae. I. Título.

ÉRICA DE MENEZES RABELO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO ETANÓLICO E  
FRAÇÕES OBTIDAS DE *Guettarda sericea* Müll. Arg. (RUBIACEAE)

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. Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.  
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Rose Jane R. Albuquerque.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Francisco Vassiliepe Sousa Arruda  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Maria Rose Jane R. Albuquerque (coorientadora)  
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Dedico este trabalho aos meus alicerces: Deus e minha mãe Marlibia.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por tudo o que tem feito e por tudo o que ainda vai fazer.

À minha mãe Marlibia, minha tia Edrildice, minha avó Euridice e minha irmã Iasmim por serem a base da minha vida, minha inspiração, minha fonte de otimismo e principalmente por não me deixarem perder a fé e nem esquecer os meus sonhos.

À minha sobrinha Luana por revigorar minhas forças, através do seu sorriso contagiante.

Ao meu pai, Francisco, pois sei que no seu íntimo ele acredita no meu potencial e tem conhecimento que toda minha dedicação terá bons frutos.

Aos meus tios Evandro e Glaudmar, que mesmo à distância não me desampararam e acreditaram em mim.

Ao Ricardo pelo carinho, paciência e preocupação ao longo deste mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira, por me servir de exemplo pela competência e sabedoria. Por nunca medir esforços para me ajudar desde a graduação e por todos os ensinamentos que me fizeram evoluir cientificamente e pessoalmente. Mas, principalmente, por acreditar em mim e na minha capacidade; confiando a mim desafios, que com sua ajuda consegui superá-los com êxito.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Maria Rose Jane R. Albuquerque por toda a colaboração e auxílio dada desde o início da realização deste trabalho.

Ao Dr. Francisco Vassiliepe Sousa Arruda pela oportunidade do aprendizado constante, através da sua participação e orientação, vivenciada desde minha iniciação científica e que com certeza perpetuará até o fim da minha carreira acadêmica.

Ao Dr. Victor Alves Carneiro pela paciência, pelo agradável convívio e pelo conhecimento compartilhado.

Ao Willian e a Andreza pela dedicação e ajuda na parte química, através das infinitas tentativas de fracionamento e isolamento dos compostos.

Ao Mayron, a Suzete e Verônica pela ajuda e apoio durante meus experimentos em Fortaleza.

As mestrandas, amigas e irmãs de coração, Ariana Azevedo, Idia Nara Veras e Simone Torres por tudo, sem a ajuda de vocês este projeto não seria concretizado a tempo. Meu Deus colocou amigos fiéis ao meu lado, que com muito mais do que palavras, me apoiaram, me ergueram e me deram forças transformando o insurportável em tolerável.

Aos amigos Luiz Gonzaga Nascimento Neto e Bruno Rocha da Silva pelo apoio, pelas conversas e por estarem sempre disponíveis quando necessitei, sanando dúvidas ou ajudando em experimentos, os quais eu não dispunha dos conhecimentos necessários a sua realização.

As alunas de Iniciação Científica e futuras mestras, Humberlânia, Wanderleia e Marianne, pelo auxílio, pela alegria e momentos partilhados, sejam eles tristes ou alegres e, especialmente pela amizade.

Ao Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS) por toda a estrutura e suporte disponibilizados, em particular ao Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS) e todos os seus integrantes pelo convívio.

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, por terem me fornecido condições acadêmicas indispensáveis à execução deste trabalho, em especial a coordenação da Pós-graduação e a Edilda.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FUNCAP pelo suporte financeiro a este projeto, tanto na forma de bolsa auxílio, como na aquisição de equipamentos e materiais necessários à sua conclusão.



“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”

*(Eleanor Roosevelt)*

## RESUMO

O gênero *Guettarda* (Rubiaceae) compreende plantas extensamente distribuídas em áreas tropicais. Com relação à espécie *Guettarda sericea*, a literatura demonstra que existe uma ampla carência acerca de estudos botânicos e fitoquímicos. Assim, o presente trabalho buscou avaliar o efeito antibacteriano do extrato etanólico das folhas de *G. sericea* (EEFGS) e suas frações sobre o crescimento de *Streptococcus oralis* ATCC 10557 e *S. salivarius* ATCC 7073, nas formas planctônicas e de biofilmes. Diferentes metodologias foram empregadas para a verificação do potencial antimicrobiano. Dentre estas estão a determinação da concentração inibitória mínima (MIC), a determinação da curva de morte e a avaliação da concentração bactericida mínima (MBC). Além disso, a quantificação da biomassa e do número de células viáveis do biofilme foi realizada, respectivamente, através da coloração pelo cristal violeta e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Os controles, negativo e positivo utilizados em todos os ensaios foram, respectivamente, DMSO 4% e Gluconato de Clorexidina com concentração ajustada de acordo com os dados da CIM de cada micro-organismo. Para a determinação da toxicidade do EEFGS utilizou-se o ensaio de toxicidade sobre náuplios de *Artemia*. Os dados mostraram que o extrato e as subfrações 13 a 17 da fração clorofórmio apresentaram um marcante efeito antimicrobiano, sendo capazes de inibir o crescimento planctônico, bem como o desenvolvimento de biofilmes da cepa de *S. oralis* até a concentração de 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Com relação a *S. salivarius*, apenas a subfração 12 interferiu sobre o crescimento bacteriano. No tocante à toxicidade, foi observado que a morte dos náuplios de *Artemia* ocorreu em concentrações mais elevadas do que aquelas que apresentaram efeito antibacteriano. A partir de tais resultados pode-se concluir que EEFGS e as subfrações 13 a 17 podem ser utilizados como insumos para o controle da formação de biofilmes de *S. oralis*. Em adição, metodologias complementares que busquem a purificação dos compostos ativos e seus efeitos citotóxicos sobre células eucarióticas necessitam ser realizadas, visando sua utilização como um agente fitoterápico.

**Palavras-chave:** Biofilme. *Streptococcus oralis*. *Streptococcus salivarius*. Efeito antibacteriano. *Guettarda sericea*.

## ABSTRACT

The genus *Guettarda* (Rubiaceae) comprises plants widely distributed in tropical areas. Regarding the *Guettarda sericea* species, the literature shows that there is a lack of botanical and phytochemicals studies. Thus, the present study aimed to evaluate the antibacterial effect of ethanol extract of leaves of *G. sericea* (EEFGS) and its fractions on the growth of *Streptococcus oralis* ATCC 10557 and *S. salivarius* ATCC 7073 in both the planktonic and biofilms states. Different methods were employed to verify the antimicrobial potential. Among these are the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) determination of the death curve and evaluation of minimum bactericidal concentration (MBC). Furthermore, quantification of biomass and the number of viable cells of the biofilm were performed, respectively, by staining with crystal violet and counting colony forming units (CFU). The negative and positive controls used in all assays were respectively 4% DMSO and chlorhexidine gluconate with concentration adjusted according to the data of the MIC of each microorganism. To determine the toxicity of EEFGS, it was used the toxicity test on *Artemia nauplii*. The data showed that the extract and subfractions 13 to 17 of the chloroform fraction show a remarkable antimicrobial effect, able to inhibit the growth of planktonic and development of biofilms of *S. oralis* strain until the concentration of 62.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . With respect to *S. salivarius*, only subfraction 12 interfered on bacterial growth. Regarding the toxicity, it was observed that death of *Artemia nauplii* occurred at higher concentrations than those that exhibited antibacterial effect. From these results it can be concluded that EEFGS and subfractions 13-17 can be used as agents for the control of biofilm formation of *S. oralis*. In addition, complementary methodologies that seek purification of the active compounds and their cytotoxic effects on eukaryotic cells need to be held, aiming its use as an herbal agent.

**Keywords:** Biofilm. *Streptococcus oralis*. *Streptococcus salivarius*. Antibacterial agent. *Guettarda sericea*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Gráfico representativo das famílias botânicas mais importantes para o tratamento antimicrobiano na odontologia, de acordo com Oliveira e colaboradores (2007).....	24
Figura 2 -	Diversidade química e distribuição dos principais metabólitos secundários dentre as subfamílias de Rubiaceae.....	26
Figura 3 -	<i>Guettarda sericea</i> encontrada na região da Meruoca-Ceará, Brasil.....	27
Figura 4 -	Fases de formação do biofilme microbiano na superfície do esmalte dental.....	31
Figura 5 -	Representação esquemática da natureza temporal da agregação bacteriana sobre a superfície do dente.....	32
Figura 6 -	Fatores etiológicos primários da cárie dentária .....	35
Figura 7 -	Fatores etiológicos do desenvolvimento da cárie.....	36
Figura 8 -	Representação esquemática do teste de toxicidade aguda com náuplios de <i>Artemia sp.</i> .....	49
Figura 9 -	Espectro de absorvância de luz do extrato.....	52
Figura 10 -	Avaliação do efeito do EEFGS em diferentes concentrações sobre o crescimento planctônico de <i>S.oralis</i> e <i>S.salivarius</i> .....	53
Figura 11 -	Curva de morte de <i>S.oralis</i> após exposição ao EEFGS por diferentes intervalos de tempo.....	54
Figura 12 -	Avaliação do potencial antimicrobiano de diferentes concentrações do EEFGS sobre a formação de biofilmes de <i>S. oralis</i> (A) e <i>S. salivarius</i> (B).....	55
Figura 13 -	Avaliação da biomassa formada por <i>S.oralis</i> quando em contato com o EEFGS em diferentes intervalos de tempo.....	56
Figura 14 -	Contagem das UFCs de <i>S. oralis</i> (A) e <i>S.salivarius</i> (B) quando em contato com o EEFGS em diferentes concentrações.....	57
Figura 15 -	Análise do potencial antimicrobiano das frações do EEFGS em diferentes concentrações sobre o crescimento planctônico de <i>S. oralis</i> .....	59

Figura 16 -	Análise do potencial antimicrobiano das frações do EEFGS em diferentes concentrações sobre o crescimento planctônico de <i>S. salivarius</i> .....	60
Figura 17 -	Avaliação do potencial antimicrobiano das frações EEFGS diferentes concentrações sobre a formação do biofilme de <i>S. oralis</i> e <i>S. salivarius</i> .....	61
Figura 18 -	Avaliação do potencial antimicrobiano dos grupos da FCEEFGS em diferentes concentrações sobre a formação do biofilme de <i>S. oralis</i> e <i>S. salivarius</i> .....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados referentes a partição líquido-líquido de EEFGS.....	43
Tabela 2 -	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração (FCEEFGS).....	44
Tabela 3 -	Concentração Bactericida Mínima (CBM do EEFGS) e Concentração Inibitória Mínima (CIM da clorexidina).....	53
Tabela 4 -	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos grupos da FCEEFGS frente a <i>S. oralis</i> .....	62
Tabela 5 -	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos grupos da FCEEFGS frente a <i>S. salivarius</i> .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CL50	Concentração letal
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPO-D	Índice de Dentes Cariados, Perdidos e Obturados
CHX	Clorexidina
Des-re	Processo de desmineralização/remineralização
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
EEFGS	Extrato etanólico das folhas de <i>Guettarda sericea</i>
EtOH	Etanol
FAEEFGS	Fração acetato do extrato etanólico das folhas de <i>G. sericea</i>
FCEEFGS	Fração clorofórmio do extrato etanólico das folhas de <i>G. sericea</i>
FNEEFGS	Fração n-butanol do extrato etanólico das folhas de <i>G. sericea</i>
g	gravidade
Gtfs	Glicosiltransferases
MeOH	Metanol
mL	Mililitro
n-ButOH	n-Butanol
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Para análise
PEC	Polissacarídeo extracelular
pH	Potencial Hidrogeniônico
REEFGS	Resíduo do extrato etanólico das folhas de <i>G. sericea</i>

SDS	Dodecil sulfato de sódio
UFC	Unidade Formadora de Colônias



## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1	INTRODUÇÃO.....	17
---	-----------------	----

### CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA – CÁRIE DENTAL

2	PRODUTOS NATURAIS.....	20
2.1	Conceito .....	20
2.2	Antimicrobianos naturais.....	21
2.3	Rubiaceae.....	23
2.3.1	<i>Guettarda</i> .....	25
2.3.1.1	<i>Guettarda sericea</i> .....	26

### CAPÍTULO 3 – REVISÃO DE LITERATURA – BACTÉRIAS E BIOFILMES ORAIS

3	BACTÉRIA E BIOFILMES ORAIS.....	28
3.1	<i>Streptococcus</i> .....	28
3.2	Biofilmes .....	28
3.2.1	<i>Processo de formação do biofilme oral</i> .....	30
3.2.1.1	<i>Colonizadores primários</i> .....	31

### CAPÍTULO 4 – REVISÃO DE LITERATURA – CÁRIE

4	CÁRIE.....	34
4.1	Aspectos Gerais.....	34

### CAPÍTULO 5 – OBJETIVOS

5	OBJETIVOS.....	39
5.1	Objetivo geral.....	39
5.2	Objetivos específicos.....	39

### CAPÍTULO 6 – MATERIAIS E MÉTODOS

6	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
6.1	Métodos cromatográficos.....	41
6.2	Material Vegetal.....	41
6.2.1	<i>Obtenção dos extratos hexânico e etanólico das folhas de G. sericea</i> .....	42
6.2.1.1	<i>Fracionamento do extrato hexânico e etanólico</i> .....	42
6.2.1.2	<i>Fracionamento cromatográfico da fração clorofórmio (FCEEFGS) obtida do EEFGS</i> .....	42
6.3	Cepas bacterinas e condições de cultivo.....	43

6.3.1	<i>Ajuste da absorbância</i> .....	43
6.4	<b>Preparação das substâncias-teste</b> .....	44
6.5	<b>Ensaio de atividade antimicrobiana</b> .....	44
6.6	<b>Ensaio de atividade antibiofilme</b> .....	45
6.6.1	<i>Quantificação de biomassa</i> .....	45
6.6.2	<i>Contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC)</i> .....	45
6.7	<b>Curva do tempo de morte</b> .....	46
6.8	<b>Análise estatística dos ensaios microbiológicos</b> .....	46
6.9	<b>Ensaio de toxicidade com <i>Artemia sp.</i></b> .....	47
6.9.1	<i>Obtenção de náuplios II</i> .....	47
6.9.2	<i>Teste de sensibilidade</i> .....	47
6.9.3	<i>Teste de toxicidade</i> .....	48
<b>CAPÍTULO 7– RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>		
7	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	50
7.1	<b>Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico</b> .....	50
7.1.1	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) E</i> <i>Concentração Bactericida Mínimo (CBM)</i> .....	50
7.1.2	<i>Quantificação de biomassa do biofilme por Cristal Violeta(CV)</i> .....	54
7.1.2.1	<i>Enumeração das Unidades Formadoras de Colônia (UFC)</i> .....	56
7.2	<b>Avaliação da atividade antimicrobiana das frações do extrato etanólico</b> .....	57
7.2.1	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) E</i> <i>Concentração Bactericida Mínimo (CBM)</i> .....	58
7.2.2	<i>Quantificação de biomassa do biofilme por Cristal Violeta(CV)</i> .....	59
7.3	<b>Avaliação da atividade antimicrobiana da FCEEFGS</b> .....	60
7.3.1	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) E</i> <i>Concentração Bactericida Mínimo (CBM)</i> .....	60
7.3.2	<i>Quantificação de biomassa do biofilme por Cristal Violeta</i> .....	62
7.4	<b>Teste de toxicidade</b> .....	64
<b>CAPÍTULO 8 – CONCLUSÕES</b>		
8	<b>CONCLUSÕES</b> .....	66
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	68
	<b>ANEXO</b> .....	82

## *Capítulo 1 – Introdução*

---

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais, pelo homem, visando à recuperação da saúde é prática tão antiga quanto a sua própria história. Inicialmente, o uso empírico destas plantas era realizado, principalmente, através da casualidade. Porém, no decorrer da sua evolução, o homem fundiu os conhecimentos populares e agregou novas descobertas científicas pela experimentação de suas propriedades químicas e terapêuticas (DE VOS, 2010).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde – (OMS, 2003), pode-se definir planta medicinal como todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos.

Os processos de síntese de biomoléculas desencadeados pelos vegetais são responsáveis pela formação e acúmulo de inúmeras substâncias. Estudos revelam que estas podem ser divididas em dois grupos: o primeiro compreende os metabólitos primários, representados pelos lipídios, glicídios e proteínas. Já o segundo é compreendido pelos metabólitos secundários, representados pelos terpênicos, alcaloides, glicosídicos e flavonoides. Muitas destas substâncias, especialmente as de origem secundária, são utilizadas na área da saúde (MATOS, 2009)

Ainda segundo a OMS, 80% da população, faz uso de medicamentos derivados de plantas medicinais (fitoterápicos) e 85% utilizam plantas ou preparações destas nos seus cuidados básicos de saúde, movimentando por ano, US\$ 60 bilhões. Pesquisas realizadas no Brasil demonstram que mais de 90% da população já fez uso de alguma planta medicinal, sendo que 46% mantém um cultivo caseiro de plantas medicinais (ABIFISA, 2008).

Um dos fatores que contribuem para a utilização de plantas para fins medicinais no Brasil é o grande conhecimento popular acerca das espécies vegetais. Associado a isso, deve-se considerar ainda as dimensões continentais do país, com suas peculiaridades edafoclimáticas, características de cada região, bioma e unidade de paisagem. Dessa forma, há necessidade de se conhecer a grande diversidade de plantas medicinais, muitas das quais desconhecidas pela comunidade científica (BORBA e MACEDO, 2006).

Nos últimos anos, a aceitação da fitoterapia no País tem aumentado, resultando no crescimento da produção industrial dos laboratórios de várias empresas nacionais, que empregam matéria-prima vegetal diretamente na elaboração de fitomedicamentos. No Brasil, 20% da população são responsáveis por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis; o

restante da população encontra nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos (FOGLIO *et al.*, 2006)

Atualmente, aproximadamente 48% dos medicamentos empregados na terapêutica advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais que permanecem como uma importante fonte para obtenção de medicamentos (CARVALHO *et al.*, 2007).

As doenças infecciosas representam uma importante causa de morbidade e mortalidade entre humanos, especialmente nos países em desenvolvimento. Assim, as indústrias farmacêuticas têm sido motivadas ao desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas nos últimos anos, especialmente em função da ocorrência de resistência microbiana a tais medicamentos (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Em geral, bactérias têm habilidade genética de transmitir e adquirir resistência a drogas usadas como agentes terapêuticos, consequência da exposição excessiva, por longos períodos, aos fármacos (WRIGHT, 2005). Frequentemente, são observados relatos na literatura sobre isolamentos de bactérias que eram reconhecidamente sensíveis às drogas de uso constante, mas que se tornaram resistentes a todos, ou a quase todos, fármacos disponíveis no mercado (SAKAGAMI e KAJAMURA, 2002).

A boca, pelas suas particularidades anatômicas, constitui um ambiente favorável para a colonização e proliferação de micro-organismos, os quais, em condições normais, mantêm-se em equilíbrio devido à atividade competitiva por nutrientes e pela ação de fatores físico-químicos próprios do meio bucal. (SIXOU, MEDEIROS e BOAURE, 1996)

Apesar das inúmeras possibilidades de uso de plantas medicinais na odontologia, estas têm sido pouco exploradas, seja para tratar doenças bucais ou para tratar doenças sistêmicas que repercutem em alterações na saúde bucal (SANTOS *et al.*, 2009).

Desta forma, a pesquisa por produtos fitoterápicos com atividade antimicrobiana sobre patógenos relacionados a infecções bucais, sem relevantes efeitos adversos, é de suma importância na Biotecnologia de produtos direcionados para a Odontologia.

*Capítulo 2 – Revisão de literatura*

*Produtos Naturais*

---

## 2 PRODUTOS NATURAIS

### 2.1 Conceito

Informações concernentes ao uso de plantas medicinais e seu potencial terapêutico tem sido acumuladas durante séculos; muito desse conhecimento empírico se encontra disponível atualmente. O homem sempre buscou na diversidade biológica, principalmente nas plantas, a cura para os mais diversos tipos de enfermidades (ELVIN-LEWIS, 2001). As plantas por sintetizarem seus princípios ativos naturais são consideradas verdadeiros laboratórios bioquímicos complexos. Além disso, a medicina tradicional denominada de fitoterapia tem sido recomendada pela OMS (Organização Mundial de Saúde) como forma de atendimento primário a saúde (MOURA, 2006).

A palavra fitoterapia deriva de dois radicais gregos: *phyton*, que significa planta, e *therapeia*, que conclui a ideia de tratamento de enfermidades no qual são empregados vegetais frescos, drogas vegetais, ou extratos vegetais preparados com esses dois tipos de matérias-primas (OLIVEIRA e GOKITI, 2000).

O Brasil demorou a adotar uma política para os medicamentos fitoterápicos e plantas *in natura*, bem como uma legislação específica para o comércio e registro de drogas vegetais e fitoterápicas, porém no ano de 1995 passou a existir normatização oficial sobre os medicamentos fitoterápicos no Brasil. A Portaria n.º 6 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, publicada em 31 de janeiro de 1995, foi revogada de acordo com o artigo 4.º da Resolução da Diretoria Colegiada n.º 17, de 24/fev./00 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde. O artigo 1.º da referida resolução aprovou o regulamento técnico, visando à normatização do registro de medicamentos fitoterápicos no Sistema de Vigilância Sanitária, acrescentando que fitoterápico é “todo medicamento obtido e elaborado utilizando-se exclusivamente de matérias-primas vegetais tendo como característica a profilaxia, cura, levando em consideração o conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, a reprodutibilidade e constância de sua qualidade” (JUNIOR *et al.*, 2005).

A partir dos produtos naturais tem-se desenvolvido novos fármacos que apresentam benefícios como maior eficácia terapêutica, diminuição de possíveis efeitos colaterais, além de variedade de estruturas químicas e homólogas que podem ser incorporadas aos medicamentos (STROHL, 2000). Cerca de 75% da população mundial utiliza as plantas medicinais no tratamento de enfermidades, devido às características desejáveis associadas ao uso, como eficácia, baixo risco, reprodutibilidade e constância de qualidade. Elas têm sido

utilizadas na assistência primária à saúde com excelentes resultados em muitos países da América Latina, Europa e extensamente na Ásia, em razão da presença de substâncias ativas como taninos, alcaloides, compostos fenólicos, óleos essenciais e vitaminas (CARVALHO, COSTA e CARNELOSSI, 2010).

No *Annual Reports of Medicinal Chemistry* no período de 1941 a 2002, dos 90 fármacos analisados, 61 eram derivados semi-sintéticos de plantas e nove eram oriundos de plantas medicinais (SILVEIRA *et al.*, 2009). Como exemplo, temos inúmeros medicamentos de extrema importância para medicina como os digitálicos, quinina, atropina, pilocarpina, artemisinina, além de algumas drogas usadas no tratamento de câncer como: vimblastina, vincristina, taxol, campotecinas (SIMÕES *et al.*, 2007). Mais de 25% dos fármacos utilizados no mundo, hoje, são derivados de produtos naturais (LUBBEA e VERPOORTEA, 2011).

Com relação ao efeito dos fitoterápicos sobre bacterioses, pode-se afirmar que a atividade antibacteriana de óleos essenciais e extrato de plantas tem sido objeto de várias pesquisas nos últimos anos (NEGI *et al.*, 2005; SILVÁN *et al.*, 2013). Partes aéreas de espécies vegetais, como ramos, folhas, flores e partes subterrâneas, como tubérculos, rizoma e raízes, são frequentemente utilizadas nas pesquisas por novos compostos (AIDI *et al.*, 2010).

## 2.2 Antimicrobianos naturais

No Brasil, os processos infecciosos causados por agentes microbianos são muito frequentes, especialmente em decorrência das condições geoclimáticas do país. Geralmente, espécies dos gêneros *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Listeria*, *Vibrio*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rhizopus* e *Fusarium* constituem-se como os principais agentes etiológicos dessas infecções (ARAÚJO *et al.*, 2004).

A resistência aos antibióticos atuais é uma das principais questões da OMS para o milênio de acordo com o *World Health Report* (Relatório Mundial de Saúde). Tal constatação reflete-se no fato de que, na última década, presenciou-se um aumento na investigação de plantas como fonte de controle de enfermidades. (MBOSSO *et al.*, 2010). Além disso, antimicrobianos originados de plantas medicinais com um enorme potencial terapêutico tem-se tornado eficazes no tratamento de doenças infecciosas aliviando, ao mesmo tempo, muitos dos efeitos colaterais que são frequentemente associados ao uso de antimicrobianos de origem sintética (KOKOSKA *et al.*, 2002).

Relata-se na literatura que especiarias e ervas possuem propriedades antibacterianas contra patógenos de origem alimentar e fungos, porém existem poucos dados



ou observações sobre a atividade antimicrobiana de extratos e de seus compostos ativos contra bactérias orais, por exemplo. Tem sido apresentados apenas estudos com plantas utilizadas no tratamento de distúrbios orais (cárie e gengivite), através de enxágues orais ou até mesmo com a mastigação rotineira de gravetos ou outras partes das plantas baseadas no uso e conhecimento popular (ADERINOKUN, LAWOYIN e ONYEASO, 1999).

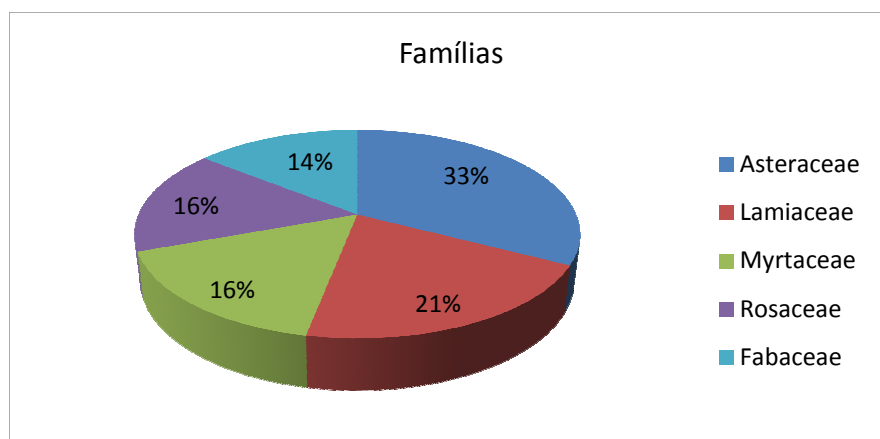
Antimicrobianos naturais ocorrem em animais e plantas como mecanismo evolutivo de defesa do hospedeiro contra patógenos invasores e estão presentes em abundância no meio ambiente (NAIDU, 2010). Plantas, ervas e especiarias, assim como seus óleos essenciais e compostos isolados, contêm um grande número de substâncias que inibem as atividades metabólicas de bactérias, leveduras e mofo (VIGIL, PALOU e ALZAMORA, 2005). Compostos antimicrobianos são comumente encontrados nas folhas dos vegetais (LEE e LEE, 2010), flores (EBRAHIMABADI *et al.*, 2010), bulbos (BENKEBLIA, 2004), rizomas (SABULAL *et al.*, 2006), frutos (SAMPAIO *et al.*, 2009) e outras partes da planta (WEI, MA e DONG, 2010).

Componentes bioativos são produzidos por vegetais como produtos finais, subprodutos e também na forma de metabólitos. A maioria deles são os ácidos fenólicos, flavonoides e compostos aromáticos (terpenoides, esteroides e alcaloides), que exercem diferentes propriedades biológicas favoráveis à saúde humana e ajudam a reduzir o risco de doenças crônicas (TAJKARIMI, IBRAHIM e CLIVER, 2010; GAHUKAR, 2012).

Na odontologia, as plantas medicinais são usadas tanto *in natura* como na forma de compostos isolados. Dentre tais plantas pode-se destacar: *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-vermelha), *Anacardium occidentale* L. (cajueiro), *Stryphnodendron adstringens* Mart.(barbatimão) e *Salvadora persica* (miswak), visto desempenharem papéis antimicrobianos importantes sobre micro-organismos orais, como bactérias e fungos patogênicos. (PEREIRA *et al.*, 2006; JOHANN *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009; AMOIAN *et al.*, 2010). Apesar das inúmeras possibilidades de uso de plantas medicinais na odontologia, estas têm sido pouco exploradas, seja para tratar doenças como cárie e gengivite ou no combate a doenças sistêmicas que repercutem em alterações na saúde bucal (SANTOS *et al.*, 2009).

Oliveira e colaboradores (2007) realizaram uma revisão de literatura sobre plantas medicinais indicadas para afecções odontológicas. Para tanto, incluíram em sua pesquisa bibliográfica o conhecimento contido em livros, artigos, sites científicos e populares. Os dados do trabalho mostraram que das 52 Famílias Botânicas citadas como úteis, cinco famílias obtiveram os maiores números de espécies mencionadas (Figura 1, p. 23).

Figura 1- Gráfico representativo das famílias botânicas mais importantes para o tratamento antimicrobiano na odontologia, de acordo com Oliveira e colaboradores (2007).



Fonte: OLIVEIRA *et al.*,2007

Com relação às espécies vegetais, as mais indicadas para o tratamento de afecções odontológicas, de acordo com a teoria consultada foram *Punica granatum L.*(romã), *Althaea officinalis L.*(malvarisco), *Salvia officinalis L.*(salva), *Calendula officinalis L.*(calêndula) e *Malva sylvestris L.*(malva) (OLIVEIRA *et al.*,2007). *Punica granatum* possui vários taninos e compostos fenólicos (JAIN *et al.*, 2011), *Althaea officinalis L.* contém polissacarídeos antimicrobianos (DETERS *et al.*, 2010), *Salvia officinalis L.* têm em sua composição química compostos fenólicos e monoterpenos (SOOKTO *et al.*, 2013), *Calendula officinalis L.* contém carotenoides, terpernos e compostos fenólicos (FORRER *et al.*,2013) e *Malva sylvestris L.* tem principalmente em sua composição terpenos e compostos fenólicos antimicrobianos (CUTILLO *et al.*, 2006).

### 2.3 Família Rubiaceae

Apesar do pequeno número de citações relativas ao efeito antibacteriano exercido por compostos isolados de membros da família Rubiaceae sobre bactérias orais, tal família apresenta estudos que demonstram grande potencial antimicobacteriano (MARTINS *et al.*,2013); antiproliferativo (DAI *et al.*, 2013); antineoplásico (OLIVEIRA *et al.*, 2013); antifúngico (NIÑO; MOSQUERA; CORREA, 2012) e antiangiogênico (PESCA *et al.*, 2013).

Rubiaceae é uma das maiores famílias dentre as Angiospermas, compreendendo cerca de 13.100 espécies, encontra-se distribuída por todo o mundo, sendo que a maior parte é

própria das regiões mais quentes, principalmente dos trópicos, onde já foram registradas aproximadamente 5.000 espécies (SOUZA e LORENZI, 2005; GOVAERTS *et al.*, 2007).

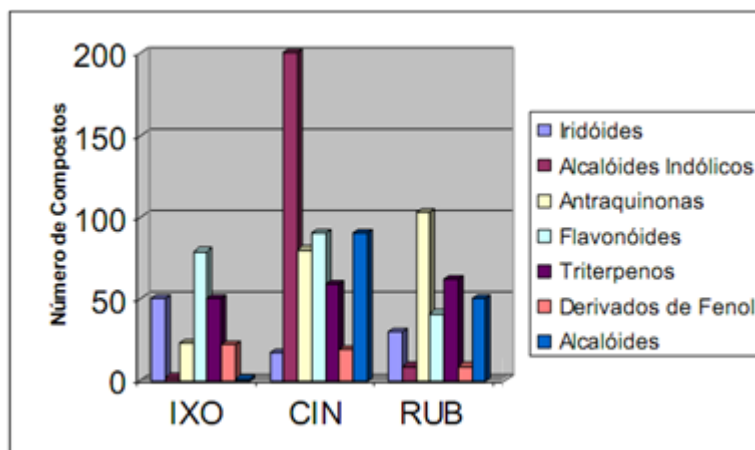
Na América do Sul tais plantas são adaptadas para praticamente todos os habitats, apresentando um número de espécies que supera todas as demais regiões do planeta (CHIQUIERI, DI MAIO e PEIXOTO, 2004). No Brasil é considerada uma das principais famílias da flora brasileira, ocorrendo cerca de 2.000 espécies amplamente distribuídas nos mais variados ecossistemas como a Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica e Cerrado, predominando sob a forma de árvores e semi-arbustos (BOLZANI *et al.*, 2001; SOUZA e LORENZI, 2005).

Os representantes desta família são caracterizados por apresentarem folhas opostas ou raramente verticiladas, simples e com margem inteira, estípulas comumente interpeciolares persistentes ou caducas, inflorescências de vários tipos (cimosas, paniculadas, tirsoides) ou reduzidas a uma flor solitária. As flores são predominantemente actinomorfas, hermafroditas, frequentemente heteromorfas, com ovário ínfero e com corola gamopétala. Os frutos desta família podem ser capsulares, baccáceos, drupáceos ou esquizocárpicos e com pericarpo carnoso ou lenhoso (DELPRETE, 2004).

De acordo com a classificação botânica realizada por Bremer e Eriksson (2009), com base na filogenia molecular de 534 táxons e 329 gêneros, a família Rubiaceae encontra-se atualmente dividida em três subfamílias: Ixoroideae, Cinchonoideae, e Rubioideae correspondendo cerca de 44 tribos.

Rubiaceae reúne um considerável número de espécies com importância econômica, principalmente como ornamental, medicinal ou alimentícia (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002; MENDOZA *et al.*, 2004). Destacando-se por seus bioprodutos, alcaloides, taninos, saponinas, esteroides, terpenos e flavonoides, além de que algumas espécies são importantes para a medicina tradicional (CARBONEZI *et al.*, 2004; HAMERSKI *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006; ALAM *et al.*, 2008; CARDOSO *et al.*, 2008). Cada uma das subfamílias apresenta um perfil típico para iridoides (Ixoroideae), alcaloides indólicos (Cinchonoideae) e antraquinonas (Rubioideae), que são considerados marcadores quimiotaxonômicos de Rubiaceae (Figura 2, p. 25) (BOLZANI *et al.*, 2001).

Figura 2 - Diversidade química e distribuição dos principais metabólitos secundários dentre as subfamílias de Rubiaceae.



Fonte: adaptado de BOLZANI *et al.*, 2001. IXO: Ixoroideae; CIN: Cinchonoideae; RUB: Rubioidae.

Considerando a riqueza dos metabólitos presentes nos membros da família Rubiaceae, o estudo fitoquímico de espécies que representam os gêneros dessa família, especialmente do gênero *Guettarda*, cuja parte química ainda é pouco conhecida, pode conduzir à descoberta de novas fontes de substâncias naturalmente bioativas.

### 2.3.1 Gênero *Guettarda*

Pertence a subfamília Cinchonoideae e a tribo Guettardeae que é composta por cerca de 150 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e neotropicais (ACHILLE *et al.*, 2006). Possui cerca de 70 espécies distribuídas nas florestas tropicais, a maioria na América tropical e região do Pacífico, porém também pode ser encontrado na costa do Oceano Índico. (TAO e TAYLOR, 2011).

Algumas dessas espécies são úteis na etnomedicina (AGRA, FRANÇA e BARBOSA-FILHO, 2007; AGRA *et al.*, 2008; BERTUCCI *et al.*, 2008). São popularmente utilizadas na América do Sul para tratamento de ferimentos e inflamações, (CAPASSO *et al.*, 1998) além de apresentarem comprovadas atividades biológicas. Dentre as quais estão *Guettarda angélica* Mart, cujo extrato aquoso das sementes demonstrou atividade antiviral contra herpesvírus equino, suíno e bovino (BARROS *et al.*, 2012). E o extrato das folhas de *G. pohliana* cuja fração hexânica quando administrada de forma tópica inibe 68% do edema de orelha em camudongo, possuindo assim atividade anti-inflamatória, atribuída a presença de ácidos ursólico, oleanólico, pomólico, rotúndico e quinóvico (TESTA *et al.*, 2011).

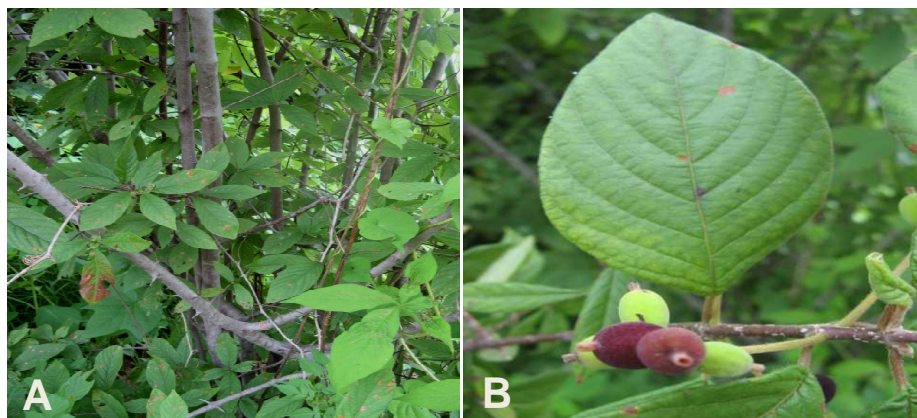
O extrato metanólico bruto e a fração acetato de etila provenientes de *Guettarda pohliana* Müll Arg apresentam atividade antioxidante avaliada pelo método DPPH

(OLIVEIRA *et al.*, 2008). Já o extrato etanólico de *G. grazielae* foi eficaz sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Não obstante, *G. acreana* (Krause) tem apresentado atividade anti-inflamatória e antiespasmódica em camundongos (CAPASSO *et al.*, 1998).

### 2.3.1.1 *Guettarda sericea*

*G. sericea* é uma planta arbustiva, sendo um táxon mais frequente nas florestas montanas nordestinas (brejos de altitude), onde a família Rubiaceae apresenta grande riqueza de espécies, sendo conhecida popularmente na Paraíba como “esporão de galo” e no Ceará como “umbigo de cunhã” (Figura 3) (PEREIRA *et al.*, 2002). É válido salientar que até a presente data, a literatura não relata qualquer estudo botânico ou químico para esta espécie.

Figura 3 – *Guettarda sericea* encontrada na região da Meruoca – Ceará, Brasil.



Fonte: Prof. Elnatan Bezerra de Souza. A - Hábito arbustivo; B – Folha e frutos.

Segundo Delprete e Jardim (2012), *Guettarda sericea* apresenta a seguinte classificação botânica:

Subdivisão: Angiospermae

Classe: Spermatopsida

Subclasse: Asteridae

Ordem: Gentianales

Família: Rubiaceae

Tribo: Guettardeae

Gênero: *Guettarda*

Espécie: *sericea* - Müll.Arg.

Nome científico: *Guettarda sericea* Müll.Arg.



*Capítulo 3 – Revisão de literatura*

*Bactérias e biofilmes orais*

---

### 3 BACTÉRIAS E BIOFILMES ORAIS

#### 3.1 Streptococcus

Os estreptococos são cocos gram-positivos habitualmente ovalados (0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ ) que aparecem frequentemente em cadeias de pequenas massas ou em pares – diplococos, anaeróbicos facultativos com metabolismo predominantemente fermentativo (FOX, 2010). É o gênero predominante da cavidade bucal e algumas espécies são produtoras de cápsulas e de diferentes polissacarídeos extracelulares (PEC) e intracelulares, a partir, exclusivamente, da sacarose. A maioria é denominada de “viridante”, pois suas hemolisinas causam lise parcial de hemácias (LORENZO, 2004).

*Streptococcus* do grupo viridans (*S. oralis*, *S. salivarius* e *S. mitis*) são colonizadores primários da superfície do dente humano (LI e CAULFIELD, 1995). Estas bactérias anexam-se a componentes salivares como a  $\alpha$ -amilase, proteínas ricas em prolina e glicoproteínas ricas em prolina formando um biofilme que cobre a superfície mineral do dente, através do crescimento e interações com outras bactérias (HOJO *et al.*, 2009; CISAR *et al.*, 1995).

Constituem parte de um conjunto de micro-organismos da flora normal da cavidade oral, sendo conhecidos como estreptococos orais, porém podem ser isolados de outras áreas como a faringe, pele, vagina ou intestino, onde normalmente não são considerados patogênicos, contudo em indivíduos imunodeprimidos e em recém-nascidos podem estar envolvidos na sepse, pneumonia e meningite (CASTILLO *et al.*, 2006). Além disso, os “viridans” são conhecidos por causar endocardite infecciosa, muitas vezes associada à bacteremia após procedimentos odontológicos, causando infecção nas válvulas ou revestimento do coração (DOUGLAS *et al.*, 1993).

#### 3.2 Biofilmes

Os biofilmes são comunidades microbianas complexas estabelecidas em uma ampla variedade de superfícies que estão geralmente associadas a uma matriz extracelular composta por vários tipos de biopolímeros derivados do metabolismo bacteriano (ABEE *et al.*, 2011; COSTERTON, STEWART e GREENBERG, 1999). São compostos geralmente por diferentes espécies que se desenvolvem na forma de consórcios funcionais, estabelecendo um mutualismo entre os membros da comunidade microbiana, que pode ser estabelecida e mantida por um longo período de tempo se comparado com a forma de vida planctônica



(RICKARD *et al.*, 2006; FLEMMING e WINGENDER, 2001). Algumas características diferenciam este tipo de organização das bactérias planctônicas, como, por exemplo, alta densidade populacional, a produção de uma matriz de polímeros extracelulares e uma vasta gama de heterogeneidades físicas e químicas (BEER e STOODLEY, 2006).

O crescimento e a proliferação do micro-organismo dentro do biofilme fornecem proteção contra a ação de antibióticos e fatores de estresse ambiental, proporcionando um mecanismo de defesa e diminuindo ou impedindo a penetração de diferentes agentes antimicrobianos através do biofilme (COSTERTON, STEWART e GREENBERG, 1999; COSTERTON *et al.*, 2003), e assim, tornam-se extremamente difíceis ou impossíveis de serem erradicados (STOODLEY *et al.*, 2002).

A proteção decorre da barreira física formada pela matriz extracelular, a qual dificulta a penetração de agentes antimicrobianos para o biofilme (COSTERTON *et al.*, 2003), e mecanismos de comunicação bacterianos que estimulam as bactérias a produzirem enzimas e proteínas importantes para a adaptação do biofilme (CORBIN *et al.*, 2011). Além disso, a matriz que o constitui permite a adesão célula-célula às superfícies, conferindo estabilidade mecânica (FLEMMING e WINGENDER, 2010). A sua natureza aniônica permite ligar-se a antibióticos e agentes biocidas, impedindo a sua difusão e penetração no interior da estrutura (DONLAN e COSTERTON, 2002).

Os exopolissacarídeos da matriz asseguram também, um ambiente altamente hidratado, permitindo a sobrevivência dos micro-organismos e a manutenção da atividade de enzimas, capazes de degradar compostos a serem utilizados como nutrientes e compostos tóxicos que destroem a integridade celular (DAVEY e O'TOOLE, 2000; JEFFERSON, 2004).

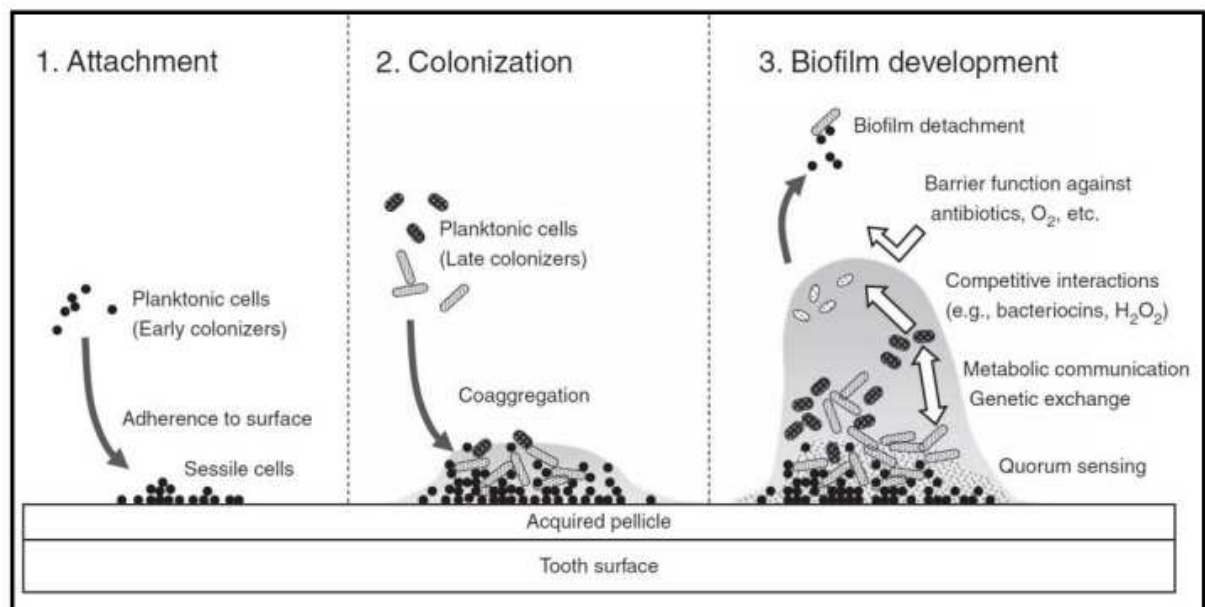
Na Odontologia, um dos principais focos de estudos são os biofilmes bacterianos formados nas superfícies da cavidade oral, por conta de seu papel etiológico em doenças bucais importantes (SALERNO *et al.*, 2011; BEIKLER e FLEMMIG, 2011). Normalmente, as bactérias no biofilme dentário vivem em harmonia com o hospedeiro, mas mudanças ecológicas podem ocorrer dentro da comunidade microbiana e resultar no desenvolvimento das duas principais doenças orais: a cárie dentária e a doença periodontal (JENKINSON e LAMONT, 2005; MARSH, 2006).

Em relação à cárie dentária o perfil dos micro-organismos no biofilme dental é decisivo para o estabelecimento de uma microbiota virulenta e, por consequência, o estabelecimento de lesões cariosas. Há evidências da cárie dentária como doença endógena resultante de uma mudança na flora supragengival para uma dominância de micro-organismos acidúricos e acidogênicos (TAKAHASHI e NYVAD, 2008).

### 3.2.1 Processo de formação do biofilme oral

A formação de biofilmes pode ser dividida em fases geneticamente distintas, seguindo uma cronologia bastante criteriosa (Figura 4).

Figura 4- Fases de formação do biofilme microbiano na superfície do esmalte dental.



Fonte: HOJO *et al.*, 2009.

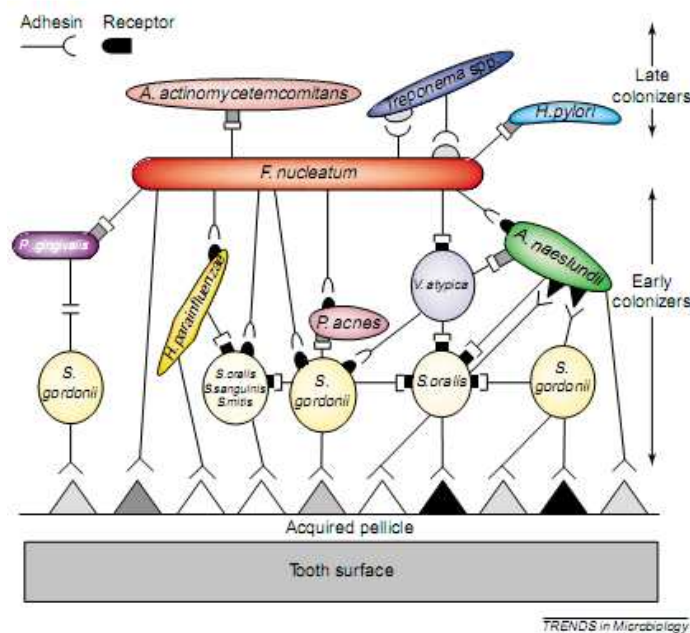
A primeira fase acontece quando ocorre a adesão de colonizadores primários ao dente através de ligações fracas, como interações de Van der Waals, sendo tais interações estabelecidas junto aos componentes da película adquirida. Na segunda fase, as colônias que não foram imediatamente retiradas da superfície podem ancorar-se de forma mais permanente, através de moléculas de adesão celular, de forma a ocorrer interações estáveis entre as proteínas da película adquirida com proteínas de superfície bacteriana, as chamadas adesinas. Na terceira fase, as primeiras colônias oferecem novos sítios de interação, visto que, colonizadores secundários apresentam adesinas que se ligam às proteínas de superfície de alguns colonizadores primários, podendo coaderir e coagregar-se. A quarta fase tem como característica principal a produção de uma matriz de polissacarídeos extracelulares que formará o biofilme e servirá de ancoragem para outros micro-organismos. Por último, evidencia-se a maturação do biofilme, etapa constituída pela multiplicação das células e surgimento de um microambiente favorável, com a formação de canais para o transporte de

água, oxigênio e nutrientes para as células formadoras do biofilme. Em seguida, aglomerados de células presas à superfície do biofilme se desprendem e migram para outras regiões, que ao se fixarem a um substrato, serão capazes de formar microcolônias dando início a um novo biofilme (HOJO *et al.*, 2009; KOLENBRANDER *et al.*, 2010).

### 3.2.1.1 Colonizadores primários

Os primeiros organismos (Figura 5) que se ligam a película adquirida no esmalte do dente são os colonizadores primários, que em condições adequadas, podem multiplicar-se formando microcolônias, acarretando mudanças nas condições ambientais, e consequentemente permitindo a agregação dos colonizadores secundários (KOLENBRANDER *et al.*, 2010).

Figura 5- Representação esquemática da natureza temporal da agregação bacteriana sobre a superfície do dente.



Fonte: RICKARD *et al.*, 2003. Os símbolos da adesina e do receptor (mostrado na parte superior) representam diferentes interações de coagregação ou de adesão à película adquirida.

A maioria dos estreptococos pode ser considerada como comensais, vivendo em relativa harmonia com o hospedeiro. São encontrados geralmente nas superfícies das mucosas, tais como os que habitam a cavidade oral, o trato respiratório superior e gastrointestinal. Deste modo, são nestes locais que estreptococos podem iniciar doenças localizadas

ou sistêmicas, desde que tenham as condições apropriadas (JENKINSON, 1997; DANNE; DRAMSI, 2012).

Tais micro-organismos ao se aderirem às superfícies orais apresentam papel fundamental na formação da placa bacteriana, podendo acarretar no aparecimento de doenças tais como cárie, gengivite e periodontite (BLACK *et al.*, 2004; BADIHI-HAUSLICH, 2011). Com relação à superfície dental é válido ressaltar que após 6 h da formação do biofilme, a placa dentária mostra-se dominada (60-90%) por espécies como *S. oralis*, *S. mitis* e *S. sanguinis* (RUTTERMANN *et al.*, 2012). A colonização e persistência de estreptococos na cavidade oral são atribuídas a três fatores, capacidade destes organismos em aderir a qualquer superfície presente em seu ambiente natural; capacidade de utilizar os nutrientes disponíveis sobre condições ambientais adversas; e capacidade de tolerar, resistir, ou mesmo destruir as defesas imunológicas do hospedeiro (JENKINSON, 1997).

Alguns trabalhos mostram que *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* e *S. salivarius* servem de pontos de ancoragem para colonizadores secundários da placa dental como *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.* e *Lactobacillus spp.*, além de se coagregarem com *Candida spp.*, quando associada a cárie da raiz do dente (BAGG e SILVERWOOD, 1986; KOLENBRANDER, ANDERSEN e MOORE, 1990; JENKINSON, LALA e SHEPHERD, 1990).

*Capítulo 4 – Revisão de literatura*

*Cárie*

---

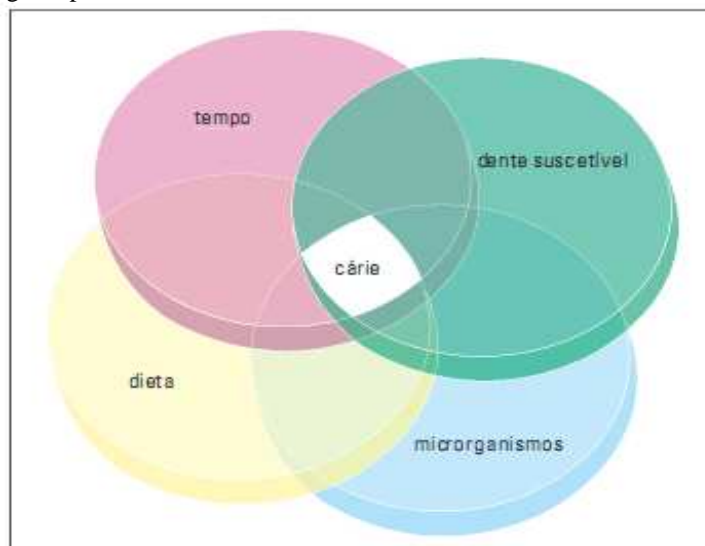
## 4 CÁRIE

### 4.1 Aspectos Gerais

A cárie dentária é uma doença crônica multifatorial comum do tecido mineralizado dos dentes, cuja infecção sucede de forma lenta e progressiva (WANG, ZHANG e CHEN, 2007). É a principal causa de perda de dentes e dor orofacial, embora possa ser controlada em seus estágios iniciais, se medidas terapêuticas não forem adotadas, sua progressão pode levar a destruição completa do dente (PITTS, 2004).

De acordo com Newbrun (1983) (Figura 6), a existência da cárie depende de fatores tais como substratos presentes na dieta, hospedeiro susceptível, microbiota cariogênica e o tempo, uma vez que os três primeiros precisam estar presentes por um determinado período de tempo, para que a desmineralização progressiva do esmalte ocorra (NEWBRUN, 1983). Fejerskov (1997) refere-se à cárie não como um evento único, mas como o efeito da acumulação de eventos; um processo que se propaga por um período de tempo. Para ele, o processo carioso é a dinâmica do fenômeno de desmineralização-remineralização (des-re) resultante do metabolismo microbiano na superfície dentária que, com o passar do tempo, pode resultar em perda de mineral e, possivelmente, mas variavelmente, em cavitação.

Figura 6- Fatores etiológicos primários da cárie dentária



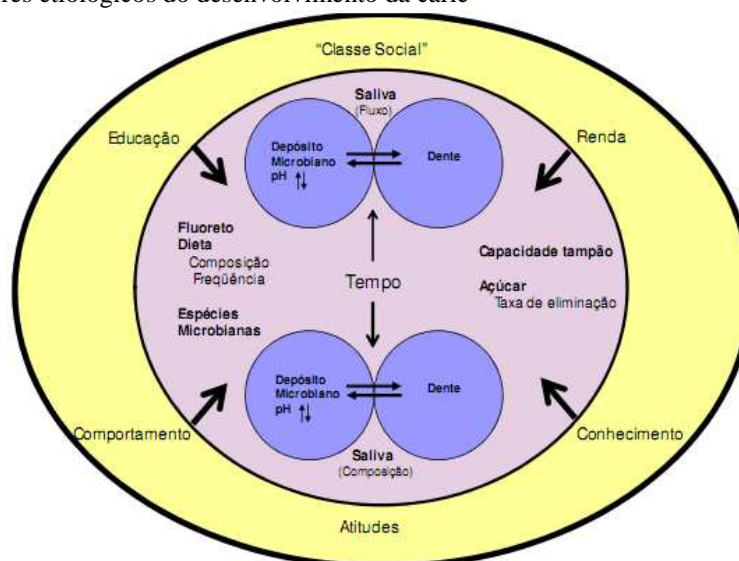
Fonte:NEWBRUN, 1983. 1. Fatores etiológicos primários da cárie dentária: 1) microbiota da placa dental, 2) substratos (originados principalmente da dieta), 3) hospedeiro susceptível, 4) tempo.

Desta forma, a definição de cárie dentária aponta para uma desmineralização irreversível do esmalte, provocada pelo desequilíbrio frequente do fenômeno de des-re, durante um período de tempo, produzida pela ação de ácidos provenientes do metabolismo de carboidratos na placa bacteriana dentária. (LIMA, 2007).

Diversos fatores podem influenciar na formação da cárie dentária, no entanto, nenhum fator causal sozinho foi identificado como único responsável, ou seja, não existe um fator determinante para a instalação de uma lesão cariosa (FEJERSKOV e KIDD, 2005). Entretanto, a presença de um biofilme cariogênico é considerado fator etiológico primordial da cárie dentária, pois a lesão de cárie passa pelo metabolismo bacteriano, culminando com a formação de ácido e conseqüente desmineralização do esmalte, desencadeando, um processo fisiológico de des-re; porém, a presença do biofilme não necessariamente determina o desenvolvimento da cárie (LIMA, 2007).

Outro aspecto importante na epidemiologia da cárie é a influência de fatores socioeconômicos e comportamentais que podem contribuir para sua instalação e desenvolvimento, destruindo as estruturas dentais e influenciando sua ocorrência e severidade. Fejerskov e Manji (1990) (Figura 7) destacaram a importância de fatores modificadores ou moduladores na menor ou maior probabilidade do indivíduo desenvolver lesões cariosas, tais como: renda, educação, fatores comportamentais, conhecimento, escolaridade e atitudes.

Figura 7- Fatores etiológicos do desenvolvimento da cárie



Fonte: modificado de FEJERSKOV e MANJI, 1990. Ilustração esquemática da relação entre os fatores etiológicos (círculos azuis), determinantes (círculo rosa) e relacionados (círculo amarelo) com a iniciação e desenvolvimento da cárie dentária. Os fatores determinantes interagem diretamente com a superfície dentária. Os fatores relacionados não estão em contato com o dente, porém influenciam o processo de aparecimento das lesões cariosas.

A placa dental tem sido implicada como um fator etiológico importante na cárie dentária, podendo ser iniciada por várias estirpes de estreptococos (MARSH, 2010). Sua composição é regulada por fatores tais como a adesão celular, coagregação, crescimento e sobrevivência no meio ambiente (KORKINA *et al.*, 2007). As bactérias da placa catabolizam os substratos de carboidratos fermentáveis sobre as superfícies dos dentes e produzem ácidos que promovem e prolongam a desmineralização do esmalte dental. Quando o pH da superfície do dente cai para menos de 5,5, a desmineralização prossegue mais rapidamente do que a remineralização, resultando na deterioração progressiva dos tecidos duros do dente (KARTHIKEYAN *et al.*, 2011).

Além das reconhecidas medidas de prevenção da cárie dental, como os procedimentos mecânicos de remoção do biofilme, a adequação da dieta e o uso do flúor; (TINANOFF, KANELIS e VARGAS, 2002) outros métodos têm sido propostos com a finalidade de reduzir a adesão bacteriana, inibir o crescimento e proliferação dos micro-organismos na superfície do dente e modificar a atividade bioquímica e a ecologia do biofilme dentário para uma microbiota menos patogênica (ANKOLA, HEBBAL e MOCHERLA, 2008). Dentre esses agentes, destaca-se a clorexidina, um detergente catiônico, da classe das bisbiguanidas, o qual possui um amplo espectro de ação, tendo como mecanismo de ação antibacteriano o fato da molécula catiônica ser adsorvida pela membrana celular alterando sua integridade, o que resulta no extravasamento dos componentes bacterianos, porém possui efeitos colaterais, podendo causar pigmentação dos dentes, interferência gustativa, descamação da mucosa podendo induzir a resistência de micro-organismos quando o uso diário for prolongado (ANKOLA, HEBBAL e MOCHERLA, 2008; KIM *et al.*, 2010).

A cárie dentária é a doença infecciosa crônica de maior incidência na espécie humana (LORENZO, 2004). Tendendo a permanecer não tratada em muitas áreas subdesenvolvidas, principalmente se considerarmos que, não raro, o paciente só consegue aliviar a sua dor com a extração dentária (AJDIC *et al.*, 2002).

Segundo a OMS, a cárie dental ainda é um grande problema de saúde na maioria dos países industrializados, que afeta 60-90% das crianças em idade escolar e a grande maioria dos adultos (PETERSEN *et al.*, 2005). Mesmo o Brasil tendo atingido status de país com baixa prevalência de cárie, 56% das crianças com 12 anos apresentam cárie dentária (idade usada como referência pela OMS), Atingindo assim, o índice de 2,07 no indicador CPO-D (sigla para dentes cariados, perdidos e obturados) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).



O alto grau de lesões cariogênicas afeta diretamente a economia, tendo em vista o gasto com a introdução de flúor em idades precoces. Os últimos dados oficiais mostram que entre 2007 e 2010, o Ministério da Saúde investiu R\$ 2,7 bilhões para melhorar a saúde bucal da população do País. As principais ações foram delimitadas por meio da execução do programa Brasil Sorridente. Tal programa, que faz parte do Brasil Sem Miséria, permitiu que diversos brasileiros tivessem pela primeira vez uma consulta odontológica e ajudou a diminuir a incidência de doenças bucais entre os brasileiros (MOREIRA, 2011).

## *Capítulo 5 – Objetivos*

---

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial antimicrobiano do extrato etanólico (EEFGS) e das frações obtidas de *Guettarda sericea* Mull. Arg. sobre bactérias importantes para a formação e desenvolvimento da cárie.

### 5.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do EEFGS sobre o crescimento planctônico e biofilmes dos colonizadores primários *S. oralis* ATCC 10557 e *S. salivarius* ATCC 7073;
- Avaliar o efeito das frações FA, FC, FN e R sobre o crescimento planctônico e biofilmes dos colonizadores primários *S. oralis* ATCC 10557 e *S. salivarius* ATCC 7073;
- Avaliar o efeito das subfrações da FC sobre o crescimento planctônico e biofilmes dos colonizadores primários *S. oralis* ATCC 10557 e *S. salivarius* ATCC 7073;
- Verificar a viabilidade de células incrustadas no biofilme monoespécie de *S. oralis* ATCC 10557 e *S. salivarius* ATCC 7073 quando submetido à ação do EEFGS;
- Descrever a cinética de morte de *S. oralis* ATCC 10557 quando submetida à ação bactericida do extrato.
- Avaliar a toxicidade do EEFGS sobre náuplios de *Artemia sp.*

*Capítulo 6 – Materiais e Métodos*

---

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Métodos cromatográficos

O extrato e as frações utilizadas no presente estudo foram gentilmente cedidos pela Profa. Maria Rose Jane R. Albuquerque (Curso de Química da Universidade Estadual Vale do Acaraú). A metodologia de isolamento do material utilizado encontra-se brevemente descrita a seguir.

As cromatografias de adsorção foram executadas utilizando coluna gel de sílica, com granulometria de 70-230 mesh, da marca Vetec (cromatografia gravitacional). O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as alíquotas das amostras a serem analisadas e com a quantidade de sílica empregada. As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando folhas ou lâminas comerciais de gel de sílica 60, ( $\text{Ø}$   $\mu\text{m}$  5-40), com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm ( $F_{254}$ ) sobre cromatofolha de poliéster (MACHEREY NAGEL) ou lâminas de vidro revestidas com gel de sílica 60 (0,063 - 0,200 MM) (70 – 230 MESH).

As revelações das substâncias nas cromatoplacas analíticas e lâminas de vidro foram realizadas através da exposição destas à radiação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, emitidos por lâmpada modelo UVSL-25 da Mineral Light e/ou pela borrifação com solução de vanilina/ácido perclórico/EtOH, seguida de aquecimento em estufa ( $\approx 100$  °C), por aproximadamente 5 minutos. Os solventes utilizados como eluentes foram: hexano, AcOEt, e MeOH, puros ou em misturas binárias, com gradiente crescente de polaridade, todos de qualidade P. A. da marca Synth ou Vetec. A destilação das soluções resultantes foi realizada sob pressão reduzida em evaporador rotatório da marca FISATON.

### 6.2 Material vegetal

As folhas de *Guettarda sericea* utilizadas para a obtenção do extrato e frações foram coletadas em abril de 2010 na Serra da Meruoca - Ceará. A identificação botânica foi realizada pelo Prof. Elnatan Bezerra de Souza. A exsicata da planta encontra-se depositada no Herbário Francisco José Abreu Matos – UVA, sob o número de registro 12713, dados do coletor E. B. Sousa *et al.*

### 6.2.1 Obtenção dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *Guettarda sericea*.

Folhas frescas de *G. sericea* (126,4 g) foram secas à temperatura ambiente, trituradas e submetidas à extração exaustiva com hexano a frio, seguida de etanol. As soluções obtidas foram concentradas por rotaevaporação a vácuo a 50°C, resultando nos extratos hexânico (6,94 g) e etanólico (40,0 g).

#### 6.2.1.1 Fracionamento do extrato hexânico e etanólico

O extrato etanólico das folhas de *G. sericea* (40,0 g) foi submetido a um processo de partição, no qual foi dissolvido em 150 mL da mistura MeOH/H<sub>2</sub>O (3:1), seguido da extração com os solventes hexano, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e n-ButOH (5 vezes 100 mL de cada solvente). As soluções obtidas foram concentradas e resultaram nas seguintes frações (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados referentes a partição líquido-líquido de EEFGS.

Eluentes	Sigla	Peso (g)
Hexano	FHEEFGS	4,8
CHCl <sub>3</sub>	FCEEFGS	7,1
AcOEt	FAEEFGS	4,2
n-ButOH	FNEEFGS	4,38
Resíduo	REEFGS	15,9

Fonte: Próprio autor

#### 6.2.1.2 Fracionamento cromatográfico da fração clorofórmio (FCEEFGS) obtida do EEFGS.

A FCEEFGS (7,1 g) foi misturada com 16,15 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sob 88,24 g de gel de sílica em coluna cromatográfica de 125 mL.

O fracionamento foi conduzido com os solventes: hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias. Utilizou-se um gradiente crescente de polaridade constituído de hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aumentando-se a concentração da seguinte forma: hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 8,5:1,5; 7,5:2,5; 1:1; 2,5;7,5; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 8,5:1,5; 7,5:2,5; 1:1; 2,5;7,5; AcOEt, seguido de MeOH. Foram obtidas 3 frações de 50 mL de cada polaridade, totalizando 33 frações que, após análise por cromatografia em camada delgada (CCD), reuniu-se as que apresentaram a mesma razão de frente, resultando em 18 grupos (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração (FCEEFGS).

Grupo	Frações resultantes após CCD (50mL)	Peso (mg)
A-I	1-3	1,9
A-II	4-6	5,0
A-III	7-9	0,5
A-IV	10-12	2,3
A-V	13-15	18,3
A-VI	16-18	13,7
A-VII	19-21	7,8
A-VIII	22	5,7
A-IX	23	87,0
A-X	24	62,0
A-XI	25	257,0
A-XII	26*	260,0
A-XIII	27*	128,0
A-XIV	28*	440
A-XV	29*	364,8
A-XVI	30*	330,0
A-XVII	31-32*	455,0
A-XVIII	33*	860,0

Fonte: próprio autor. \*Frações que obtiveram atividade antimicrobiana

### 6.3 Cepas bacterianas e condições de cultivo

As bactérias Gram-positivas *Streptococcus oralis* ATCC 10557 e *Streptococcus salivarius* ATCC 7073, utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ Rio de Janeiro-Brasil.

Para cada micro-organismo, partiu-se de uma cultura estoque em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) com 20% de glicerol e conservados a -80°C. Uma alíquota de 50 µL desta cultura foi inoculada em 5 mL de meio BHI caldo estéril e incubado por 24 h, a 37 °C em atmosfera com 10% CO<sub>2</sub>. Após a ativação inicial, a cultura foi renovada, transferindo-se uma nova alíquota de 50 µL e inoculada em 5 mL de BHI caldo estéril sobre as mesmas condições de crescimento anteriormente citadas.

#### 6.3.1 Ajuste da Absorbância

Antes das bactérias serem utilizadas, a concentração das células de cada inóculo foi ajustada através da utilização de curvas de espectrofotometria e de calibração, previamente determinada para cada bactéria. As células bacterianas em fase de crescimento exponencial tardia foram transferidas para microtubos, centrifugadas a 1.610 g a 4°C por 5 min, sendo o pellet resultante posteriormente ressuspenso em 1 mL de BHI caldo estéril. Posteriormente, a absorbância da suspensão é determinada através de espectrofotometria a 620 nm, tendo a

concentração ajustada para  $2 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> (experimento para determinação da CIM) e  $2 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> (experimentos com biofilmes). Com o intuito de fornecer às condições adequadas a formação de biofilmes, o meio de crescimento foi suplementado com 2% de sacarose.

#### **6.4 Preparação das substâncias-teste**

O EEFGS, frações e subfrações foram devidamente solubilizado em água estéril deionizada com 4% de Dimetilsulfóxido (DMSO) à concentração de 1000 µg.mL<sup>-1</sup> previamente ao uso.

#### **6.5 Ensaio de atividade antimicrobiana**

A avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias-teste foi feito segundo o teste de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços de fundo em “U” padronizada segundo a norma do CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2010).

Cada poço da placa foi inicialmente preenchido com 0,1mL de água MiliQ estéril, com exceção da primeira coluna, a qual, foi preenchida com 0,2 mL da substância-teste na concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup>. Em seguida realizou-se diluições seriadas na base dois para obtenção de diferentes concentrações (1000-15,62 µg mL<sup>-1</sup>) em um volume final de 0,1 mL. Depois deste processo, 0,1 mL de células ( $2 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) ajustadas segundo item anterior foi adicionado a cada poço, obtendo-se um volume final de 0,2 mL. Gluconato de Clorexidina (ETHICALL) e meio de cultura BHI com 4% de DMSO foram utilizados, respectivamente, como controles positivos e negativos, além do controle de turbidez da substância-teste, que continha o extrato ou as frações diluídas nas mesmas concentrações do teste antimicrobiano.

Em seguida, as placas foram colocadas em estufa a 37°C com 10% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. A avaliação do crescimento bacteriano foi medido pela turbidez com auxílio de espectrofotômetro (BioTrak II, Amersham Biosciences) a 620 nm. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi estabelecida como sendo a menor concentração da substância teste capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano.

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) utilizou-se placas de petri contendo meio BHI ágar, as quais foram inoculadas com 10 µL da suspensão contida nos poços que não apresentaram crescimento visual durante o experimento de



determinação da CIM. A CBM foi estabelecida como sendo a menor concentração das substâncias-testes capaz de inibir completamente o crescimento microbiano nas placas de petri após 24-48 horas de crescimento.

## **6.6 Ensaio de atividade antibiofilme**

O ensaio da atividade antibiofilme foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Stepanovic e colaboradores (2000). Placas de poliestireno de 96 poços com fundo chato foram preparadas seguindo os mesmos procedimentos anteriormente descritos para os ensaios de atividade antimicrobiana. Contudo, para cada ensaio, duas placas foram utilizadas, uma para a quantificação da biomassa e outra para contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). Devido à limitação na quantidade das frações do extrato, a contagem de UFCs foi feita apenas para determinar o efeito do EEFGS sobre ambas as cepas submetidas ao experimento.

### **6.6.1 *Quantificação de biomassa***

Após 24 horas em estufa a 37°C em atmosfera de 10% CO<sub>2</sub> as placas tiveram seus poços lavados três vezes com água destilada para retirada das células fracamente aderidas e em seguida adicionou-se 200 µL de álcool metílico P.A., por 15 minutos, para fixação das células aderidas. Após a remoção do metanol, 200 µL de cristal de violeta 0,1% foram adicionados por 15 minutos, em temperatura ambiente. Esse processo foi realizado para permitir a quantificação indireta da formação de biofilme através da coloração com cristal violeta. Após duas lavagens com água destilada, a placa foi colocada em temperatura ambiente até secar completamente. Para a dissolução do corante aderido ao biofilme, foi adicionado 200 µL de ácido acético 33%, permanecendo por 15 minutos. A suspensão obtida foi transferida para outra placa de 96 poços estéril e feito a medida da absorbância de cada poço com o auxílio do leitor de microplacas à 590nm.

### **6.6.2 *Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)***

Para execução do referido teste, a microplaca contendo os biofilmes crescidos foi retirada da estufa e submetida a três lavagens com água destilada estéril para possibilitar a remoção das células fracamente aderidas. Posteriormente, 200 µL de solução salina estéril a

0,9% foi adicionada aos poços da placa e submetida a banho ultrassônico (Sonicor/SC-52) por 6 minutos para liberação das células incrustadas no interior da substância polimérica extracelular. Assim, coletou-se o sobrenadante de 5 poços, sendo este reunidos em microtubos estéreis perfazendo um volume final de 1 mL. Em seguida, diluições seriadas na base dez foram realizadas em uma nova placa de poliestireno de 96 poços. Então, inoculou-se 3 gotas contendo 10 µL de cada suspensão bacteriana previamente diluída em placas de petri contendo BHI ágar, as quais foram após secagem das gotas, incubadas de maneira invertida em estufa a 37 °C com 10% CO<sub>2</sub> durante 24 horas, procedendo-se com a contagem do número de colônias para cada diluição inoculada. Considerando-se o tamanho reduzido das colônias de *S. oralis*, as placas contendo esta cepa foram contadas após 48 h de crescimento. Os resultados de todas as contagens foram expressos em UFC mL<sup>-1</sup>.

### **6.7 Curva do tempo de morte**

A curva do tempo de morte foi realizada como descrito anteriormente pelas diretrizes do NCCLS (agora conhecido como CLSI) com algumas alterações (NCCLS, 1999). A bactéria foi crescida até a fase log (18-24h) e a concentração das células no inóculo foi ajustada para 2x10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. O EEFGS foi ajustado para a concentração de duas vezes o valor de sua CIM sobre a respectiva bactéria. As quantidades da bactéria e do extrato dispensadas em cada poço foram semelhantes àquelas praticadas nos testes de determinação da CIM. Imediatamente ao preenchimento da placa e após 10, 30, 60, 720 e 1440 minutos, coletava-se o volume de 5 poços contendo a suspensão bacteriana em contato com o EEFGS e procedia-se com a diluição seriada em base 10. Em seguida, inoculava-se as amostras seguindo o mesmo procedimento que era executado para a enumeração das UFCs. Os resultados foram expressos como UFC mL<sup>-1</sup>. Os grupos controles utilizados nos ensaios da curva do tempo de morte são semelhantes aos utilizados nos ensaios para determinação da CIM.

### **6.8 Análise estatística dos ensaios microbiológicos**

Todos os experimentos foram realizados em triplicata com os respectivos resultados 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. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,001$ .

## **6.9 Ensaio de toxicidade com *Artemia sp.***

O ensaio de toxicidade foi realizado segundo a metodologia descrita por Veiga e Vital (2002). O cálculo da CL50 foi feito com auxílio do programa estatístico TSK (Trimmed Spearman-Kärber) tendo como nível de significância  $p < 0,05$  (HAMILTON, RUSSO; THURSTON, 1977). Após a obtenção dos valores de CL50, esses valores foram comparados por teste T de Student com dados não pareados, utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 2.0 para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre efeito tóxico do EEFGS.

### **6.9.1 Obtenção dos náuplios II**

Para obtenção dos náuplios de *Artemia sp.*, pesou-se 30 mg de cistos que foram hidratados durante uma hora em água destilada sob aeração constante. Esse procedimento permite que os cistos desidratados, que possuem forma bicôncava, passem a apresentar uma forma mais esférica e, então, permita uma maior ação do hipoclorito de sódio (agente desencapsulante). Após a hidratação, os cistos passaram por um tratamento com hipoclorito de sódio na concentração de 50%, sob agitação constante, até passarem da cor marrom para a cor alaranjada. O hipoclorito de sódio além de atuar na camada do córion, facilitando a eclosão, também promove a assepsia dos cistos. Ao atingirem a cor alaranjada os cistos foram imediatamente lavados com água corrente, sem deixar resíduos do agente desencapsulante e, depois, com água destilada, para que a solução de hipoclorito de sódio não atingisse o embrião, em seguida foram transferidos para um recipiente com fundo cônico com água do mar filtrada, recebendo aeração constante e, após 48 h, os náuplios estavam na fase II, prontos para serem utilizados nos testes de toxicidade (VEIGA; VITAL, 2002).

### **6.9.2 Teste de sensibilidade**

Foi realizado um teste de sensibilidade utilizando SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) para verificar se os organismos utilizados estavam dentro do padrão de sensibilidade descrito

(VEIGA; VITAL, 2002). Para esse procedimento, foram utilizadas diferentes concentrações, obtidas a partir da diluição de uma solução estoque de  $1,5 \text{ g L}^{-1}$ . Para controle do teste, foi utilizado apenas água do mar filtrada. O teste foi feito em triplicata e cada réplica recebeu 10 náuplios (fase II). Após 24 horas, com auxílio de uma lupa, os náuplios que demonstravam ausência de motilidade ou qualquer outro tipo de comportamento foram estimados como mortos (BIRGE; BLACK; WESTERMAN, 1985), e com a ajuda do programa estatístico TSK (Trimmed Spearman- Karber) tiveram a CL50 determinada.

### 6.9.3 Teste de toxicidade

O EEFGS foi solubilizado em água do mar, obtendo-se uma solução estoque na concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  e, a partir desta, foram realizadas diluições seriadas na base dois para obtenção de concentrações partindo de 1000 até  $15,62 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . O controle negativo foi feito com água do mar filtrada contendo DMSO a 4%. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e repetidos três vezes de forma independente. Em cada réplica, foram adicionados 10 náuplios de *Artemia sp.* Os ensaios foram realizados em placas de acrílico estéreis com 24 poços, sendo verificada a mortalidade dos náuplios a cada 24 horas. Para tanto, com o auxílio de uma lupa, os náuplios desprovidos de motilidade foram contados e submetidos ao programa estatístico TSK (Trimmed Spearman- Karber) para a determinação da concentração-teste que induz morte em 50% da população (CL50) (Figura 8). Para a aceitabilidade do teste, admitiu-se até 10% de mortalidade no controle (VEIGA; VITAL, 2002).

Figura 8- Representação esquemática do teste de toxicidade aguda com náuplios de *Artemia sp.*



Fonte: SILVA (2010)

## *Capítulo 7 – Resultados e Discussão*

---

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico

O Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento de produtos naturais aplicados à odontologia, visto que, apresenta uma grande diversidade vegetal e ampla sociodiversidade, a qual através da utilização de plantas medicinais permite o vínculo do conhecimento tradicional com o tecnológico, de modo a validar cientificamente este conhecimento (ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006).

Os estudos com produtos naturais têm relevância significativa, pois agregam benefícios à população e facilitam o acesso a plantas medicinais com atividades terapêuticas. Um dos principais fatores que tem engrandecido as pesquisas e potencializado a busca de plantas medicinais com fins terapêuticos em Odontologia é a constatação da atividade antimicrobiana de muitos desses vegetais, tendo em vista que as principais doenças da cavidade oral, cárie dentária e doenças periodontais, apresentam natureza infecciosa (CASTRO *et al.*, 2010).

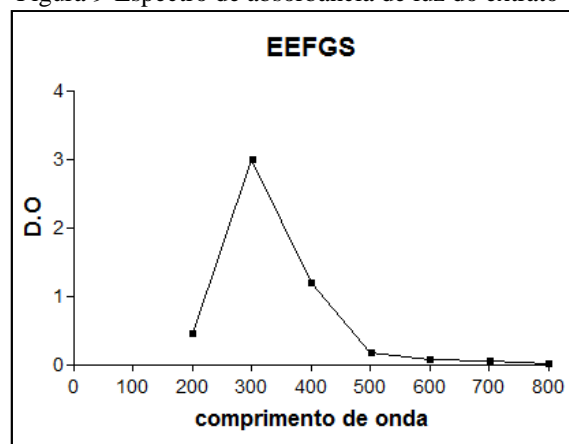
#### 7.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínimo (CBM)

Na avaliação preliminar da atividade antibacteriana foram utilizadas seis linhagens bacterianas cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, sendo: *Streptococcus oralis* ATCC 10557, *S. salivarius* ATCC 7073, *S. mutans* ATCC 25175, *S. sanguinis* ATCC 10556, *S. sobrinus* ATCC 6715 e *Streptococcus sp* ATCC 15300. Contudo, os experimentos prosseguiram somente com as cepas que foram sensíveis ao extrato bruto de *Guettarda sericea*.

De acordo com o NCCLS (2003) a CIM é a concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um micro-organismo no teste de sensibilidade. No presente estudo a técnica de microdiluição em caldo, utilizada para determinação da CIM, apresentou dificuldades no tocante à observação da turbidez causada pelo crescimento das células bacterianas. Isto ocorreu, provavelmente, devido à intensa turbidez apresentada pelo extrato testado, a qual era bastante visível quando este era disposto nos poços da microplaca e diluído pelo meio de cultivo utilizado. Desta forma, com a finalidade de verificar o espectro de absorção de luz do extrato realizou-se uma varredura nas

absorbâncias com emissão de luz partindo de 200 até 800 nm (Figura 9). Após análise de tal espectro observou-se que o pico de absorção ocorre em 300 nm. Considerando que o monitoramento do crescimento da célula bacteriana é realizado a 620 nm, espera-se que não haja interferência da turbidez inerente ao extrato. Esta dificuldade também foi encontrada por Eloff (1998) que utilizou a técnica de diluição em microplacas para verificar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais. Suas observações demonstraram inconveniências na técnica, como a precipitação de compostos presentes em alguns extratos, bem como o aparecimento da coloração verde característica da presença de clorofila.

Figura 9-Espectro de absorbância de luz do extrato



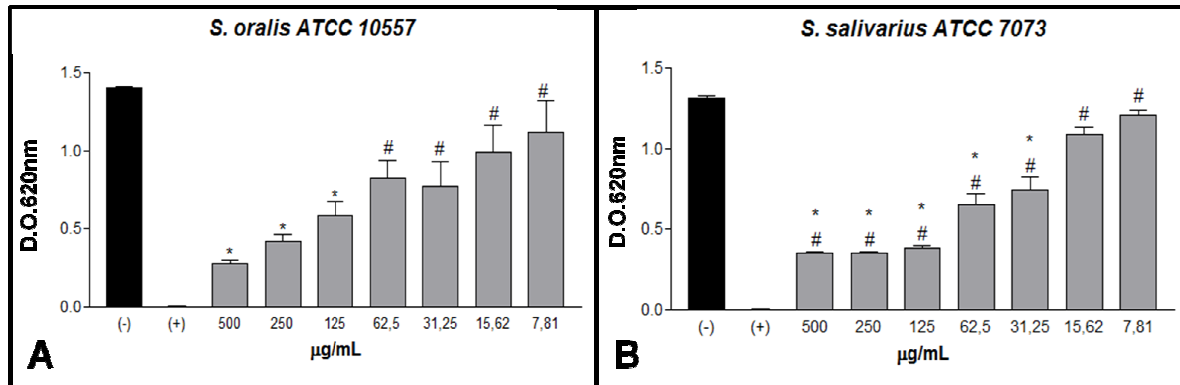
Fonte: Próprio autor

Considerando o que foi outrora exposto, a determinação da CIM visual foi comprometida. Entretanto, no sentido de superar esta dificuldade, realizaram-se ensaios de determinação da CIM mediante a verificação da absorbância a 620 nm. Os resultados estão dispostos em gráficos que comparam a absorbância dos poços contendo o grupo teste (extrato e bactéria) e a dos poços utilizados no controle da turbidez inerente ao extrato (extrato diluído em meio). Assim, a turbidez intrínseca do extrato foi subtraída daquela encontrada nos grupos teste.

O EEFGS interferiu significativamente no crescimento planctônico de *S. oralis* e *S. salivarius* (Figura 10A e 10B, p.52), quando comparado ao controle negativo. Já em comparação ao controle positivo, o grupo teste não se mostrou estatisticamente diferente, ou seja, o EEFGS teve efeito semelhante ao da clorexidina, substância corriqueiramente utilizada na clínica odontológica.

Com relação às outras cepas de *Streptococcus*, o EEFGS não apresentou atividade inibitória, mesmo nas concentrações mais elevadas (ANEXO).

Figura 10- Avaliação do efeito do EEFGS em diferentes concentrações sobre o crescimento planctônico de *S.oralis* e *S.salivarius*.



Fonte: Próprio autor. Substância teste (■), BHI com 4% DMSO (■) e Clorexidina (□). \* p < 0,001 estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, # p < 0,001 estatisticamente significativa em relação ao controle positivo, n=30.

Considerando que duas das principais estratégias para prevenir a cárie dental são inibir o crescimento dos estreptococos e/ou inibir a aderência dessas bactérias à superfície dos dentes (KOO *et al.*, 2002) é importante salientar que os resultados do presente trabalho mostram que o EEFGS consegue interferir no crescimento e provavelmente no metabolismo de duas espécies de *Streptococcus* que compõem a placa dental: *S. oralis* e *S. salivarius*.

Devido à observação e confirmação da CIM qualitativa ter sido prejudicada, fato este explicado anteriormente, optou-se por desconsiderar a CIM e utilizar somente os valores da Concentração Bactericida Mínima (CBM) (Tabela 3). Através da CBM foi possível determinar a quantidade mínima do agente antimicrobiano capaz de matar as células bacterianas. A CBM para *S.oralis* foi obtida na concentração de 125 µg mL<sup>-1</sup>, enquanto para *S. salivarius* observou-se crescimento das células bacterianas em todas as concentrações, logo, o EEFGS não tem característica bactericida para este micro-organismo. O resultado encontrado para *S. oralis* foi o mesmo de Sá e colaboradores (2012), quando na ocasião testava-se um diterpeno isolado de *Croton nepetaefolius*.

Tabela 3-Concentração Bactericida Mínima (CBM do EEFGS) e Concentração Inibitória Mínima (CIM da clorexidina)

Espécie	CBM do EEFGS	CIM da Clorexidina (CHX)
<i>S. oralis</i> ATCC 10557	125 µg mL <sup>-1</sup>	0,122 µg mL <sup>-1</sup>
<i>S. salivarius</i> ATCC7073	-	0,976 µg mL <sup>-1</sup>

Fonte: Próprio autor

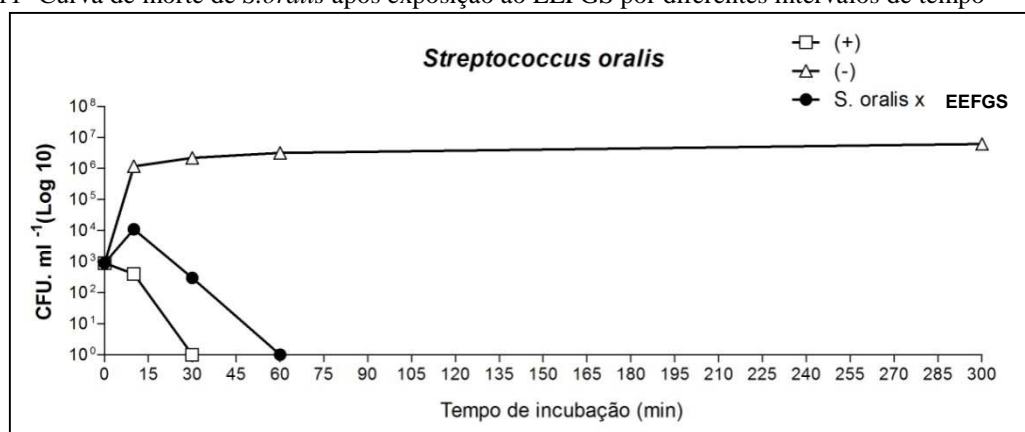
A exclusividade do presente trabalho pode ser evidenciada pelo fato de que, até o presente momento, não foi encontrado na literatura qualquer referência com relação à atividade antimicrobiana de *Guettarda sericea*. Segundo Miller (2011) existe, pelo menos,



500 compostos bioativos medicinalmente úteis, aguardando por descoberta em espécies de plantas, cujos constituintes químicos ainda não foram avaliados, conseqüentemente a biodiversidade vegetal representa uma fonte pouco explorada de princípios ativos que podem potencialmente tratar e curar doenças.

Considerando que o EEFGS apresentou CBM sobre *S. oralis*, avaliou-se detalhadamente o *momentum* de ação do referido extrato, a partir da realização da curva de morte da cepa após exposição em diferentes intervalos de tempo (Figura 11). O resultado apresentado é bastante significativo, visto que a atividade bactericida do EEFGS sobre a cepa de *S. oralis* iniciou-se logo após 15 minutos de incubação. Neste ponto, observou-se redução de 2  $\log_{10}$  UFC mL<sup>-1</sup> do inóculo inicial, atingindo a redução de 6  $\log_{10}$  UFC mL<sup>-1</sup> após 60 minutos, quando comparado ao controle negativo.

Figura 11- Curva de morte de *S.oralis* após exposição ao EEFGS por diferentes intervalos de tempo



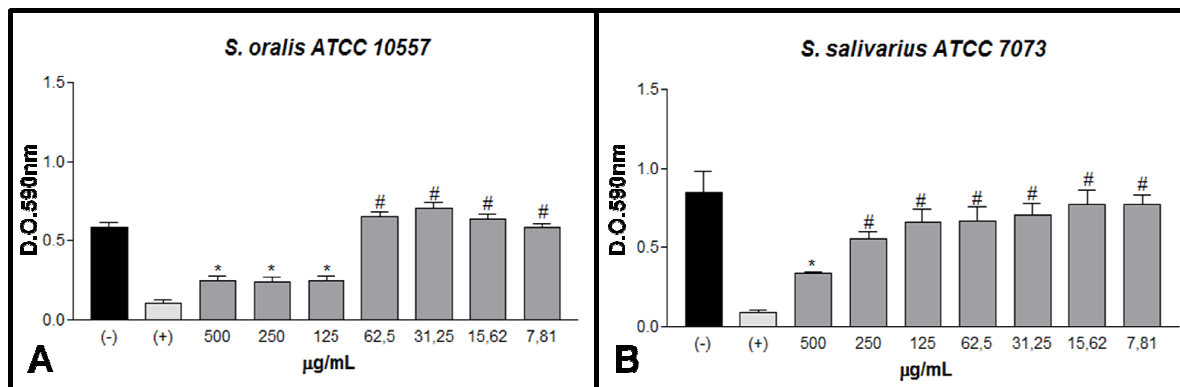
Fonte: Próprio autor

De acordo com a curva de morte, o EEFGS teve ação bactericida frente às colônias de *S. oralis*, logo após 60 minutos de contato. A literatura relata que o efeito bactericida pode ser observado pela diminuição de 3  $\log_{10}$  UFC mL<sup>-1</sup> ou 99% de morte celular, à partir do inóculo inicial, sobre um tempo determinado (MAY *et al.*, 2000; SHELBURNE *et al.*, 2004). Por outro lado, Jones e colaboradores (2002) consideram significativamente satisfatória, a cinética bactericida de um produto, quando este é capaz de reduzir o inóculo inicial, para valores iguais ou superiores a 2  $\log_{10}$  UFC mL<sup>-1</sup> em um tempo menor ou igual a 24 horas de incubação, e consideram graus menores de morte celular como efeito bacteriostático.

### 7.1.2 Quantificação de biomassa do biofilme por Cristal Violeta (CV)

O EEFGS foi testado com o intuito de demonstrar a sua capacidade de prevenir a formação *in vitro* de biofilmes monomicrobianos de *S. oralis* e *S. salivarius*. Tais biofilmes foram quantificados através do método do cristal violeta. Os resultados mostraram que EEFGS diminuiu significativamente a formação do biofilme de *S. oralis*, quando comparado ao controle negativo. Por outro lado, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada quando o EEFGS, em concentrações de 500-125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , foi comparado ao controle com clorexidina (Figura 12A). Com relação aos ensaios envolvendo *S. salivarius*, o EEFGS interfere na formação do biofilme apenas na maior concentração testada, a qual, inclusive, não apresentou diferença estatisticamente significativa da clorexidina (Figura 12B).

Figura 12- Avaliação do potencial antimicrobiano de diferentes concentrações do EEFGS sobre a formação de biofilmes de *S. oralis* (A) e *S. salivarius* (B).



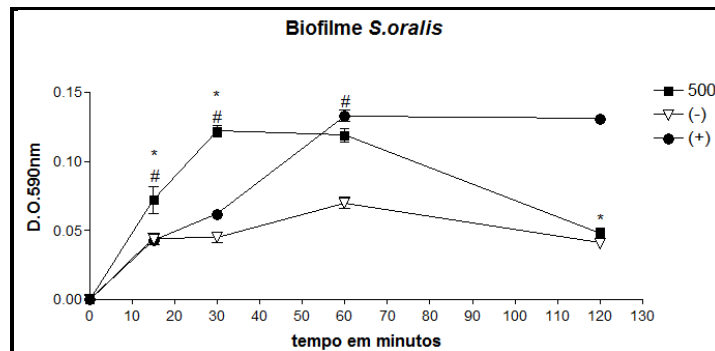
Fonte: Próprio autor. Substância teste (■), BHI com 4% DMSO (■) e Clorexidina (□). \*  $p < 0,001$  estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, #  $p < 0,001$  estatisticamente significativa em relação ao controle positivo,  $n=30$ .

Os biofilmes são formas mais resistentes de vida microbiana quando comparados à forma planctônica. Tal resistência está diretamente relacionada às características naturais de sobrevivência das células microbianas que vivem nestes tipos de comunidades. Dentre estas características, destacam-se o crescimento mais lento das células associadas ao biofilme, comparando-se com as em estado planctônico, além da baixa regulação de processos celulares causada, principalmente, por um contato menor das células no interior do biofilme com nutrientes externos. Em adição, para sua proteção, essas bactérias produzem uma matriz extracelular polissacarídica que dificulta a ação de agentes antimicrobianos, justificando ainda mais sua resistência, uma vez que essa matriz age como uma barreira de difusão para pequenas moléculas (ANDERSON e O'TOOLE, 2008; HALL-STOODLEY e STOODLEY, 2009).

Poucos estudos relatam a influência dos agentes antimicrobianos nos estágios iniciais da formação do biofilme. Isto por si só suporta a ideia de pesquisar produtos naturais que inibam a formação do biofilme de colonizadores primários. *Streptococcus sanguis*, *S. mitis* e *S. oralis* tem função essencial no início dos depósitos microbianos nas superfícies dos dentes, pois são os primeiros colonizadores na superfície dental, e aparentemente, atuam como receptores dos micro-organismos que se acumulam para formar o biofilme cariogênico (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 2005).

Com relação ao efeito do EEFGS sobre a biomassa de *S. oralis*, as concentrações de 125-500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  apresentaram-se tão efetivas quanto a clorexidina, apesar da existência de um grande conteúdo de biomassa residual. Com a finalidade de confirmar se essa biomassa residual é constituída por células viáveis ou apenas por substância polimérica extracelular, o biofilme de *S. oralis* foi formado em contato com o EEFGS em diferentes tempos (0, 15, 30, 60 e 120 minutos) (Figura 13). Os resultados mostraram que existe um aumento brusco na absorvância nos tempos iniciais, possivelmente refletindo a presença de polissacarídeos produzidos a partir da sacarose que é adicionada ao meio de crescimento de *S. oralis*. Após esse período, a quantificação da biomassa apresentou redução, até atingir com 120 minutos valores estatisticamente iguais aos do controle positivo.

Figura 13- Avaliação da biomassa formada por *S.oralis* quando em contato com o EEFGS em diferentes intervalos de tempo.



Fonte: Próprio autor. \*  $p < 0,001$  estatisticamente significante em relação ao controle negativo (BHI com 4% de DMSO); #  $p < 0,001$  estatisticamente significante em relação ao controle positivo (Clorexidina),  $n=18$ .

A partir de sacarose, cepas bacterianas produzem polissacarídeo extracelular (PEC), que tem como função promover a aglutinação bacteriana ao dente, formando a placa bacteriana. *S. oralis*, *S. gordonii*, e *S. sanguis* são conhecidos por possuir *Glicosiltransferases* (GTases) e produzir polissacarídeo extracelular a partir de sacarose (WILLCOX, PATRIKAKIS e KNOX, 1995). *S. oralis* é um colonizador primário da flora bucal, e, sua presença afeta o potencial de infecção e colonização de *Streptococos mutans*, devido a síntese

de glucano pela GTase, funcionando como um substrato para a adesão das bactérias. Além disso, a prevalência de estreptococos do grupo *sanguis* é diferente em indivíduos com placa dental cariogênica, pois a aderência de *S. mutans* depende de GTases, sacarose e também de *S. oralis* (FUJIWARA *et al.*, 2000).

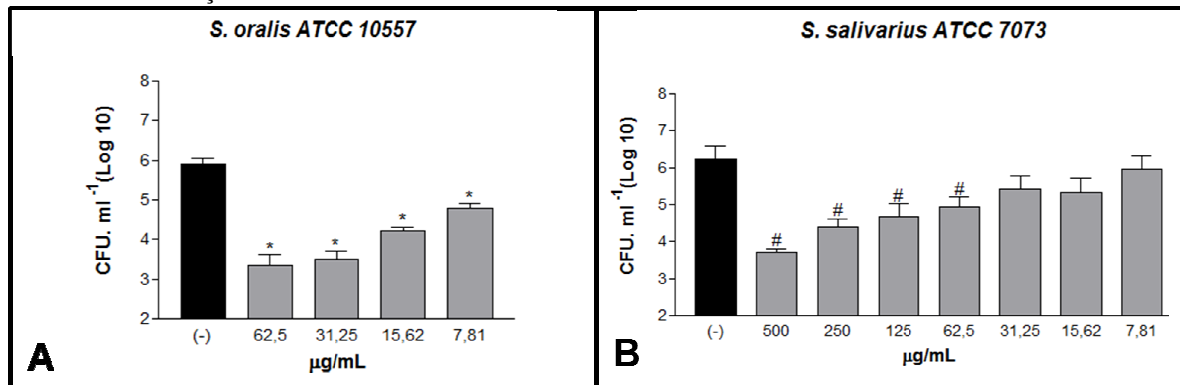
### 7.1.2.1 Enumeração das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

A contagem das unidades formadoras de colônias foi realizada em todas as concentrações, pois, a quantificação da biomassa realizada através do método do CV, tanto nos tempos após 24h, quanto em diversos intervalos de tempo de contato, demonstraram significativa absorbância. Os resultados encontrados no que tange a este ensaio são mostrados na Figura 14.

Após a enumeração das células viáveis, observou-se que nas concentrações de 125-500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , o EEFGS quando em contato com *S. oralis*, apresentou atividade bactericida, pois não houveram colônias viáveis para contagem, e as demais concentrações promoveram uma redução significativa na contagem de UFCs, quando comparado com o controle negativo (Figura 14A).

Estes dados mostram-se semelhantes ao encontrado nos ensaios de determinação da CIM e CBM, nos quais a atividade antimicrobiana foi expressa nas maiores concentrações do EEFGS (125-500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), exercendo desta forma, atividade em modelo dose-resposta. *S. oralis* mostrou alta susceptibilidade ao agente teste, o qual, na concentração de 7,81  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi capaz de reduzir de forma significativa a quantidade de células bacterianas viáveis.

Figura 14- Contagem das UFCs de *S. oralis* (A) e *S. salivarius* (B) quando em contato com o EEFGS em diferentes concentrações.



Fonte: Próprio autor. Substância teste (■), BHI com 4% DMSO (■), \*  $p < 0,001$  estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, #  $p < 0,001$  estatisticamente significativa em relação ao controle negativo,  $n=18$ .

*S. salivarius*, muito embora tenha evidenciado potencial resistência frente ao EEFGS, teve a sua quantidade de células viáveis diminuída pelo mesmo. Na concentração de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , o extrato reduziu em aproximadamente 60% o número de células viáveis (Figura 14B, p.56).

A contagem das UFCs de *S. oralis* confirmou que o EEFGS tem efeito bactericida, inibindo a viabilidade celular; e a absorbância no método do CV deu-se pela coloração das células mortas e da matriz extracelular, geradas como consequência da atividade metabólica no biofilme. A coloração de violeta de cristal (CV) foi primeiramente descrita por Christensen em 1985 e, desde então, é utilizado para quantificar a biomassa do biofilme no poço inteiro em placas de poliestireno (STEPANOVIC *et al.*, 2007). O cristal violeta é um corante básico, que se liga às moléculas carregadas negativamente, incluindo moléculas de superfície e polissacarídeos da matriz extracelular em biofilmes maduros. Neste método tanto as células vivas, quanto células mortas, bem como a matriz extracelular são marcadas pelo corante, por esse motivo, este método é pouco adequado para avaliar a morte de células do biofilme (LI, YAN e XU, 2003).

Não se sabe ao certo qual o mecanismo de ação do EEFGS sobre o crescimento de *S. oralis*, porém segundo KIM e colaboradores (2008), o metabolismo anticárie de agentes antimicrobianos naturais pode ser classificado em dois mecanismos: primeiramente pela destruição da integridade da parede celular bacteriana, e segundo através da inibição da aderência bacteriana, sem efetivamente ter efeito bactericida.

## **7.2 Avaliação da atividade antibacteriana das frações do extrato etanólico**

Devido a natureza complexa do extrato, existiu uma dificuldade em atribuir à atividade observada a qualquer componente presente no mesmo. Portanto, para se obter uma noção do modo de ação do EEFGS se fez necessário examinar separadamente cada fração do extrato, com a finalidade de adquirir constituintes químicos que possuam ação inibitória sobre *S.oralis*.

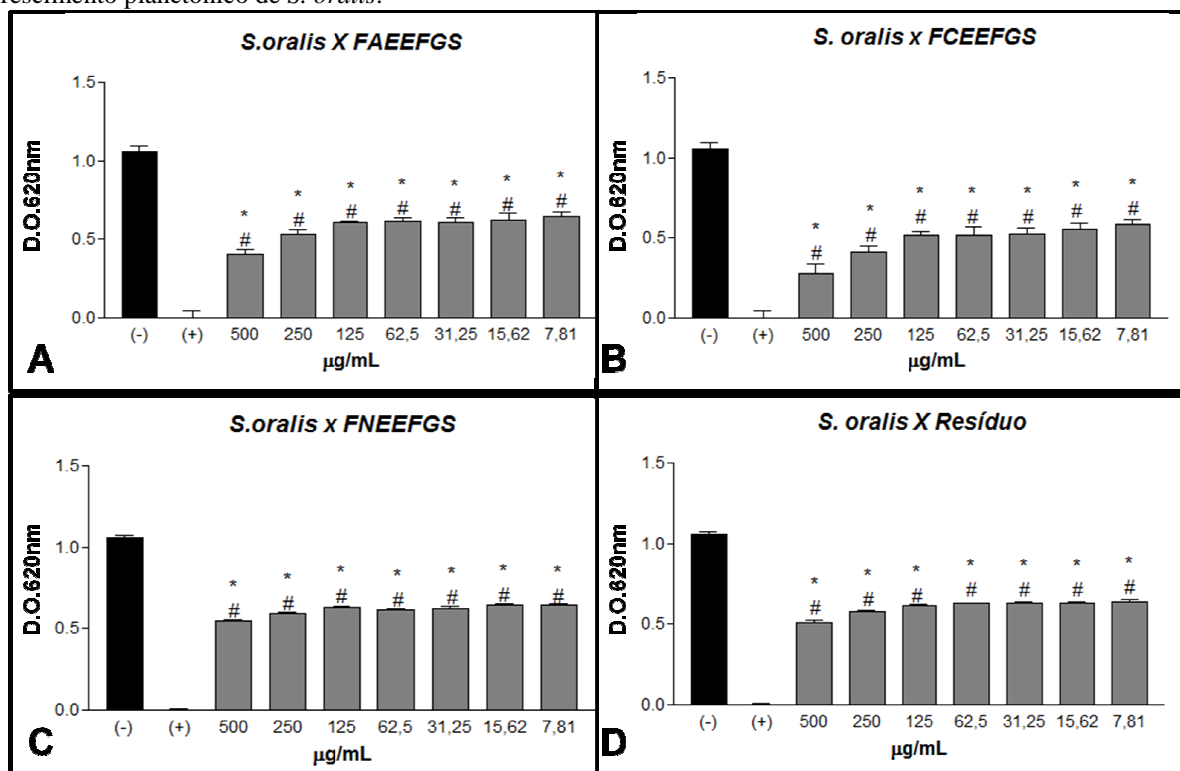
O EEFGS foi fracionado através de coluna cromatográfica utilizando solventes de polaridade crescentes (hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol). Neste processo, os solventes retiram da mistura, em etapas sucessivas, grupos de substâncias de solubilidade semelhante. A técnica de fracionamento é estratégia que propicia a investigação das diversas substâncias presentes no extrato bruto, possibilitando a separação dos componentes do extrato segundo suas solubilidades nos solventes utilizados. (BARBOSA *et al.*, 2004).

Após a obtenção de cinco frações, apenas quatro frações (FAEEFGS/ FCEEFGS/ FNEEFGS/ REEFGS) foram submetidas a teste frente às células planctônicas de *S. oralis* e *S. salivarius*, devido somente estas serem solúveis em DMSO 4%.

### 7.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínimo (CBM)

Todas as frações do extrato apresentaram interferência no crescimento de *S. oralis* (Figura 15), contudo nenhuma fração apresentou inibição visual. A FCEEFGS demonstrou ser a mais efetiva exercendo maior redução no crescimento planctônico, aproximadamente 75% na concentração de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 15B), o que sugere que existem compostos com ação antimicrobiana nesta fração do extrato.

Figura 15- Análise do potencial antimicrobiano das frações do EEFGS em diferentes concentrações sobre o crescimento planctônico de *S. oralis*.

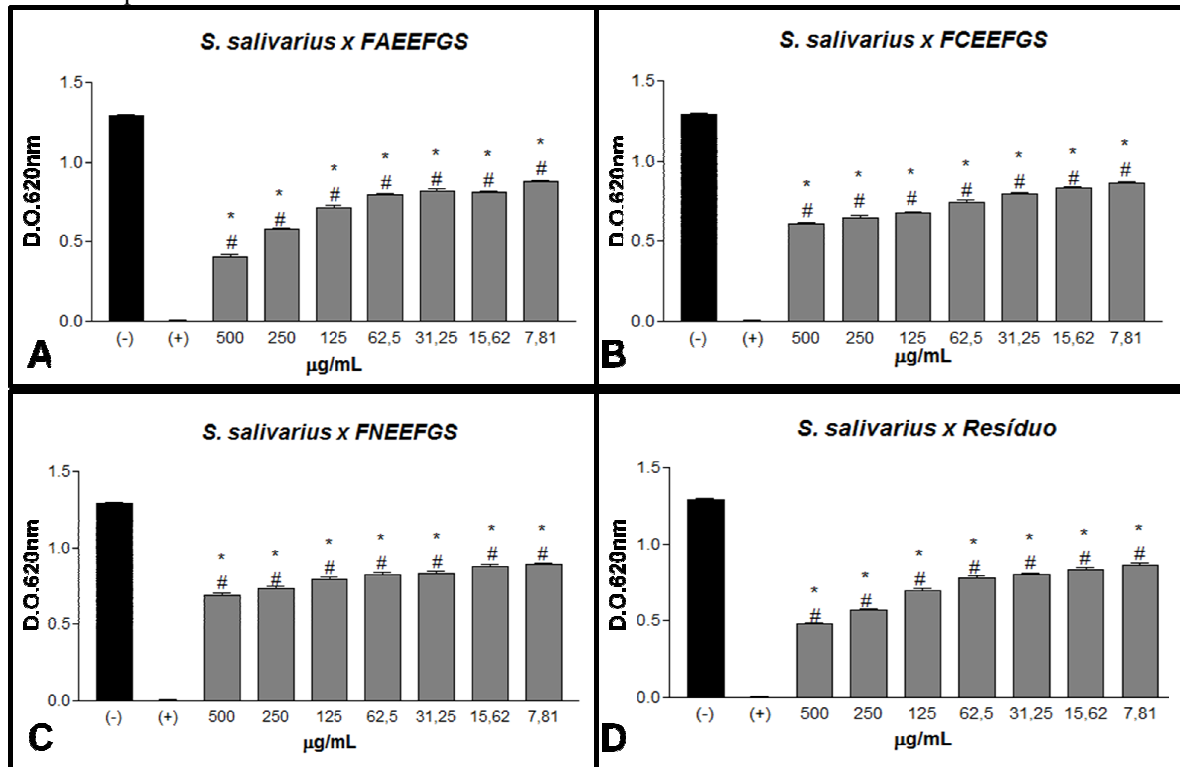


Fonte: Próprio autor. Substância teste (■ BHI com 4% DMSO (■) e Clorexidina (□). \*  $p < 0,001$  estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, #  $p < 0,001$  estatisticamente significativa em relação ao controle positivo,  $n=18$ . FAEEFGS: fração acetato do extrato etanólico das folhas de *G.sericea*; FCEEFGS: fração clorofórmio; FNEEFGS: fração n-butanol.

No que concerne à espécie *S. salivarius*, a mesma se mostrou susceptível a todas as frações testadas (Figura 16, p.59). Contudo, a concentração de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  da FAEEFGS,

da FCEEFGS e do Resíduo foram capazes de reduzir, respectivamente em 69%, 53% e 63% o crescimento desta bactéria (Figura 16A, 16B e 16D).

Figura 16- Análise do potencial antimicrobiano das frações do EEFGS em diferentes concentrações sobre o crescimento planctônico de *S. salivarius*.



Fonte: Próprio autor. Substância teste (■), BHI com 4% DMSO (■) e Clorexidina (□). \*  $p < 0,001$  estatisticamente significante em relação ao controle negativo, #  $p < 0,001$  estatisticamente significante em relação ao controle positivo,  $n=18$ . FAEEFGS: fração acetato do extrato etanólico das folhas de *G.sericea*; FCEEFGS: fração clorofórmio; FNEEFGS: fração n-butanol.

As plantas por conterem milhares de componentes são uma excelente fonte para pesquisas de compostos com atividade antimicrobiana. A escolha correta dos solventes e dos métodos de avaliação da atividade antimicrobiana é fundamental para o isolamento e identificação dos compostos com atividade biológica (OSTRSKY *et al.*, 2008; DAS, TIWARI e SHRIVASTAVA, 2010).

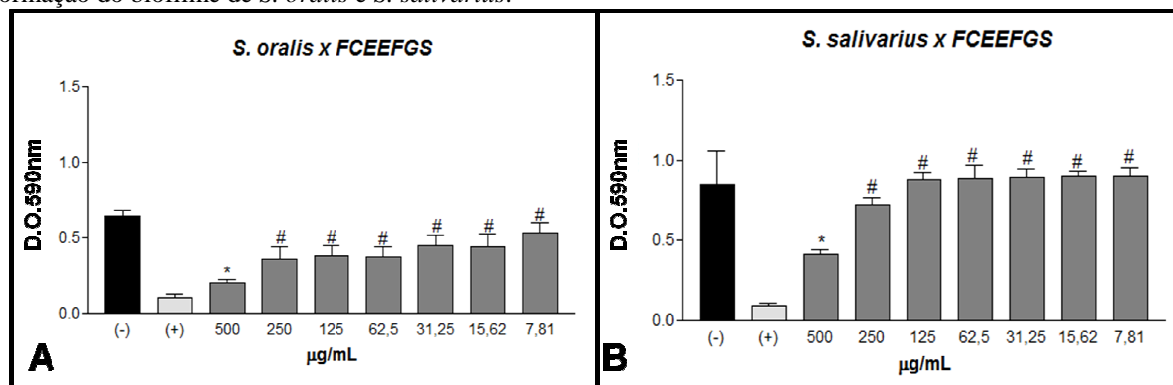
### 7.2.2 Quantificação de biomassa do biofilme por Cristal Violeta (CV)

Embora nenhuma das frações tenha inibido totalmente o crescimento planctônico das bactérias, a FCEEFGS demonstrou nesta triagem ser a fração mais ativa e foi a fração escolhida para prosseguir com as atividades antimicrobianas.

*S. oralis* se mostrou mais susceptível à atividade antibiofilme da FCEEFGS, achado semelhante ao encontrado nos ensaios de atividade antimicrobiana (Figura 17A, p.60), observando-se uma redução de cerca de 70% na formação do biofilme, quando comparado ao

controle negativo, e em relação ao controle positivo não apresentou diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Em relação à formação do biofilme monoespécie de *S. salivarius* quando em contato com FCEEFGS, reduziu em 51,6% do seu biofilme (Figura 17B).

Figura 17- Avaliação do potencial antimicrobiano das frações EEFGS diferentes concentrações sobre a formação do biofilme de *S. oralis* e *S. salivarius*.



Fonte: Próprio autor. Substância teste (■), BHI com 4% DMSO (■) e Clorexidina (□). \*  $p < 0,001$  estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, #  $p < 0,001$  estatisticamente significativa em relação ao controle positivo,  $n=18$ . FCEEFGS: fração clorofórmio do extrato etanólico das folhas de *G.sericea*.

### 7.3 Avaliação da atividade antibacteriana da FCEEFGS

A busca por novos agentes com ação sobre patógenos orais tem estimulado a pesquisa com produtos de origem natural, incluindo as plantas medicinais. Uma grande porcentagem das novas moléculas descobertas, com vistas à sua introdução na indústria farmacêutica, provém de constituintes isolados a partir do fracionamento dos extratos brutos de plantas e/ou derivados semissintéticos (NEWMAN e CRAGG, 2007).

#### 7.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A partir dos resultados do fracionamento do EEFGS, a fração clorofórmica, por ser responsável pela atividade antimicrobiana, foi fracionada com o intuito de investigar as diversas substâncias presentes na mesma, o que possibilitou a separação dos componentes do extrato segundo suas solubilidades nos solventes utilizados (BARBOSA *et al.*, 2004). Utilizando um gradiente crescente de polaridade constituído de hexano/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ ; AcOEt, seguido de MeOH, obteve-se o total de 33 subfrações, que foram reunidas em 18 grupos de acordo com a razão de frente. Os experimentos foram realizados apenas com os grupos que apresentaram massa suficiente para a realização dos mesmos.

A determinação da CIM visual dos grupos das subfrações, bem como os valores de CBM, foi estabelecida como mostrado nas Tabelas 4 e 5, p. 61.



Tabela 4- Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos grupos da FCEEFGS frente a *S. oralis*.

GRUPOS	CIM	CBM
9	-	-
11	-	-
12	500 $\mu\text{g mL}^{-1*}$	-
13	250 $\mu\text{g mL}^{-1*}$	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$
14	250 $\mu\text{g mL}^{-1*}$	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$
15	62,5 $\mu\text{g mL}^{-1*}$	125 $\mu\text{g mL}^{-1}$
16	250 $\mu\text{g mL}^{-1*}$	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$
17	250 $\mu\text{g mL}^{-1*}$	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$
18	500 $\mu\text{g mL}^{-1*}$	-

Fonte: Próprio autor. \*  $p < 0,001$  estatisticamente significante em relação ao controle negativo (BHI com DMSO 4%), n=18.

Dos nove grupos analisados frente a *S. oralis*, os grupos 13, 14, 15, 16 e 17 apresentaram melhor atividade, destacando-se o grupo 15 que possuiu valor de CIM igual a 62,5 e CBM igual a 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Apesar dos outros grupos possuírem valores de CIM variando entre 250 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , todos apresentaram ação bactericida na concentração de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com exceção dos grupos 9 e 11 que demonstraram ação bacteriostática frente a *S.oralis*. No caso dos grupos que apresentaram frações ativas, estas demonstraram maior atividade do que a fração FCEEFGS que as originou.

Todos os grupos avaliados frente a *S. salivarius* (Tabela 6) não apresentaram ação antibacteriana, com exceção do grupo 12, que obteve valor de CIM igual a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , mostrando-se bacteriostático. É possível que o extrato da planta contenha constituintes antibacterianos em concentrações não suficientes para ser efetivo contra essa bactéria. Entretanto, novos testes devem ser conduzidos utilizando outras espécies bacterianas para comprovação da ausência de atividade antimicrobiana desta planta frente a cepas de *Streptococcus*.

Tabela 5- Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos grupos da FCEEFGS frente a *S. salivarius*.

GRUPOS	CIM	CBM
9	-	-
11	-	-
12	500 $\mu\text{g mL}^{-1*}$	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	-	-

Fonte: Próprio autor. \*  $p < 0,001$  estatisticamente significante em relação ao controle negativo (BHI com DMSO 4%), n=18.

Os valores de CIM das frações antibacterianas testadas possuem de moderada a boa atividade biológica, de acordo com a classificação da atividade antibacteriana das frações vegetais proposta por Dalmarco (2010), onde as amostras que apresentam valores de concentração inibitória mínima (CIM) abaixo de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  são classificadas com atividade excelente, CIM entre 10 e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  com atividade boa, CIM entre 100 e  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  com atividade moderada, CIM entre 500 e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  com atividade fraca e CIM acima de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  são inativos.

Os resultados das CBM, assim como os da CIM evidenciaram a possibilidade de mais de um componente ativo estar presente no EEFGS e/ou frações, e esses componentes podem apresentar atividades distintas contra as bactérias avaliadas, além disso, os resultados do CBM das frações mais ativas refletem com maior precisão o potencial microbicida do extrato e das frações isoladas de *G. sericea*.

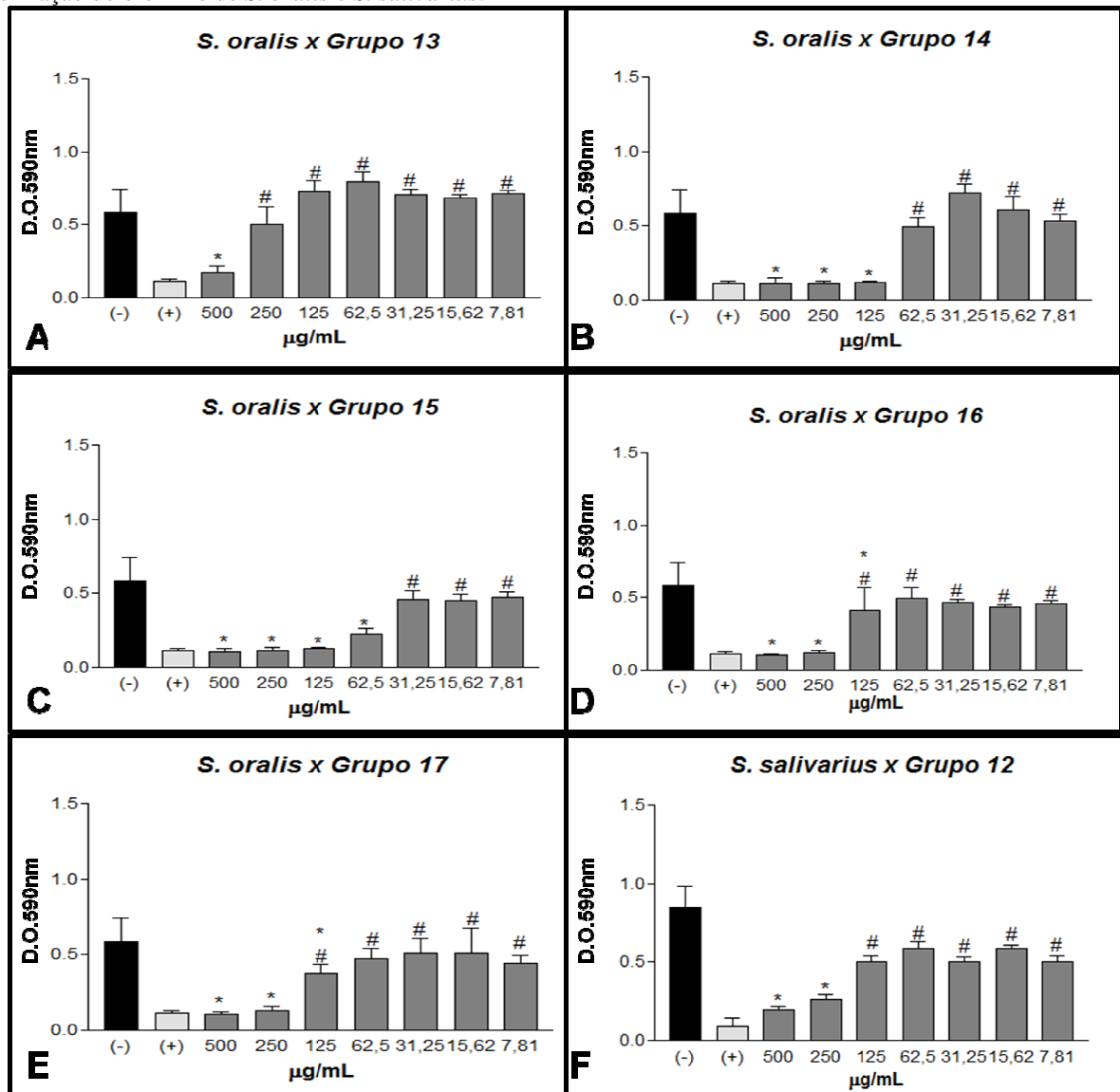
Os compostos sintetizados pelas plantas durante o metabolismo secundário apresentam diversas propriedades biológicas, por serem de natureza tóxica para bactérias e fungos fitopatogênicos. Neste estudo destacamos a ação antibacteriana, que tem sido foco de inúmeras pesquisas no mundo inteiro devido ao aumento dos casos de resistência bacteriana às drogas antimicrobianas (SCHELZ e HOHMANN, 2006).

### **7.3.2 Quantificação de biomassa do biofilme por Cristal Violeta (CV)**

A quantificação da biomassa do biofilme ocorreu apenas com as frações ativas, identificadas a partir da determinação do CIM, realizado anteriormente. Para *S. oralis* os grupos 13, 14, 15, 16 e 17 e para *S. salivarius* o grupo 12 (Figura 18, p.63).

A interferência das frações mais ativas sobre a formação do biofilme de *S. oralis* permaneceu, tendo o grupo 15 a ação mais expressiva nas concentrações  $500-62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , quando comparado ao controle negativo ( $p < 0,001$ ), além de ser estatisticamente igual ao controle positivo ( $p > 0,05$ ). O grupo 12, testado na formação do biofilme de *S. salivarius*, também interferiu no crescimento desta bactéria na forma sésil. Estas atividades demonstraram a presença de compostos ativos com atividade bactericida promissora frente a colonizadores primários do dente, além disso, os grupos contendo as frações ativas mantiveram a atividade do extrato (grupo 14, 16 e 17) ou apresentaram atividade superior (grupo 15).

Figura 18- Avaliação do potencial antimicrobiano dos grupos da FCEEFGS em diferentes concentrações sobre a formação do biofilme de *S. oralis* e *S. salivarius*.



Fonte: Próprio autor. Substância teste (■), BHI com 4% DMSO (■) e Clorexidina (□). \*  $p < 0,001$  estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, #  $p < 0,001$  estatisticamente significativa em relação ao controle positivo.

Não foi possível o isolamento dos compostos responsáveis pela atividade antibacteriana demonstrada nos testes, mesmo após a partição do EEFGS e de suas frações. Porém, a partir dos dados encontrados podemos supor que, no EEFGS e na FCEEFGS, existem vários tipos de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana contra *S. oralis*, pois o efeito bactericida permanece em vários grupos da FCEEFGS. Esse fato pode ser constatado, pois, embora uma planta possa conter centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. A análise de substâncias ativas é muito mais complexa e longa, já

que geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos (VIEGAS JR, BOLZANI e BARREIRO, 2006).

As plantas medicinais apresentam inúmeros compostos ativos que as tornam importantes para a busca de novos usos terapêuticos. Considerando-se que novos produtos de origem natural com atividade sobre patógenos orais podem ser de grande importância para prevenção e controle de doenças bucais infecciosas, incluindo a cárie dental, estudos recentes apresentaram efeitos de extratos e seus compostos bioativos sobre fatores de virulência de *Streptococci*, apresentando potencial antimicrobiano e anticárie (KOO *et al.*, 2000; DUARTE *et al.*, 2006).

Estudos com a espécie *Guettarda sericea* com atividade antibacteriana são inexistentes. No entanto, observa-se atividade antimicrobiana de extratos de outras espécies de *Guettarda* como, *G. speciosa* cujos extratos etanólico e o clorofórmio são potentes antibacterianos contra *Staphylococcus aureus* e *E.coli* (THAMIZHVANAN *et al.*, 2010); *G. virburnoides* que possui atividade antibacteriana frente a *Mycobacterium kansasii* (RAMOS *et al.*, 2008); e *G. angélica* que demonstrou efeito bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BISPO, FRANCISCO e SCHIMITT, 2007).

#### 7.4 Teste de Toxicidade

O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto é considerado um ensaio preliminar no estudo de compostos com potencial antimicrobiano. Estudos relatam que a *Artemia sp.* é utilizada para determinar toxicidade de produtos naturais e químicos, considerando que estas larvas apresentam sensibilidade a substâncias tóxicas (SANTOS *et al.*, 2003; KRISHNARAJUA *et al.*, 2005).

Após avaliação pelo teste de toxicidade contra *Artemia sp.*, por um o tempo de exposição de 24h (CL50), obteve-se o valor médio CL50 de 310,79  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A concentração letal média CL50 foi menor que 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , o que indica a possibilidade de realização de testes clínicos (COSTA *et al.*, 2007).

A maioria das plantas produzem muitos compostos biologicamente ativos como parte normal de seu crescimento e desenvolvimento ou em resposta ao ataque de patógenos ou estresse, dentre esses compostos destacam-se: antimicrobianos, alelopáticos, antioxidante e propriedades bio-reguladoras (SGARIGLIA *et al.*, 2011). No entanto o uso de produtos naturais também pode resultar em efeitos tóxicos, o que salienta a necessidade de compreender os efeitos biológicos de compostos naturais (LIMA *et al.*, 2006).

## *Capítulo 8 – Conclusões*

---

## 8 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pôde-se concluir que o extrato etanólico e suas frações apresentaram atividade antimicrobiana contra dois colonizadores primários. Tendo o EEFGS efeito bactericida sobre o crescimento planctônico de *S. oralis* após 60 minutos de contato.

Através do fracionamento do EEFGS foi possível a determinação de frações ativas contra *S. oralis*, com maior destaque para as subfrações 13 a 17 da fração clorofórmio, sendo capazes de inibir o crescimento planctônico, bem como o desenvolvimento do biofilme. Com relação a *S. salivarius*, apenas a subfração 12 interferiu no crescimento bacteriano.

Com base no teste de toxicidade, é possível afirmar que as concentrações com efeito antibacteriano do EEFGS, não revelaram ação tóxica. Em adição, metodologias complementares que busquem a purificação dos compostos ativos e seus efeitos citotóxicos sobre células eucarióticas necessitam ser realizadas, visando sua utilização como um agente fitoterápico.

## *Referências Bibliográficas*

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEE, T. *et al.* Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 22, n. 2, p. 1-8, apr. 2011.

ABIFISA. **Informações sobre os fitoterápicos brasileiros**, 2008. Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br>>. Acesso em: 15 janeiro 2013.

ACHILLE, F. *et al.* Polyphyly in *Guettarda L.* (Rubiaceae, *Guettardeae*) based on nrDNA ITS sequence data. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 93, n. 1, p. 103-121, may. 2006.

ADERINOKUN, G. A.; LAWOYIN, J. O.; ONYEASO, C. O. Effect of two common Nigerian chewing sticks on gingival health and oral hygiene. **Odontostomatol. Trop.**, v. 22, n. 87, p. 13-18, sept. 1999.

AGRA, M. F. *et al.* Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 3, p. 472-508, july/sept. 2008.

AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 1, p. 114-140, jan./mar. 2007.

AIDI, W. W. *et al.* Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food Chem. Toxicol.**, v. 48, n. 5, p. 1362-1370, may. 2010.

AJDIC, D. *et al.* Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 22, p. 14434-14439, oct. 2002.

ALAM, M. A. *et al.* Antidiarrhoeal property of the hydroethanolic extract of the flowering tops of *Anthocephalus cadamba*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 2, p. 155-159, apr./june 2008.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 678-689, dez. 2006.

AMOIAN, B. *et al.* *Salvadora persica* extract chewing gum and gingival health: improvement of gingival and probe-bleeding index. **Complement. Ther. Clin. Pract.**, v. 16, n. 3, p. 121-123, aug. 2010.

ANDERSON, G. G.; O'TOOLE, G. A. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.322, p. 85-105, 2008.



ANKOLA, A. V.; HEBBAL, M.; MOCHERLA, M. A review of efficacy of various modes of chlorhexidine delivery. **J. Oral Biosci.**, v. 50, n. 4, p. 239-242, oct. 2008.

ARAÚJO, J. C. L. V. *et al.* Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre micro-organismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, n. 1, p. 55-64, jan./jun. 2004.

BADIHI-HAUSLICH, L. *et al.* The adhesion of oral bacteria to modified titanium surfaces: role of plasma proteins and electrostatic forces. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 13, p. 21-32, dec. 2011.

BAGG, J.; SILVERWOOD, R. W. Coagglutination reactions between *Candida albicans* and oral bacteria. **J. Med. Microbiol.**, v. 22, n. 2, p. 165-169, sept. 1986.

BARBOSA, W. L. R. *et al.* **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais**. 2. ed. Pará: Revista Científica da UFPA, v. 4, 2004.

BARROS, A. V. *et al.* *In vitro* evaluation of the antiviral potential of *Guettarda angelica* against animal herpesviruses. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 4, p. 1068, July 2012.

BEER, D.; STOODLEY, P. Prokaryotes. In: Dworkin, M. *et al.* **Microbial Biofilms in Prokaryotes**. 2 ed. New York: Springer, 2006. 904–937 p.

BEIKLER, T.; FLEMMIG, T. F. Oral biofilm-associated diseases: trends and implications for quality of life, systemic health and expenditures. **Periodontol.**, v. 55, n. 1, p. 87-103, feb. 2011.

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extract of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativa*). **Food Science & Technology**, v. 37, n. 2, p. 263-268, 2004.

BERTUCCI, A. *et al.* Prospección química del bosque de galería del río Uruguay. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 1, p. 21-25, enero/marzo 2008.

BIRGE, W. J.; BLACK, J. A.; WESTERMAN, A.G. Short-term fish and amphibian tests for determining the effects of toxicant stress on early life stages and estimating chronic values for single compounds and complex effluents. **Environment Toxicology and Chemistry**, v. 49, p. 808-810, 1985.

BISPO, N. J.; FRANCISCO, N. M. A. C.; SCHIMITT, A. C. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos da planta *Guettarda angelica* sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Laes & Haes**, v. 168, n. 1, p. 164-169, set. 2007.

BLACK, C. *et al.* Biofilm-specific surface properties and protein expression in oral *Streptococcus sanguis*. **Arch. Oral Biol.**, v. 49, p. 295-304, apr. 2004.

- BOLZANI, V. S. *et al.* Secondary metabolites from Brazilian Rubiaceae plant species: chemotaxonomical and biological significance. **Recent Res. Devel. Phytochem.**, v. 5, p. 19-31, 2001.
- BORBA, A. N.; MACEDO, M. Plantas medicinais usadas em saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 20, n. 4, p. 771-782, 2006.
- BREMER, B.; ERIKSSON, O. Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamily, and tribes. **In. J. Plant Science**, v. 170, p. 766-793, June 2009.
- CAPASSO, A. *et al.* Phytochemical and pharmacological studies of *Guettarda acreana*. **Planta Med.**, v. 4, n. 64, p. 348-352, May 1998.
- CARBONEZI, C. A. *et al.* Determinação por RMN das configurações relativas e conformações de alcalóides oxindólicos isolados de *Uncaria guianensis*. **Quim. Nova**, v. 27, p. 878-881, Dez. 2004.
- CARDOSO, C. L. *et al.* Indole monoterpene alkaloids from *Chimarrhis turbinata* DC Prodr.: a contribution to the chemotaxonomic studies of the Rubiaceae family. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 1, p. 26-29, Jan./Mar 2008.
- CARVALHO, A. C. B. *et al.* **Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos.** [S.l.]: T&C Amazônia, v. 11, 2007.
- CARVALHO, L. M.; COSTA, J. A. M.; CARNELOSSI, M. A. G. Qualidade em plantas medicinais. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, Sergipe, n. 1, p. 1-54, 2010.
- CASTILLO, A. *et al.* Interference of antibiotics in the growth curves of oral *Streptococci*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 27, n. 3, p. 263-266, Mar. 2006.
- CASTRO, R. D. *et al.* *In vitro* antibacterial action of natural products on *Lactobacillus casei*. **Int. J. Dent.**, v. 9, n. 2, p. 74-77, Abr./Jun. 2010.
- CHIQUIERI, A.; DI MAIO, F. R.; PEIXOTO, A. L. A distribuição geográfica da família Rubiaceae Juss. na Flora Brasiliensis de Martius. **Rodriguesia**, v. 55, n. 84, p. 47-57, 2004.
- CHRISTENSEN, G. D. *et al.* Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. **J. Clin. Microbiol.**, v. 22, n. 6, p. 996-1006, Dec. 1985.
- CISAR, J. O. *et al.* Lectin recognition of host-like saccharide motifs in streptococcal cell wall polysaccharides. **Glycobiology**, v. 5, n. 7, p. 655-662, Oct. 1995.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty informational supplement, approved standard MS100-S20.** Wayne, PA: CLSI; 2010.

CORBIN, A. *et al.* Antimicrobial penetration and efficacy in an in vitro oral biofilm model. **J. Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 7, p. 3338–3344, July 2011.

COSTA, M. P. *et al.* Uma revisão das atividades biológicas da trans-desidrocrotonina, um produto natural obtido de *Croton cajucara*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 2, p. 275-286, abr./jun. 2007.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, May 1999.

COSTERTON, W. *et al.* The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. **J. Clin. Invest.**, v. 112, n. 3, p. 146-1477, Nov. 2003.

CUTILLO, F. *et al.* Terpenoids and phenol derivatives from *Malva silvestris*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 5, p. 481-485, Mar. 2006.

DAI, Y. *et al.* Two antiproliferative triterpene saponins from *Nematostylis anthophylla* from the highlands of Central Madagascar. **Chem. Biodivers.**, v. 10, n. 2, p. 233-240, Feb. 2013.

DALMARCO, J. B. E. A. Isolation and identification of bioactive compounds responsible for the anti-bacterial efficacy of *Lotus comiculatus*: var. São Gabriel. **Int. J. Green Pharm.**, v. 4, n. 2, p. 108-114, Apr. 2010.

DANNE, C.; DRAMSI, S. Pili of gram-positive bacteria: roles in host colonization. **Res. Microbiol.**, v. 163, n. 9, p. 645-658, Dec. 2012.

DAS, K.; TIWARI, R. K. S.; SHRIVASTAVA, D. V. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **J. Med. Plant. Res.**, v. 4, n. 2, p. 104-111, Jan. 2010.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, n. 4, p. 847-867, Dec. 2000.

DE VOS, P. European materia medica in historical texts: Longevity of a tradition and implications for future use. **J. Ethnopharmacol.**, v. 28, n. 1, p. 28-47 Oct. 2010.

DELPRETE, P. G. Flowering plant families of the American Tropics. **Princeton University Press/New York Botanical Garden Press**, p. 328-333, 2004.

DELPRETE, P. G.; JARDIM, J. G. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 101-128, 2012.

DETERS, A *et al.* Aqueous extracts and polysaccharides from Marshmallow roots (*Althea officinalis L.*): Cellular internalisation and stimulation of cell physiology of human epithelial cells *in vitro*. **J. Ethnopharmacol.**, v.127, p. 62–69, sept. 2010.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: UNESP, 2002.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.** , v. 15, p. 167-193, apr. 2002.

DOUGLAS, C. W. *et al.* Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. **J. Med. Microbiol.**, v. 39, n. 3, p. 179–182, sept. 1993.

DUARTE, S. *et al.* The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. **Arch. Oral Biol.**, v. 51, n. 1, p. 15-22, july 2006.

EBRAHIMABADI, A. H. *et al.* Essential oil composition, antioxidant and antimicrobial activity of the leaves and flowers of *Chaerophyllum macropodum*. **Food Control**, v. 21, n. 8, p. 1173-1178, aug. 2010.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med**, v. 64, n. 8, p. 711-713, dec. 1998.

ELVIN-LEWIS. Should we be concerned about herbal remedies. **J. Ethnopharmacol.** v. 75, p. 141-164, dec. 2001.

FEJERSKOV, O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 25, n. 1, p. 5-12, feb. 1997.

FEJERSKOV, O. ; KIDD, E. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico**. São Paulo: Santos, 2005.

FEJERSKOV, O. ; MANJI, F. Risk assessment in dental caries. In: BADER, J. D. **Risk assessment in dentistry**. Chapel Hill: University of North Carolina Dental Ecology, 1990. p. 215-217.

FLEMMING, H. C. ; WINGENDER, J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs): Structural and ecological aspects. **Water Sci.Technol.**, v. 43, n. 6, p. 1-8, 2001.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 1-8, sept. 2010.

FOGLIO, M. A. *et al.* Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: Um modelo multidisciplinar. **Multiciência**, v. 7, p. 55-63, 2006.

FORRER, M. *et al.* The antimicrobial activity of alpha-bisabolol and tea tree oil against *Solobacterium moorei*, a Gram-positive bacterium associated with halitosis **Arch. Oral Biol.**, v. 58, n. 1, p.10-16, jan. 2013.

FOX, A. Bacteriology- Chapter twelve. **Microbiology and Immunology on-line**, 2010. Disponivel em: <[http://pathmicro.med.sc/foldername/chapter\\_name.htm](http://pathmicro.med.sc/foldername/chapter_name.htm) University of Carolina School of Medicine>. Acesso em: 12 fev 2013.

FUJIWARA, T. *et al.* Purification, characterization, and molecular analysis of the gene encoding glucosyltransferase from *Streptococcus oralis*. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 5, p. 2475-2483, may 2000.

GAHUKAR, R. T. Evaluation of plant-derived products against pests and diseases of medicinal plants: A review. **Crop Protection**, v. 42, p. 202-209, dec. 2012.

GOVAERTS, R. *et al.* **World checklist & bibliography**. [S.l.]: The Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew, 2007.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cell Microbiol.**, v. 11, n. 7, p. 1034–1043 , july 2009.

HAMERSKI, L. *et al.* Saponinas triterpênicas de *Tocoyena brasiliensis* Mart. (Rubiaceae). **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, p. 601-604, jul./ago. 2005.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.**, Washington, v. 11, n. 7, p.714-719, jul. 1977.

HOJO, K. *et al.* Bacterial interactions in dental biofilm development. **J. Dent. Res.**, v. 88, n. 11, p. 982-990, nov. 2009.

JAIN, V. *et al.* Isolation and standardization of various phytochemical constituents from methanolic extracts of fruit rinds of *Punica granatum*. **Chin. J. Nat. Med.**, v. 9, n.6, p. 414-420, nov. 2011.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, n. 2, p. 163-173, july 2004.

JENKINSON, H. F.; LAMONT, R.J. Streptococcal adhesion and colonization. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 8, n. 2, p. 175-200, 1997.

JENKINSON, H. F.; LALA, H. C.; SHEPHERD, M. G. Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other streptococci with *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 5, p. 1429-1436, may 1990.

JENKINSON, H. F.; LAMONT, R. J. Oral microbial communities in sickness and in health. **Trends Microbiol.**, v. 13, p. 589-595, dec. 2005.

JOHANN, S. *et al.* Inhibitory effect of extracts from Brazilian medicinal plants on the adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, n. 11, p. 2459-2464, nov. 2008.

JONES, R. N.; ANDEREGG, T. R.; DESHPANDE, L. M. AZD2563, a new oxazolidinone bactericidal activity and synergy studies combined with gentamicina or vancomycin against staphylococci and streptococcal stains. **Diagn. Microbiol. Infec. Dis.**, v. 43, n. 1, p. 87-90, may 2002.

JUNIOR, L. F. J. *et al.* O uso de fitoterápicos e a saúde bucal. **Saúde em Revista**, v. 7, n. 16, p. 11-17, 2005.

KARTHIKEYAN, R. *et al.* Antimicrobial activity of nanoemulsion on cariogenic *Streptococcus mutans*. **Arch. Oral Biol.**, v. 56, n. 5, p. 437-445, may 2011.

KIM, J. *et al.* Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. **Dent. Mat.**, v. 26, n. 8, p. 771-778, aug. 2010.

KIM, J.E. *et al.* Antibacterial characteristics of *Curcuma xanthorrhiza* extract on *Streptococcus mutans* biofilm. **J. Microbiol.**, v. 46, n. 2, p. 228-232, apr. 2008.

KOKOSKA, L. *et al.* Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 82, n. 1, p. 51- 53, sept. 2002.

KOLENBRANDER, P. E.; ANDERSEN, R. N.; MOORE, L. V. Intra-generic coaggregation among strains of human oral bacteria: potential role in primary colonization of the tooth surface. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, n. 12, p. 3890-3894, dec. 1990.

KOLENBRANDER, P. E. *et al.* Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 471-480, apr. 2010.

KOO, H. *et al.* Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. **Curr. Microbiol.**, v. 41, n. 3, p. 192-196, sept. 2000.

KOO, H. *et al.* Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 17, n. 6, p. 337-343, dec. 2002.

KORKINA, L. G. *et al.* Molecular mechanisms underlying wound healing and anti-inflammatory properties of naturally occurring biotechnologically produced phenylpropanoid glycosides. **Cell. Mol. Biol.**, v. 53, n. 5, p. 84-91, may 2007.

KRISHNARAJUA, A. V. *et al.* Assessment of bioactivity of indian medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. **Int. J. Eng. Sc.**, v. 3, n. 2, p. 125-134, 2005.

LEE, O. H.; LEE, B. Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. **Bioresour. Technol.**, v. 101, n. 1, p. 3751-3754, jan. 2010.

LI, Y.; CAULFIELD, P. W. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. **Journal of Dental Research.**, v. 74, n. 2, p. 681-685, feb. 1995.

LI, X.; YAN, Z.; XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 149, n. 2, p. 353-362, feb. 2003.

LIMA, F. R. M. *et al.* Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 105, n. 1/2, p. 137-147, apr. 2006.

LIMA, J. E. O. Cárie dentária: um novo conceito. **R. Dental Press. Ortodon. Ortop. Facial**, n. 6, p. 119-130, nov./dez 2007.

LORENZO, J. L. **Microbiologia para estudantes de odontologia**. São Paulo: Atheneu, 2004.

LUBBEA, A.; VERPOORTEA, R. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 785- 801, july 2011.

MARSH, P. D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. **BMC Oral Health**, v. 6, p. 145-152, june 2006.

MARSH, P. D. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. **Dent. Clin. North Am.**, v. 54, n. 3, p. 441-454, july 2010.

MARTINS, D. *et al.* Triterpenes and the antimycobacterial activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). **Biomed. Res. Int.**, v. 2013, p. 1-7, feb. 2013

MATOS, F. J. A. Introdução a fitoquímica experimental. Fortaleza: UFC, 2009. p. 148.

MAY, J. *et al.* Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 45, n. 5, p. 639-643, may 2000.

MBOSSO, E. J. T. *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of extracts and compounds of some selected medicinal plants from Cameroon. **J. Ethnopharmacol.**, v. 128, n. 2, p. 476-481, mar. 2010.

MENDOZA, H. *et al.* **Rubiaceae de Colômbia guia ilustrada de gêneros**. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexandre von Humboldt, 2004.

MILLER, J.S. The discovery of medicines from plants: a current biological perspective. **Economic Botany**, v. 65, n. 4, p. 396–407, dec. 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de atenção à saúde. **Projeto SB-Brasil: Resultados Principais**. Brasília, DF, 2011.

MOREIRA, Z. Ministério da Saúde. **Portal da saúde- SUS**, 2011. Disponível em: <[http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/3935/162/ministerio-investe-r\\$-27-bilhoes-em-saude-bucal.html](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/3935/162/ministerio-investe-r$-27-bilhoes-em-saude-bucal.html)>. Acesso em: 31 jan 2013.

MOURA, L. C. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos das espécies vegetais *Miconia rubinosa* e *Pfaffia glomerata* em micro-organismos da cavidade bucal. **Universidade de Franca**, Dissertação (mestrado em Promoção de Saúde), p. 17-18, 2006.

NAIDU, A. S. **Natural food antimicrobial systems**. California: California State Polytechnic University, 2010.

NASCIMENTO, G. C. F. *et al.* Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz. J. Microbiol.**, v. 31, n. 4, p. 247-256, oct./dec. 2000.

NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; Approved Standard. 6. ed. USA: NCCLS, 2003.

NCCLS; STANDARDS, N. C. F. C. L. **Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents**. M62A. ed. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999.

NEGI, P. S. *et al.* Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) seed extracts. **Food Chem.**, v. 92, n. 1, p. 119-124, aug. 2005.

NEWBRUN, E. **Cariology**. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1983.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, n. 3, p. 461-477, mar. 2007.

NIÑO, J.; MOSQUERA, A. M.; CORREA, Y. M. Antibacterial and antifungal activities of crude plant extracts from Colombian biodiversity. **Rev. Biol. Trop.**, v.60, n. 4, p. 1535-1542, dec. 2012.

OLIVEIRA, F. Q. *et al.* Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Braz. J. Pharm.**, v. 17, n. 3, p. 466-476, july/sept. 2007.

OLIVEIRA, F.; GOKITI, A. Fundamentos da Farmacobotânica. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 157-162.



OLIVEIRA, P. R. N. *et al.* Saponinas triterpênicas das raízes de *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae). **Quim. Nova**, v. 31, n. 4, p. 755-758, 2008.

OLIVEIRA, P. V. *et al.* Larvicidal activity of 94 extracts from ten plant species of northeastern of Brazil against *Aedes aegypti*. **Parasitol. Res.**, v. 107, n. 2, p. 403–407, July 2010.

OLIVEIRA, P.R. *et al.* Cytotoxic activity of *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae). **Nat. Prod. Res.**, v. 6, p.1-7, Feb. 2013

OMS. **Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales**. Ginebra: OMS. 2003.

OSTRSKY, E. A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração Mínima Inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Braz. J. Pharm.**, v. 18, n. 2, p. 301-3012, 2008.

O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Mol. Microbiol.**, v. 28, n. 3, p. 449-461, May 1998.

PEREIRA, I. M. *et al.* Composição florística e análise fitossociológica do componente arbustivo-arbóreo de um remanescente florestal no agreste paraibano. **Acta bot. bras.**, v. 16, n. 3, p. 357-369, Jul. 2002.

PEREIRA, J. V. *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of an extract from *Anacardium occidentale* Linn. on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. **Odontol. Clin. Cientif.**, v. 5, n. 2, p. 137-141, Abr./Jun. 2006.

PESCA, M.S. *et al.* Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antiangiogenic activities. **J. Nat. Prod.**, v.76, n.1, p. 29-35, Jan. 2013.

PETERSEN, P. E. *et al.* The global burden of oral disease and risks to oral health. **Bull. World Health Organ.**, v. 83, n. 9, p. 661-669, 2005.

PITTS, N. B. Are we ready to move from operative to non-operative/preventive treatment of dental caries in clinical practice. **Caries Res.**, v. 38, n. 3, p. 294–304, May/June 2004.

RAMOS, D. F. *et al.* Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 44, n. 4, p. 669-674, Oct./Dec. 2008.

RICKARD, A. H. *et al.* Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends Microbiol.**, v. 11, n. 2, p. 94-100, Feb. 2003.

RICKARD, A. H. *et al.* Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. **Mol. Microbiol.**, v. 60, n. 6, p. 1446-1456, june 2006.

RUTTERMANN, E. *et al.* Bacterial viability on surface-modified resin-based dental restorative materials. **Arch. Oral Biol.**, v. 57, n.11, p. 1512-1521, nov. 2012.

SA, N. C. *et al.* Antimicrobial and antibiofilm action of Casbane Diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. **Arch. Oral Biol.**, v. 57, n. 5, p. 550-555, may 2012.

SABULAL, B. *et al.* Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v. 67, n. 22, p. 2464-2473, nov. 2006.

SAKAGAMI, Y.; KAJAMURA, K. Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin-resistant *Enterococci*. **J. Hosp. Infect.**, v. 50, n. 2, p. 140-144, feb. 2002.

SALERNO, C. *et al.* Candida-associated denture stomatitis. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.**, v. 16, n. 2, p. 139-143, mar. 2011.

SAMPAIO, F. C. *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **J. Ethnopharmacol.**, v. 124, n. 2, p. 289-294, july 2009.

SANTOS, P. L. P. *et al.* Biological screening of *Annonaceos brazilian* medicinal plants using *Artemia salina* (brine shrimp test). **Phytomedicine**, v. 10, n. 2/3, p. 209-212, mar. 2003.

SANTOS, V. R. *et al.* Susceptibility of oral pathogenic microorganisms to aqueous and ethanolic extracts os *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). **Int. J. Dent.**, v. 8, n. 1, p. 1-5, jan./mar. 2009.

SHELZ, Z. M. J.; HOHMANN, J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. **Phytotherapy**, v. 77, n. 4, p. 279-285, june 2006.

SGARIGLIA, A. M. *et al.* Isolation of antibacterial components from infusion of *Caesalpinia paraguariensis* bark. A bio-guided phytochemical study. **Food Chem.**, v. 126, n. 2, p. 395-404, may 2011.

SHELBURNE, S. A. *et al.* *In vitro* killing of community- associated methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* with drugs combinations. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 10, p. 4016-4019, oct. 2004.

SILVA, V. C. *et al.* Isolation of lignans glycosides from *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (Rubiaceae) by preparative high-performance liquid chromatography. **Eclat. Quim.**, v. 31, n. 4, p. 55-58, 2006.

SILVA,R.S.Characterização da lectina de alga marinha vermelha *Amansia multifida*

**J.V.Lamouroux por espectrometria de massa.** 2010,59f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

SILVÁN, J. M. *et al.* Antibacterial activity of a grape seed extract and its fractions against *Campylobacter spp.* **Food Control**, v. 29, n.1, p. 25-31, jan. 2013.

SILVEIRA, L. M. S. *et al.* Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Rev. Bras. Farm.**, v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SIMÕES, C. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 6. ed. Florianópolis: Universidade/URFGS, 2007.

SIXOU, J. L.; MEDEIROS, B. O.; BOAURE, M. M. Modifications of the microflora of the cavity arising during immunosuppressive chemotherapy. **Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.**, v. 32, n. 5, p. 306-310, sept. 1996.

SOOKTO, T. *et al.* *In vitro* effects of *Salvia officinalis* L. essential oil on *Candida albicans*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 5, p. 376–380, may, 2013.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática:** guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em AGP II. São Paulo: Nova Odessa, 2005.

STEPANOVIC, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J. Microbiol. Methods**, v. 40, n. 2, p.175-179, apr. 2000.

STEPANOVIC, S. *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891-899, aug. 2007.

STOODLEY, P. *et al.* Biofilms as complex differentiated communities. **Annu. Rev. Microbiol.** , v. 56, p. 187-209, jan. 2002.

STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discov. Today**, v. 5, n. 2, p. 39-41, feb. 2000.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, n. 9, p. 1199-1218, sept. 2010.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. **Caries Res.**, v. 42, n. 6, p. 409-418, oct. 2008.

TAO, C.; TAYLOR, C. M. *Guettarda* Linnaeus. **Fl. China** v. 19, p. 145, 2011.

TESTA, G. *et al.* Constituintes químicos das folhas e avaliação da atividade anti-inflamatória de extratos das raízes e folhas de *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae). **Quím. Nova**, v. 35, n. 3, p. 1-3, 2011.

THAMIZHVANAN, K. *et al.* Antibacterial and antifungal activities of various extracts of *Guettarda speciosa*. **Inter. J. Phytopharmacol.**, v. 1, n. 1, p. 20-22, 2010.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia clínica**. 3. ed. São Paulo: Santos, 2005.

TINANOFF, N.; KANELIS, M. J.; VARGAS, C. M. Current understanding of the epidemiology, mechanism and prevention dental caries in preschool children. **Pediatr. Dent.**, v. 24, n. 6, p. 543-551, nov./dec. 2002.

VEIGA, L. F.; VITAL, N. Testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia sp.* In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. (eds.), **Métodos em Ecotoxicologia Marinha**. Aplicações no Brasil. Ed. Artes Gráficas e Indústria Ltda, São Paulo, p. 111-112, 2002.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, mar./abr. 2006.

VIGIL, A. L.; PALOU, E.; ALZAMORA, S. M. Naturally occurring compounds: plant sources. In: DAVIDSON, P. M.; SOFOS, J. N.; BRANEN, A. L. **Antimicrobial in food**. [S.l.]: CRC Press, 2005.

WANG, X. Y.; ZHANG, Q.; CHEN, Z. A possible role of LIM mineralization protein 1 in tertiary dentinogenesis of dental caries treatment. **Medical Hypotheses**, v. 69, n. 3, p. 584-586, mar. 2007.

WEI, Q.; MA, X.; DONG, J. Preparation, chemical constituents and antimicrobial activity of pyroligneous acids from walnut tree branches. **J. An. Appl. Pyrolysis**, v. 87, n. 1, p. 24-28, jan. 2010.

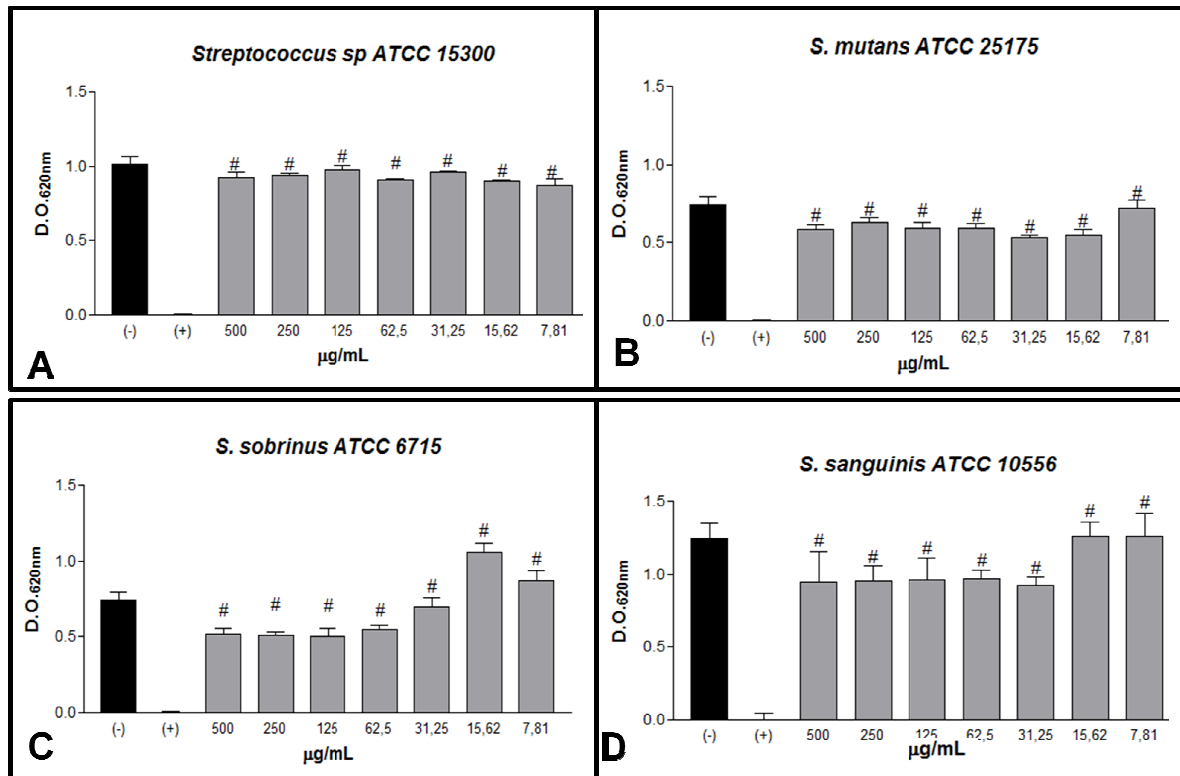
WILLCOX, M. D.; PATRIKAKIS, M.; KNOX, K. W. Degradative enzymes of oral streptococci. **Aust. Dent. J.**, v. 40, n. 2, p. 121-128, apr. 1995.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 57, n. 10, p. 1451-1470, July 2005.

*ANEXO*

---

ANEXO A- Avaliação do potencial antimicrobiano do EEFGS em diferentes concentrações sobre o crescimento planctônico de *Streptococcus*.



Fonte: Próprio autor. Substância teste (□), BHI com 4% DMSO (■) e Clorexidina (□). \*  $p < 0,001$  estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, #  $p < 0,001$  estatisticamente significativa em relação ao controle positivo, n=18.