



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

THEODORA THAYS ARRUDA CAVALCANTE

**ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LECTINAS E OUTRAS
SUBSTÂNCIAS NATURAIS FRENTE A BACTÉRIAS ORAIS**

FORTALEZA

2012

THEODORA THAYS ARRUDA CAVALCANTE

ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LECTINAS E OUTRAS
SUBSTÂNCIAS NATURAIS FRENTE A BACTÉRIAS ORAIS

Tese submetida á Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada
Coorientador: Prof. Dr. Edson Holanda
Teixeira

FORTALEZA
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- C364a Cavalcante, Theodora Thays Arruda.
Análise do potencial antimicrobiano de lectinas e outras substâncias naturais frente as bactérias orais / Theodora Thays Arruda Cavalcante. – 2012.
215f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Prof. Dr. Benildo de Sousa Cavada.
Coorientação: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.
1. Biofilmes. 2. Cáries dentárias – Bactérias. 3. Lectinas. 4. Fitoterapia. I. Título.

CDD 574.192

THEODORA THAYS ARRUDA CAVALCANTE

ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LECTINAS E OUTRAS
SUBSTÂNCIAS NATURAIS FRENTE A BACTÉRIAS ORAIS

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

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

Prof. Dr. Andréa Silvia Walter de Aguiar
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha
Universidade Estadual Vale do Acaraú - UEVA

À minha família de origem, berço onde me
criei. Ao meu esposo, Henrique, minha
segurança; ao meu filho, Artur, passarinho que
veio inteirar meu ninho.

AGRADECIMENTOS

Ao Mestre Superior, Senhor do tempo, pela oportunidade de seguir o caminho reto.

Aos meus pais, Arruda Júnior e Madalena, pelo esforço realizado na minha formação durante muitos anos;

Aos meus sogros, Sr. Ernani e Sr^a. Clery, pelos exemplos de perseverança.

Às minhas irmãs, Elys e Ticiane, para às quais dedico profunda admiração pela solicitude, amor e companheirismo de longa data.

Aos Profs. Drs. Benildo e Edson, pelas orientações nos momentos da construção deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa que me foi concedida.

Aos servidores da Faculdade de Medicina Campus Sobral-UFC.

Aos meus colegas do LIBS, pelo aprendizado constante na convivência.

Aos meus colegas do Biomol-Lab, em especial à Raquel Benevides, pelo apoio durante o desenvolvimento do doutorado.

À Nairley Cardoso Sá Firmino, por todo auxílio em todos os momentos da realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Hécio dos santos pela presteza em todos os momentos em que foi solicitado.

Ao Professor Dr. Rodrigo Maranguape, por sua solicitude, e a todos os componentes do NUBS, pela atenção e auxílio, em especial à Gleiciane, Francisco e João Garcia.

À Dioneide, pessoa de confiança que possibilitou, cuidando de meu pequeno Artur, que eu pudesse melhor me dedicar à realização deste trabalho.

“Não sei se a vida é curta ou longa pra nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas. Muitas vezes basta ser colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove. E isso não é coisa do outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas, que seja intensa, verdadeira, e pura enquanto durar. **Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.**”

Cora Coralina

RESUMO

Os biofilmes são uma forma mais resistente de vida microbiana comparada à forma planctônica, em vida livre. Essa resistência está diretamente relacionada às características naturais de sobrevivência das células microbianas vivendo nesse tipo de comunidade. A doença cárie capaz de acometer os tecidos dentais está diretamente relacionada com a formação de comunidades microbianas e ainda apresenta grande impacto social e econômico sobre a sociedade atual. O presente trabalho teve como objetivo investigar a potencialidade de compostos vegetais como insumos biotecnológicos a serem aplicados na prevenção e tratamento da cárie dental. Para tanto, foram realizadas metodologias de verificação da atividade antimicrobiana e antibiofilme de lectinas vegetais do gênero *Canavalia* e óleos essenciais de *Croton zehntneri* assim como de seus componentes majoritários frente a bactérias envolvidas na cárie. Além disso, foi verificada a possível ação simultânea de lectinas e diterpeno casbano (DC) sobre a expressão de genes de virulência relacionados à formação de biofilmes de *Streptococcus mutans*. Dentro dos limites das metodologias realizadas no presente trabalho pode-se concluir que: lectinas vegetais do gênero *Canavalia* podem interferir no fator micro-organismos relacionado à cárie dental; óleos essenciais e seus componentes majoritários apresentaram atividade antimicrobiana significativa sobre *S. mutans* e ainda que as soluções da lectina ConM e ConM/DC atuando simultaneamente foram capazes de alterar a expressão de genes relacionados a formação de biofilmes por *S. mutans*, podendo vir a ser usado em estudos pré-clínicos no intuito de instituir novas alternativas de prevenção e terapêutica para doença cárie.

Palavras-chave: Biofilmes. Cárie dentária. Lectinas. Fitoterapia.

ABSTRACT

Biofilms are more resistant form of microbial life compared to planktonic form, in the wild. This resistance is related to the natural characteristics of survival of microbial cells living in this type of community. The caries that can affect the dental tissues is directly related to the formation of microbial communities and still has great social and economic impact on society. This study aimed to investigate the potential of plant compounds as biotechnological inputs to be applied in prevention and treatment of dental caries. To this end, methods were performed to verify the antimicrobial and antibiofilme activity of plant lectins of the genus *Canavalia* and essential oils of *Croton zehntneri* as well as its major components against bacteria involved in caries. Furthermore, was verified the possible simultaneous action of lectins and casban diterpene (DC) on the expression of virulence genes related to biofilm formation of *Streptococcus mutans*. Within the methodology undertaken in this work can be concluded that: lectins of the genus *Canavalia* can interfere with the factor micro-organisms related to dental caries; essential oils and their major components showed significant antimicrobial activity against *S. mutans* and that solutions of ConM lectin and ConM/DC acting simultaneously were able to alter the expression of genes related to biofilm formation by *S. mutans*, and may be used in preclinical studies in order to develop new alternatives for prevention and therapy for caries.

Keywords: Biofilms. Tooth decay. Lectins. Herbal.

.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Modelo ilustrativo da colonização de bactérias orais na superfície dental....	26
Figura 2 -	Esquema de ciclo de crescimento universal dos biofilmes com características comuns em quatro estágios.....	30
Figura 3 -	Diagrama ilustrando as etapas de formação de um biofilme multiespécie....	31
Figura 4 -	Fatores concorrentes para desenvolvimento da cárie dentária.....	37
Figura 5 -	Desenho esquemático da progressão da doença cárie.	38
Figura 6 -	Gráfico que representa a comparação do índice CPO de crianças aos 12 anos por região brasileira.....	39
Figura 7 -	Espécies mais abundantes presentes no microbioma do biofilme dental.....	39
Figura 8 -	Diagrama de fatores que contribuem para desenvolvimento da cárie dental de acordo com a hipótese ecológica do desenvolvimento da placa dental....	42
Figura 9 -	Imagem de microscopia de luz de espécie do gênero <i>Streptococcus</i> submetidas à coloração de Gram.....	43
Figura 10 -	Sequência temporal de aderência e colonização por estreptococos.....	44
Figura 11 -	Mecanismos de tolerância ácida utilizado por <i>Streptococcus mutans</i>	48
Figura 12 -	Sobreposição de CRD das lectinas ConBr e ConA.....	57
Figura 13 -	Diversidade estrutural de constituintes voláteis de óleos essenciais.....	64
Figura 14 -	Metabólitos secundários de plantas como modificadores dos mecanismos de resistência multi-drogas.....	72
Figura 15 -	Gráfico de barra dos diferentes tempos de crescimento de <i>S. mutans</i> sob o efeito de lectinas.....	81
Figura 16 -	Gráfico de barra dos diferentes tempos de crescimento de <i>S. oralis</i> sob o efeito de lectinas.....	82
Figura 17 -	Gráfico de barra dos biofilmes de <i>S. mutans</i> em diferentes tempos de crescimento sob o efeito de lectinas.....	83
Figura 18 -	Gráfico de barra dos biofilmes de <i>S. oralis</i> em diferentes tempos de crescimento sob o efeito de lectinas.....	84
Figura 19 -	Comparação dos sítios de ligação a carboidratos entre CGL e ConM.....	85
Figura 20 -	Esquema ilustrativo do método de extração dos óleos essenciaia de <i>Croton zhentneri</i>	95
Figura 21 -	Estruturas químicas dos constituintes majoritários dos óleos essenciais dos	

	três quimiotipos de <i>Croton zehntneri</i>	102
Figura 22 -	Gráfico da avaliação do potencial antibiofilme dos óleos essenciais dos três quimiotipos do <i>C. zehntneri</i>	106
Figura 23-	Gráfico da avaliação da ação dos componentes majoritários dos óleos essenciais dos três quimiotipos do <i>C. zehntneri</i> frente ao biofilme já formado.....	107
Figura 24 -	Gráfico da avaliação da ação dos óleos essenciais dos três quimiotipos do <i>C. zehntneri</i> frente ao biofilme já formado.....	107
Figura 25 -	Imagem de gel de eletroforese em gel de agarose demonstrando a integridade do RNA obtido.....	122
Figura 26 -	Gráfico da avaliação do potencial antimicrobiano de ConM/DC 250 µg/mL sobre o crescimento planctônico de <i>Streptococcus mutans</i> UA 159 com 24 horas de incubação.....	124
Figura 27 -	Gráfico da avaliação do potencial antimicrobiano de ConA/DC 250 µg/mL sobre o crescimento planctônico de <i>Streptococcus mutans</i> UA 159 com 24 horas de incubação.....	125
Figura 28 -	Gráfico da expressão relativa dos genes de virulência de <i>S. mutans</i> UA 159 submetido a ConM 250 µg/mL e ConM/DC 250 µg/mL comparado ao controle NaCl 0,9%.....	128
Figura 29 -	Gráfico da expressão relativa dos genes de virulência de <i>S. mutans</i> UA 159 submetido a DC 250 µg/mL comparado ao controle NaCl 0,9%.....	128
Figura 30 -	Gráfico da expressão relativa dos genes de virulência de <i>S. mutans</i> UA 159 submetido a ConA 250 µg/mL comparado ao controle NaCl 0,9%.....	129

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Infecções/doenças humanas associadas com formação de biofilmes e micro-organismos comumente envolvidos.....	24
Quadro 2-	Espécies utilizadas para o isolamento das lectinas selecionadas para os experimentos e sua especificidade por carboidrato, siglas e referência da metodologia utilizada.....	76
Quadro 3-	Lista de substâncias naturais obtidas a partir do <i>Croton zhentneri</i> selecionadas para testes.....	96
Quadro 4 –	Lista de <i>Primers</i> usados para qRT-PCR, suas sequências de DNA e amplicon.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Rendimento dos óleos essenciais dos três quimiotipos de <i>Croton zehntneri</i>	102
Tabela 2-	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais e seus componentes majoritários frente a <i>Streptococcus mutans</i> UA 159.....	103
Tabela 3-	Lista dos primers sua respectivas concentração após realização de testes de otimização da metodologia de qRT-PCR.....	123

LISTA DE ABRVIATURAS E SIGLAS

Biomol-Lab	Laboratório de moléculas biologicamente ativas
ConA	Lectina isolada de <i>Canavalia ensiformis</i>
ConM	Lectina isolada de <i>Canavalia maritima</i>
CGL	Lectina isolada de <i>Canavalia gladiata</i>
ConBol	Lectina isolada de <i>Canavalia boliviana</i>
ConBr	Lectina isolada de <i>Canavalia brasiliensis</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
G	Unidade de gravidade
UFC	Unidade formadora de colônias
mL	Mililitro
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
Nm	Nanômetros
μL	Microlitros
°C	Graus centígrados
CONEP	Comitê de ética em pesquisa
CNS	Comitê Nacional de Saúde
MS	Ministério da Saúde
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
PDB	<i>Protein data bank</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CRD	<i>Carbohydrate recognition domain</i>
CG/EM	Cromatografia gasosa/espectrômetro de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
CBM	Concentração bactericida mínima
RPM	Rotações por minuto
PBS	<i>Potassium buffered saline</i>
DC	Diterpeno casbano
Ua	Unidade de absorbância
DO	Densidade óptica
mM	Milimolar
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
qRT-PCR	PCR em tempo real
CLX	Clorexidina
OECC-A	Óleo essencial do caule de cróton var. anetol
OEFC-E	Óleo essencial da folha de cróton var. estragol
OECC-E	Óleo essencial do caule de cróton var. eugenol
DNA	Ácido desoxiribonucleico
Gtf	Glicosiltransferase
Gbp	<i>Glucan binding protein</i>
Brp	<i>Biofilm regulator protein</i>
PEC	Polissacarídeo extracelular
CPO-D	Índice de dentes caridos perdidos e obturados
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
pH	Potencial hidrogeniônico
KDa	Kilo Dalton
Gal	Galactose
GalNac	<i>N</i> -acetil-galactosamina

NeuNAc	Ácido neuramínico
Fuc	Fucose
GlcNAc	<i>N</i> -acetil-glucosamina
Glc	Glicose
spaP	<i>Antigen surface protein</i>
ATP	Adenosina trifosfato
NAD ⁺	Nicotinamida adenina oxidada
NADH	Nicotinamida adenina reduzida
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ldh	Enzima lactato desidrogenase
RTA	Resposta de tolerância ácida
PIC	Polissacarídeo intracelular
EGM	Estreptococos do grupo mutans
RIP	Proteína inativadora de ribossomos
TxLc-1	Lectina de tulipa
AS	Ácido siálico
PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
DCTN	Diterpeno clerodano <i>trans</i> - desidrocrotóina
CIF	Concentração inibitória fracional
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ATCC	<i>American type culture collection</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
cDNA	DNA complementar
DEPC	Dietilpolicarbonato
<i>Ct</i>	<i>Cycle treshold</i>
Arg	Arginina
Tyr	Tirosina
Asn	Asparagina
DVL	Lectina de <i>Diocle variegata</i>
DGL	Lectina de <i>Diocle grandiflora</i>
CFL	Lectina de <i>Cratylia floribunda</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA: BIOFILMES	21
2.1	Conceito e correlações de interesse biomédico	22
2.2	Biofilme oral	25
2.3	Mecanismos de formação dos biofilmes	28
2.4	Resistência dos biofilmes às medidas antimicrobianas	32
3	REVISÃO DE LITERATURA: CÁRIE DENTÁRIA	35
3.1	Aspectos gerais	36
3.2	Micro-organismos no desenvolvimento da cárie dentária	39
3.3	Fatores de virulência das bactérias cariogênicas	42
3.3.1	<i>Aderência inicial à superfície dental</i>	44
3.3.2	<i>Atividade acidogênica e acidotolerância</i>	46
3.3.3	<i>Produção de polissacarídeo intracelular (PIC) e extracelular (PEC)</i>	49
4	REVISÃO DE LITERATURA: LECTINAS	53
4.1	Aspectos históricos	54
4.2	Definição, classificação e importância	55
4.3	Correlações estrutura/função	56
4.4	Aplicações e funções biológicas	58
5	REVISÃO DE LITERATURA: GÊNERO <i>Croton</i>	60
5.1	Substâncias naturais	61
5.2	Considerações a respeito da família Euphorbiaceae e gênero <i>Croton</i>	62
5.3	Constituintes químicos e atividade biológica do óleo essencial de espécies de <i>Croton</i>	63
5.4	Atividade antibiofilme de óleos essenciais e seus constituintes	66
6	REVISÃO DE LITERATURA: SINERGISMO	69
6.1	Definição	70
6.2	Sinergismo frente a infecções bacterianas	71
7	OBJETIVOS	73
7.1	Objetivo geral	74
7.2	Objetivos específicos	74

8	MATERIAIS E MÉTODOS: PARTE I	75
8.1	Isolamento das Lectinas	76
8.2	Cepas bacterianas e condições de cultivo	76
8.3	Preparação das soluções de lectina	77
8.4	Efeito das lectinas no crescimento bacteriano	77
8.5	Efeito das lectinas na inibição da formação de biofilmes em superfícies cobertas por saliva	77
8.5.1	<i>Coleta e processamento da saliva</i>	77
8.5.2	<i>Ensaio de interferência na formação de biofilme</i>	78
8.6	Análise de estrutura versus função	79
8.7	Análise estatística	79
9	RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE I	80
10	CONCLUSÕES: PARTE I	89
11	OBJETIVOS: PARTE II	91
12	MATERIAIS E MÉTODOS: PARTE II	93
12.1	Coleta e identificação do material vegetal	94
12.2	Obtenção do óleo essencial de três quimiotipos de <i>Croton zehntneri</i> e isolamento de seus componentes majoritários	94
12.3	Preparo das soluções dos óleos essenciais e componentes majoritários	96
12.4	Cepas bacterianas e condições de cultivo	96
12.5	Ensaio de atividade antimicrobiana	96
12.6	Atividade antibiofilme	97
12.6.1	<i>Coleta de saliva</i>	97
12.6.2	<i>Inibição da formação do biofilme</i>	98
12.6.3	<i>Ação sobre o biofilme previamente formado</i>	98
12.7	Análise estatística	99
13	RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE II	100
14	CONCLUSÕES: PARTE II	111
15	OBJETIVOS: PARTE III	113
16	MATERIAIS E MÉTODOS: PARTE II	115
16.1	Preparação das substâncias	116
16.2	Cepa bacteriana e condições de cultivo	116
16.3	Atividade antimicrobiana	116

16.4	Preparação bacteriana para extração de RNA	116
16.5	Extração de RNA total e síntese do cDNA	117
16.6	qRT-PCR e análise da expressão relativa	118
16.7	Análise estatística	120
17	RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE III	121
18	CONCLUSÕES: PARTE III	130
19	CONSIDERAÇÕES FINAIS	132
20	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
	ANEXO A	165
	ANEXO B	166
	ANEXO C	168

Capítulo 1-Introdução

1 INTRODUÇÃO

Bactérias patogênicas apresentam numerosos mecanismos de defesa contra agentes antimicrobianos e a resistência a drogas atualmente comercializadas é crescente. Dentre esses mecanismos de defesa bacterianos, pode-se citar a formação de biofilmes que são responsáveis por uma série de doenças de natureza crônica e demonstram extrema resistência a antibióticos e ao sistema de defesa do hospedeiro (LEWIS, 2001; FUX, *et al.*, 2003).

Os biofilmes são uma forma mais resistente de vida microbiana comparada à forma planctônica, em vida livre. Essa resistência está diretamente relacionada às características naturais de sobrevivência das células microbianas vivendo nesse tipo de comunidade. Dentre estas características destacam-se o crescimento mais lento de células associadas ao biofilme, comparando-se com as células microbianas de vida livre, e, baixa regulação de processos celulares causada, principalmente, por um contato menor das células no interior do biofilme com nutrientes externos. Além disso, 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 extracelular age como uma barreira de difusão para pequenas moléculas (ANDERSON; O'TOOLE, 2008; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009).

Considerando esses aspectos, o aumento da incidência de espécies bacterianas resistentes a medicamentos tem levado à busca de novas abordagens para lidar com infecções em áreas de grande importância médica e odontológica (OFEK, *et al.*, 2003; TEIXEIRA, 2006). Nas últimas décadas, o uso irracional de antimicrobianos determinou o surgimento de cepas multiresistentes, impulsionando a comunidade científica à pesquisa nas áreas de química, farmacologia e microbiologia para a descoberta de novos agentes antimicrobianos (CECHINEL FILHO, 2000; MACIEL, *et al.*, 2000; SOUZA, *et al.*, 2003). Atualmente, compostos naturais têm emergido como importantes candidatos com enfoque biotecnológico na busca por novas drogas antimicrobianas e antibiofilmes (SCHACHTER, 2003). A relevância destas pesquisas é devido à importância dos biofilmes como etiologia de várias doenças humanas persistentes e crônicas (SIMÕES, *et al.*, 2010).

Nesse contexto, têm sido desenvolvidos estudos em todo o mundo baseados nas propriedades biológicas de muitas plantas de utilização rotineira pela medicina popular que

poderão contribuir, de forma inovadora, na terapêutica antimicrobiana (ZACCHINO *et al.*, 2001; YAMAMOTO; OGAWA, 2002; HOLETZ *et al.*, 2002).

É importante ressaltar que o conhecimento popular sobre as propriedades curativas de plantas e outros produtos naturais é utilizado por muitos povos desde períodos remotos, sendo esses compostos fontes de moléculas com relevância como agentes antimicrobianos que podem vir a ser utilizados na tentativa de superar a resistência aos medicamentos novos e antigos usados no tratamento clínico (SIMÕES, *et al.*, 2010).

Considerando toda a problemática em relação à resistência antimicrobiana, torna-se de extrema importância o desenvolvimento de estudos sobre a atividade biológica de produtos extraídos de plantas, seu mecanismo de ação e toxicidade através de metodologias multidisciplinares, aliando conhecimentos de microbiologia, biologia molecular e farmacologia com foco em aplicação biotecnológica de possíveis produtos obtidos com uso clínico validado.

Capítulo 2-Revisão de Literatura
Biofilmes

2 BIOFILMES

2.1 Conceito e correlações de interesse biomédico

A observação do mundo microbiano através de diferentes técnicas de microscopia tem proporcionado aos estudiosos, ao longo dos anos, a possibilidade de observar os micro-organismos arranjados em comunidades compartilhando nutrientes, metabólitos, elementos genéticos e, desta forma, mostrando-se capazes de resistir às intempéries do ambiente sobrevivendo e causando doenças de difícil erradicação. Biofilmes têm impacto sobre a humanidade de várias maneiras à medida que podem formar-se em ambientes naturais, aparatos médicos e aparelhagem industrial (LÓPEZ *et al.*, 2010).

Em 1847, Leuwenhoek usou um microscópio primitivo e descreveu “animalículos” de uma amostra raspada de dentes humanos. Quase 100 anos depois, em 1934, Claude Zobell examinando populações marinhas diretamente ao microscópio concluiu que aquelas bactérias estavam aderidas às superfícies formando populações sésseis. Entre 1935 e 1978, os microbiologistas Ron Gibbons e van Houte do *Forsyth Dental Center* examinaram os biofilmes microbianos que formam a placa dental. O primeiro estágio de formação dos biofilmes em cultura pura foi observado em 1964 quando foi estabelecido o estágio de adesão irreversível dos micro-organismos a uma superfície como o primeiro de formação destas comunidades microbianas (COSTERTON, 1999).

Mais de sessenta anos depois do primeiro relato referente aos biofilmes (ZOBELL, 1943), eles continuam sendo motivo de preocupação em uma ampla gama de áreas, especificamente nas áreas de alimentos, ambiental e no campo biomédico (FLINT; BREMER; BROOKS, 1997; SIHORKAR; VYAS, 2001; VERAN, 2002; MAUKONEN *et al.*, 2003). Baseado em observações da placa dental e comunidades sésseis dos córregos das montanhas, Costerton e colaboradores, em 1978, lançaram uma teoria dos biofilmes que explicava mecanismos pelos quais micro-organismos aderem a superfícies vivas ou inertes, e quais benefícios os micro-organismos vivendo nestas comunidades teriam.

De acordo com Hoiby e colaboradores (2010) um biofilme é um consórcio estruturado de bactérias capazes de produzir uma matriz polimérica que consiste de polissacarídeos, proteínas e DNA. Estas comunidades podem estabelecer-se em uma ampla variedade de superfícies (ABEE *et al.*, 2010). Além da capacidade de produzir biopolímeros extracelulares, as células em comunidades apresentam padrão de crescimento reduzido e genes específicos regulados para mais ou para menos. A organização dos micro-organismos em biofilmes ocorre naturalmente, pois vivendo neste tipo de comunidade aumentam

consideravelmente as probabilidades de sobrevivência destes seres microscópicos. A produção de substâncias poliméricas extracelulares por micro-organismos é aceita como um mecanismo-chave para facilitar a adesão celular irreversível a superfícies inanimadas em ambientes aquosos, promovendo assim o desenvolvimento de um biofilme (BEECH *et al.*, 2005).

Biofilmes bacterianos estão relacionados a problemas de saúde humana, pois são responsáveis por muitas doenças infecciosas, associadas a muitas superfícies inertes, incluindo aparatos médicos para uso interno e externo. Podem estar presentes em tubulações de água em hospitais levando à aquisição de infecções após internamento (BORDI; BENTZMANN, 2011). É relevante evidenciar que, a formação de biofilmes em dispositivos médicos, tais como cateteres ou implantes, resultam em infecções crônicas de difícil terapia (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004; DONLAN, 2008; HATT; RATHER, 2008).

Desde as primeiras observações usando microscopia confocal, tornou-se evidente que biofilmes maduros vivos não são camadas únicas estruturadas de células microbianas em uma superfície. Ao invés disso, eles aparecem como entidades heterogêneas em tempo e espaço, constantemente mudando em decorrência de processos externos e internos (DONLAN; COSTERTON, 2002). Um biofilme pode ser formado por uma única espécie bacteriana ou fúngica, embora possa também consistir de muitas espécies bacterianas, fúngicas, e ainda algas e protozoários (BATONI *et al.*, 2011). Um exemplo de biofilme monoespecífico são aqueles formados em válvulas cardíacas de pacientes com endocardite infecciosa formados por *Staphylococcus epidermidis* (BUTANY *et al.*, 2002). Além disso, infecções têm sido associadas com a formação de biofilmes em superfícies humanas tais como dente, pele e o trato urinário (HATT; RATHER, 2008) (Quadro 1). Esta organização em comunidade que os micro-organismos podem assumir confere resistência a muitos antimicrobianos, proteção ao ataque de protozoários e frente às defesas do hospedeiro (MATZ; KJELLEBERG, 2005; ANDERSON; O'TOOLE, 2008).

Quadro 1 - Infecções/doenças humanas associadas com formação de biofilmes e micro-organismos comumente envolvidos.

Doenças associadas a biofilmes / Principais micro-organismos envolvidos	
Endocardite valvular nativa	<i>Staphylococcus aureus</i>
Otite	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Infecção do trato urinário	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
Fibrose cística	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i>
Doenças periodontais	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Bacteroides forsythus</i> , <i>Treponema denticola</i>
Cárie	<i>Streptococcus mutans</i>
Artrite séptica aguda	<i>S. aureus</i>
Prostatite bacteriana crônica	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>
Aparelhos médicos colonizados por biofilmes	
Válvulas do coração	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Candida spp.</i>
Cateter venoso central	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
Cateter urinário	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i>
Acrílicos dentais	<i>C. albicans</i>
Aparelhos intra-uterinos	<i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>C. albicans</i>

Fonte: BATONI *et al.*, 2011 com modificações.

Atualmente sabe-se que em ambientes naturais 95-99% dos micro-organismos existem na forma de biofilmes (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007). Estas comunidades protegem seus habitantes microbianos não apenas do oxigênio, mas também das consequências de outros fatores ambientais danosos (PAERL; PINCKNEY, 1996). Bactérias crescendo em biofilmes podem causar infecções crônicas (COSTERTON *et al.*, 2003) que são caracterizadas por inflamação persistente e dano tecidual (BJARNSHOLT *et al.*, 2009). Infecções crônicas, incluindo infecções de corpo estranho, são infecções que 1) persistem à despeito de antibioticoterapia, sistema imune inato e adaptativo e resposta inflamatória do hospedeiro e 2) em contraste à colonização, são caracterizados por resposta imune e persistência patológicos (HOIBY *et al.*, 2010).

Micro-organismos pertencentes a essas comunidades microbianas exibem propriedades únicas, tais como tolerância multidroga e resistência tanto à opsonização quanto à fagocitose, permitindo-lhes sobreviver em ambientes hostis e resistir a pressões seletivas (WEITÃO, 2009). Parece que a imunidade do hospedeiro é ineficiente em “limpar” essas microcomunidades, pois, evidências mostram a incapacidade de células fagocíticas em realizar suas funções (LEID *et al.*, 2002) ou, possivelmente, mesmo que haja fagocitose, parece haver uma diminuição na produção e liberação de espécies reativas de oxigênio (JESAITIS *et al.*, 2003).

Estas comunidades apresentam caráter único também porque abrigam diferentes espécies em uma estrutura na qual podem cooperar, preferencialmente, do que competir (BORDI; BENTZMANN, 2011) (Quadro 1). Constituem sociedades microbianas com seu próprio conjunto de regras sociais e padrões de comportamento, incluindo o altruísmo e cooperação, o que favorece o sucesso do grupo (SHAPIRO, 1998; PARSEK; GREENBERG, 2005) compartilhando comportamentos, por um lado, e competição (VELICER, 2003) por outro. Determinadas subpopulações podem exibir especialização; esses padrões de comportamento são orquestrados por comunicações químicas (WEIGEL *et al.*, 2007). Assim, se constituem em uma forma única de interações entre as espécies, induzindo mudanças marcantes nas relações simbióticas entre seus componentes (HANSEN *et al.*, 2007).

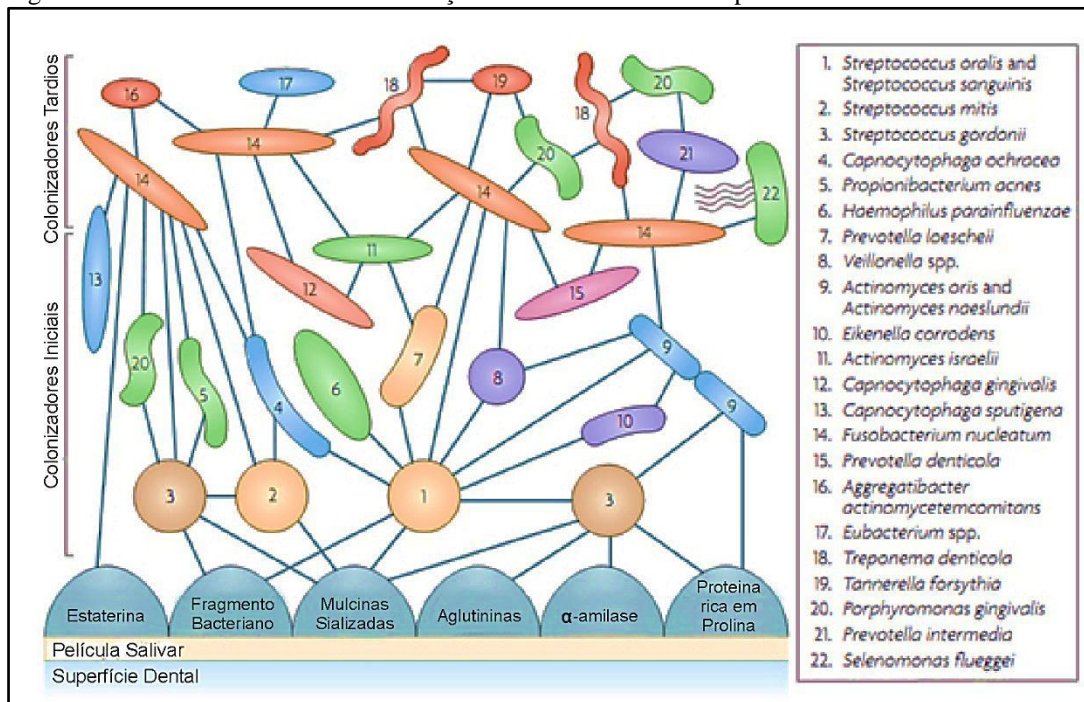
2.2 Biofilme oral

A formação da placa bacteriana sobre a superfície dental ocorre inicialmente com o contato entre os micro-organismos e a saliva na cavidade oral, onde há a formação da película adquirida do esmalte (LEACH; SAXTON, 1966 *apud* SIQUEIRA *et al.*, 2007; HAY,

1967 *apud* SIQUEIRA *et al.*, 2007). Esta película abriga constituintes que influenciam o desenvolvimento da placa. Os constituintes derivados da saliva adsorvem-se seletivamente à superfície, e incluem amilase, lisozima, histatinas, peroxidases, estaterinas, mucina e proteínas ricas em prolina (MAYHALL; BUTLER, 1976 *apud* SIQUEIRA *et al.*, 2007). Algumas dessas moléculas sofrem mudanças conformacionais quando adsorvidas à superfície dental fornecendo sítios de ligação específicos para os micro-organismos (HAY *et al.*, 1971; GIBBONS *et al.*, 1990; BOWEN; KOO, 2011).

Essa película acelular rica em glicoproteínas salivares serve como ponto de ancoragem e interação bacteriana inicialmente de cocos e bacilos Gram-positivos, principalmente o *Streptococcus sanguinis* (PACHECO, 2007). O acúmulo progressivo de bactérias levando ao desenvolvimento inicial da placa bacteriana cria condições para proliferação de anaeróbios, contribuindo para o aumento da diversidade dos micro-organismos presentes nos biofilmes orais (Figura 1).

Figura 1 - Modelo ilustrativo da colonização de bactérias orais na superfície dental



Fonte: KOLENBRANDER *et al.*, 2010, adaptado.

O biofilme maduro que se acumula sobre a superfície dental é constituído por uma grande variedade de micro-organismos, mas, apenas alguns apresentam fatores de virulência que podem levar à instalação e desenvolvimento da lesão cariosa. Estudos de Loesch (1976), Newman (1976) e Slots (1976) foram as bases para a formulação da Teoria da Placa Específica que prevalece até os dias atuais. Esta abordagem mostra que existem diferentes

tipos de biofilmes orais, com diferentes atividades metabólicas relacionadas a diferentes composições microbianas. Em função das diferenças metabólicas tais biofilmes apresentam diferentes ações sobre seus substratos de crescimento (DE LORENZO, 2010).

Loesche e colaboradores em 1975 verificaram a relação direta da presença de *Streptococcus mutans* com o desenvolvimento da cavitação relacionada à doença cárie em pacientes com consumo de sacarose. O desenvolvimento da lesão de cárie está relacionado com a capacidade de produzir ácido láctico por este microrganismo como resultado do metabolismo da sacarose. Este ácido láctico catalisa o crescimento da *Veillonella alcalescens*, que contribui para uma maior complexidade da placa dentária. Por outro lado, alguns microrganismos produzem dextrano (a partir da metabolização da sacarose), que funciona como molécula de adesão das bactérias entre si, mais especificamente o *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* e o *Actinomyces viscosus*, com alta afinidade para as glicoproteínas salivares (CAWSON; ODELL, 2002; PACHECO, 2007).

A adesão dos micro-organismos ao dente e aos tecidos bucais pode ser determinada por moléculas de adesão que se ligam a receptores específicos, habitualmente açúcares simples. Este processo envolve os antígenos adesina I e II, as glucosiltransferases (Gtfs) e a proteína de ligação ao glucano (*Glucan binding protein-Gbp*) (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Posteriormente, a placa bacteriana é colonizada por *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, que produzem Gtfs. Estas enzimas são capazes de clivar a sacarose em glicose e frutose, e de catalisar a polimerização das moléculas de glicose em dextrano hidrossolúvel e em dextrano insolúvel em água, substâncias fundamentais para a agregação dos estreptococos entre si e à película dentária (PACHECO, 2007). No entanto, o *Streptococcus mutans* parece produzir essencialmente dextrano hidrossolúvel, o que explica a sua maior facilidade para formar o biofilme dental, conseqüentemente levando ao desenvolvimento da cárie (PACHECO, 2007).

Streptococcus mutans apresenta-se *in vivo* quase exclusivamente como biofilme na superfície dental. BrpA (*Biofilm regulator protein*), uma proteína associada a superfície, parece estar envolvida na regulação da divisão celular, autólise, tolerância ao stress e formação de biofilmes (WEN *et al.*, 2006). Desta forma, observa-se que a formação de biofilmes é um processo altamente regulado e relacionado à expressão de genes de virulência.

A placa dentária é tipicamente um sistema com múltiplas espécies formando uma comunidade microbiana, onde o potencial de espécies patogênicas pode coexistir com seres inofensivos, micro-organismos comensais. Fatores ambientais e/ou genéticos podem

promover sobrecrecimento das espécies patogênicas e contribuir com o aparecimento de doenças bucais (BATONI *et al.*, 2011).

2.3 Mecanismos de formação dos biofilmes

O entendimento das bases moleculares do desenvolvimento dos biofilmes tem sido favorecido por melhoramentos dos métodos genéticos, genômicos e desenvolvimento de técnicas de visualização que revelam os processos envolvidos no desenvolvimento, fisiologia e adaptação dos micro-organismos a esta condição de vida. Uma plethora de sistemas permite à bactéria identificar e ancorar a superfícies apropriadas e aderir umas as outras para formar comunidades multicelulares (BORDI; BENTZMANN, 2011).

Esse crescimento bacteriano em culturas puras tem sido a principal maneira de se realizar cultivo microbiológico desde o tempo de Pasteur até os dias atuais. Esses tipos de experimentos têm servido bem para fornecer conhecimento e entendimento da genética e metabolismo procariótico e tem facilitado o isolamento e identificação de patógenos de uma variedade de doenças (COSTERTON *et al.*, 1987).

Quando se tornou evidente que o comportamento de bactérias associadas a superfícies não podia ser predito a partir de observações feitas em micro-organismos cultivados em suspensão, na sua forma planctônica, um novo termo para descrever populações microbianas sésseis foi introduzido através de pesquisas com biofilmes (JAKUBOVICS; KOLENBRANDER, 2010).

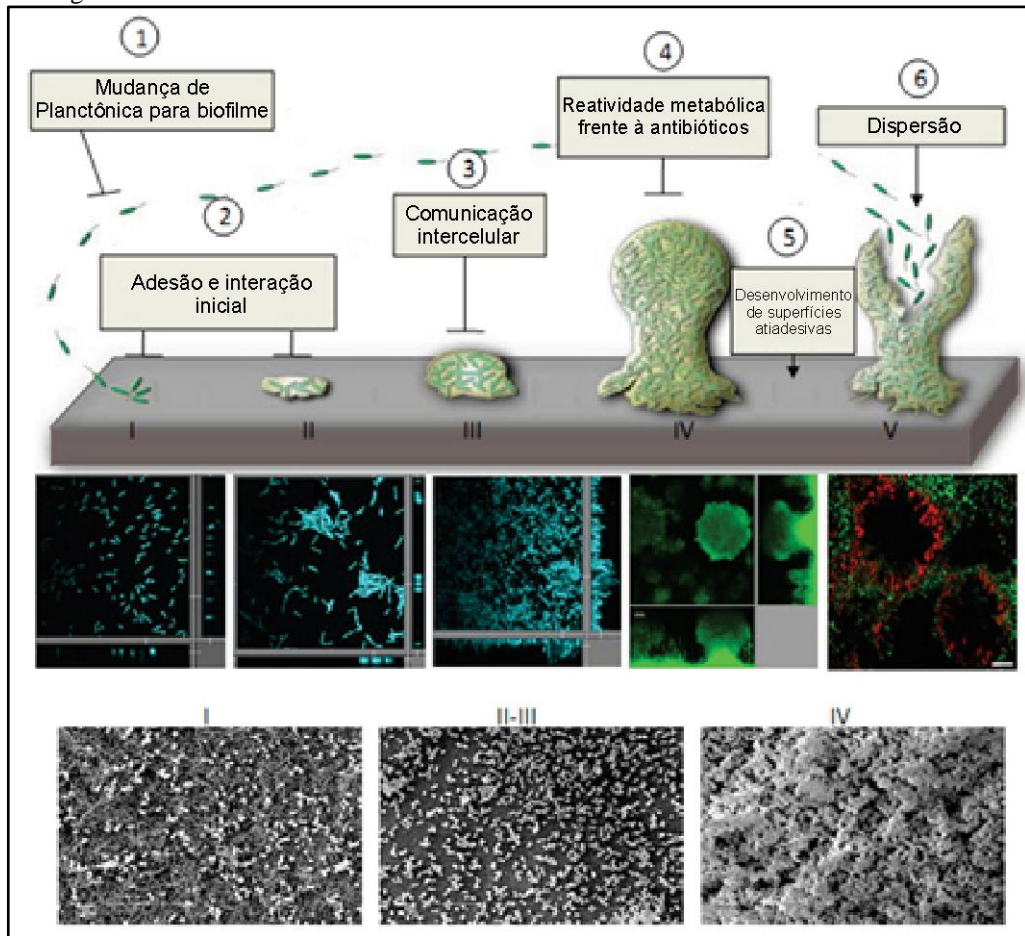
A formação de biofilmes pode ser considerada um mecanismo de proteção para a comunidade bacteriana contra insultos externos, assim, parece razoável que sinais extracelulares específicos regulem a ativação de padrões metabólicos que desencadeiam o estabelecimento dos biofilmes. Essa sinalização externa pode advir de diversas fontes: podem ser produzidas e secretadas pela própria comunidade bacteriana, onde as moléculas são designadas autoindutores, que se acumulam no meio extracelular, sendo sua concentração correlacionada com a densidade populacional (LÓPEZ *et al.*, 2010), e que em altas concentrações, podem desencadear cascatas de sinalização que levam a respostas multicelulares na população bacteriana. Esse mecanismo de comunicação célula-célula (designado *quorum sensing*) controla um grande número de processos incluindo aqueles relacionados à formação do biofilme (CAMILLI; BASSLER, 2006).

Cada espécie bacteriana tem seu próprio arsenal de ferramentas para realizar adesão, e contém um número de moléculas diferentes para cada espécie que podem ser usadas antagonicamente ou sinergicamente, dependendo da situação (HAGAN *et al.*, 2010).

O processo de formação dos biofilmes tem sido extensamente descrito (COSTERTON *et al.*, 1995; HABASH; REID, 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002). Este é um processo que envolve muitas etapas: uma ligação inicial reversível de células plactônicas a uma superfície seguida de uma fase de maturação. A ligação inicial envolve forças de atração e repulsão entre as células e a superfície. Essas forças incluem interações eletrostáticas e hidrofóbicas, forças de van der Waals, forças hidrodinâmicas em temperatura adequadas (AGARWAL *et al.*, 2010). Após a ligação com a superfície as bactérias crescem e dividem-se formando densos aglomerados celulares que caracterizam o biofilme. Esta fase está associada com a produção de polissacarídeo pelas células bacterianas, que se tornam irreversivelmente aderidas ao substrato. Com o tempo, microcolônias desenvolvem-se em um biofilme maduro adquirindo uma arquitetura típica, com projeções tipo cogumelo separadas por canais preenchidos por fluidos. O estágio final (fase de dispersão) envolve o desligamento de células unitárias ou grupos celulares do biofilme maduro, sendo considerada uma etapa essencial para a disseminação bacteriana (Figura 2) (BATONI *et al.*, 2011).

Tanto quanto a hidrofobicidade celular e a presença de fímbrias e de flagelos, a produção de PEC é um dos principais fatores que influencia a taxa e o grau de adesão de células microbianas em diferentes superfícies, além de proteger contra o estresse ambiental e desidratação (VU *et al.*, 2009). Desta forma, a produção de PEC tem sido alvo de diversas pesquisas para impossibilitar o processo de formação e de maturação dessas comunidades microbianas (MURRAY *et al.*, 2009; NAGORSKA *et al.*, 2010).

Figura 2 - Esquema de ciclo de crescimento universal dos biofilmes com características comuns em quatro estágios.



Fonte: BORDI; BENTZMANN, 2011, adaptado. Os estágios de desenvolvimento dos biofilmes incluem: iniciação (I), maturação (II e III), manutenção (IV), e dissolução (V).

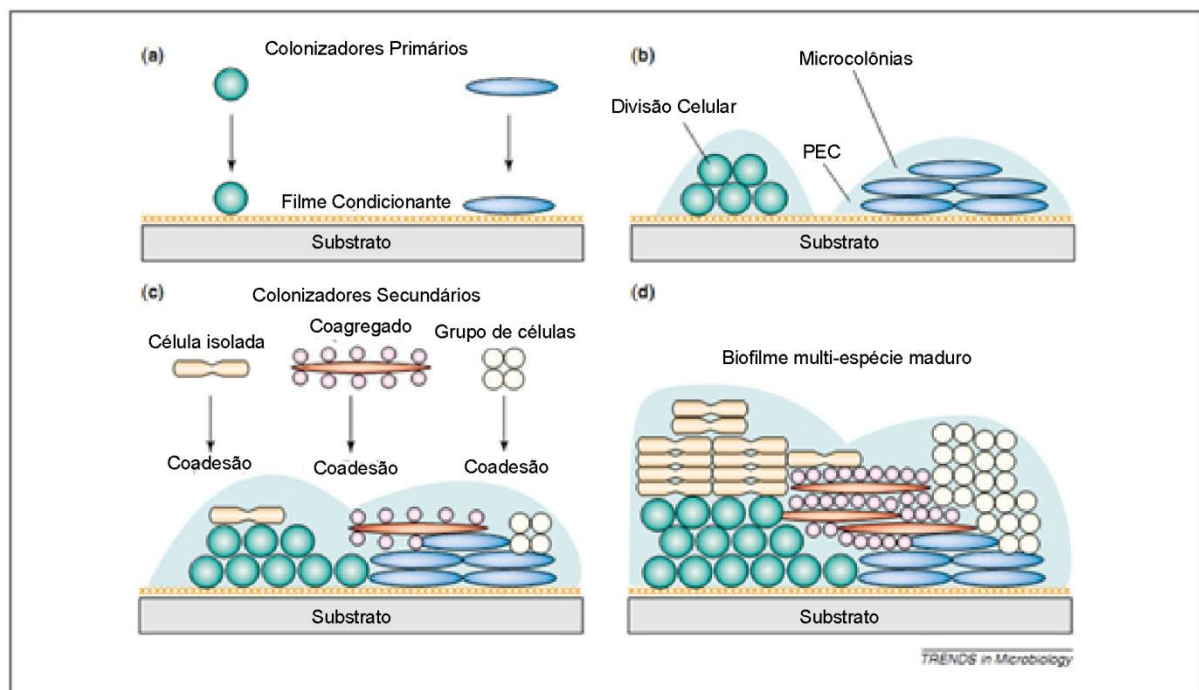
Os colonizadores iniciais interagem com a superfície através de interações fracas, principalmente do tipo forças de van der Waals. Caso estes primeiros micro-organismos não sejam retirados da superfície, por ação mecânica ou química, podem ancorar-se de forma mais permanente através de moléculas de adesão celular, tais como pili e flagelo (Figura 3) (CARNEIRO *et al.*, 2010). A adesão dos micro-organismos aos tecidos moles adjacentes é determinada pela existência de moléculas de adesão (adesinas), que se fixam a receptores específicos, habitualmente açúcares simples (PEREIRA *et al.*, 2010).

As primeiras microcolônias criam substrato e ambiente propícios para chegada de outras células através de sítios de adesão e começam a construir a matriz que formará o biofilme. Apenas algumas espécies são capazes de aderir a uma superfície em si. Outras podem ancorar-se à matriz ou até mesmo diretamente às colônias já existentes. Uma vez que a colonização tenha iniciado, o biofilme se desenvolve através de uma combinação de divisão celular e de recrutamento de outras células (CARNEIRO, 2010).

Em se tratando do esmalte dental, os primeiros colonizadores são principalmente os estreptococos do grupo mitis, que incluem, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus gordonii* (BLACK *et al.*, 2004), que representam 56% do total da microbiota inicial (NYVAD; KILIAN, 1999). Espécies pioneiras se multiplicam formando microcolônias as quais ficam mergulhadas em muco bacteriano extracelular, polissacarídeos e proteínas salivares adsorvidas, resultando em um filme confluyente de micro-organismos (Figura 3).

O metabolismo destas espécies pioneiras cria condições apropriadas para colonização por bactérias com maior nível de exigências atmosféricas (PHILIP; MARTIN, 2005). Cooperação metabólica é bem documentada entre espécies bacterianas da flora oral (KOLENBRANDER *et al.*, 2002; KURAMITSU *et al.*, 2007) e o desenvolvimento subsequente da placa dental envolve coagregações intergenéricas com os colonizadores primários (PHILIP; MARTIN, 2005) (Figura 3).

Figura 3 - Diagrama ilustrando as etapas de formação de um biofilme multiespécie.



2.4 Resistência dos biofilmes às medidas antimicrobianas

Os métodos primários para o controle de doenças relacionadas à placa dental envolvem remoção da maior quantidade destes depósitos microbianos e a proteção do esmalte dental. Estas abordagens são razoavelmente efetivas, pois a cárie e a doença periodontal permanecem sendo doenças muito prevalentes no mundo ocidental. Esta é uma área que merece investimentos da ciência no sentido de utilização de métodos e produtos que interfiram com o acúmulo bacteriano através do controle da adesão, inibição da comunicação interbacteriana ou o estabelecimento da matriz polissacarídica (JAKUBOVICS; KOLENBRANDER, 2010).

A maioria dos indivíduos tem dificuldade em manter os padrões necessários de controle de placa por períodos prolongados. Estratégias adicionais vêm sendo desenvolvidas de forma a tornar o controle de micro-organismos patogênicos menos dependentes do paciente, estratégias estas que devem favorecer os métodos convencionais de higiene mantendo os níveis de placa compatíveis com saúde.

A cavidade oral é colonizada por uma rica coleção de micro-organismos benéficos que vivem em harmonia com o hospedeiro, havendo benefícios para ambas as partes. Desta forma, produtos de cuidados à saúde oral devem preferencialmente tentar controlar os níveis de placa ao invés de eliminá-la, de forma que permaneçam as propriedades benéficas da microflora residente (MARSH, 1992; MARSH, 2010).

Desse modo, existem medidas consideradas antiplaca, que previnem a formação dos biofilmes e medidas antimicrobianas que envolvem ações de inibição ou morte de bactérias-alvo, atividades estas que podem ser expressas em termos de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Estas técnicas são aplicadas em testes com bactérias na sua forma planctônica. No entanto, é mais preditivo para uso clínico a realização de testes utilizando técnicas de formação de biofilmes ou mesmo avaliação frente a biofilmes maduros.

O objetivo do uso de adjuvantes aos métodos mecânicos de controle da placa dental deve ser manter ou restaurar o balanço saudável do microbioma oral. Placa associada à saúde é geralmente representada por um biofilme imaturo e composto primariamente por Gram-positivas anaeróbias facultativas (AAS *et al.*, 2005; WADE, 2010). Uma das maneiras de realizar-se o controle da placa é bloqueando mecanismos específicos de aderência e/ou coagregação durante o desenvolvimento destas comunidades (KELLY; YOUNSON, 2000).

Estes mecanismos incluem o uso de análogos de adesinas, anticorpos para epítomos-chave e peptídeos que bloqueiem sítios específicos.

A interrupção dos mecanismos de *quorum-sensing* é outro possível alvo para terapias frente aos biofilmes (NJOROG; SPERANDIO, 2009). Medidas deste tipo podem tornar bactérias associadas a biofilmes mais susceptíveis a antimicrobianos ou diminuir sua patogenicidade (BJARNSHOLT *et al.*, 2005).

Uma grande variedade de agentes tem sido formulada de forma a aumentar o potencial de controle de placa, entre eles: antibióticos, compostos quaternários de amônio, acetato e gluconato de clorexidina (OLIVEIRA, 1998; BRADING; MARSH, 2003; BAEHNI; TAKEUCHI, 2003). Clorexidina apresenta boa substantividade, com amplo espectro de atividade frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras e pode reduzir a placa associada à cárie e gengivite (KLEEREBEZEM *et al.*, 1997; MUKAMOLOVA *et al.*, 1998).

A clorexidina tem aplicações no tratamento periodontal, infecções dermatológicas, feridas da pele, infecções oftalmológicas e de garganta e endodontia (TEIXEIRA; CORTÊS, 2005). Seu uso frequente e por longo prazo, apresenta muitos efeitos colaterais como mudanças no sabor dos alimentos, e uma sensação de queimação na ponta da língua (GREENBERG *et al.*, 2008; MORE *et al.*, 2008; PORTO *et al.* 2009). Além disso, a clorexidina é menos eficiente na redução de níveis de *Lactobacillus*, que são fortemente relacionados com a evolução da cárie (AMBRÓSIO *et al.* 2008).

Alguns fatores devem ser considerados para a seleção de uma substância antimicrobiana, como: toxicidade, baixa permeabilidade, retentividade e capacidade de manutenção do equilíbrio da microbiota residente na cavidade bucal (CURY, 2003). Outra importante consideração é a forma de veiculação e administração destes agentes antiplaca. A liberação destes na cavidade oral pode ser feita através de bochechos, *sprays*, dentifrícios, géis ou veículos de liberação prolongada, como vernizes (SCHEIE, 2007).

Considerando essas observações, a utilização de produtos naturais como recurso para saúde é tão antiga quanto a civilização humana e, por muito tempo, produtos minerais, vegetais e animais, constituíram o arsenal terapêutico disponível às populações (EISENBERG *et al.*, 1998). Embora a presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores não seja um fato recente, somente a partir da descoberta da penicilina é que esta busca teve grande impulso (TAVARES, 1996; COELHO *et al.*, 2004).

As plantas possuem várias vias metabólicas secundárias que dão origem a diversos compostos como alcalóides, flavanóides, isoflavanóides, taninos, cumarinas,

glicosídeos, terpenos, poliacetilenos que, por vezes, são específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies, e cujas funções, até pouco tempo, eram desconhecidas (COWAN, 1999; SIMÕES *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2010). Com o avanço das pesquisas, foram atribuídas às referidas substâncias importâncias relevantes nos mecanismos de defesa das plantas contra seus predadores sejam fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos ou animais superiores (LIMA, 2006).

Pesquisas envolvendo a biodiversidade da flora brasileira apresentam-se como uma fonte extremamente promissora para a descoberta de novas substâncias que possam ser utilizados no tratamento de várias doenças (CARNEIRO, 2010). Embora poucos estudos sejam relatados na literatura (NASCIMENTO *et al.*, 2000; ABURJAI *et al.*, 2001; AQIL *et al.*, 2005), a avaliação da ação sinérgica entre produtos naturais e antibióticos de uso corrente na clínica médica parecem um campo promissor na tentativa de minimizar o efeito de cepas resistentes ou ainda a capacidade dos micro-organismos organizados em biofilmes de resistir as medidas antimicrobianas.

Capítulo 3-Revisão de Literatura
Cárie Dentária

3 CÁRIE DENTÁRIA

3.1 Aspectos gerais

Cárie é uma palavra que deriva do latim *carie*, que significa apodrecimento, decomposição, destruição, corrosão (DE LORENZO, 2010). Embora esta patologia apresente a cavitação como seu principal sinal clínico, a instalação desta doença infecciosa multifatorial e transmissível precede esta evidência.

É fundamental conceituar-se a cárie dentária como um processo anormal, pois vai contra as condições naturais onde o homem primitivo não desenvolvia uma lesão no esmalte que pudesse ser considerada cárie dentária, por estar inserido em uma biodiversidade comandada pela natureza, em um equilíbrio físico-químico (LIMA, 2007). O desequilíbrio da ecologia bucal gerado pela introdução de alimentos e hábitos incompatíveis com a manutenção da saúde bucal instalou na humanidade uma das doenças mais abrangentes existentes. A cárie é uma doença infecciosa, transmissível que é fortemente modificada pela dieta e tem sido uma das doenças mais prevalentes nos seres humanos (KRASSE, 1965 *apud* CARVALHO, 2010). Através dos tempos, muitas teorias sobre a sua etiologia foram levantadas, porém só em 1890 com os estudos de W. D. Miller é que se formou a base para a teoria acidogênica ou químico-parasitária de desenvolvimento da cárie (CARVALHO, 2010). Verifica-se, portanto, uma destruição progressiva dos cristais de hidroxiapatita pelos ácidos bacterianos, levando a uma descalcificação e posterior perda da estrutura do dente.

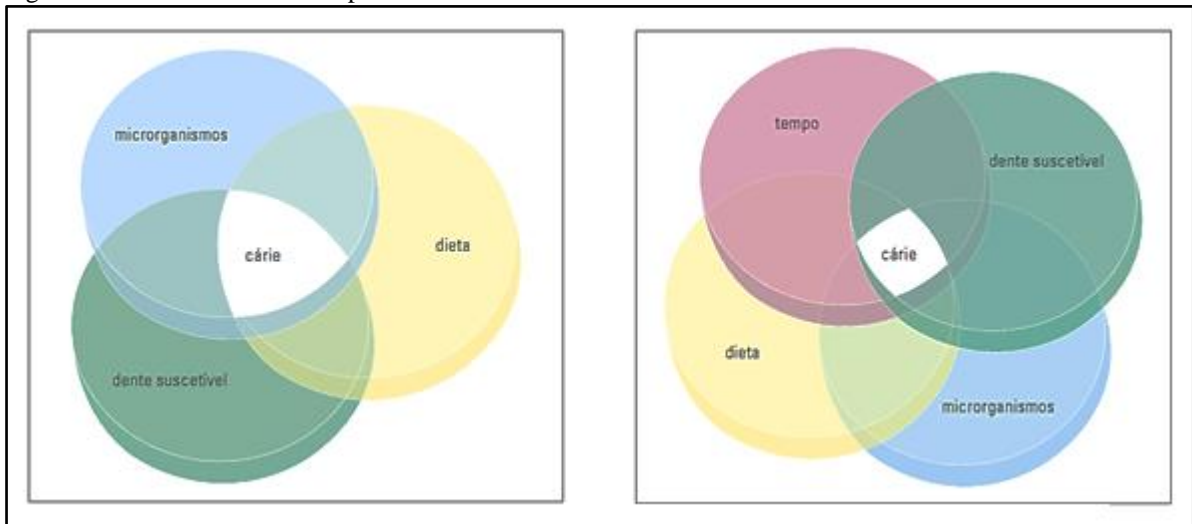
Em 1820, foi postulado que a cárie, especificamente a lesão cariiosa, seria causada por um agente químico formado a partir de restos alimentares acumulados sobre os dentes. Quinze anos depois, em 1835, afirmou-se que estes agentes químicos eram ácidos orgânicos resultantes da fermentação de alimentos aderidos ao dente, sendo este um processo de origem química e não microbiana. Após a descoberta de Pasteur, que relacionou o processo de fermentação aos micro-organismos em 1867 demonstrou-se, *in vitro*, que a fermentação de açúcares leva à dissolução da estrutura dental (DE LORENZO, 2010).

No final da década de 40 do século passado, a cárie dentária foi considerada como uma doença infecciosa e transmissível, mas os principais micro-organismos responsáveis pela doença só foram identificados na década seguinte (FEJERSKOV, 2003; PEREIRA, 2010). Atualmente, esta doença é descrita como uma patologia multifatorial, onde fatores como a anatomia da cavidade oral, a resistência dentária, a composição da saliva, o líquido sicular e a dieta, assim como a formação da placa bacteriana e seus micro-organismos causadores, podem contribuir para da doença (FEJERSKOV, 2003; PEREIRA, 2010).

O caráter infeccioso da doença cárie foi demonstrado quando, em 1954, foi observado que ratos de linhagem bastante susceptível à cárie não desenvolveram a doença se mantidos isentos de micro-organismos demonstráveis apesar de alimentação por meses de dieta rica em sacarose (PEREIRA, 2010).

O conceito da cárie dentária como uma doença infecciosa e transmissível associada à presença de estreptococos ocorreu somente após estudos na década de 60 em trabalho referente à observação do processo cariioso em roedores (Figura 4) (FITZGERAED,1960). A progressão da cárie, geralmente, ocorre de forma lenta existindo fatores do hospedeiro, que auxiliam na sua formação ou controlam o seu crescimento.

Figura 4 – Fatores concorrentes para desenvolvimento da cárie dentária.



Fonte: LIMA, 2007, adaptado. (A) Diagrama de Keyes; (B) Diagrama de Keyes modificado por Newbrum incluindo o fator tempo.

A cárie dentária é uma doença crônica que progride lentamente na maioria dos indivíduos. A destruição localizada dos tecidos duros, referida como lesão, é o sinal ou sintoma da doença (FEJERSKOV *et al.*, 2008). As lesões progridem desde perda inicial de mineral ao nível ultraestrutural até a destruição total do dente. Na realidade, o desenvolvimento da lesão cariiosa é uma série de processos altamente dinâmicos com períodos alternados de progressão e regressão (Figura 5) (BACKER-DIRKS, 1966 *apud* NYVAD *et al.*, 2003).

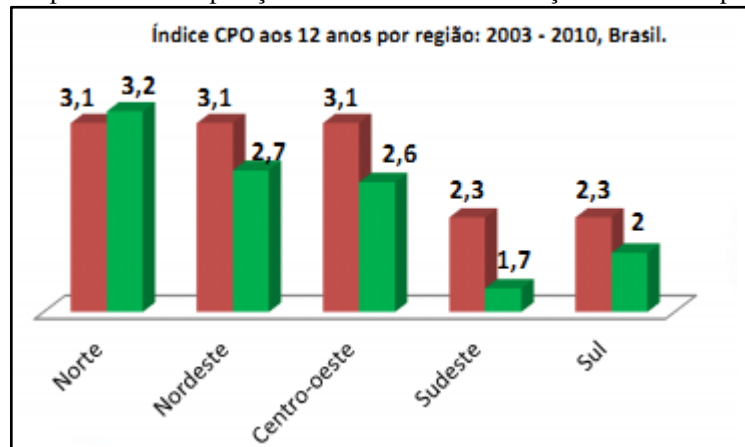
Figura 5 - Desenho esquemático da progressão da doença cárie.



Fonte: (<http://www.arthurstreetdental.com.au/>).

De acordo com Petersen (2003), a cárie dentária continua sendo o principal problema de saúde bucal na maioria dos países industrializados, afetando cerca de 60 a 90% dos escolares e praticamente todos os adultos. Para os levantamentos epidemiológicos o índice mais usado é o de dentes cariados, perdidos e obturados, CPO-D, inicialmente formulado por Klein e Palmer, em 1937. Este índice até hoje permanece sendo o mais utilizado em todo mundo, mantendo-se como o ponto básico de referência para o diagnóstico das condições dentais e para formulação e avaliação de programas de saúde bucal (KLEIN; PALMER, 1937 *apud* CARVALHO *et al.*, 2010). Desde 1969, a OMS tem publicado periodicamente os dados de levantamentos epidemiológicos efetuados em diversos países, dando especial atenção ao índice CPO-D em crianças com 12 anos de idade, um importante referencial de saúde ou de atividade de cárie dental. No Brasil, o Governo Federal vem aplicando avaliações periódicas através de um programa chamado *SB Brasil: pesquisa nacional de saúde bucal* como política do Brasil Sorridente. Comparando-se as duas últimas análises realizadas em 2003 e 2010, percebe-se um declínio no índice CPO-D em crianças de 12 anos (Figura 6), o que indica uma melhora nas condições de acesso às medidas de prevenção em saúde bucal desta parcela da população.

Figura 6 – Gráfico que representa a comparação do índice CPO de crianças aos 12 anos por região brasileira.

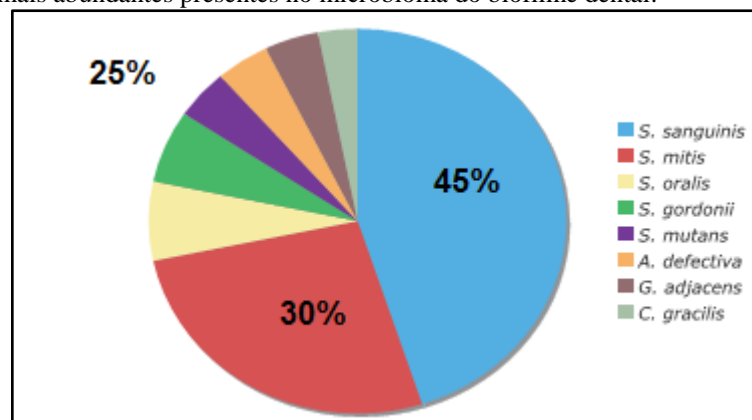


Fonte: (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresentacaonova_281210.pdf).
 ■ 2003; ■ 2010

3.2 Micro-organismos no desenvolvimento da cárie dentária

Aproximadamente 280 espécies bacterianas da cavidade oral já foram isoladas em cultura e nomeadas formalmente. Tem sido estimado que menos da metade do total das espécies bacterianas encontradas na boca podem ser cultivadas usando métodos aeróbicos e anaeróbicos, sabendo-se que existem aproximadamente de 500 a 700 espécies comumente presentes na cavidade oral (PASTER, *et al.*, 2001; DEWHIRST *et al.*, 2010). Métodos moleculares independente de cultivo, baseados em estudos de clonagem referentes ao gene 16S rRNA, tem validado essa estimativa identificando aproximadamente 600 espécies (Figura 7) (DEWHIRST *et al.*, 2010).

Figura 7 - Espécies mais abundantes presentes no microbioma do biofilme dental.



Fonte: PETERSON *et al.*, 2011, adaptado.

Estudos detalhados da bioquímica e biologia molecular de bactérias cariogênicas permitiram que os traços associados à cariogenicidade fossem identificados. Estes incluem:

(1) a expressão de sistemas de transporte de açúcar de alta afinidade para captação de carboidratos fermentáveis e a rápida conversão dos açúcares transportados em ácidos e produtos metabólicos (acidogenicidade); (2) habilidade de tolerar, crescer e continuar a produzir ácido em ambientes de baixo pH (acidotolerância); (3) a síntese de polímeros extracelulares, especialmente mutana e dextrana, a partir da sacarose para consolidar a adesão à superfície dental e (4) a produção de polissacarídeos intracelulares durante períodos de grande disponibilidade de carboidratos; esses componentes armazenados podem ser convertidos em ácido nos períodos entre as refeições (LOESCHE, 1986; TANZER, *et al.*, 2001; LEMOS *et al.*, 2005; MARSH, 2010)

Loesch em 1986 confirmou o que havia comprovado em estudo anterior (1975) afirmando ter evidências substanciais da associação de *Streptococcus mutans* com o desenvolvimento da cárie dental. Nesse estudo de 1975 foi demonstrada uma forte relação entre a presença desta bactéria na placa bacteriana associada a fissuras com cárie incipiente, havendo nesses sítios um correspondente decréscimo na prevalência de *S. sanguinis* comparado aos sítios livres de cárie (LOESCH *et al.*, 1975).

Já em 1980, Hamada e Slade postularam que aparentemente não se poderia nomear um único micro-organismo como responsável pela cárie dental. O mais certo seria dizer que vários micro-organismos são essenciais para patogênese desta doença.

Streptococcus sobrinus tem sido relacionado ao desenvolvimento da cárie particularmente na ausência de *S. mutans*. Este microrganismo tem a capacidade de produzir níveis de ácido e tolerância a estes maiores que o *S. mutans* (PETERSON *et al.*, 2011).

O grupo mutans apresenta espécies heterogêneas do ponto de vista antigênico e genético, dando origem a várias linhagens que permitem o conhecimento de diferentes biotipos deste grupo bacteriano (CARLSSON, 1969 *apud* PETERSON *et al.*, 2011). *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* destacam-se por apresentarem maior número de colônias isoladas a partir de amostras de saliva (PETERSON *et al.*, 2011).

Alguns estudos realizados por Carlsson (1969) e Edwardsson (1968), tentaram mostrar que os estreptococos cariogênicos isolados apresentavam características compatíveis com o *Streptococcus mutans*, justificando, assim, a relação desta espécie com a cárie dental como o seu principal agente etiológico, podendo ser isolado de placas dentais ou da saliva de indivíduos cárie-ativos (LOESCHE, 1982).

Streptococcus mutans são amplamente distribuídas não apenas em populações com moderada ou alta prevalência de cárie, como também nas populações com baixa ou nenhuma experiência de cárie (NAPIMOGA *et al.*, 2004). Uma possível explicação para sua

presença em indivíduos com baixa experiência de cárie é a dependência de fatores de virulência dos estreptococos e dos fatores promotores da doença que podem diferir entre populações com prevalência de cárie (NAPIMOGA *et al.*, 2004).

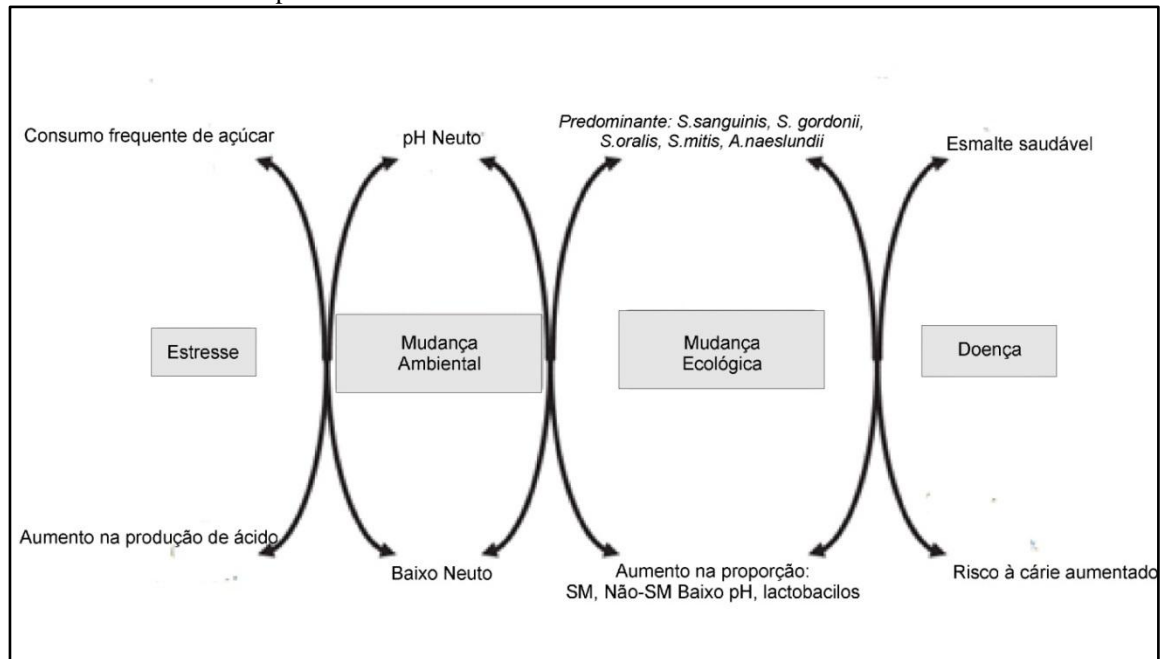
Alguns estudos mais recentes indicam que a relação entre cárie dentária e Estreptococos do grupo mutans não é absoluta; foi observado que alguns sítios dentais podem apresentar altas proporções destes micro-organismos e, no entanto não apresentar lesão ou, de forma inversa, haver desenvolvimento de lesão cáriosa sem a presença das espécies relacionadas à doença (AAS *et al.*, 2008). Nestas situações, sugere-se que outras bactérias acidogênicas e acidúricas não pertencentes a este grupo, incluindo “não-mutans baixo-pH” e *Actinomyces* (van HOUTE *et al.*, 1994, 1996), sejam responsáveis pela iniciação do processo. Estudos moleculares recentes têm reforçado esse conceito mostrando que a microflora associada a lesões de mancha branca é mais diversa do que aquela até então observada e que novos filotipos e espécies incluindo *Actinomyces gernesseriae*, *A. naeslundii*, e *A. israelii* assim como uma ampla gama de Estreptococos não-mutans e *Veillonella* sp podem ainda ter importância (BECKER *et al.*, 2002; AAS *et al.*, 2008; TAKAHASHI; NYVAD, 2008).

Todas as espécies bacterianas associadas à cárie pertencem ao microbioma da cavidade oral, e por isso, a cárie dentária é descrita como uma infecção endógena (FEJERSKOV; NYVAD, 2003). Estas infecções endógenas acontecem quando membros da microflora residente obtém vantagem seletiva sobre as outras espécies havendo perturbação na homeostasia do biofilme (MARSH, 1994).

O acima exposto entra em consenso com a teoria proposta por Marsh (1994) sobre a hipótese ecológica da placa. Esta teoria propõe que há uma relação dinâmica entre o biofilme oral e o ambiente local. Quando há o aumento na frequência de ingestão de açúcar, o metabolismo bacteriano resulta em um biofilme submetido a um baixo pH por um maior período de tempo. Um pH ácido inibe o crescimento de muitas bactérias associadas com a saúde do esmalte e ainda seleciona aquelas bactérias que exibem um fenótipo de capacidade para produção e tolerância a ácidos. Eventos similares podem acontecer caso haja uma diminuição no fluxo salivar. Sob essas condições, a desmineralização acontece, aumentando assim, a probabilidade de desenvolvimento da lesão cáriosa.

Dessa forma, pode-se prevenir o processo de cárie não apenas inibindo diretamente a bactéria causadora, mas, também, interferindo com mudanças no ambiente que dirijam as alterações deletérias na composição e atividade metabólica do biofilme (Figura 8).

Figura 8 - Diagrama de fatores que contribuem para desenvolvimento da cárie dental de acordo com a hipótese ecológica do desenvolvimento da placa dental.



Fonte: MARSH, 1994, adaptado.

3.3 Fatores de virulência das bactérias cariogênicas

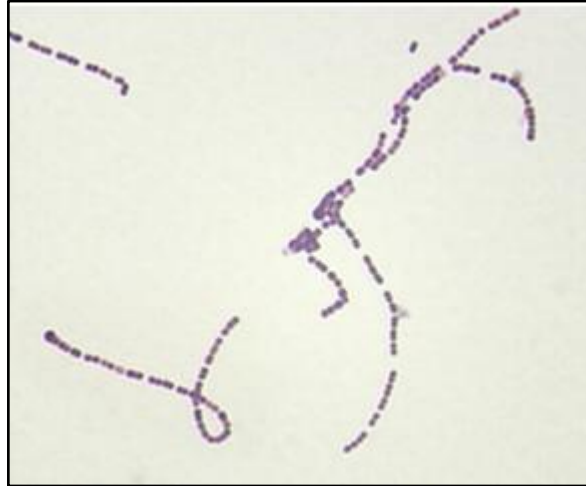
Para se realizar a classificação de uma espécie bacteriana presente no biofilme dental como cariogênica ou iniciadora do processo cariioso, esta bactéria deve exibir mecanismos de virulência que a faça capaz de promover a desmineralização dos tecidos dentais.

Dentre as várias espécies bacterianas que podem compor o biofilme dental nos seres humanos, apenas algumas são capazes de preencher os requisitos básicos de cariogenicidade; dentre estas se destacam, para lesões em esmalte, espécies dos gêneros *Streptococcus* e *Lactobacillus*, sendo estes últimos encontrados em zonas mais retentivas (FITZGERALD *et al.*, 1966). Já na superfície radicular, são reconhecidas como cariogênicas as espécies de *Actinomyces naeslundii* e *A. odontolyticus* (ZAREMBA *et al.*, 2006).

É importante destacar que o *S. mutans* parece ser a espécie que preenche de forma convincente os requisitos de cariogenicidade. Os *Streptococcus* do grupo viridans são um grupo de cocos Gram-positivos, catalase-negativos com morfologia em cadeia na visualização ao microscópio de luz (Figura 9). São leucina aminopeptidase positivo, pirrolidonilamidase negativo, não crescem em NaCl 6,5% e quase todas as espécies não crescem no ágar bile-esculina. Incluem os grupos anginosos, mitis, sanguinis, bovis, salivarius e mutans (DOERN; BURNHAM, 2010). Fazem parte dos *Streptococcus* do grupo mutans

(EGM) as espécies *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. mutans*, *S. ferus*, *S. macacae*, *S. sobrinus*, *S. downei* e *S. onisratti*, sendo que *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* são predominantes nas populações humanas (ZHU *et al.*, 2000; DOERN; BURNHAM, 2010).

Figura 9 - Imagem de microscopia de luz de espécie do gênero *Streptococcus* submetida à coloração de Gram.



Fonte: (<http://medinfo.ufl.edu/year2/mmid/imagky.html>).

Características genéticas podem estar relacionadas a diferenças na virulência entre cepas. A habilidade bacteriana de sobreviver e persistir na cavidade bucal irá depender de sua plasticidade genética, que determina a sua capacidade de responder às mudanças locais das condições ambientais ou de estresse (DOBRINDT; HACKER, 2001). O microbioma do biofilme dental está sujeito a variações, devido à redução na disponibilidade de nutrientes e redução do pH, além de exposição aos ácidos orgânicos produzidos na presença de carboidratos fermentáveis (CARLSSON, 1989; NASCIMENTO *et al.*, 2004; VALDEVITE, 2007).

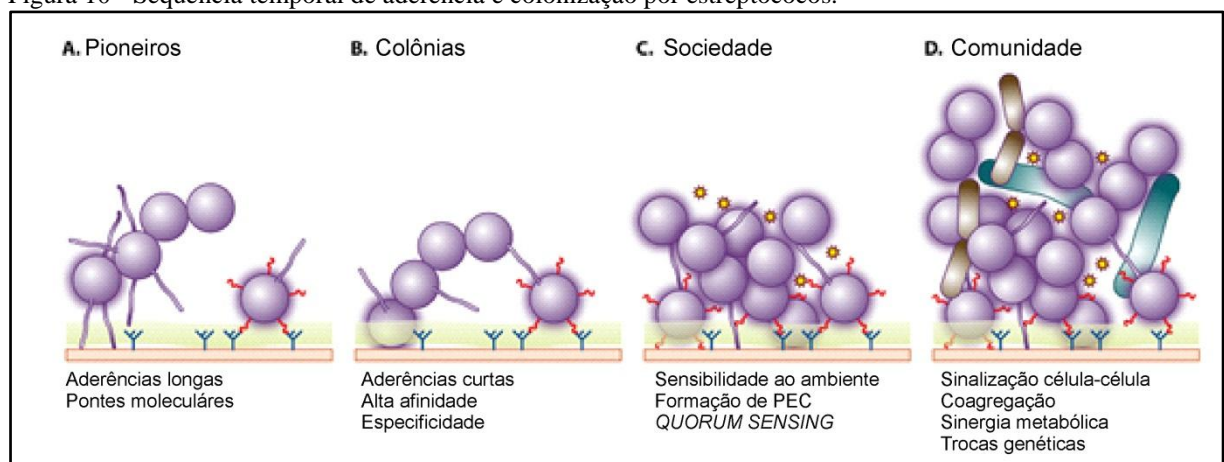
3.3.1 Adesão inicial à superfície dental

Para exibir suas características de patogenicidade um microrganismo precisa inicialmente obter proximidade da superfície a ser colonizada para posteriormente ser bem sucedido em causar doença. O micro-organismo diretamente envolvido na produção de ácido deve estar aderido à superfície dental ou retido nas reentrâncias anatômicas ou patológicas do

dente. Um número limitado de diferentes bactérias, primariamente estreptococos do grupo viridans e *Actinomyces oris*, iniciam a colonização da superfície dental (NYVAD; KILIAN, 1987). Esses organismos ligam-se aos componentes salivares da película adquirida do esmalte, e, através do crescimento e interações entre espécies, formam um biofilme relativamente simples (PALMER *et al.*, 2003). O reconhecimento de bactérias por receptores salivares na superfície dental representa um importante passo inicial na patogênese de doenças orais (RUHL *et al.*, 2004). Exemplos destas interações incluem ligação Has-mediada do *Streptococcus gordonii* ao ácido siálico presente na mucina (TAKAHASHI, *et al.*, 2002; TAKAHASHI, *et al.*, 2004; TAKAHASHI, *et al.*, 2006), ligação mediada por fímbria tipo I do *Actinomyces oris* (antes denominado *Actinomyces naeslundii*) a proteínas ricas em prolina (PRPs) (GIBBONS *et al.*, 1988; RUHL *et al.*, 2004), e adesão mediada por fímbria tipo 2 do *A. oris* ao motivo 1-3GalNAc na mucina (RUHL *et al.*, 2004).

As propriedades bacterianas que contribuem para o desenvolvimento dos biofilmes precoces podem incluir as adesinas de superfície e receptores que mediam as coagregações observadas entre diferentes cepas de *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. mitis* e *A. naeslundii* (Figura 10) (HSU, 1994).

Figura 10 - Sequência temporal de aderência e colonização por estreptococos.



Fonte: NOBBS, *et al.*, 2009, adaptado. (A) espécies pioneiras de estreptococos associadas a uma superfície condicionada (verde), utilizando interações longas (pili) ou interações curtas. (B) Algumas espécies pioneiras formam interações mais fortes com as moléculas da superfície (azul) ligando-se a múltiplas adesinas (vermelho). (C) Adaptação nutricional, sinalização intermicrobiana (estrelas), e produção de substância extracelular polimérica (SEP) resultam na formação de comunidades. (D) Incorporação de outros micro-organismos, incluindo coagregações intergenéricas e sinalização célula-célula, leva ao desenvolvimento de comunidades complexas

A especificidade da adesão microbiana está frequentemente associada com reações carboidratos-proteína (tipo lectina). Carboidratos que são reconhecidos incluem

galactose (Gal), *N*-acetil-galactosamina (GalNAc), ácido siálico (ácido neuramínico-NeuNAc), fucose (Fuc), *N*-acetil-glucosamina (GlcNAc), e glicose (Glc). O reconhecimento de cadeias de carboidratos ou oligossacarídeos contendo Gal é um achado comum no desenvolvimento de comunidades microbianas orais (KOLENBRANDER, *et al.*, 1993). Por outro lado, os polipeptídeos Has e GspB ancorados na parede bacteriana de *S. gordonii* reconhecem resíduos de NeuNAc em células humanas (TAKAMATSU, *et al.*, 2005), enquanto as Gbps expressas por *S. mutans* ligam-se a dextrana (BANAS; VICKERMAN, 2003). O processo de adesão pode levar a um ou mais resultados: colonização por bactérias comensais, infecção superficial dos tecidos, invasão intracelular por patógenos e disseminação sistêmica (NOBBS, *et al.*, 2009).

Um micro-organismo só conseguirá formar comunidades complexas como biofilmes dentais se conseguir aderir a uma superfície e iniciar a expressão de genes relacionados a moléculas de superfície que desempenham este papel. A partir disso, sabe-se que a formação dos biofilmes está, em muitos aspectos, associada diretamente com o desenvolvimento de infecção e doença. Assim, novos agentes que interfiram na adesão inicial ou que destruam os biofilmes podem ser importantes para terapia e prevenção destas comunidades microbianas (NOBBS, *et al.*, 2009).

A inibição específica da adesão bacteriana tem sido considerada como potencial mecanismo para o controle da formação do biofilme oral. Possíveis inibidores incluem moléculas que funcionem dentro da célula ou periplasma inibindo a biossíntese ou montagem das estruturas das paredes celulares bacterianas associadas com adesão ou outras moléculas que funcionem como inibidores específicos na superfície celular (CISAR, *et al.*, 1995).

No *S. mutans*, a produção de polissacarídeo extracelular insolúvel é essencial para a formação de biofilmes. No entanto, polissacarídeos de glucana não medeiam a adesão inicial à superfície dental, a não ser que proteínas ligadoras de glucana (Gbps) estejam presentes na película salivar (BANAS; VICKERMAN, 2003; NOBBS, *et al.*, 2009). Na ausência de sacarose, uma adesina associada à parede celular de 185 kDa pertencente à família dos polipeptídeos estreptocócicos designada como antígeno I/II (RUSSELL; LEHNER, 1978) tem sido relacionada a um importante papel na colonização da superfície dental (JENKINSON; LAMONT, 1997). O gene para esta adesina em *S. mutans* foi clonado e designado como *spaP* (LEE *et al.*, 1988). A inativação deste gene resultou em uma diminuição na agregação celular, o que contribuiu para uma remoção de células de *S. mutans* da cavidade oral (LEE, *et al.*, 1989; KOGA *et al.*, 1990).

3.3.2 Atividade acidogênica e acidotolerância

A lesão inicial do esmalte dental é uma desmineralização da hidroxiapatita carbonatada que ocorre na camada subsuperficial do esmalte dental. Essa desmineralização é causada por ácidos resultantes da fermentação homoláctica de carboidratos formados em quantidade suficiente no biofilme cariogênico. Isso justifica que, para ser reconhecida como cariogênica, uma bactéria deve apresentar uma capacidade metabólica fundamental, a de ser intensamente acidogênica (DE LORENZO, 2010).

De acordo com Loesche (1993), a sacarose obtida e utilizada por *S. mutans* resulta na formação de ATP e ácido lático através da via glicolítica. Para que estas reações aconteçam, a molécula de glicose deve ser transportada para o interior da célula bacteriana. No interior da célula bacteriana, a glicose é fosforilada a glicose-6-fosfato e degradada a piruvato pela via glicolítica, provocando um aumento da concentração intracelular de NADH pela ação da enzima gliceraldeído-fosfatodesidrogenase (TAKAHASHI-ABBE *et al.*, 2001). Para garantir o equilíbrio oxido-redutor da célula, este NADH em excesso precisa ser oxidado a NAD^+ , garantindo a continuidade do processo de quebra da glicose (CARLSSON; HAMILTON, 1994; VALDEVITE, 2007). Caso a célula bacteriana esteja em condições de aerobiose o piruvato é convertido em acetil-CoA pela piruvato desidrogenase e o último intermediário retorna às vias metabólicas bacterianas (CARLSSON *et al.*, 1985). Se o microambiente for de anaerobiose, e houver excesso de substrato, o piruvato será reduzido ao L-ácido lático por uma enzima denominada lactato desidrogenase (ldh), havendo a oxidação do NADH em NAD^+ (IWAMI; YAMADA, 1999).

A ldh é responsável pela produção de lactato, contribuindo assim como um fator de virulência do *S. mutans* (LE MOS *et al.*, 2005). Mutantes de *S. mutans*, deficientes em fatores de virulência específicos, foram mais sensíveis ao estresse ambiental e menos cariogênicos que a cepa original (YAMASHITA *et al.*, 1993; HILLMAN *et al.*, 1996; LEMOS *et al.*, 2005; MATSUMOTO-NAKANO *et al.*, 2007). Esses achados sugerem que a supressão de genes associados à virulência e suas enzimas pode ser atraente para prevenção da cárie dental (XU *et al.*, 2011).

O biofilme potencialmente mais acidogênico é formado na presença de sacarose e apresenta em sua matriz menores concentrações de cálcio, fosfatos e fluoretos do que os desenvolvidos frente a outros carboidratos (DE LORENZO, 1989). Paes-Leme *et al.*, (2004), constataram a presença de proteínas ligadoras de cálcio somente nos biofilmes formados na ausência de sacarose; assim, a ausência destas proteínas no biofilme desenvolvido em

presença deste carboidrato pode explicar a baixa concentração de íons cálcio presente em sua matriz, o que certamente resulta em maior dificuldade para a remineralização do esmalte dental.

As bactérias do biofilme humano que melhor preenchem os requisitos de acidogênese intensa responsáveis por cáries no esmalte são *S. mutans* e *S. sobrinus*, que geram pH em torno de 4, e algumas espécies de *Lactobacillus*, que geram pH próximo de 3 (TAKAHASHI; YAMADA, 1999).

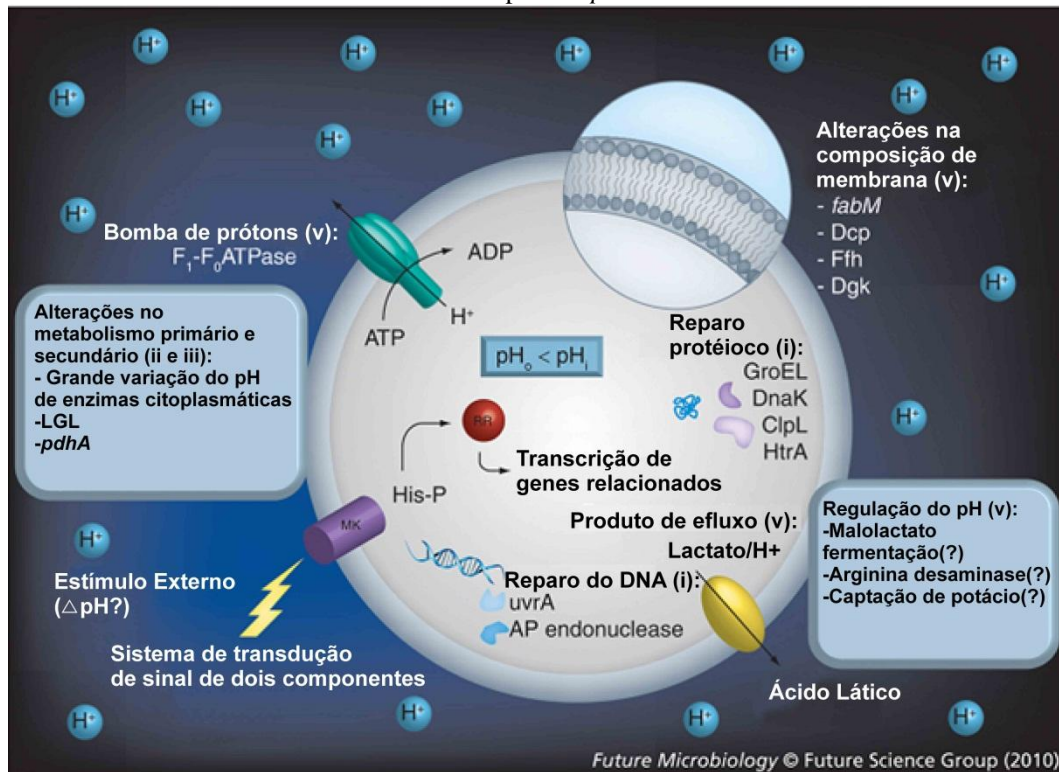
Em 1944, Stephan descreveu a sequência de eventos relacionados à produção de ácidos por micro-organismos com essa capacidade a partir da introdução de carboidratos na cavidade oral. Foram realizadas mensurações do pH da placa dental madura em 65 pessoas antes e após bochecho com solução de glicose a 10% durante dois minutos; o primeiro fato importante que foi obtido destes experimentos foi que todos os grupos, independente de sua atividade de cárie forneceram um desenho padrão de gráfico de resultados conhecido como curva de Stephan. Estes gráficos mostravam que logo após a realização do bochecho havia uma queda no pH, permanecendo baixo por um tempo e em seguida retornava ao ponto basal (média 6,7) (DE LORENZO, 2010).

A capacidade de tolerar ácidos por parte dos EGM deve-se parcialmente a uma proteína ligada à membrana chamada F_1F_0 -ATP, que ejeta prótons para fora da célula, prevenindo uma queda no pH intracelular e consequente dano às enzimas sensíveis aos ácidos, DNA e proteínas (QUIVEY *et al.*, 2001). Uma variedade de outras adaptações, especificamente mudanças nos ácidos graxos de membrana, pode aumentar a tolerância ácida (FOZO *et al.*, 2004; FOZO; QUIVEY, 2004).

Componentes microbianos do biofilme oral experimentam flutuações de pH rápidas e dinâmicas influenciadas pelo nível de presença de carboidratos na dieta resultando em níveis de pH que podem cair da neutralidade pH 7,0 a valores abaixo de 3,0 em menos de 20 minutos (JENSEN *et al.*, 1982; 1989). De forma a suportar estes ciclos de choque ácido, *S. mutans* desenvolve um repertório de mecanismos que culminam em duas categorias distintas: mecanismos constitutivos e mecanismos ácido-induzidos (BURNE, 1998), referidos como resposta de tolerância ácida (RTA) (SVENSATER *et al.*, 1997). A RTA é definida como a habilidade de adaptar-se ao estresse ácido antes de exposição a pHs baixos e sub-letais de aproximadamente 5,5, resultando na indução de estímulo (expressão de certos genes) que favorecem a sobrevivência a pH tão baixo quanto 3,0 (HAMILTON; BUCKLEY, 1991; BELLI; MARQUIS, 1991). Esses mecanismos objetivam: proteção e reparo de macromoléculas intracelulares, alterações nos padrões metabólicos, metabolismo secundário,

densidade celular, formação de biofilme e homeostases do pH intracelular (Figura 11) (COTTER; HILL, 2003; MATSUI; CVITKOVITCH, 2010).

Figura 11 - Mecanismos de tolerância ácida utilizado por *Streptococcus mutans*.



Fonte: MATSUI; CVITKOVITCH, 2010, adaptado. Algarismos romanos simbolizam cada componente envolvido na tolerância ácida i) a proteção e reparo de macromoléculas; ii) alterações de padrões metabólicos; iii) metabolismo secundário; iv) densidade celular, formação de biofilme e sistema regulatório; e v) equilíbrio de pH intracelular. AP: Apurina-apirimidina; LGL: Lactoilglutaciona liase; pH_i: pH intracelular; pH_o: pH externo; RR: Resposta regulatória

3.3.3 Produção de polissacarídeo intracelular (PIC) e extracelular (PEC)

Os polissacarídeos produzidos em um biofilme podem ser divididos em duas categorias: (1) polissacarídeo extracelular (PEC), que promove acúmulo bacteriano na superfície dental, e influencia as propriedades físicas e bioquímicas do biofilme; e (2) polissacarídeo intracelular (PIC), o qual funciona como fonte endógena de carboidratos que podem ser metabolizados levando a produção de ácidos durante os períodos de limitação nutricional (TANZER *et al.*, 1976; ZERO *et al.*, 1986). Tanto PIC quanto PEC apresentam importantes funções nas características de patogenicidade dos biofilmes.

O PEC apresenta um papel central na patogênese da doença cárie, promovendo mudanças fisiológicas e bioquímicas na matriz do biofilme que incluem: (1) aumento da

adesão bacteriana e acúmulo de micro-organismos, (2) fornece integridade estrutural e massa aos biofilmes, e (3) aumento da acidogenicidade da matriz dos biofilmes (PAES-LEME *et al.*, 2006).

Os polissacarídeos intracelulares (PIC) são reservas de carboidratos armazenados intracelularmente por algumas bactérias. No caso dos EGM, trata-se de um tipo de glicogênio-pectina sintetizados por fosfoglicomutanases. Esses polímeros podem ser produzidos por *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Fusobacterium* spp, *L. bucalis* e *Neisseria* spp. Sua degradação também leva à produção de ácido láctico, mantendo a acidogênese (DECKER *et al.*, 2011).

Entre os carboidratos consumidos na dieta, a sacarose é dito ser o mais cariogênico porque, além de ser fermentado, é o único que funciona como substrato para síntese de PEC (CURY *et al.*, 2000).

As propriedades estruturais e funcionais da placa dental são essencialmente determinadas pela presença de polímeros hidratados microbianos os quais são compostos principalmente por PEC e também proteínas, ácidos nucleicos, fosfolipídeos, células da mucosa e nutrientes (THURNHEER *et al.*, 2006; VU *et al.*, 2009). Particularmente, o PEC produzido por *S. mutans* contribui para o potencial cariogênico de um biofilme e a sua resistência às medidas de higiene oral (KLEIN *et al.*, 2009; DECKER *et al.*, 2011).

Os polissacarídeos produzidos pelos estreptococos bucais são as glucanas solúveis e insolúveis, sintetizados por colonizadores iniciais (*S. sanguinis*, *S. gordonii* e *S. oralis*), e o frutano ou levano utilizado por *S. salivarius* para colonizar a mucosa (DECKER *et al.*, 2011).

Os glucanos insolúveis são utilizados pelos EGM para colonizar a superfície dental porque, além de consolidar a aderência, também une especificamente as células dessas espécies através de receptores protéicos de superfície para estas moléculas. Já os glucanos solúveis em água e o frutano são utilizados como reserva energética, disponibilizados nos momentos de escassez de carboidratos através de reações que obtém glicose e frutose além de ácidos que podem desmineralizar o esmalte (DECKER *et al.*, 2011).

Por esses motivos expostos, pode-se considerar que as poucas espécies produtoras de glucanas que podem estar presentes nos biofilmes dentais estão estritamente relacionadas com a instalação e desenvolvimento da doença cárie, podendo ser levadas em consideração as suas características metabólicas na tentativa de se obter meios de controle desta doença. Assim, inibir a produção destas moléculas pode minimizar o risco de cárie dental.

Algumas proteínas como as glicosiltransferases (Gtfs) e proteínas ligadoras de glucanos (Gbp) são responsáveis mais diretamente por essas características de virulência relacionada à produção de polissacarídeos.

O metabolismo da sacarose e glicose por *S. mutans* envolve interações versáteis e regulação de diferentes glicosiltransferases extracelulares (FUKUSHIMA *et al.*, 1992).

As glicosiltransferases (Gtfs) são enzimas extracelulares que também podem apresentar-se associadas à superfície celular bacteriana. Funcionalmente, tem a capacidade de hidrolisar a sacarose em moléculas de frutose e de glicose e, na sequência, polimerizar as moléculas de glicose resultantes em glucanos (BANAS; VICKERMAN, 2003). As Gtfs possuem tamanho entre 140 e 175 kDa e apresentam dois domínios de maior importância: um domínio catalítico, que se liga à sacarose e a hidrolisa (MOOSER *et al.*, 1991) e um domínio C-terminal, que se liga ao glucano recém sintetizado, sendo também essencial na atividade enzimática de extensão e crescimento de suas cadeias (MOOSER; WONG, 1988; KATO; KURAMITSU, 1990). Pelo menos três enzimas Gtfs estão envolvidas na síntese de glucano por *S. mutans* no biofilme dental: GtfB, GtfC e GtfD, codificadas pelos genes *gtfB*, *gtfC* e *gtfD* respectivamente.

As atividades das Gtfs são determinadas pelo tipo de ligação glicosídica predominante no glucano sintetizado. GtfB catalisa a síntese de glucanos ricos em ligações glicosídicas do tipo α -1-3 (AOKI *et al.*, 1986), que resultam em polímeros insolúveis em água. GtfD catalisa a formação de glucanos ricos em ligações glicosídicas α -1-6, que resultam em moléculas solúveis em água (HANADA; KURAMITSU, 1989), enquanto que a GtfC está envolvida na síntese de glucanos solúveis e insolúveis em água (HANADA; KURAMITSU, 1988). A presença de Gtfs adsorvidas à película dental facilita a formação de glucanas *in situ*, assim, fornecendo sítios de ligação distintos para micro-organismos orais. Bowen e Koo (2011) hipotetizaram que Gtfs de *S. mutans* influenciam a colonização microbiana da superfície dental.

Vários grupos de micro-organismos produzem Gtfs, estes incluem *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Actinomyces* spp., *Streptococcus salivarius* e *Lactobacillus* spp. (NEWBRUN, 1974).

Além das Gtfs, as proteínas ligadoras de glucano (Gbp) são fatores de virulência que têm despertado grande interesse no desenvolvimento de métodos de controle de infecção por *S. mutans* (SMITH *et al.*, 1993; CHILDERS *et al.*, 1999; TAUBMAN; NASH, 2006).

As Gbps representam um grupo heterogêneo de proteínas que possuem variações no tamanho, no domínio ligador de glucano, na afinidade de ligação ao glucano, na

distribuição entre espécies de estreptococos e na sua função primária. Algumas Gbps são proteínas receptoras de superfície associadas à parede celular; outras representam proteínas secretadas, que passam a ser associadas às células quando o glucano deposita-se sobre a superfície celular e, estas, ali o reconhecem e se acumulam (BANAS; VICKERMAN, 2003).

Quatro Gbps (A/B/C/D) foram caracterizadas em *S. mutans*, sendo estas relacionadas à formação de biofilme. A GbpA é secretada e possui alta homologia ao domínio carboxil terminal das Gtfs, também conhecido como domínio ligador de glucano, além disso, não apresenta função enzimática (RUSSEL *et al.*, 1979). A GbpB não apresenta homologia com outras Gbps, embora apresente cerca de 70% de similaridade com hidrolases de mureína (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001). A GbpC apresenta-se ligada à parede celular de *S. mutans*, com importância no processo de agregação bacteriana tendo sua expressão intensificada em condições de estresse osmótico (SATO *et al.*, 1997; 2002). A GbpD encontra-se de forma secretada, possui domínio ligador de glucano com homologia a GbpA e outro domínio com alta similaridade a lipases (SHAH; RUSSELL, 2004).

Streptococcus mutans ligam-se a superfícies cobertas por glucano em grande número e com alta força adesiva comparado a superfícies cobertas por saliva. (SCHILLING; BOWEN 1992; CROSS *et al.*, 2007). Essa bactéria expressa várias proteínas capazes de se ligar a glucanos, incluindo Gtfs e Gbps não enzimáticas específicas (BANAS; VICKERMAN 2003). A deleção de GbpC ligada à célula de *S. mutans* reduz significativamente a biomassa e a agregação bacteriana enquanto que a deleção de GbpA ou GbpD interfere na formação das microcolônias do biofilme (LYNCH *et al.* 2007; OGAWA *et al.*, 2011).

O significado biológico das Gbps não foi ainda definido, no entanto, estudos sugerem que estas proteínas influenciam a virulência apresentando papel na manutenção da arquitetura do biofilme ligando as espécies bacterianas às moléculas de glucano do PEC (BANAS *et al.*, 1990; SHAH *et al.*, 2004).

Capítulo 4-Revisão de Literatura

Lectinas

4 LECTINAS

4.1 Aspectos históricos

A atividade aglutinante derivada de um lectina foi observada primeiramente por Mitchel em 1860, utilizando-se o veneno de *Crotalus durissus*. Mas, foi somente em 1888 que Stillmark identificou uma mistura protéica com efeito tóxico hemaglutinante a partir das sementes da mamona (*Ricinus communis*) recebendo o nome de ricina. Em seguida, H. Hellin isolou a abrina, a partir de *Abrus precatorius* e logo ricina e abrina foram aplicadas como antígenos modelos para estudos imunológicos (BEZERRA, 2011). Essas duas proteínas foram utilizadas por Paul Ehrlich em estudos de estímulo à produção de anticorpos, sendo estes específicos para cada proteína (SHARON; LIS, 2004).

Em 1900, Landsteiner descobriu as diferenças dos eritrócitos dos grupos sanguíneos através da aplicação de lectinas, criando assim o sistema ABO (WATKINS, 1999) e juntamente com Raubistschek demonstrou, em 1908, que os extratos de diferentes sementes apresentavam atividade hemaglutinante variada, desta forma, indicando esta capacidade específica de cada lectina.

Devido à habilidade de algumas aglutininas de plantas em distinguir entre eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos, em 1954, Boyd e Shapleigh propuseram o termo “lectina” do latim *legere*, capaz de escolher, selecionar, sendo o termo posteriormente generalizado por englobar aglutininas açúcar-específicas de origem não imune (SHARON; LIS, 1972).

Em 1936, Sumner e Howell observaram que o açúcar de cana inibia a atividade hemaglutinante da lectina Concanavalina A (ConA), mas, somente em 1952 foi demonstrado que a atividade aglutinante de lectinas era baseada na sua ligação específica a carboidratos. Assim, as lectinas passaram a ser reconhecidas como proteínas de ligação a carboidratos, diferenciando-se de outras proteínas por suas características funcionais (VAN DAMME *et al.*, 1998). O estudo das lectinas sofreu uma mudança em 1960, quando, Nowell demonstrou que a lectina de *Phaseolus vulgaris*, o feijão mulatinho, apresentou ação mitogênica sobre linfócitos. Essa descoberta orientou a aplicabilidade de lectinas nas áreas biomédicas (MOURA, 2009).

4.2 Definição, classificação e importância

Com base no conhecimento obtido a respeito de lectinas, Peumans e Van Damme (1995) e Van Damme e colaboradores (1998), as definiram como proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico de ligação reversível a carboidratos, mono ou oligossacarídeos, e classificaram-nas em quatro tipos de acordo com suas características estruturais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.

Merolectinas: são proteínas monovalentes que possuem um único sítio de ligação a carboidratos, não apresentando a característica de aglutinar glicoconjugados ou células, ausência de atividade hemaglutinante e catalítica. A Heveína, uma proteína quitina-ligante encontrada no látex da seringueira (VAN PARIJIS, 1998), e as proteínas manose-ligantes presentes em orquídeas são exemplos desta classe de lectinas (VAN DAMME, 1998).

Hololectinas: agrupa as lectinas que possuem dois ou mais sítios idênticos ou similares de ligação a um mesmo carboidrato ou estruturalmente similares. Esta classe de lectinas é definida como multivalente sendo estas capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados; são representadas pelas hemaglutininas ou fitohemaglutininas onde está presente a maior parte das lectinas já abordadas em estudos (PEUMANS *et al.*, 2000). A maior parte das lectinas de leguminosas são classificadas como hololectinas, dentre as quais podemos citar as lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Artocarpus integrifolia* (Jacalina) e *Griffonia simplicifolia*.

Quimerolectinas: são proteínas de fusão consistindo de um ou mais domínio de ligação a carboidratos dispostos de forma sequencial a um domínio não relacionado. Este último domínio pode apresentar atividade enzimática bem definida ou outra atividade biológica atuando independente do domínio de ligação a carboidrato. Dependendo do número de sítios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas podem comportar-se como merolectinas ou hololectinas. Como representantes dessa classe, podem ser citadas as proteínas inativadoras de ribossomos - RIP's (PEUMANS *et al.*, 2001).

Em 1996, os mesmos autores introduziram a classe superlectinas, que possuem dois sítios de ligação a carboidratos, estruturalmente diferentes e que reconhecem açúcares não relacionados. Um exemplo desse grupo é a lectina de tulipa TxLC-1, que possui subunidades com um sítio específico para manose e outro para *N*-acetil-galactosamina, atuando de maneira totalmente independente (Figura 12) (VAN DAMME *et al.*, 1996).

Com o intuito de facilitar o uso de lectinas na glicobiologia, Wu *et al.* (2009) classificaram essas moléculas segundo a sua especificidade por estruturas de monossacarídeos e oligossacarídeos:

- Lectinas específicas a *N*-Acetil-galactosamina (GalNAc);
- Lectinas específicas por galactose (Gal) ;
- Lectinas específicas por glicose e/ou manose e oligossacarídeos *N*-ligados;
- Lectinas específicas por *N*-Acetil-glicosamina e/ou Gal β 1 \rightarrow 4 GlcNAc;
- Lectinas específicas por L-Fucose, com subgrupos baseados no número e local de ligação de L-Fuc α ;
- Lectinas específicas por ácido siálico (subgrupos de ligação reconhecida por AS).

Podem funcionar como mediadores de informação em sistemas biológicos, realizar interações com glicoproteínas, glicolipídios e oligossacarídeos (GUPTA, 2010; GOMES *et al.*, 2010).

4.3 Correlações estrutura/função

As lectinas representam um grupo de proteínas de grande heterogeneidade estrutural podendo diferir na composição de aminoácidos, massa molecular aparente, estrutura e número de subunidades e ainda por estarem ou não relacionadas a íons metálicos ou cátions bivalentes (CAVADA, 2001).

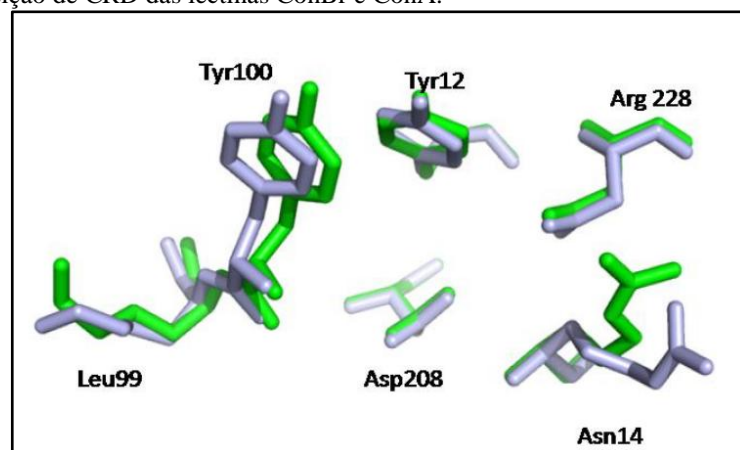
Estas moléculas têm sido empregadas largamente no campo da fisiologia, bioquímica e ciências biomédicas. Entretanto, não se conseguiu responder de modo claro e definitivo qual a verdadeira função biológica dessas proteínas. Alguns trabalhos têm tentado trazer aspectos relevantes quanto a este tópico (RÜDIGER; ROUGE, 1998; 2001; LANNON; VAN DAMME, 2010). Mesmo para as lectinas da família Leguminosae com sequências primárias com alta similaridade não podem ser atribuídas funções comuns, pois alguns parâmetros como as especificidades de carboidratos, localização e tempo de produção são diferentes (CARNEIRO, 2011).

Nas plantas as lectinas possuem funções biológicas importantes, como: proteína de reserva, defesa e comunicação (SHARON, 1980; COOK, 1986; VAN DAMME; PEUMANS *et al.*, 1998). As funções realizadas por estas moléculas nos vegetais são vistas sob duas perspectivas: a lectina interage com fontes externas, agressores ou simbionte

(animais, bactérias ou fungos), e outra função na qual a lectina assume um papel fisiológico na planta (SHARON; LIS, 1995).

Lectinas com alto grau de similaridade na sequência de aminoácidos, estrutura secundária e conformação tridimensional são encontradas nas plantas da família Leguminosae evidenciando assim uma linha taxonômica bem definida (CAVADA *et al.*, 1993; SHARON; LIS, 1995). Estas lectinas, em geral, são compostas por duas ou quatro subunidades, iguais ou diferentes e com massa molecular em torno de 25 a 30 kDa. Estas subunidades podem ser constituídas por um único esqueleto polipeptídico estabilizado por ligações não covalentes tipo pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas podendo ou não formar dímeros canônicos (VASCONCELOS, 2010). As lectinas pertencentes à subtribo Diocleinae são tetrâmeros compostos por uma mistura de subunidades intactas formadas por uma cadeia polipeptídica com 237 resíduos de aminoácidos e de subunidades fragmentadas, nas quais a mesma cadeia polipeptídica está dividida em dois fragmentos (CHRISPEELS *et al.*, 1986). Um exemplo são as lectinas ConA e ConBr pertencentes a esta subtribo, que apresentam alta similaridade estrutural nas sequências de aminoácidos. A diferença na estrutura cristalina entre ConA e ConBr está em apenas dois aminoácidos e nenhum dos dois estão próximos ao sítio de ligação a carboidratos nas duas lectinas. No entanto, esta diferença faz com que a estrutura da ConBr seja mais aberta do que a ConA (Figura 12).

Figura 12 - Sobreposição de CRD das lectinas ConBr e ConA.



Fonte: VASCONCELOS, 2010. ConBr (Cinza); ConA (Verde); *Carbohydrate recognition domain*-CRD. Mostrando diferenças no arranjo espacial dos resíduos de aminoácidos que compõem o CRD.

Assim, alguns indícios dão suporte à hipótese de que, mesmo pequenas diferenças, em pontos chaves da estrutura primária das lectinas filogeneticamente próximas, levam a um impacto no equilíbrio dímero-tetrâmero podendo ser amplificadas por oligomerizações e com consequências biológicas importantes (CALVETE *et al.*, 1999).

4.4 Aplicações e funções biológicas

As lectinas apresentam uma grande variedade de características estruturais e são amplamente distribuídas na natureza, já tendo sido identificadas em fungos, bactérias, insetos animais, plantas, inclusive em vírus (MOREIRA *et al.*, 1991).

Estas moléculas podem estar envolvidas em diversos fenômenos naturais. Entre eles, destacam-se os processos de fertilização, embriogênese, migração celular, formação de órgãos e defesa imunológica (SHARON; LIS, 2004). O funcionamento impróprio destes processos de reconhecimento celular pode levar ao surgimento de diversas patologias (SHARON; LIS, 1989).

Quando Nowell (1960) descreveu a atividade mitogênica da lectina de sementes de *Phaseolus vulgaris* (PHA) sobre linfócitos humanos, um novo e importante ramo de pesquisa surgiu para a aplicabilidade dessas moléculas em sistemas biológicos. Sobre a superfície celular existem moléculas de carboidratos na forma de glicoproteínas, glicolipídeos e polissacarídeos e essas moléculas participam diretamente em muitos processos celulares. A investigação dos mecanismos envolvidos na interação célula-célula passou a ressaltar a importância dos carboidratos nos processos bioquímicos, até então vistos apenas como moléculas ricas em energia ou meros elementos prostéticos (CARVALHO, 2008).

Os carboidratos são elementos determinantes de reconhecimento em uma grande variedade de processos biológicos, tanto fisiológicos quanto patológicos (VARKI, 1993; SHARON; LIS, 1995). Assim, pelo fato das lectinas muitas vezes detectarem diferenças na configuração dos carboidratos, elas seriam instrumentos poderosos para esta troca de informações entre células.

As possibilidades do uso de lectinas como ferramentas biotecnológicas são consideradas devido ao grande número de trabalhos científicos exibindo atividades biológicas relevantes para essas proteínas (KITADA *et al.*, 2010; KIMBLE *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2010; CAO *et al.*, 2010). Dentre as atividades biológicas, pode-se ressaltar as lectinas que apresentam atividade antibacteriana (ALENCAR *et al.*, 2005; HOLANDA *et al.*, 2005; WONG *et al.*, 2010); outras, comprovam claramente a capacidade de interferir no processo de formação de biofilmes microbianos (TEIXEIRA *et al.*, 2006; 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2007; ISLAM *et al.*, 2009; CAVALCANTE *et al.*, 2011).

Uma série de infecções é iniciada por interações lectina-carboidrato, como no caso da adesão celular e fagocitose de *Pseudomonas aeruginosa* (IMBERTY *et al.*, 2004), *Neisseria gonorrhoeae* (SHARON, 2006), *Escherichia coli* (FIRON *et al.*, 1983), formas

tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (SILBER *et al.*, 2002) e promastigotas de *Leishmania major* (SACKS *et al.*, 1985). Muitos destes patógenos desenvolveram mecanismos de fixação ou adesão aos tecidos ou células do hospedeiro e esta adesão é necessária, já que, de outra forma, estes micro-organismos seriam eliminados pelos mecanismos naturais de defesa do hospedeiro, como o fluxo de ar no sistema respiratório ou a urina no sistema excretório (SHARON; LIS, 1993). Além disso, a adesão adequada do patógeno propicia melhor acesso a fontes nutritivas, facilita a introdução de substâncias tóxicas nos tecidos do hospedeiro e mesmo a penetração do patógeno nestes tecidos (KARLSSON, 1998).

No caso das bactérias, a maioria das lectinas está disposta na superfície celular, muitas vezes na forma de multiunidades protéicas denominadas fímbrias ou pili, que se caracterizam como fibras alongadas expressas em bactérias Gram-negativas (SHARON; LIS, 1989; SAUER *et al.*, 2000).

Até o início da década de 80, somente bactérias que possuíam lectinas específicas para manose haviam sido identificadas, e estes estudos foram desenvolvidos principalmente com *Escherichia coli* (SHARON, 2006). Desde então, diferentes cepas de *E. coli* com especificidades distintas foram descobertas, como aquelas que colonizam o tecido do trato urinário ou o tecido nervoso (CARNEIRO, 2011).

Bactérias que possuem lectinas com especificidade por outros açúcares foram em seguida descritas, como a *Neisseria gonorrhoea*, que reconhece resíduos de *N*-acetilgalactosamina (Galb4GlcNAc), e *Streptococcus pneumoniae*, que tem alta especificidade pelo pentassacarídeo NeuAc(α -3)Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc (CARVALHO, 2008).

Capítulo 5-Revisão de Literatura
Gênero Croton

5 GÊNERO *Croton*

5.1 Substâncias naturais

O uso de plantas com fins terapêuticos é uma tradição milenar presente nas culturas de várias nações constituindo, ainda hoje, um recurso alternativo de grande aceitação, tanto nos centros urbanos, quanto em pequenas comunidades rurais (FENNELL *et al.*, 2004).

Plantas medicinais são amplamente utilizadas para tratamento de doenças em todo o mundo. Já em 1985, de acordo com a OMS, cerca de 80% da população mundial tinha interesse por remédios à base de plantas medicinais (FRANSWORTH *et al.*, 1985). Em 1989, produtos derivados de plantas estavam representados em 14 de 15 categorias terapêuticas de preparações farmacêuticas que eram recomendadas por profissionais da área médica formando uma parte importante do sistema de cuidado à saúde no mundo ocidental (PHILLIPSON; ANDERSON, 1989). Estima-se que aproximadamente 75% dos compostos derivados de plantas biologicamente ativos em uso atualmente no mundo tiveram suas funções identificadas através da verificação por parte dos pesquisadores de informações da medicina popular. Desta forma, é de grande valor buscar pesquisar novas drogas baseado no uso tradicional de plantas (PULLAIAH e MOULALI, 1977 *apud* DEVI *et al.*, 2011).

Levando em consideração a biodiversidade vegetal que existe no planeta (cerca de 250.000 espécies) e que somente cerca de 5 a 15% foi investigada do ponto de vista fitoquímico e/ou farmacológico, as pesquisas com plantas superiores apresentam-se como fonte extremamente promissora para a descoberta de novas substâncias que possam ser utilizados no tratamento de várias doenças (ROJAS *et al.*, 2003), principalmente naquelas causados por micro-organismos resistentes às medidas antimicrobianas atualmente usadas.

Resistência antimicrobiana é um fenômeno biológico natural. Depois de descobertas científicas realizadas entre 1930 e 1970, os últimos 30 anos presenciaram menos achados na luta contra os “assassinos infecciosos”. O uso de extratos vegetais, bem como outras formas alternativas de tratamentos médicos, apresentou maior evidência nos anos da década de 1990. As razões para esse renascimento incluem uma redução na descoberta de novas drogas antimicrobianas no setor farmacêutico, um aumento da resistência antimicrobiana, bem como necessidade de tratamentos para novos patógenos emergentes (MAHADY, 2005; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2009).

5.2 Considerações a respeito da família Euphorbiaceae e gênero *Croton*

A família Euphorbiaceae pertence à ordem Euphorbiales e subdivide-se em quatro subfamílias: Phyllanthoideae, Crotonoideae, Porantheroideae e Ricinocarpoideae. Esta família compreende em torno de 300 gêneros e quase 7.500 espécies presentes principalmente em regiões tropicais (PALMEIRA-JUNIOR, 2006). De acordo com Palmeira Júnior (2006), no Brasil, ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies.

A química das plantas da família Euphorbiaceae é uma das mais diversas, pois inúmeros compostos pertencentes a diferentes classes químicas têm sido isolados de suas espécies como, por exemplo, diterpenos, alcalóides, flavonóides e triterpenóides além de cumarinas, glicosídeos cianogênicos e taninos (PALMEIRA-JÚNIOR, 2006).

O gênero *Croton* é um dos maiores da família Euphorbiaceae, com cerca de 1.300 espécies distribuídas entre as Américas e a Ásia sendo 300 destas mais frequentes no Brasil. Estudos realizados com algumas espécies de *Croton* têm revelado atividades farmacológicas (PALMEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2007; PERAZZO *et al.*, 2007; TORRICO *et al.*, 2007; ROCHA *et al.*, 2008; BERTUCCI *et al.*, 2009).

Várias espécies do gênero *Croton* destacam-se por apresentarem uso na medicina popular, dentre estas, *C. nepetaefolius*, conhecida popularmente como “marmeleiro sabiá”, “marmeleiro cravo” ou “marmeleiro de cheiro”, uma planta aromática endêmica do nordeste brasileiro, tem o seu óleo essencial utilizado como estomáquico, carminativo e no tratamento de cólicas intestinais (ABDOM, 2002).

Linnaeus em 1753 descreveu 13 espécies de *Croton* da Ásia e África na primeira edição de *Species Plantarum*. Depois, o gênero já recebeu atenção de diversos estudiosos destacando-se Webster (1992, 1993, 1994, 2001), que propôs a classificação infragenérica mais recente para o gênero (SILVA; SALES; CARNEIRO-TORRES, 2009).

O gênero apresenta difícil classificação Taxonômica atribuída ao seu elevado número de espécies, problemas de delimitação específica, de nomenclatura e polimorfia de seus representantes (WEBSTER, 1993). Novos táxons de *Croton* têm sido propostos para o Brasil desde a revisão de Müller (1873), em trabalhos esparsos, tornando ainda mais confusa a taxonomia do gênero, dificultando especialmente a identificação (ANGÉLICO, 2011).

5.3 Constituintes químicos e atividade biológica do óleo essencial de espécies de *Croton*

Nos últimos anos, tem se verificado um grande avanço científico, envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas, visando obter novos compostos com propriedades terapêuticas (FILHO; YUNES, 1998). Neste sentido, dentre os agentes terapêuticos provenientes de plantas destacam-se os óleos essenciais, também denominados de óleos voláteis ou óleos etéreos.

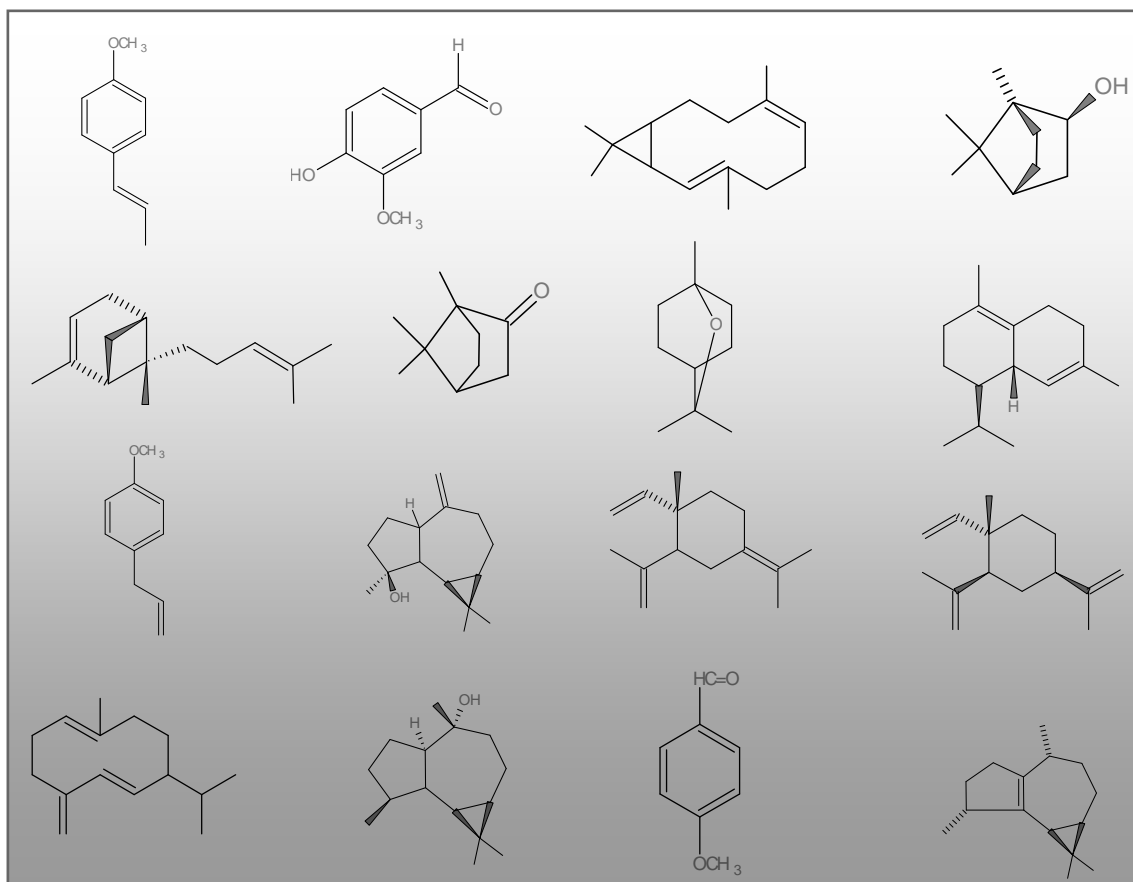
Os óleos essenciais do ponto de vista químico são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. São extraídos de diversas partes das plantas (flores, inflorescências, sementes, folhas, gravetos, cascas, frutos e raízes) por processos específicos; são dotados de aroma quase sempre agradável, incolores quando recentemente extraídos ou ligeiramente amarelados de aparência oleosa. Têm como característica principal a volatilidade, que os difere dos óleos fixos que são misturas de substâncias lipídicas obtidas geralmente de sementes (SIMÕES *et al.*, 2007). Essas denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como por exemplo, a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente advindo daí a designação de óleo.

Óleos voláteis são definidos como substâncias obtidas de órgãos de espécies vegetais através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como as substâncias obtidas por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. Também podem ser chamados de óleos essenciais, óleos etéreos ou essências (Figura 13).

Outra característica importante é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos voláteis, sendo por isso denominados essências. Eles também são solúveis em solventes orgânicos apolares, como éter, recebendo, por isso, a denominação de óleos etéreos ou, em latim, *aetheroleum*. Em água, os óleos voláteis apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são denominadas hidrolatos.

Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas (SIMÕES *et al.*, 1999).

Figura 13 – Diversidade estrutural de constituintes voláteis de óleos essenciais.



Fonte: Próprio autor.

A importância do estudo de óleos essenciais está relacionada às suas inúmeras aplicações, dentre as quais destacam-se, por exemplo, funções ecológicas, especialmente como inibidores de germinação, proteção contra predadores e polinizadores; utilização na indústria de alimentos (condimentos e aromatizantes) e cosméticos (perfumes e produtos de higiene) e por suas propriedades terapêuticas (SIMÕES *et al.*, 1999).

As espécies de *Croton* têm sido largamente estudadas em relação aos seus constituintes voláteis e não voláteis. Muitas espécies são produtoras de um grande número de substâncias pertencente às classes dos alcalóides, fenilpropanóides e terpenóides (RANDAU *et al.*, 2004). Estudos fitoquímicos realizados com algumas espécies de *Croton* de ocorrência brasileira têm proporcionado o isolamento de 109 compostos pertencentes as mais variadas classes estruturais tais como diterpenos (35,6%), alcalóides (24,8%) flavonóides (12,8%) e triterpenos (11%) (TORRES, 2008).

Os fenilpropanóides, como anetol e derivados do eugenol, comuns nos óleos de erva-doce, cravo e manjeriço têm sido relatados como os principais componentes dos óleos essenciais de espécies de *Croton* encontradas em diferentes partes do mundo, como por

exemplo, *C. zehntneri* e *C. nepetaefolius*, no Brasil (MORAIS *et al.*, 2006); *C. molambo* e *C. cuneatus* na Venezuela (SUÁREZ *et al.*, 2005); *C. pseudonivenus* e *C. suberosus* no México (PEREZ-AMADOR; MONROY; BUSTAMANTE, 2007).

Estudo realizado com óleo essencial extraído de diferentes partes de *C. blanchetianus* (folhas, flores, raízes e cascas do lenho) coletadas em diferentes regiões do estado do Ceará, em diferentes horas do dia, possibilitou investigar e identificar 32 compostos dentre os quais β -felandreno (20,4%) nas folhas, biciclogermacreno (29,1%) nas flores e (17,7%) nas folhas, β -elemeno (17,8%) nas flores e (22,0%) nas cascas do caule, cipereno (14,2%) nas raízes e germacreno D (12,8%) nas cascas do caule sendo os constituintes majoritários (DOURADO; SILVEIRA, 2005).

Avaliando a atividade antinociceptiva do óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus* Santos *et al.*, (2005) obtiveram resultados promissores e ainda conseguiram identificar 11 compostos majoritários, dentre eles podem ser citados: biciclogermacreno (10,2%), cis-calameneno (10,8%) e guaiazuleno (8,3%)

Na espécie *C. nepetaefolius* foram identificados como constituintes majoritários o 1,8 cineol (37,5%), o β -cariofileno (23,0%) e o γ -elemeno (12,0%) (CRAVEIRO *et al.*, 1980). A composição do óleo essencial das cascas de *C. aubrevillei* e folhas de *C. zambesicus* foram estudadas por Menut (1995) que constatou que em ambas as espécies possuem os mesmos constituintes majoritários, porém em proporções diferentes: linalol, 34,6% e 9,9%, β -cariofileno 11,9% e 9,9%, respectivamente.

As atividades biológicas são investigadas utilizando tanto óleo essencial como extratos ou frações, principalmente as constituídas de alcalóides e compostos fenólicos. O diterpeno clerodano trans-desidrocrotonia (DCTN), isolado de *C. cajucara*, apresentou diversas atividade como hipoglicêmica, hipolipidêmica, antígenotópica, antiulcerogênica, antitumoral, antiinflamatória e antinociceptiva, antiestrogênica e cardiovascular (COSTA *et al.*, 2007). Em ensaios com flavonóides extraídos dessa mesma espécie também foi observada atividade antiinflamatória e antioxidante (NARDI *et al.*, 2007). Análises químicas realizada por Fontenelle *et al.*, (2008) mostraram que *C. nepetaefolius* tem metil-eugenol (15,7%) e biciclogermacreno (14,1%) como principais constituintes, enquanto que os principais constituintes *C. argyrophyloides* são espatulenol (20,3%) e biciclogermacreno (11,7%), e os de *C. zehntneri* são estragol (72,9%) e anetol (14,3%).

O óleo essencial de *C. zenhteneri* apresenta atividade antifúngica (FONTENELLE *et al.*, 2008). Essa atividade pode ser atribuída ao estragol principal constituinte e/ou anetol,

que já demonstraram propriedades antifúngicas contra *Aspergillus parasiticus* (SINGH *et al.*, 2006).

Os principais constituintes identificados no óleo essencial extraído das folhas de *C. palanostigma* foram linalol (25,4%), (E)-cariofileno (21,0%), metileugenol (17,2%) e β -elemeno (6,0%). Já o óleo da casca do tronco *C. palanostigma* mostrou atividade larvicida com CL50, $3,71 \pm 0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$), podendo ser considerado altamente tóxico (BRASIL *et al.*, 2009), pois quanto menor o valor de CL50 maior a atividade biológica.

Acredita-se que em torno de duas mil plantas brasileiras sejam usadas como remédios naturais pela população. O Ministério da Saúde possui atualmente uma lista com 71 nomes de plantas medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS), dentre estas se incluem duas espécies do gênero *Croton*, *C. zenhtneri* e *C. cajucara* (<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>), trazendo assim maior relevância a estudos que possam evidenciar cientificamente sua eficácia e aplicabilidade.

5.4 Atividade antibiofilme de óleos essenciais e seus constituintes

Extratos e óleos extraídos de plantas têm sido usados para uma grande variedade de objetivos por séculos (JONES, 1996). Esses objetivos variam desde uso de jacarandá e cedro em perfumaria, adição de sabor em bebidas com óleo do limão (LAWLESS, 1995), e ainda, preservação de alimentos armazenados (MISHRA; DUBEY 1994). Em particular, a atividade antimicrobiana de óleos e extratos de plantas tem formado a base de muitas aplicações, incluindo conservação de alimentos crus e processados, produtos farmacêuticos, medicina alternativa e terapias naturais (REYNOLDS 1996; LIS-BALCHIN; DEANS, 1997).

Em 2008, Silva e colaboradores investigaram a ação antimicrobiana e a inibição de aderência *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis* Linn. (alecrim) sobre cepas padrão de *Streptococcus mitis* ATCC 98811, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Nesse estudo, o extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. foi efetivo na inibição de aderência de *S. mitis* ATCC 98811, *S. mutans* ATCC 25175 e *S. sobrinus* ATCC 27609, podendo ser utilizado em futuros testes na inibição da formação de biofilmes.

O uso de óleos essenciais como agentes antimicrobianos tem sido descrito desde muito tempo (MARTINDALE, 1910 *apud* ALVIANO *et al.*, 2005) e, no caso específico de micro-organismos orais, enxaguatórios bucais contendo óleos essenciais têm se mostrado benéficos, e com componentes seguros para uso na rotina diária de higiene oral (CLAFFEY,

2003), precisando de mais estudos para melhor entender seu espectro de ação frente a estes micro-organismos (ALVIANO *et al.*, 2005).

Como já mencionado anteriormente, biofilmes são muito mais resistentes a agentes antimicrobianos do que as células planctônicas (PARSEK; SINGH, 2003). Cloração de um biofilme geralmente não é bem sucedido porque o biocida mata apenas as bactérias no exterior biofilme, deixando os micro-organismos saudáveis dentro das camadas internas (DUNNE, 2002). Além disso, o uso repetido de agentes antimicrobianos em biofilmes pode selecionar micro-organismos resistentes a drogas. Neste contexto, novos agentes que podem inibir o crescimento de micro-organismos associados a biofilmes são muito necessários no sentido de aumentar o número de alternativas terapêuticas eficazes (ALVIANO *et al.*, 2005).

Agentes antibacterianos usados na prevenção e tratamento de doenças orais, incluindo cloreto cetilpiridínio, clorexidina, amins fluoretadas ou produtos contendo tais agentes podem apresentar efeitos indesejados tais como manchamento dental ou, no caso do etanol, comumente encontrado em enxaguatórios, relação com o desenvolvimento de câncer oral (KNOLL-KÖHLER; STIEBEL, 2002; NEUMEGEN; FERN, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2007; LACHENMEIER, 2008; MCCULLOUGH; FARAH, 2008;). Assim, a busca por produtos alternativos e fitoquímicos isolados de plantas usados na medicina tradicional é considerada boa alternativa em detrimento de drogas sintéticas (PRABU *et al.*, 2006).

Em particular, extratos de plantas medicinais que tem demonstrado inibir o crescimento de patógenos orais, reduzir o desenvolvimento da placa dental, influenciar adesão bacteriana à superfície dental e reduzir os sintomas das doenças orais (PALOMBO, 2011).

Poucos são os relatos da literatura no que concerne à atividade antibiofilme de óleos essenciais ou seus isolados sobre biofilmes de patógenos relacionados a doenças orais. Millezi e colaboradores (2010) relataram atividade de detergentes sanificantes à base de *C. citratus* e *T. vulgaris* sobre biofilmes de *Aeromonas hydrophila*, microrganismo relacionado à contaminação de alimentos, havendo redução no número de células viáveis presentes nestas comunidades submetidas às substâncias em teste.

O Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento de produtos naturais aplicados, inclusive, à Odontologia e mais especificamente na tentativa de minorar as consequências da instalação de doenças orais biofilme-relacionadas. Destarte, o uso de plantas medicinais vinculando o conhecimento tradicional e tecnologia para validar cientificamente este conhecimento pode tornar-se uma opção eficaz no tratamento da cárie dental quando houver necessidade de medidas de maior abrangência.

Capítulo 6-Revisão de Literatura
Sinergismo

6 SINERGISMO

6.1 Definição

O primeiro relato de ação sinérgica de compostos com atividade antimicrobiana data de 1947. Dessa data até os dias atuais, outros estudos foram realizados com o objetivo de obter a ação combinada de compostos com sítios-alvo diferentes, apresentando maior eficácia com toxicidade inferior ou semelhante às drogas isoladas (SILVA *et al.*, 2011).

Uma estratégia para sobrepor os mecanismos de resistência bacteriana é o uso de combinações de drogas com vários extratos de plantas, os quais exibiram atividade sinérgica frente aos micro-organismos (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008).

As moléculas oriundas dos vegetais normalmente tem atividade antibiótica muitas ordens de magnitude menor que os antibióticos comumente usados frente a bactérias e fungos. Apesar do fato de que antibióticos derivados de plantas sejam menos potentes, plantas combatem infecções de forma bem sucedida. Assim, parece que as plantas adotam paradigmas diferentes (sinergismo) para combater infecções (SILVA *et al.*, 2011).

Sinergismo tem sido definido como fenômeno onde dois compostos diferentes são combinados com o objetivo de aumentar sua atividade individual. Se a combinação resultar em efeito de pior atividade comparado à ação individual de cada substância é denominado de antagonismo; efeitos menores que sinergismo, mas não considerados antagonismos são denominados efeitos aditivos ou indiferentes (RANI *et al.*, 2009).

O efeito sinérgico de duas substâncias pode ser mensurado através da concentração inibitória fracional (CIF), que pode ser calculado de acordo com a seguinte fórmula: $CIF \text{ da droga A (CIM da droga A combinada / CIM da droga A sozinha) + CIF da droga B (CIM da droga B combinada / CIM da droga B sozinha)}$ (SILVA *et al.*, 2011). Dessa forma, definiram sinergismo como índice $CIF \leq 0.5$; atividade aditiva índice $0,5 < CIF < 2$; indiferença índice $2 \leq CIF < 4$ e antagonismo índice $CIF \geq 4$ (LORIAN, 2005).

De acordo com o dicionário médico Mosby (2008), sinergia farmacológica ou sinergismo é a junção da ação de duas (ou mais) moléculas (drogas) de tal maneira que uma aumente a ação da outra para produzir melhor efeito do que aquele obtido com qualquer quantidade segura destas moléculas sozinhas. Potencialização, outro termo usado na farmacologia é uma ação sinérgica de duas drogas dando simultaneamente melhor efeito do que cada droga em separado (GERTSCH, 2011).

6.2 Sinergismo frente a infecções bacterianas

O valor terapêutico de interações sinérgicas é conhecido desde a antiguidade. O sistema de cura de muitas culturas permanece ligado ao princípio da crença de que terapias combinadas podem aumentar a eficácia do tratamento (VAN VUUREN; VILJOEN, 2011).

O conceito de sinergia antimicrobiana é baseado no princípio de que a combinação e a formulação podem aumentar a eficácia, reduzir a toxicidade, diminuir os efeitos colaterais, aumentar a biodisponibilidade, diminuir a dose e reduzir a possibilidade de resistência antimicrobiana (LI; SCHENTAG; NIX, 1993; INUI *et al.*, 2007; COTTAREL; WIERZBOWSK, 2007). Novas combinações antibióticas incluindo combinações de produtos naturais recentemente têm se tornado prioridade nas pesquisas (VAN VUUREN e VILJOEN, 2011).

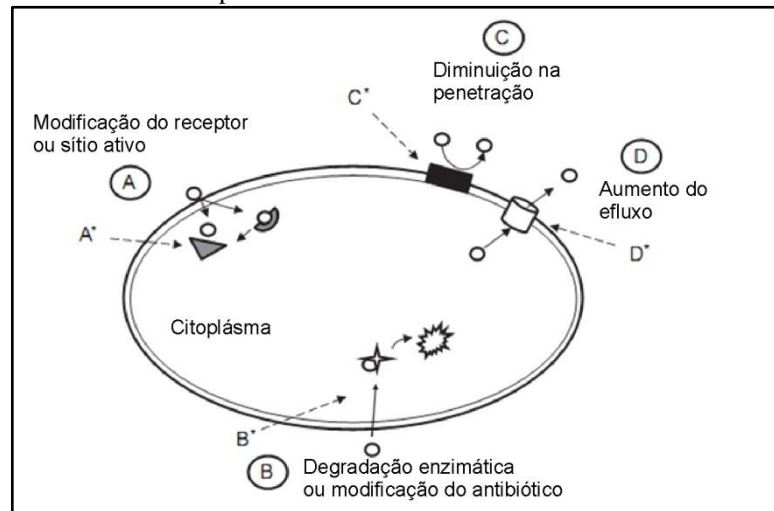
O desenvolvimento de resistência antibiótica pode ser natural ou adquirida, e pode ser transmitida entre espécies bacterianas semelhantes ou diferentes. A resistência natural pode ser advinda de mutação genética espontânea e a resistência adquirida através da transferência de fragmentos de DNA de uma bactéria para outra (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

Uma estratégia para sobrepor os mecanismos de resistência bacterianos é o uso de combinações de drogas. Inibidores de β -lactamases são bem conhecidos e são ministrados com antibióticos como co-droga. A estratégia mais bem sucedida para superar a resistência bacteriana pela produção de penicilinase tem sido o uso de ácido clavulânico com as drogas tazobactam e sulbactam (LEE, YUEN; KUMANA, 2003). Os metabólitos secundários de plantas são boas fontes para terapias combinadas. Como demonstrado na figura 14, existem muitos fitoquímicos que agem nos mecanismos bacterianos de multi-resistência.

O uso de combinações de extratos de plantas não é apenas observado em terapia antinfeciosa, mas também pode ser visto no tratamento de várias desordens incluindo câncer, HIV, osteoartrite e hipertensão (WILLIAMSON, 2001).

Alguns estudos têm explorado a combinação de drogas sintéticas com óleos essenciais de forma a avaliar a eficácia antimicrobiana. Um destes estudos observou um efeito sinérgico entre o antifúngico cetoconazol e o látex de *Euphorbia characias* cujo efeito antifúngico foi substancialmente aumentado (GIORDANI *et al.*, 2001).

Figura 14 - Metabólitos secundários de plantas como modificadores dos mecanismos de resistência multi-drogas.



Fonte: HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008. (A*) Corilagin, telimagrandin I, diterpeno 416 e componente P inibem PBP 2^a, um receptor modificado; (B*) EGCg inibe a β -lactamase; (C*) timol, carvacrol, ácido gálico aumentam a permeabilidade da membrana externa; e (D*) EGCg 5'-metoxihidnocarpina, reserpina, ácido carnósico e derivados do isopiramano inibem as bombas de efluxo. Droga antibiótica ○; Receptor ☾; receptor modificado ▼; bomba de efluxo ☼; enzima ✨; degradação da droga ☼.

A predição precisa do sinergismo entre drogas comerciais ou entre uma droga e um produto natural baseado nos resultados de testes *in vitro* é crucial na determinação do potencial de uso clínico da combinação de substâncias. Alguns métodos são utilizados como detectores de atividade sinérgica, no entanto, o método de curva de tempo de morte é um dos mais usados e de mais fácil aplicação (WHITE *et al.*, 1996). Sinergismo, neste caso, é definido como um decréscimo de 100 vezes ou mais na contagem de colônias pela combinação dos agentes em teste quando comparado com suas atividades individuais (SAIMAN, 2007).

Capítulo 7-Objetivos

Parte I

7.1 Objetivo geral

Investigar a potencialidade de compostos vegetais como insumos biotecnológicos a serem aplicados no controle e tratamento da cárie dental.

7.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito das lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia maritima*, *Canavalia gladiata* e *Canavalia boliviana*, no crescimento bacteriano de *Streptococcus mutans* ATCC UA 159, e *S. oralis* ATCC 10557.
- Verificar a possível interferência das lectinas das sementes de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia maritima*, *Canavalia gladiata* e *Canavalia boliviana* na formação de biofilmes monoespecífico de *Streptococcus mutans* ATCC UA 159 e *S. oralis* ATCC 10557 em superfícies cobertas por saliva.
- Analisar a relação entre a estrutura das lectinas das sementes de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia maritima*, *Canavalia gladiata* e *Canavalia boliviana* e suas possíveis funções biológicas sobre o crescimento planctônico e dos biofilmes monoespecíficos de *Streptococcus mutans* ATCC UA 159 e *S. oralis* ATCC 10557.

Capítulo 8-Materiais e Métodos

Parte I

As lectinas selecionadas para testes estão descritas na quadro 2, assim como sua especificidade por carboidratos, siglas e referência metodológica. As etapas da pesquisa relacionada ao isolamento e purificação das lectinas foram realizadas no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BIOMOL – LAB), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, por meio de diferentes técnicas cromatográficas.

Quadro 2 - Espécies utilizadas para o isolamento das lectinas selecionadas para os experimentos e sua especificidade por carboidrato, siglas e referência da metodologia utilizada.

Espécie	Sigla	Especificidade por carboidratos	Referência
<i>Canavalia brasiliensis</i>	ConBr	Glicose/Manose	MOREIRA; CAVADA, 1984.
<i>Canavalia ensiformis</i>	ConA	Glicose/Manose	MOREIRA <i>et al.</i> , 1984.
<i>Canavalia maritima</i>	ConM	Glicose/Manose	PEREZ, <i>et al.</i> , 1991.
<i>Canavalia gladiata</i>	CGL	Glicose/Manose	WONG; NG, 2005.
<i>Canvalia boliviana</i>	ConBol	Glicose/Manose	MOURA, <i>et al.</i> , 2009.

8.2 Cepas bacterianas e condições de cultivo

Streptococcus mutans UA 159 e *Streptococcus oralis* ATCC 10557 foram utilizadas para realização dos testes nesta etapa experimental.

As cepas foram mantidas em *Brain Heart Infusion* (BHI) caldo com glicerol (20%) à -80 °C. Para realização dos experimentos uma alíquota de 100 µL foi inoculada em 10 mL de BHI caldo e crescida em estufa com 10% de CO₂ à 37 °C por 24 horas. Após essa ativação inicial, a cultura foi renovada em mais 10 mL de BHI caldo esterilizado com inóculo de 100 µL e crescida nas mesmas condições descritas acima por 18 horas. Essa renovação foi feita para obter um microrganismo com melhor condição de crescimento e desenvolvimento.

8.3 Preparação das soluções de lectina

As lectinas foram pesadas, solubilizadas em água e deixadas sob agitação em rotação lenta por 24 horas para favorecer sua dissolução. Em seguida, foram filtradas em filtro MiliPore® 0,22 µm de porosidade e armazenadas a 20 °C.

8.4 Verificação do efeito das lectinas do gênero *Canavalia* no crescimento bacteriano (CAVALCANTE *et al.*, 2011)

Após o crescimento bacteriano, a cultura foi centrifugada a 1500 g por 20 minutos a 4 °C, lavada duas vezes com NaCl 0,9 % e a concentração celular ajustada para 10^6 – 10^8 unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL). As soluções de lectinas foram preparadas antes da montagem da placa, em concentrações que variaram de 500 µg/mL a 15 µg/mL e incubadas em conjunto com as bactérias selecionadas por um período de 6 horas, com 10% de CO₂ a 37 °C, sem caldo de cultura para evitar possíveis ligações das lectinas a carboidratos disponíveis no meio.

A montagem das placas de poliestireno (BD Falcon®) de fundo “U” com 96 poços foi feita adicionando-se 200 µL de caldo BHI em cada poço e 4 µL da solução lectina/bactéria previamente incubadas em cada concentração. O controle utilizado foi solução NaCl 0,9%, o que representa o crescimento normal das bactérias. Depois da montagem das placas, foi realizada uma leitura inicial, e outras leituras em comprimento de onda de 620 nm (DO₆₂₀ nm) em leitor de ELISA (BioTrak II - Plate Reader®) após 12, 18 e 24 horas de incubação a 37 °C, com 10% de CO₂.

8.5 Verificação da possível interferência das lectinas do gênero *Canavalia* na inibição da formação de biofilmes em superfícies cobertas por saliva

8.5.1 Coleta e processamento da saliva

A saliva foi coletada e processada de acordo com o protocolo definido por Guggenheim e colaboradores (2000). Resumidamente, a saliva total não estimulada foi coletada durante 1 hora, durante vários dias, de voluntários com idade entre 20 e 40 anos, que assinaram previamente um termo de consentimento livre e esclarecido (Número de aprovação no Comitê de Ética da Universidade Estadual Vale do Acaraú 217-CONEP/CNS/MS) pelo menos 1 hora após comer, beber ou realizar higiene oral. As amostras de saliva foram coletadas em tubos de polipropileno de 50 mL e mantidas em banho de gelo ou congeladas a -

20°C. Após a coleta total de 500 mL as amostras foram unidas, homogeneizadas e então centrifugadas (30 minutos, 4°C, 27000 g); o sobrenadante foi pasteurizado (60°C, 30 minutos) e centrifugado novamente em tubos esterilizados. O sobrenadante resultante foi aliquoteado e armazenado a -80°C. A eficiência do processo foi verificada através de plaqueamento da saliva processada em BHI ágar; após 72 horas a 37°C nenhuma UFC foi observada nas placas incubadas.

8.5.2 Ensaio de interferência na formação de biofilme (quantificação da biomassa) **(CAVALCANTE et al., 2011)**

Para a montagem das placas de poliestireno de fundo chato com 96 poços, 200 µL da saliva processada foram adicionados a cada poço e mantidas sob agitação por 2 horas (Orbital Shaking Incubator Board MA-420-Marconi[®]) a 37 °C. Em seguida a saliva foi removida e 200 µL da solução de lectinas a 100 ou 200 µg/mL e controle de *Bovine serum albumin* (BSA) 200 µg/mL foram adicionados por 2 horas a 37 °C. Após esse período, as soluções foram removidas dos poços e 200 µL de suspensão bacteriana ajustada na concentração de 10⁶-10⁸ UFC/mL foram colocados por 2 horas. Na sequência, a solução bacteriana foi removida e 200 µL de BHI caldo esterilizado com 5% de sacarose foi adicionado e as placas incubadas a 37 °C, 10% de CO₂. Cada passo do protocolo experimental foi seguido por uma lavagem com 200 µL de NaCl 0,9 %. Como controle foi utilizado BSA (SANTI-GADELHA *et al.*, 2006) para que fosse observada a ação de uma proteína sem ação antimicrobiana ao meio.

Após incubação por 12, 20 e 24 horas a 37 °C com 10% de CO₂, o meio foi removido das placas de microtitulação. As células planctônicas remanescentes foram removidas por lavagem cuidadosa com água. Os biofilmes aderidos aos poços foram fixados com formalina (37%, diluída de 1:10) mais acetato de sódio 2% por 15 minutos, e corados com 200 µL de cristal violeta 0,1% por 15 minutos a temperatura ambiente. Após duas lavagens com água destilada, o corante remanescente foi removido com 100 µL de etanol 95%. As placas foram, então, postas em agitação por 5 minutos para favorecer o desprendimento do corante no etanol. A formação dos biofilmes foi quantificada por meio da mensuração da densidade óptica a 595 nm em leitor de placas ELISA (BioTrak II - Plate Reader[®]) (O'TOOLE; KOLTER, 1998). Um total de 10 réplicas por bactéria e para cada concentração foi montada em três experimentos separados totalizando trinta réplicas de cada situação experimental (12, 20 e 24 horas de incubação).

8.6 Análise da relação entre a estrutura de lectinas do gênero *Canavalia* e suas funções biológicas

Coordenadas atômicas para a estrutura cristalina das lectinas do *Protein Data Bank* (PDB) foram usadas para comparar o desenho do sítio de ligação a carboidratos das lectinas selecionadas no estudo de inibição de crescimento bacteriano e relacionado com a atividade biológica. Os códigos do PDB para as proteínas usadas na análise foram: para *Canavalia gladiata* (PDB código 1WUV) (DELATORRE *et al.*, 2007), *Canavalia marítima* (PDB código 2CWM) (GADELHA *et al.*, 2005), *Canavalia ensiformis* (PDB código 1JBC) (SUMNER; HOWELL, 1936 *apud* SHARON, 2007), *Canavalia brasiliensis* (PDB código 3JU9) (MOREIRA; CAVADA, 1984) e *Canavalia boliviana* (MOURA *et al.*, 2009). As análises estruturais foram realizadas usando PyMol (DELANO, 2002).

8.7 Análise estatística

Trata-se de uma pesquisa quantitativa em que os experimentos foram realizados em três repetições independentes com 10 réplicas cada uma. Os resultados foram demonstrados através de gráficos; a diferença entre as médias dos experimentos foi verificada através da aplicação do teste One-way ANOVA com Bonferroni pós teste, executados com o auxílio do programa GraphPad Prism[®], San Diego California USA. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,01$.

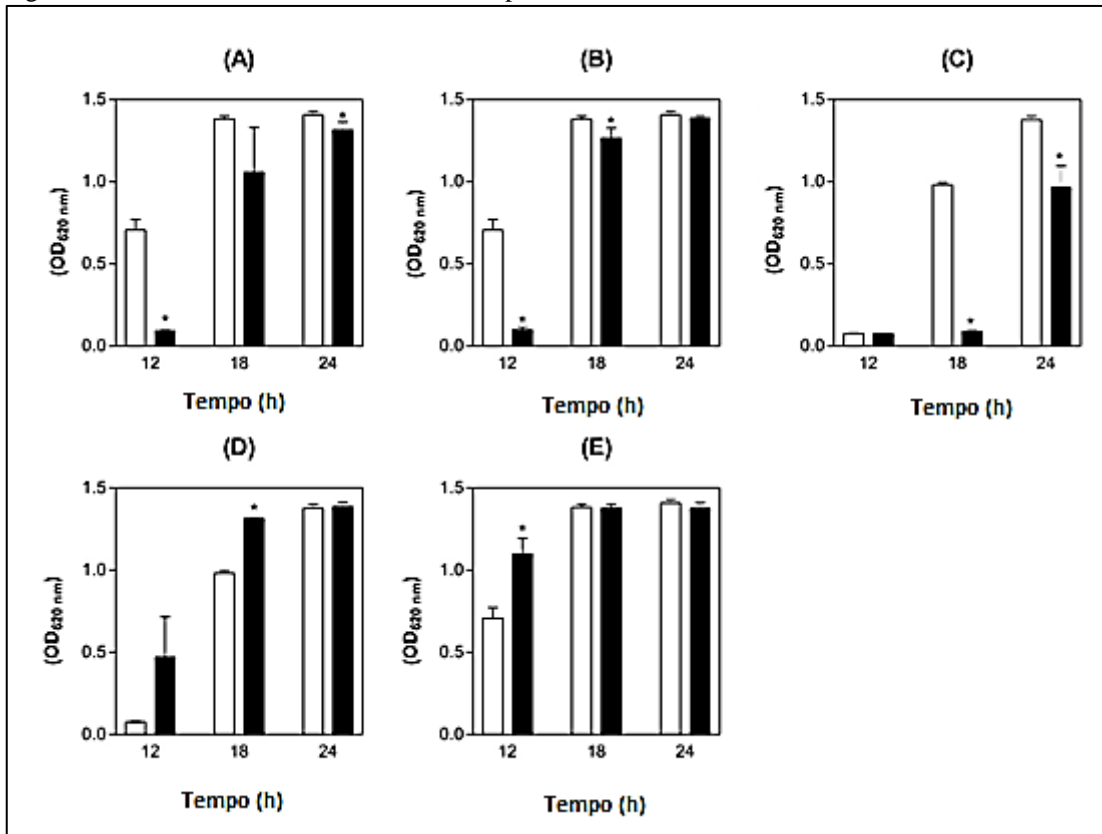
Capítulo 9-Resultados e Discussão
Parte I

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE I

As mensurações do crescimento bacteriano foram realizadas para as lectinas nas concentrações de 15,6 µg/mL a 500 µg/mL e para o controle (NaCl 0,9 %). A concentração 500 µg/mL foi selecionada devido à diferença estatística comparada ao controle. As outras concentrações foram avaliadas, no entanto, não demonstraram diferença estatisticamente significativa comparada ao controle.

Para *S. mutans*, ConBol, ConBr e ConM apresentaram uma atividade inibitória comparada ao controle (Figura 15 A, B e C) e CGL e ConA estimularam o crescimento desta bactéria comparado ao controle (Figura 15 D e E).

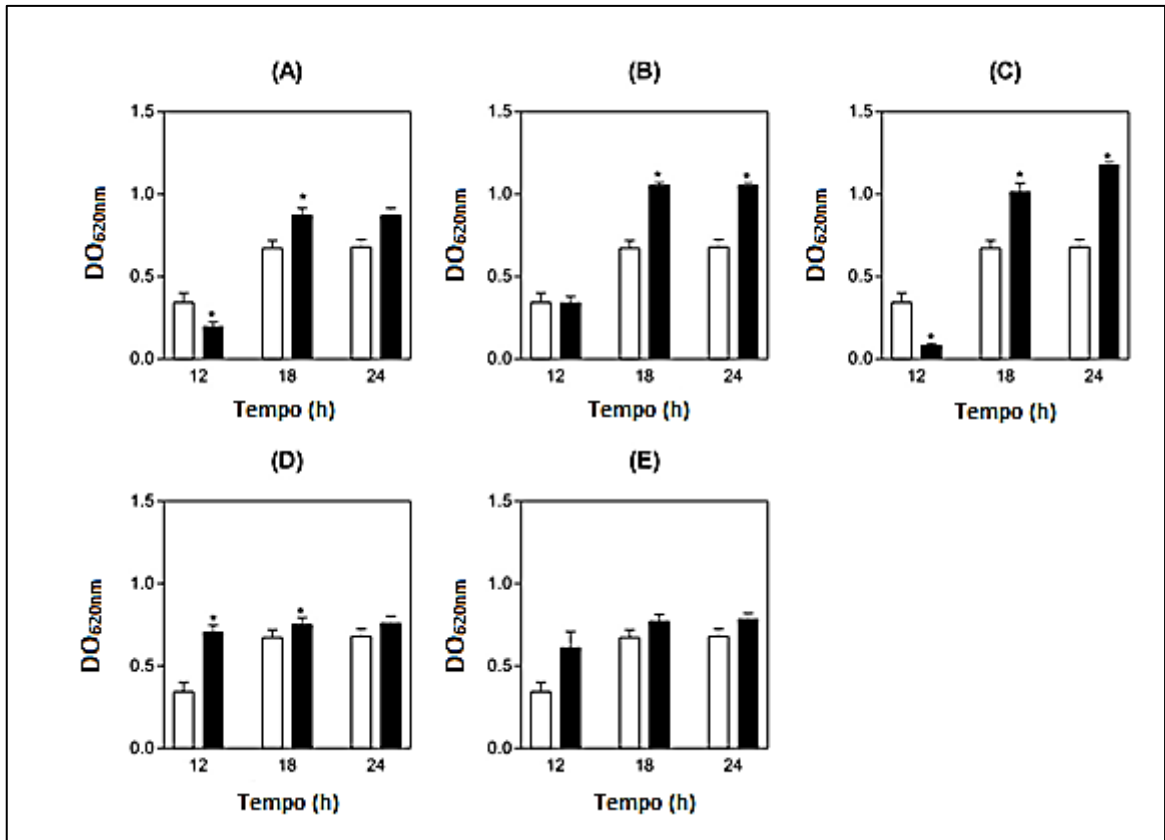
Figura 15 - Gráfico de barra dos diferentes tempos de crescimento de *S. mutans* sob o efeito de lectinas.



(A) ConBol; (B) ConBr; (C) ConM; (D) CGL; (E) ConA. *P<0,01 relacionado ao controle de NaCl 0,9%. (□) NaCl 0,9% (■) Lectina 500 µg/mL.

Os testes das mesmas lectinas frente ao *S. oralis* demonstraram que ConBol, ConBr e CGL (Figura 16 A, B e D) estimularam o crescimento bacteriano comparado ao controle. ConM mostrou marcante estimulação do crescimento (Figura 16 C). Quando ConA foi avaliada nenhuma ação diferente do controle foi observada (Figura 16 E).

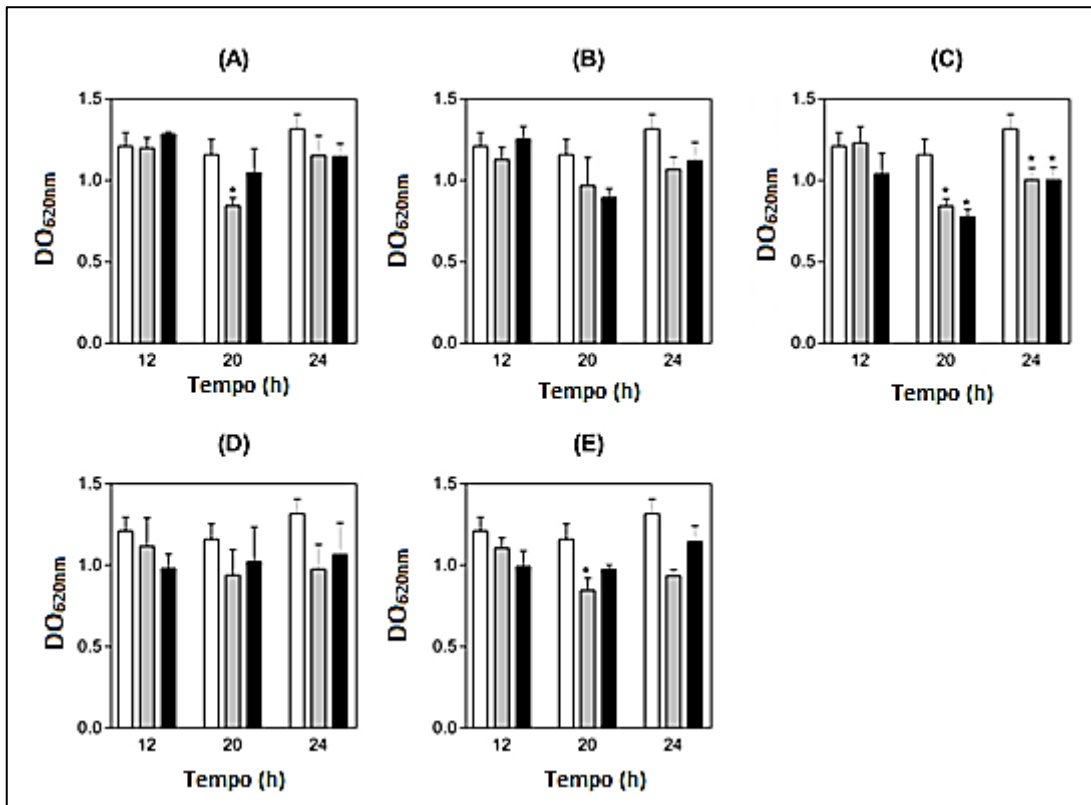
Figura 16 - Gráfico de barra dos diferentes tempos de crescimento de *S. oralis* sob o efeito de lectinas.



(A) ConBol; (B) ConBr; (C) ConM; (D) CGL; (E) ConA. *P<0,01 relacionado ao controle de NaCl 0,9%. (□) NaCl 0,9% (■) Lectina 500 µg/mL.

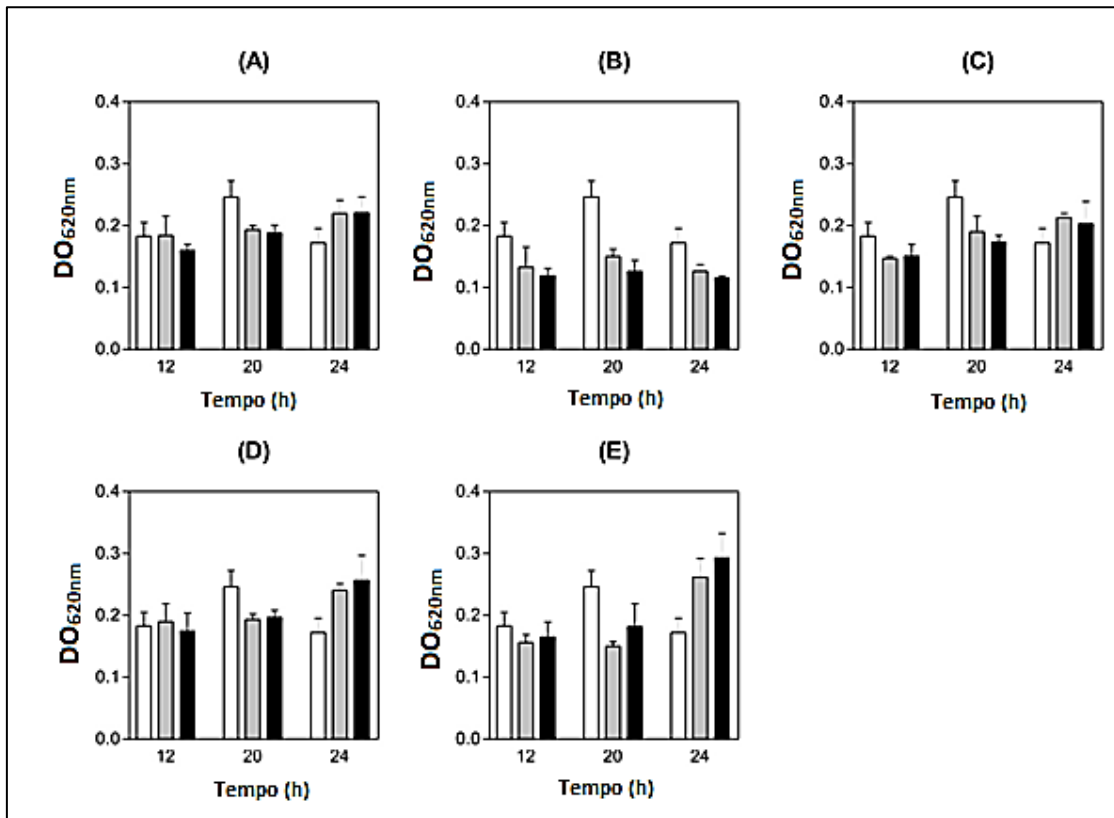
Quando se avaliou o efeito das lectinas sobre a formação dos biofilmes de *S. mutans* e *S. oralis* em superfícies cobertas por saliva observou-se que ConBol e ConA inibiram a formação do biofilme de *S. mutans* na concentração de 100 µg/mL e ConM demonstrou o mesmo efeito nas concentrações de 100 e 200 µg/mL (Figura 17 A, C e E). Nenhum efeito foi observado nos testes com ConBr e CGL (Figura 17 B e D). Nenhum estímulo ou inibição foi encontrado nos biofilmes de *S. oralis* (Figura 18 A a E). Para os biofilmes, os testes estatísticos foram realizados comparando-se os grupos de lectinas ao controle de BSA.

Figura 17 - Gráfico de barra dos biofilmes de *S. mutans* em diferentes tempos de crescimento sob o efeito de lectinas.



O controle foi BSA 200 µg/mL. (A) ConBol; (B) ConBr; (C) ConM; (D) CGL; (E) ConA.*p<0,01 relacionado ao BSA 200 µg/mL. Legenda: (□) BSA 200 µg/mL (◻) Lectina 100 µg/mL (■) Lectina 200 µg/mL.

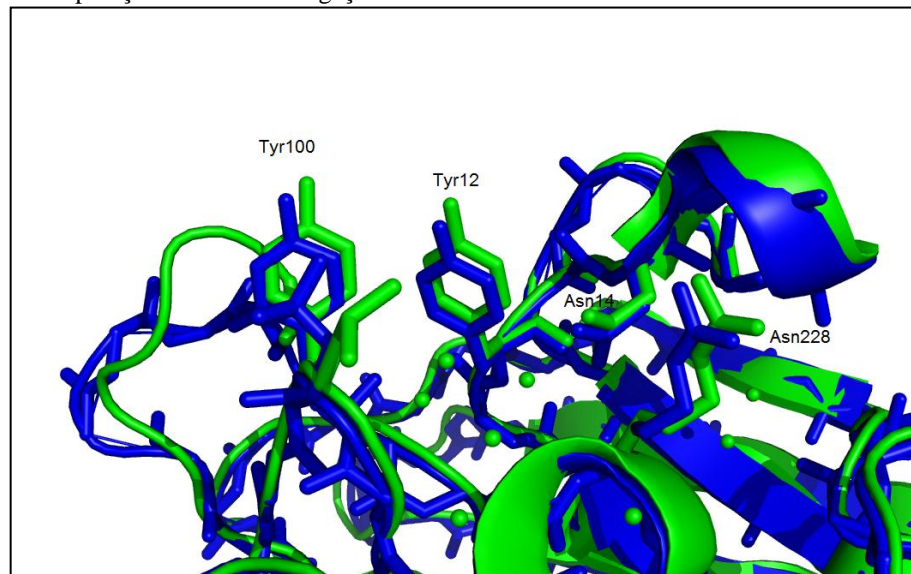
Figura 18 - Gráfico de barra dos biofilmes de *S. oralis* em diferentes tempos de crescimento sob o efeito de lectinas.



O controle foi BSA 200 µg/mL. (A) ConBol; (B) ConBr; (C) ConM; (D) CGL; (E) ConA. *p<0,01 relacionado ao BSA 200 µg/mL. Legenda: (□) BSA 200 µg/mL (▒) Lectin 100 µg/mL (■) Lectin 200 µg/mL.

Nas análises de estrutura *versus* função biológica das lectinas nos testes realizados verificou-se nos ensaios de inibição do crescimento bacteriano na forma planctônica que *S. mutans* foi inibido por ConBol, ConBr, e ConM, enquanto ConA e CGL estimularam seu crescimento comparado ao controle. O sítio de ligação a carboidratos dessas lectinas é muito similar e diverge discretamente entre ConA e CGL; esta divergência está principalmente relacionada às distâncias entre as cadeias laterais dos aminoácidos que compõem o domínio de reconhecimento a carboidratos. A principal diferença observada no CRD foi uma redução na profundidade do sítio (Arg228-Tyr12 e Arg228-Asn14) e da abertura (Tyr100 – Tyr12 e Tyr12 – Tyr14) (Figura 19). A abertura e profundidade do CRD permite distinguir dois grupos de lectinas de Canavalias de acordo com sua ação frente ao *S. mutans*; o grupo com ação inibitória formado por ConBol, ConBr e ConM e o grupo com ação estimulatória formado por ConA e CGL.

Figura 19 - Comparação dos sítios de ligação a carboidratos entre CGL e ConM.



Fonte: Próprio autor. CGL (lectina estimulatória para *S. mutans* - azul) e ConM (lectina inibitória para *S. mutans* - verde).

O primeiro relato de ação inibitória de peptídeos frente a micro-organismos data de 1942, e refere-se a uma proteína obtida do trigo (BALLS, *et al.*, 1942). Lectinas em plantas superiores tem função de defesa frente a agentes patogênicos como bactérias e fungos através do reconhecimento e imobilização dos agentes microbianos infectantes através de ligação, assim, prevenindo a subsequente multiplicação e colonização da planta hospedeira (ETZLER, 1986). A inibição do crescimento de bactérias e fungos por lectinas, tal como a de *Amaranthus*, já foi relatada anteriormente na literatura (DE BOLLE, *et al.*, 1996).

A determinação da atividade antimicrobiana seguiu os parâmetros metodológicos propostos pelo CLSI, que sugere que nas concentrações utilizadas e nas condições testadas, apenas ConBol, ConBr e ConM tiveram um efeito inibitório a 500 µg/mL frente ao *S. mutans*. CGL e ConA tiveram efeito estimulatório frente a esta bactéria. No entanto, nestes testes com *S. oralis* todas as lectinas, exceto ConA, tiveram efeito estimulatório na mesma concentração, 500 µg/mL.

As concentrações usadas são consideradas altas comparadas às usadas em estudos similares (LIAO *et al.*, 2003; SANTI-GADELHA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008). No entanto, Liao e colaboradores (2003), ao testar a ação antimicrobiana de lectinas de plantas e algas marinhas usaram concentrações entre 102 e 800 µg/mL e encontraram que ConA e WGA de plantas terrestres não inibiram nenhum dos víbrios analisados.

Os presentes resultados mostram que ConM foi capaz de inibir o crescimento do *S. mutans*, o que pode ser atribuído a possíveis danos ocorridos na membrana celular. Santi-Gadelha e colaboradores (2006) mostraram através de microscopia eletrônica a presença de poros e ruptura severa da membrana bacteriana de Gram-positivas a demonstrar forte atividade antimicrobiana e apontando um possível mecanismo de inibição do crescimento bacteriano pela ação de lectinas. Esses poros formados na membrana permitem a saída do conteúdo celular (TERRAS *et al.*, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Os sítios de ligação a carboidratos na superfície bacteriana apresentam provavelmente um papel chave na atividade antibacteriana, o que os torna responsáveis pelo reconhecimento bacteriano. É importante notar que diferenças na atividade antimicrobiana frente a *S. mutans* e *S. oralis* podem estar relacionadas a diferenças na composição característica dos carboidratos de superfície de cada bactéria em questão. Quase todos os micro-organismos expressam carboidratos expostos em sua superfície. Esses carboidratos podem estar covalentemente ligados, como nos ácidos teicóicos glicosilados ligados ao peptideoglicano, ou não covalentemente ligados, como nos polissacarídeos capsulares (SANTI-GADELHA *et al.*, 2006; CALDERON, *et al.*, 1997). Cada carboidrato exposto na superfície celular é um potencial sítio de ligação à lectina.

A habilidade das lectinas de formarem complexos com glicoconjugados microbianos tem estimulado sua aplicação como sondas para células completas, seus mutantes e numerosos constituintes e metabólitos celulares. Receptores microbianos para Concanavalina A tem sido descritos. Por exemplo, ácido teicóico glicosilado encontrado na superfície de muitas bactérias Gram-positivas (CALDERON, *et al.*, 1997) e polissacarídeos neutros produzidos por membros dos gêneros *Leuconostoc* e *Streptococcus* (SANTI-GADELHA *et al.*, 2006). O desenvolvimento de ligantes de alta afinidade capazes de reconhecer seletivamente uma variedade de pequenos motivos em diferentes oligossacarídeos seria de significativo interesse como ferramentas experimentais e de diagnóstico para muitas infecções bacterianas. A ligação seletiva de certas lectinas a bactérias tem sido proposta para uso em *drug delivery* de agentes antimicrobianos com a lectina de *C. ensiformis* tendo como ponto de ação *Streptococcus sanguis* e *Corynebacterium hofmannii* e lectina de *Triticum vulgare* tendo como alvo *Streptococcus epidermidis* em testes *in vitro* (KASZUBA *et al.*, 1995). Isso pode apresentar-se como nova perspectiva para estudos envolvendo a conjugação de lectinas e outros produtos com conhecida atividade antimicrobiana.

A microflora residente beneficia o hospedeiro ao agir como parte das suas defesas e inibindo a colonização por micro-organismos endógenos (frequentemente patogênicos),

“resistência à colonização” (VAN DER WAAIJ *et al.*, 1971). O conceito de mudança ecológica microbiana como um mecanismo de prevenção a danos aos elementos dentais é de grande importância (CAGLAR *et al.*, 2005). Os presentes resultados mostraram que as lectinas de *C. boliviana*, *C. brasiliensis* e *C. maritima* tiveram uma ação inibitória frente ao *S. mutans*, e um efeito estimulatório frente ao crescimento de *S. oralis*.

S. mutans, uma bactéria acidogênica, tem sido associada com o desenvolvimento da cárie dentária através da produção de ácido como um resultado da fermentação de carboidratos (HAMILTON, 2000). Micro-organismos presentes na cavidade oral como *S. oralis* são membros numericamente importantes da microbiota oral, que podem ser isolados de todas as superfícies intraorais e são considerados organismos pioneiros envolvidos na colonização primária da dentição (NYVAD e KILIAN, 1990; DO *et al.*, 2009). Marsh (1991), na “hipótese ecológica da placa”, propôs que mudanças em fatores ambientais poderiam desencadear alterações no balance da microbiota residente, e isso poderia predispor um sítio oral à doença.

Um dos muitos mecanismos moleculares de aderência bacteriana e o desenvolvimento de biofilmes orais mistos está relacionado a interações lectina/carboidrato específicas entre bactérias, tal como a interação envolvida em co-agregações sensíveis à lactose de *Actinomyces* spp. e *Streptococcus* spp. Devido ao seu papel na adesão, lectinas são consideradas importantes tanto em interações simbióticas quanto patogênicas entre micro-organismos e hospedeiros (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Com um novo entendimento das interações entre membros da comunidade microbiana, existe agora interesse em abordagens ou estratégias que possam inibir seletivamente patógenos orais, ou modular a composição microbiana da placa dental para controlar a patogênese de doenças microbianas baseadas na formação de comunidades (HE *et al.*, 2009).

De acordo com Teixeira e colaboradores (2006), seis lectinas de plantas ConA, ConBr, DVL, DGL, CFL têm a habilidade de bloquear a adsorção de estreptococos orais, evitando sua adesão a receptores da película adquirida salivar. Lectinas aglutinam bactérias e sua presença no meio pode ser aplicada para prevenir ligações mais duradouras de bactérias a superfície dental (ISLAM *et al.*, 2009). Os presentes resultados indicam uma ação inibitória sobre a formação de biofilmes de *S. mutans* e efeito diferente sobre a formação dos biofilmes de *S. oralis*. Isso pode ser atribuído às diferenças na composição de carboidratos de superfície entre as espécies bacterianas. Liljemark e colaboradores (1981) demonstraram o efeito da agregação bacteriana na aderência de estreptococos orais à película adquirida usando lectinas. Seus resultados sugerem que a formação de grandes agregados causa uma diminuição no

número de bactérias aderidas e indica que, independente da concentração de certas lectinas, sua atividade de agregação não se opõe ao seu efeito de bloqueio e ainda auxilia a diminuir o número de estreptococos aderidos. Inibição significativa do crescimento de biofilmes causada por lectinas de plantas foi relatada anteriormente por Islam e colaboradores (2009), fato que pode estar relacionado a uma glicoproteína de 60 kDa presente na superfície de *S. mutans* (com manose e *N*-acetilgalactosamina) que já se sabe estar envolvida em interações saliva/bactéria (CHIA *et al.*, 2001). A menor taxa de adesão na presença de lectinas específicas por glicose/manose pode ser devido à interação com esta proteína (ISLAM *et al.*, 2009).

As diferenças no padrão de ação antimicrobiana das lectinas estão relacionadas às suas estruturas quaternárias, mas, estudos recentes de cristalografia revelaram que a orientação de sítios de ligação a carboidratos específicos determina a resposta biológica de muitos sistemas à presença da lectina (DELATORRE *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2007). O efeito estimulatório das lectinas de *Canavalia* sobre *S. oralis* pode ser devido à alta frequência de ácido neuramínico na superfície celular (BYERS *et al.*, 1999), o qual não é específico para ligação de lectinas de Diocleinae.

A inibição de *S. mutans* causada por três das cinco lectinas testadas é estruturalmente confirmada pela comparação das distâncias dos aminoácidos das cadeias laterais no domínio de reconhecimento a carboidratos (principalmente a abertura *versus* a profundidade do sítio). Esses aspectos já foram reportados para ConM e CGL como relacionados ao aumento da seletividade das lectinas por dissacarídeos (GADELHA *et al.*, 2005; DELATORRE *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2007). A preferência de ConBol, ConBr e ConM de ligar-se e inibir especificamente a *S. mutans* pode ser explicada pela redução do sítio primário de ligação a carboidratos e pelo aumento da especificidade destas lectinas pelo epítipo mais externo de carboidrato, o qual forma padrões de interações mais complexas com as lectinas acima citadas comparado a ConA e CGL que apresentam sítios de ligação a carboidratos maiores.

Capítulo 10-Conclusões

Parte I

10 CONCLUSÕES: PARTE I

- Verificar o efeito das lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia maritima*, *Canavalia gladiata* e *Canvalia boliviana*, no crescimento bacteriano de *Streptococcus mutans* ATCC UA 159, e *S. oralis* ATCC 10557 através de técnica de microdiluição.
- Verificar a possível interferência das lectinas das sementes de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia maritima*, *Canavalia gladiata* e *Canvalia boliviana* na formação de biofilmes monoespecífico de *Streptococcus mutans* ATCC UA 159 e *S. oralis* ATCC 10557 em superfícies cobertas por saliva.
- Analisar a relação entre a estrutura das lectinas das sementes de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia maritima*, *Canavalia gladiata* e *Canvalia boliviana* e suas possíveis funções biológicas sobre o crescimento planctônico e dos biofilmes monoespecíficos de *Streptococcus mutans* ATCC UA 159 e *S. oralis* ATCC 10557.

Capítulo 11-Objetivos

Parte II

11 OBJETIVOS: PARTE II

11.1 Objetivos específicos

- Verificar a concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais de *Croton zehntineri* variedades anetol, estragol e eugenol, e seus respectivos componentes majoritários anetol, estragol e eugenol frente à bactéria *Streptococcus mutans* ATCC UA 159.
- Verificar a concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais do caule de *Croton zehntineri* variedades anetol, estragol e eugenol, e seus respectivos componentes majoritários anetol, estragol e eugenol frente à bactéria *Streptococcus mutans* ATCC UA 159.
- Analisar a capacidade dos óleos essenciais de *Croton zehntineri* variedades anetol, estragol e eugenol de inibir a formação de biofilmes monomicrobianos de *Streptococcus mutans* ATCC UA 159 em placas de poliestireno.
- Analisar o efeito dos óleos essenciais de *Croton zehntineri* variedades anetol, estragol e eugenol e seus respectivos componentes majoritários anetol, estragol e eugenol sobre a viabilidade celular dos biofilmes monomicrobianos de *Streptococcus mutans* ATCC UA 159 com 24 horas de formação em placas de poliestireno.

Capítulo 12-Materiais e Métodos

Parte II

12 PARTE EXPERIMENTAL II

12.1 Coleta e identificação do material vegetal

O material vegetal coletado foi constituído de três quimiotipos de *Croton zehntneri*. No ato da coleta foi feita a exsicata das amostras vegetais, que consistiu na separação das partes aéreas das plantas com flores e frutos, sendo então identificadas pelo Dr. Edson Paula Nunes e depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará-UFC sendo *C. zehntneri* variedade anetol exsicata N°: 42389, coletada em Ubajara-CE em abril de 2008; *C. zehntneri* variedade estragol exsicata N°: 42774, coletada em Croatá da Serra-CE em maio de 2008; *C. zehntneri* variedade eugenol exsicata N°: 43048, coleta também em Croatá da Serra-CE em maio de 2008. Os óleos e seus componentes majoritários foram gentilmente cedidos pelo Professor Dr. Hércio dos Santos.

12.2 Obtenção do óleo essencial de três quimiotipos de *Croton zehntneri* e isolamento de seus componentes majoritários

Os caules dos dois quimiotipos e as folhas de um quimiotipo de *Croton zehntneri* recém-coletados foram colocados separadamente em balões de vidro de 5 L, juntamente com 2 L de água e mantidos por duas horas em ebulição. Após este período, a mistura água/óleo contida no doseador foi separada, em funil de separação por partição com éter etílico. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e concentrada sob pressão reduzida, fornecendo óleo essencial (Figura 20).

A análise dos óleos essenciais foi feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) em aparelho da Hewlett-Packard 5971. As condições programadas no aparelho foram: coluna capilar de DB-1 (dimetil-polisiloxano) com 30 cm de comprimento e 0,2 mm de diâmetro interno; gás de arraste: Hélio (1 mL/min); programa: 50-180 °C a 4 °C/minuto e, depois, 180-220 °C a 20 °C/minuto; temperatura no injetor: 220 °C; modo de injeção: 0,1 µL (solução 10%), split 1:20, 500 ng/na coluna. Os espectros de massas foram produzidos por impacto eletrônico (70 eV).

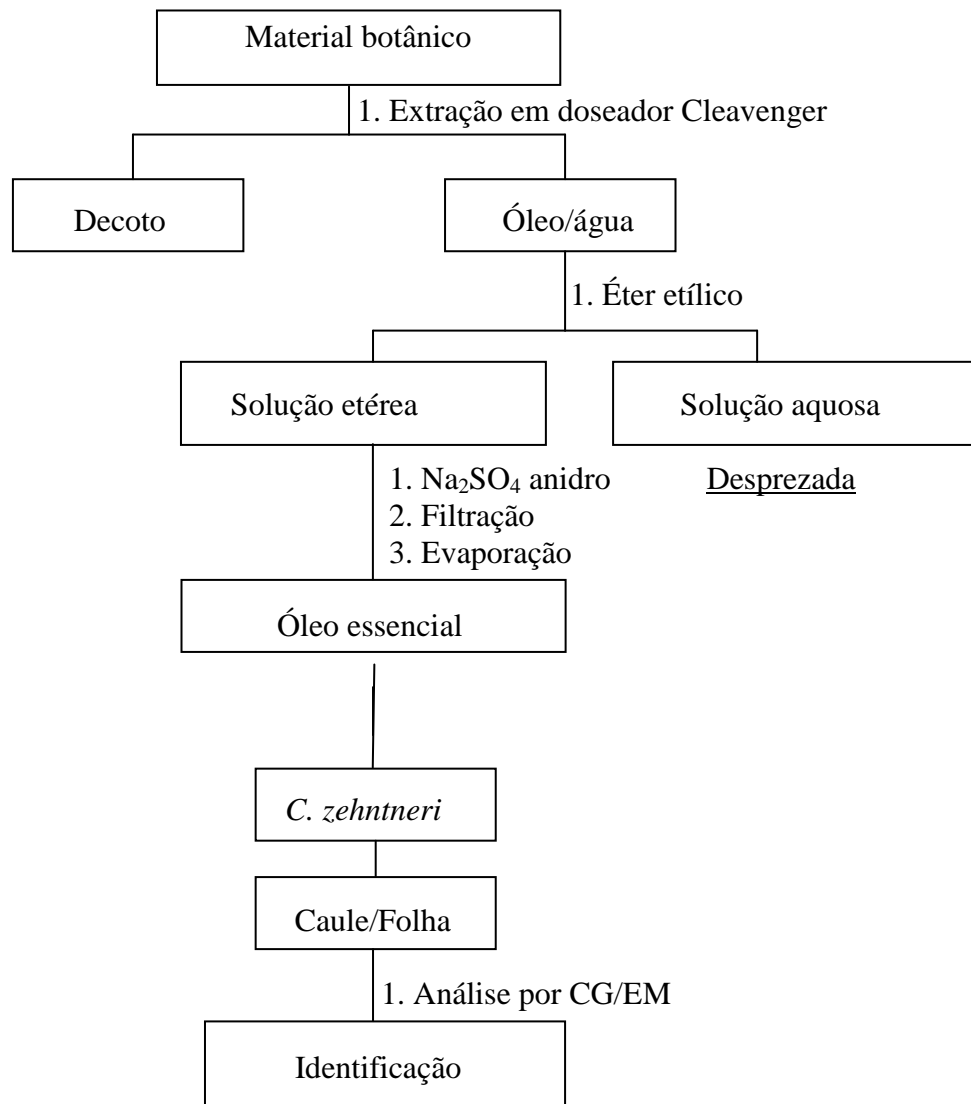
Os espectros de massas dos constituintes foram comparados com os padrões existentes na quimioteca Wiley do computador do aparelho. Em seguida, foram feitas comparações visuais com espectros de massas de substâncias encontradas na literatura (ADAMS, 2001) (Anexo A).

Os tempos de retenção dos picos maiores, mais facilmente identificados no espectro de massas, foram comparados com os tempos de retenção destas substâncias

registrados na literatura, observando-se a diferença que se manteve aproximadamente constante para as demais substâncias identificadas pelo computador do aparelho.

Os constituintes majoritários anetol, estragol e eugenol foram isolados dos óleos essenciais por meio de métodos cromatográficos.

Figura 20 - Esquema ilustrativo do método de extração dos óleos essenciais de *Croton zehntneri*.



12.3 Preparo das soluções dos óleos essenciais e componentes majoritários

As soluções para teste (Quadro 3) foram preparadas na concentração inicial de 5% solubilizadas em água destilada com 5% de Tween 80 e estocadas em tubos esterilizados a 20 °C. A concentração do Tween 80 em cada poço foi no máximo de 2,5%, sendo este componente isento de atividade antimicrobiana. Anteriormente a cada uso foi realizada inoculação em meio de cultura para verificar a ausência de contaminantes.

Quadro 3 - Lista de substâncias naturais obtidas a partir do *Croton zehntneri* selecionadas para testes.

Substâncias	Sigla
Óleo essencial <i>Croton zehntneri</i> var. anetol	OECC-A
Óleo essencial <i>Croton zehntneri</i> var. estragol	OEFC-E
Óleo essencial <i>Croton zehntneri</i> var. eugenol	OECC-E
Anetol	NA
Estragol	ES
Eugenol	EU

12.4 Cepas bacterianas e condições de cultivo

Para os testes com substâncias naturais foi selecionada a cepa bacteriana *Streptococcus mutans* ATCC UA 159.

A cepa foi mantida em BHI caldo mais glicerol (20%) a -80 °C; para realização dos experimentos uma alíquota de 100 µL foi inoculada em 10 mL de BHI caldo e crescida em estufa com 10% de CO₂ à 37 °C por 24 horas. Após essa ativação inicial, a cultura foi renovada em mais 10 mL de BHI caldo esterilizado com inóculo de 100 µL e crescida nas mesmas condições descritas acima por 18 horas. Essa renovação foi feita para obter um microrganismo com melhor condição de crescimento e desenvolvimento.

12.5 Ensaios de atividade antimicrobiana

A ação antimicrobiana de todas as substâncias naturais listadas no quadro 3 foi determinada por testes de microdiluição em placas de poliestireno, padronizados de acordo com o guia *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow*

Aerobically; Approved Standard – Sixth Edition; CLSI documento M7-A6. Em tubos de 2 mL, as soluções foram diluídas seriadamente em água (Mili-Rios[®]) nas concentrações de 5% a 0,078%. A avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e seus componentes isolados foi verificada através da obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) em placas de poliestireno de 96 poços. Neste procedimento, 100 µL de BHI caldo duas vezes concentrado foram colocados em cada poço, em seguida, 100 µL das soluções em teste de cada concentração da diluição seriada foram adicionados à placa. As bactérias foram manipuladas de acordo com as condições descritas no item 8.4. Após esses procedimentos, as bactérias foram submetidas a três lavagens. As etapas de centrifugação ocorreram durante cinco minutos, a temperatura de 4 °C a 5000 rpm e o precipitado bacteriano foi ressuspensionado em água (Mili-Rios). A concentração bacteriana foi ajustada para 10⁶-10⁸ UFC/mL. Um volume de 4 µL da suspensão bacteriana foi colocado em cada poço nas placas anteriormente montadas. Os controles foram clorexidina 0,025% e água (Mili-Rios).

Depois da montagem das placas foram realizadas uma leitura inicial e outras leituras a DO_{620 nm} em leitor de ELISA (BioTrak II - Plate Reader[®]) após 12, 18 e 24 horas de incubação a 37 °C, com 10% de CO₂. Foi considerado CIM a menor concentração da substância onde não se verificou visualmente crescimento microbiano.

A CBM foi determinada retirando-se uma alíquota de 50 µL da solução contida nas placas em cada concentração, após a leitura de 24 horas, e inoculando-as em tubos de vidro contendo 5 mL de meio BHI caldo. Os tubos foram incubados em estufa a 37 °C com 10% de CO₂. Foi considerado CBM a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano nos tubos.

12.6 Atividade antibiofilme

Os ensaios de ação antibiofilme foram realizados de acordo com metodologia desenvolvida por Stepanovic *et al.*, (2000) e Islam *et al.*, (2009) com modificações.

12.6.1 Coleta de saliva

A saliva foi coletada e processada de acordo com metodologia descrita no item 8.5.1.

12.6.2 Inibição da formação do biofilme

Este teste foi realizado com a bactéria *S. mutans* UA 159 apenas frente aos óleos essenciais dos três quimiotipos de *Croton zehntneri*.

Inicialmente os poços foram tratados com tampão carbonato pH 9,3 e, adicionada saliva processada na proporção de 1:1 com volume 200 µL por poço, onde permaneceram por duas horas numa temperatura de 4 °C. Após esse período, a saliva foi retirada e os poços foram lavados três vezes com tampão salina fosfato (PBS) pH 7,4. Em seguida, a diluição seriada das soluções em teste foi feita diretamente na placa resultando num volume final de 100 µL; foram adicionados 100 µL da bactéria ajustada previamente em espectrofotômetro numa concentração de 10⁷ UFC/mL no próprio meio de cultura (BHI caldo duas vezes concentrado). Assim, a primeira concentração no poço das substâncias em teste foi de 2,5%.

As placas inoculadas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C e 10% de CO₂. Todo meio de cultura utilizado na montagem da placa possuía 5% de sacarose utilizada como fonte de carbono para que as bactérias produzam a matriz polissacarídica do biofilme. Nessa placa também foram colocados os controles de clorexidina 0,025% e crescimento normal (água Mili-Rios[®]).

Após o período de incubação, a placa foi submetida a um processo de revelação iniciando-se com a retirada do meio de cultura dos poços, seguida de três lavagens com água destilada para retirar as células planctônicas remanescentes. A fixação do biofilme foi feita adicionando-se 200 µL de formalina com 2% de acetato de sódio por 15 minutos. Em seguida, adicionados 200 µL de cristal violeta 0,1% por 15 minutos para corá-lo; ao final de cada uma destas duas etapas o biofilme foi submetido a lavagem com água destilada. Após esses processos, foram adicionados 200 µL de álcool etílico 95% por 5 minutos, então uma alíquota de 100 µL desse álcool foi retirada e colocada em uma nova placa de 96 poços com fundo chato e realizada a leitura a DO_{595 nm} em leitor de ELISA (BioTrak II - Plate Reader[®])

12.6.3 Ação sobre o biofilme previamente formado

Este teste foi realizado com todas as substâncias listadas no quadro 3 frente ao *S. mutans* UA 159.

Em placas de poliestireno com 96 poços foram colocados 100 µL de saliva juntamente com 100 µL de tampão carbonato pH 9,3 e mantidos por duas horas a 4 °C. Em seguida, retirou-se essa solução e adicionou-se meio BHI caldo com 5% de sacarose inoculado com a

bactéria na concentração de 10^7 UFC/mL. Essas placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 10% de CO_2 e 37 °C.

Após esse período de crescimento do biofilme, o meio de cultura foi retirado e as placas receberam tratamento de acordo com os diferentes grupos experimentais e controles. Na placa do controle de NaCl 0,9% foi feita apenas a troca do meio por um meio de cultura novo nas mesmas condições. Na placa das substâncias-teste, adicionou-se 100 μL na concentração de 5% mais 100 μL de meio BHI duas vezes concentrado resultando em uma concentração final de 2,5% de cada substância-teste. A clorexidina 0,025% foi adicionada da mesma forma. Na sequência, as placas foram mantidas por mais 24 horas em estufa com 10% de CO_2 e 37 °C.

Para verificar a viabilidade bacteriana após os diferentes tratamentos recebidos foi realizada contagem de UFC. Para tanto, as placas de poliestireno foram lavadas duas vezes com água destilada esterilizada para retiradas das células fracamente aderidas. Em seguida, foi adicionada a cada poço da placa 200 μL de PBS pH 7,4 e levado para o banho de ultrassom (Sonicor[®]/SC-52) por 10 minutos para a liberação das células formadoras do biofilme. O volume de cinco poços foi retirado, com movimento *up-down*, e reunidos em um tubo esterilizado fazendo um volume final de 1 mL. Em uma placa de 96 poços, foi feita a diluição na base dez da suspensão de células para posterior semeadura em meio sólido. As placas de Petri com BHI ágar foram incubadas a 37 °C durante 24 horas para posterior contagem do número de colônias crescidas para cada diluição. Foi realizada correção do número de células, multiplicando-se o número de UFC na placa pela diluição, expressando o valor em número de UFC/mL.

12.7 Análise estatística

Trata-se de uma pesquisa quantitativa em que os experimentos foram realizados em três repetições independentes com 10 réplicas cada uma. Os resultados foram demonstrados através de gráficos; a diferença entre as médias dos experimentos foi verificada através da aplicação do teste One-way ANOVA com Bonferroni pós teste, executados com o auxílio do programa GraphPad[®], San Diego California USA. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,01$.

Capítulo 13-Resultados e Discussão
Parte II

Os produtos naturais derivados de plantas medicinais tem se mostrado como fonte abundante de compostos biologicamente ativos, muitos dos quais têm sido a base para o desenvolvimento de novos produtos químicos que podem levar a produtos farmacêuticos. A respeito de doenças causadas por micro-organismos, o aumento na resistência de muitos patógenos comuns a agentes terapêuticos corriqueiramente utilizados, tais como antibacterianos e antivirais, têm levado a renovação do interesse na descoberta por novos compostos anti-infecciosos. Como existem aproximadamente 500.000 espécies de plantas distribuídas no planeta, das quais apenas 1% foi fitoquimicamente investigada, existe um grande potencial para descoberta de novos compostos bioativos (PALOMBO, 2011).

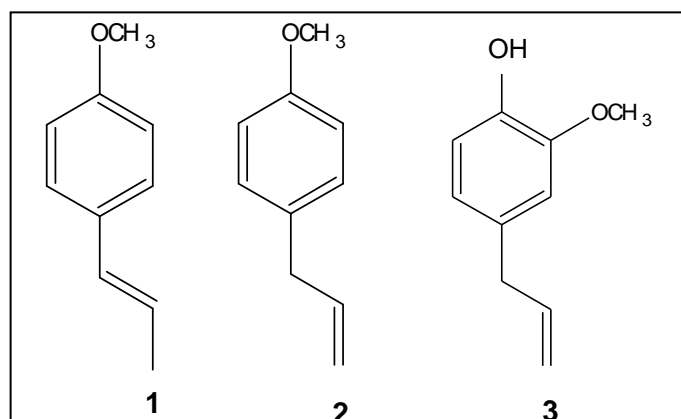
Considerando que a caatinga é um bioma com uma grande diversidade de plantas medicinais, mais pesquisas farmacológicas e fitoquímicas são necessárias para estabelecer o uso potencial destas plantas como tratamento alternativo às terapias convencionais (ALMEIDA *et al.*, 2006).

Óleos essenciais são misturas complexas de compostos principalmente terpenos (EDRIES, 2007). Fortes evidências *in vitro* indicam que os óleos essenciais podem atuar como agentes antibacterianos frente a um grande espectro de cepas bacterianas patogênicas (BURT, 2004; NGUEFACK *et al.*, 2004; SCHMIDT *et al.*, 2005).

Os óleos essenciais extraídos do caule dos quimiotipos 1 e 3 e das folhas do quimiotipo 2 de *Croton zehntneri* foram analisados por CG/MS e os constituintes identificados e quantificados (Anexo B). Um total de 31 compostos organizados por ordem de eluição em uma coluna DB-5 foram identificados nas amostras dos óleos essenciais, tendo como constituintes majoritários os fenilpropanóides E-anetol (1) do caule do quimiotipo 1, estragol (2) da folha do quimiotipo 2 e eugenol (3) do caule do quimiotipo 3 (Figura 21).

O óleo essencial do caule de *C. zehntneri* (quimiotipo 1) foi obtido com rendimentos de 0,30% (Tabela 1). No óleo essencial do caule (94,5%) foram identificados 10 constituintes, correspondentes a 3 monoterpenos (10,3%), p-anisalaldeído (1,8%), 3 fenilpropanóides (78,1%) e 3 sesquiterpenos (4,3%). O constituinte principal foi identificado como sendo o fenilpropanóide anetol, o qual está presente no óleo essencial do caule no teor de 70,53% (Anexo B).

Figura 21 – Estruturas químicas dos constituintes majoritários dos óleos essenciais dos três quimiotipos de *Croton zehntneri*.



Fonte: Próprio autor. (1) Anetol; (2) Estragol; (3) Eugenol.

O óleo essencial das folhas de *C. zehntneri* (quimiotipo 2) foi obtido com rendimentos de 0,90% (Tabela 1). Foram identificados 3 constituintes, 2 fenilpropanóides (90,6%) e 1 sesquiterpeno (1,74%). O fenilpropanóide estragol foi identificado como constituinte majoritário no óleo essencial das folhas como um teor de 90,2% (Anexo B).

O óleo essencial do caule de *C. zehntneri*, quimiotipo 3, foi obtido com rendimento de 0,19% (Tabela 1). Foram identificados 21 constituintes, relacionados a 8 monoterpenos (17,9%), 4 fenilpropanóides (66,0%), 7 sesquiterpenos (14,3%). O constituinte majoritário foi identificado como sendo o fenilpropanóide eugenol no teor de 49,1% (Anexo B) (Tabela 1).

Tabela 1 - Rendimento dos óleos essenciais dos três quimiotipos de *Croton zehntneri*.

<i>Croton zehntneri</i>	Óleo essencial	Material vegetal (g)	Massa (g)	Rendimento (%)
Quimiotipo 1 (var. anetol)	Caule	1500	4,74	0,30
Quimiotipo 2 (var. estragol)	Folhas	327	3,02	0,90
Quimiotipo 3 (var. eugenol)	Caule	700	1,33	0,19

A família Euphorbiaceae inclui árvores, arbustos, ervas e trepadeiras (LEME, 1994). O gênero *Croton* destaca-se por seu expressivo número de espécies, de distribuição neotropical (JUDD *et al.*, 1999; HELUANI *et al.*, 2000) com importância econômica nas regiões onde são facilmente encontrados. Várias espécies de *Croton* apresentam óleos essenciais e constituintes ativos como terpenóides, flavonóides e alcalóides, com frequência

utilizada na medicina popular. Algumas espécies possuem propriedades terapêuticas já comprovadas (SANTOS *et al.*, 2005; PALMEIRA JÚNIOR *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2006; PERAZZO *et al.*, 2007; TORRICO *et al.*, 2007; ROCHA *et al.*, 2008). *Croton zehntneri* Pax *et Hoffm.*, conhecida popularmente como “canela de cunhã”, “canelinha” ou “canela-brava”, é uma planta subarborescente e caducifolia do Nordeste brasileiro, cujas folhas e talos são dotadas de um aroma que lembra uma mistura de erva-doce e cravo-da-Índia. Entretanto, este aroma mostra-se variável entre exemplares desta planta coletados em diferentes localidades do Nordeste. Isto se deve à variação na concentração dos constituintes químicos mais abundantes nos seus óleos essenciais (CRAVEIRO *et al.*, 1978). Assim, distinguem-se para esta espécie quatro tipos químicos como: anetol - para os exemplares coletados em Fortaleza (CE) e Viçosa (CE); eugenol - para os coletados em Areia Branca (RN) e Quixadá (CE); metil-eugenol - para os coletados em Ipu (CE) e Oeiras (PI); estragol - para os exemplares coletados em Tianguá (CE) e Granja (CE) (MORAIS *et al.*, 2006).

Foram realizadas leituras para verificação do crescimento bacteriano nos intervalos de 12, 18 e 24 horas de incubação com a intenção de se observar diferentes estratégias de possíveis tratamentos. Ficou demonstrado que com 12 horas de incubação todas as substâncias ou foram mais efetivas ou tiveram efetividade semelhante aos tempos de 18 e 24 horas (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais e seus componentes majoritários frente a *Streptococcus mutans* UA 159.

Substâncias testadas	CIM (% v/v) /Tempo (horas)			CBM (% v/v)
	12	18	24	
OECC – Anetol	0,31	0,62	1,25	-
Anetol	1,25	2,5	2,5*	-
OEFC – Estragol	0,078	0,078	0,078	0,078
Estragol	2,5	2,5	2,5*	-
OECC – Eugenol	0,078	0,078	0,078	0,62
Eugenol	0,078	0,078	0,078	0,078

*diferença estatística frente aos controles positivo e negativo

É importante ressaltar que, todas as substâncias em todas as concentrações e todos os tempos de incubação apresentaram efetividade em inibir o crescimento planctônico do *S. mutans* comparado ao crescimento normal (H₂O) (p<0,001). Além disso, todas as substâncias nas CIMs não foram estatisticamente diferentes da clorexidina, excetuando-se o

estragol e anetol com 24 horas de incubação, ou seja, apresentaram efetividade semelhante a esta substância corriqueiramente utilizada na clínica odontológica.

Pode-se observar pela leitura da tabela 7, que, os óleos essenciais dos quimiotipos 1 e 2 foram mais efetivos, com concentrações inibitórias mínimas menores, que seus respectivos componentes majoritários. Essa informação induz que o efeito inibitório sobre as células bacterianas foi mais significativo quando os diferentes componentes dos óleos atuaram provavelmente em múltiplos alvos. A exceção para este achado foi o óleo do quimiotipo 3, em que seu componente majoritário atuando sozinho apresentou CIM em uma concentração igual ao óleo, podendo demonstrar sua grande participação na atividade apresentada pelo óleo. Quanto a CBM para o espectro de concentrações utilizadas no estudo, pode-se observar que somente os óleos dos quimiotipos 2 e 3 apresentaram concentração bactericida com o menor valor de dose atribuído ao OEF-Estragol (0,078%) comparado ao OEC-Eugenol (0,62%). Para os componentes majoritários somente o eugenol apresentou CBM dentre as doses testadas (0,078%).

C. zehntneri é usado popularmente como sedativo, estimulante de apetite e para aliviar distúrbios intestinais (MATOS, 2000; AGRA *et al.*, 2007; AGRA *et al.*, 2008), com comprovados efeitos do óleo essencial de suas folhas como antioxidante (MORAIS *et al.*, 2006), com atividade antinocepsiva (OLIVEIRA *et al.*, 2001) e efeitos depressivos sobre o sistema nervoso central em ratos e camundongos (BATATINHA *et al.*, 1995).

Foi demonstrada efetividade do óleo essencial de *Croton zehntneri* variedade estragol frente a bactérias Gram-positivas, assim como foi observado no presente estudo (COSTA *et al.*, 2008). No entanto, as concentrações utilizadas neste estudo com efetiva ação comparada ao controle ($p < 0,001$) foram menores comparadas aquelas testadas por Costa *et al.* (2008). Foi verificada também a toxicidade frente *Artemia salina* desta variedade de óleo essencial do *Croton zehntneri* e foi observada que a CL_{50} foi menor que 1000 $\mu\text{g/mL}$, o que indica a possibilidade de realização de testes clínicos (COSTA *et al.*, 2008).

A atividade antimicrobiana de alguns óleos essenciais e componentes isolados foi revisada e foi observado que o eugenol apresentava boa efetividade antibacteriana na concentração de 0,5% (BURT, 2004). No presente estudo, após 24 horas de incubação o eugenol apresentou redução estatisticamente significativa no crescimento bacteriano nas concentrações de 2,5 a 0,078% e ainda vale ressaltar que não houve diferença significativa quando se comparou todas as concentrações da substância em teste com a clorexidina.

Algumas funções biológicas das plantas são atribuídas aos óleos voláteis, como a atração de polinizadores, a defesa contra o ataque de predadores, a proteção contra perda de

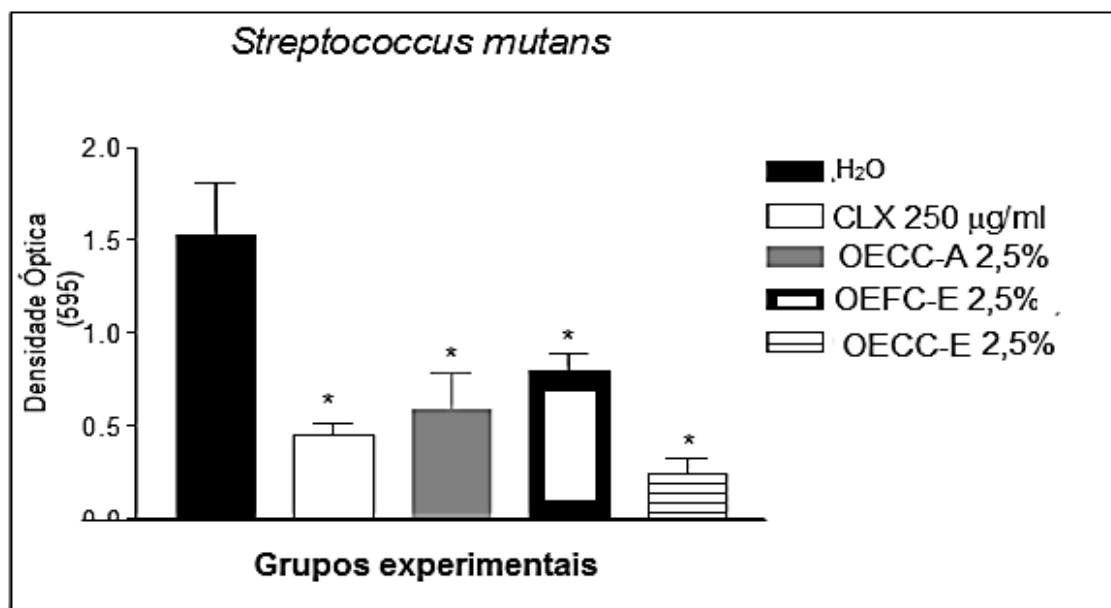
água e aumento de temperatura e a inibição de germinação. Os óleos essenciais são também considerados produtos de desintoxicação, funcionando na adaptação do organismo ao meio (JAKIEMI, 2008). A constituição dos óleos essenciais varia desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos estão presentes em diferentes concentrações, normalmente variando de acordo com as características de cada planta (SIMÕES; SPITZER, 2003). Os constituintes de óleos essenciais de plantas são divididos em duas classes químicas inteiramente distintas, terpenóides e fenilpropanóides. Embora os terpenos representem a maioria dos componentes e ocorram com muito mais frequência e abundância, sempre que os fenilpropanóides estão presentes fornecem um sabor e odor indispensáveis e significativos ao óleo. Biogeneticamente, terpenóides e fenilpropanóides originam-se de metabolismos precursores diferentes e são gerados por rotas biossintéticas completamente distintas (SANGWAN *et al.* 2001).

Os mecanismos bioquímicos específicos de óleos essenciais e síntese de fenilpropanóides, tais como o eugenol e a elemicina, são conhecidos somente a uma extensão limitada. Embora os fenilpropanóides não sejam constituintes comuns de óleos essenciais de plantas, os óleos essenciais de certas espécies contêm proporções abundantes ou significativas de tais compostos. Quando ocorrem, sua natureza e suas propriedades alteram significativamente as características sensoriais do óleo. Os principais fenilpropanóides conhecidos são eugenol, metil-eugenol, miristicina, elemicina, chavicol, metil chavicol, dilapiol, anetol, estragol, apiol (SANGWAN *et al.* 2001).

Os fenilpropanóides são substâncias constituídas por um anel aromático unido a uma cadeia de três carbonos e derivadas biossinteticamente do ácido chiquímico. O ácido chiquímico é formado por dois metabólitos da glicose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fostato (PERES, 2004 *apud* JAKIEMI, 2008).

Foram realizados ensaios para verificar a capacidade dos óleos essenciais dos três quimiotipos em inibir a formação de biofilmes monomicrobianos de *S. mutans in vitro*, utilizados em uma concentração de 2,5%, através de quantificação indireta por cristal violeta. Observou-se que todos os óleos apresentaram ação de inibição da formação do biofilme com diferença estatisticamente significativa comparado ao seu desenvolvimento normal ($p < 0,01$); e que não apresentaram diferença estatística comparado ao controle de clorexidina ($p > 0,05$). Quando se compara a ação dos três óleos observa-se que não há diferença estatisticamente significativa em suas atividades anti-biofilme ($p > 0,05$) (Figura 22).

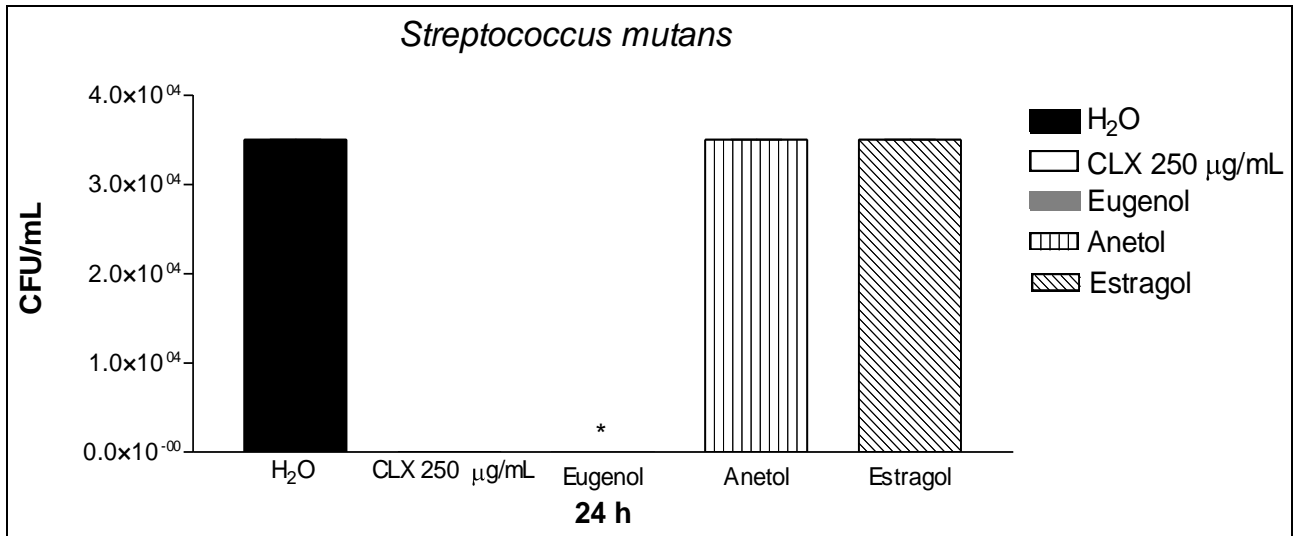
Figura 22 - Gráfico da avaliação do potencial antibiofilme dos óleos essenciais dos três quimiotipos do *C. zehntnerie*.



* p < 0,001 diferença estatisticamente significativa em relação à H₂O.

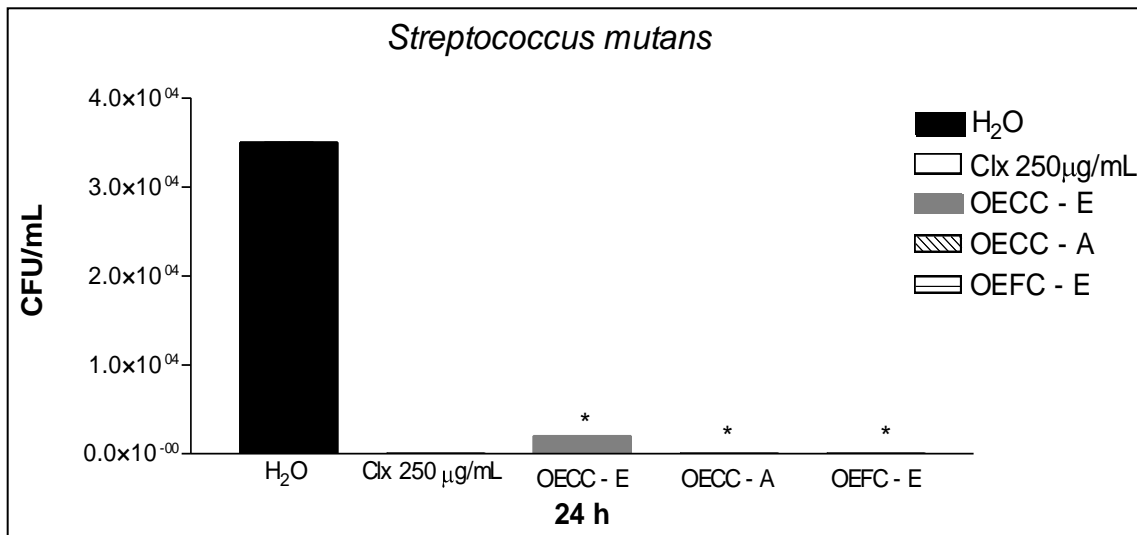
De forma a complementar os resultados de avaliação da inibição da formação do biofilme, foram realizados ensaios da verificação da viabilidade bacteriana após tratamento dos biofilmes já formados com os óleos em questão e seus componentes majoritários. Observou-se que os componentes isolados estragol e anetol não foram capazes de diminuir a viabilidade bacteriana comparado ao controle de crescimento normal, enquanto que OEC-Anetol, OEF- Eugenol e eugenol isolado, mostraram completa inibição da viabilidade celular destes biofilmes. O OEC- Estragol mostrou uma redução em torno de 98% na viabilidade celular (Figuras 23 e 24).

Figura 23 - Gráfico da avaliação da ação dos componentes majoritários dos óleos essenciais dos três quimiotipos do *C. zehntneri* frente ao biofilme já formado.



* p < 0,001 diferença estatisticamente significativa em relação à H₂O.

Figura 24 - Gráfico da avaliação da ação dos óleos essenciais dos três quimiotipos do *C. zehntneri* frente ao biofilme já formado.



* p < 0,001 diferença estatisticamente significativa em relação à H₂O.

Em 2005, Alviano e colaboradores estudaram atividade antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial do *Croton cajucara* e seu componente majoritário linalol, observando, assim como no presente estudo, que o efeito dos óleos foi mais potente que o do componente isolado. Em outro estudo foi demonstrado que colutórios contendo óleos essenciais podem ser benéficos, funcionando como componentes seguros da rotina diária de

higiene oral (CLAFFEY, 2003), mas, a atividade antimicrobiana e a toxicidade seletiva destas preparações, assim como sua composição química precisam ainda ser mais exploradas.

Em estudo de toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* em ratos e foi observado que as doses tóxicas estavam acima de 3g/Kg administrados por via oral, doses bem superiores às utilizadas no presente estudo (FONTENELE *et al.*, 2008).

A pesquisa de sinergismo objetiva encontrar razões científicas para a superioridade de muitas substâncias herbais comparado com substâncias isoladas (WANGER; ULRICH-MERZENICH, 2009). Os óleos essenciais podem interagir e afetar a membrana plasmática, interferindo com a cadeia respiratória e produção de energia em célula microbianas (NICOLSON *et al.* 1999), assim podem fornecer maior permeabilidade e extravasamento do conteúdo celular (BURT, 2004; JUVEN *et al.* 1994). Os danos aos sistemas enzimáticos bacterianos podem ainda ser considerados mecanismos de ação em potencial (WENDAKOON; SAKAGUCHI, 1995), podem ser derivados da combinação de substâncias presentes nos óleos essenciais que podem atingir múltiplos alvos na célula bacteriana.

Foi sugerido que os óleos voláteis, tanto inalados quanto aplicados sobre a pele, agem através de sua fração lipofílica reagindo com os componentes lipídicos da membrana plasmática, e como resultado, modifica a atividade dos canais de cálcio (BUCHBAUER; JIROVETZ, 1994). Em certos níveis de dose, saturam a membrana e apresentam efeito similar ao dos anestésicos locais. Eles podem interagir com a membrana por suas propriedades físico-químicas e formas moleculares, e podem influenciar suas enzimas, carreadores, canais de íons e receptores.

Acredita-se que a maioria dos óleos essenciais exerce seu efeito antimicrobiano através de modificações na estrutura da parede celular do microrganismo. Mais especificamente, altera a permeabilidade de membrana citoplasmática pela modificação no gradiente de íons hidrogênio (H^+) e potássio (K^+), causando a interrupção dos processos essenciais da célula, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, etapas da fosforilação e outras reações dependentes de enzimas, resultando em perda do controle quimiosmótico da célula afetada e, conseqüentemente, a morte bacteriana (DORMAN; DEANS, 2000).

Os resultados, obtidos a partir das metodologias empregadas, quanto à ação na formação do biofilme e sobre este já formado não permitem induzir possíveis mecanismos de ação das substâncias testadas, mas acredita-se que, de certa forma, tais substâncias foram capazes de remover ou interagir de tal forma com os polissacarídeos extracelulares presentes

nos biofilmes que sua concentração no interior destas estruturas foi suficientemente eficaz para impedir sua formação e inviabilizar ou reduzir drasticamente a viabilidade celular.

Jae-Gyu Jeon *et al.* (2011), testando a capacidade de t-farnesol, um terpenóide que pode compor óleos essenciais, observaram sua capacidade de afetar os biofilmes de *S. mutans* através de alterações na força próton-motriz, possivelmente através da interação de domínios lipofílicos com a membrana bacteriana, assim como é suposto para ação frente a bactérias na forma planctônica. Danificando as funções celulares da membrana, a habilidade de *S. mutans* em (1) produzir ácidos, (2) tolerar ácidos, e (3) sintetizar polissacarídeos intra/extracelulares ficará comprometida (KOO *et al.*, 2003; KOO *et al.*, 2002). Dados deste estudo sugerem ainda que o tratamento com t-farnesol pode subsequentemente inviabilizar o acúmulo bacteriano nos biofilmes submetidos a depleções nutricionais (JAE-GYU JEON *et al.*, 2011).

Geralmente os compostos naturais podem agir por meio de padrões já citados, mas, nem todos os mecanismos de ação agem em alvos específicos, podendo alguns sítios serem afetados em consequência de outros mecanismos (BURT, 2004).

Componentes de óleos essenciais podem atuar sobre as proteínas componentes da membrana citoplasmática, além do seu componente lipídico (KNOBLOCH *et al.*, 1989). Hidrocarbonetos cíclicos poderiam agir sobre enzimas ATPases que são conhecidas por estarem localizados na membrana citoplasmática e rodeadas por moléculas lipídicas. E hidrocarbonetos lipídicos poderiam distorcer a interação lipídio-proteína, ou ainda, interação direta dos compostos lipofílicos com partes hidrofóbicas da proteína pode acontecer (SIKKEMA, 1995). O eugenol, componente que, no presente estudo, apresentou melhor efetividade comparado aos outros componentes majoritários, apresentou concentrações capazes de inibir a produção de amilase e protease por *B. cereus*, degradar a parede celular e levar à sua lise (THOROSKI *et al.*, 1989).

A presença de um grupo hidroxila parece ser importante na atividade biológica, pois o eugenol apresenta esta característica em sua estrutura química, diferentemente do anetol e estragol e demonstrou uma atividade antimicrobiana diferenciada.

É interessante observar que compostos derivados de plantas tem ganhado um maior interesse na busca de identificar alternativas para o controle de infecções, especialmente aquelas relacionadas à formação de biofilmes, que apresentam caráter recalcitrante. É bem aceito que existem duas razões principais porque os óleos essenciais não levam ao desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes: eles são complexos e são compostos por um bom número de compostos em proporções variadas dependendo do

quimiotipo da planta. Assim, mesmo que a bactéria consiga sobrepujar o efeito de um componente do óleo, existem outros, possivelmente, com alvos de ação diferentes para compor a atividade antimicrobiana global do óleo essencial (BAKKALI *et al.*, 2008; REICHLING *et al.*, 2009).

De acordo com a Resolução RDC 48/2004, fitoterápico é todo medicamento obtido com o uso exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, não se considerando aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2004). Produtos fitoterápicos vêm sendo utilizadas na Odontologia e, para este fim, devem apresentar biocompatibilidade, logo, há a necessidade de estudá-las sob este aspecto. O biofilme dental é considerado como o principal fator etiológico da cárie e da doença periodontal. Entre as vantagens dos fitoterápicos que justificam seu uso podem-se citar: efeito sinérgico, devido aos vários fitoconstituintes que atuam melhor em associação; menores riscos de efeitos colaterais, devido às baixas concentrações em que os princípios ativos se apresentam nas plantas, e menores custos de pesquisa, quando se compara ao desenvolvimento de um novo fármaco (YUNES; PEDROSA; CECHINEL, 2001; ALBUQUERQUE, *et al.*, 2010). A busca por recursos alternativos já é uma realidade, e pelo acima exposto, justifica-se a necessidade de se estudar a ação e possíveis mecanismos de atuação de fitoterápicos sobre os micro-organismos formadores do biofilme dental.

Capítulo 14-Conclusões

Parte II

14 CONCLUSÕES: PARTE II

- Verificar a concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais de *Croton zehntineri* variedades anetol, estragol e eugenol, e seus respectivos componentes majoritários anetol, estragol e eugenol frente à bactéria *Streptococcus mutans* ATCC UA 159.
- Verificar a concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais do caule de *Croton zehntineri* variedades anetol, estragol e eugenol, e seus respectivos componentes majoritários anetol, estragol e eugenol frente à bactéria *Streptococcus mutans* ATCC UA 159.
- Analisar a capacidade dos óleos essenciais de *Croton zehntineri* variedades anetol, estragol e eugenol de inibir a formação de biofilmes monomicrobianos de *Streptococcus mutans* ATCC UA 159 em placas de poliestireno.
- Analisar o efeito dos óleos essenciais de *Croton zehntineri* variedades anetol, estragol e eugenol e seus respectivos componentes majoritários anetol, estragol e eugenol sobre a viabilidade celular dos biofilmes monomicrobianos de *Streptococcus mutans* ATCC UA 159 com 24 horas de formação em placas de poliestireno.

Capítulo 15-Objetivos

Parte III

15 OBJETIVOS

15.1 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial de efeito sinérgico de soluções das lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis* e *Canavalia maritima* com o composto diterpeno casbano isolado do *Croton nepetaeapholius* (ConA/DC e CoM/DC) no crescimento bacteriano de *Streptococcus mutans* ATCC UA 159 por meio de técnica de microdiluição.
- Estabelecer a diferença de expressão dos genes *spaP*, *gtfB*, *gpbB*, *Idh* e *brpA* de *Streptococcus mutans* ATCC UA 159 na sua forma planctônica submetido a soluções de ComM, ConA, DC, ConM/DC e NaCl 0,9% através de qRT-PCR.

Capítulo 16-Materiais e Métodos

Parte III

16 PARTE EXPERIMENTAL III

16.1 Preparação das substâncias

Para verificação de possível efeito sinérgico foram selecionadas duas lectinas, ConM e ConA, por suas atividades frente aos micro-organismos orais testados, e o metabólito secundário diterpeno casbano (DC) isolado do extrato etanólico das cascas do caule do *Croton nepetaefolius* (cedido pelo Laboratório de Química Orgânica do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual Vale do Acaraú-UEVA).

As soluções de lectinas foram preparadas em separado em uma concentração de 1 mg/mL e filtradas. A solução contendo DC foi preparada na concentração de 1 mg/mL adicionando-se dimetilsulfóxido (DMSO) a 2% do volume total e da mesma forma filtrada.

Em cabine de segurança biológica, as duas soluções foram unidas perfazendo uma concentração de 500 µg/mL de cada uma, no total duas soluções diferentes para testes de sinergismo, ConA/DC e ConM/DC.

16.2 Cepa bacteriana e condições de cultivo

Foi selecionada a cepa *Streptococcus mutans* UA 159 para realização dos testes de sinergismos por seu bem conhecido envolvimento com o desenvolvimento da doença cárie. O microrganismo foi manipulado de acordo com metodologia descrita no item 8.2.

16.3 Atividade antimicrobiana

Foi realizada metodologia para verificação da inibição do crescimento bacteriano na forma planctônica por meio da metodologia já descrita no item 8.4. Os grupos experimentais testados segundo esta metodologia foram: ConM/DC 500 µg/mL e ConA/DC 500 µg/mL, além dos grupos utilizados como controle, NaCl 0,9% e clorexidina 0,05%.

16.4 Preparação bacteriana para extração de RNA

A cepa bacteriana foi manipulada inicialmente como no item 8.2 e em seguida realizadas três lavagens com NaCl 0,9% (5000 g, 4 °C, 5 minutos) e ajustada em espectrofotômetro para uma concentração de 2×10^8 UFC/mL. Em seguida, colocou-se 5 mL de solução dos diferentes grupos experimentais (ConM, ConA, DC, ConM/DC) ou controle

(NaCl 0,9%) juntamente com 5 mL da bactéria ajustada incubados em estufa 37 °C, CO₂ 10% por 1 hora.

Para obtenção de cultura bacteriana após submissão aos diferentes tratamentos, de cada um dos tubos incubados retirou-se uma alíquota de 300 µL e inoculou-se em 30 mL de BHI caldo sendo este incubado nas mesmas condições descritas acima. Foi realizado monitoramento do crescimento bacteriano através de leituras da absorbância a 620 nm até a obtenção de leitura em torno de 0,4 e 0,5 unidades de absorbância (ua), leitura correspondente ao início da fase logarítmica, onde se obteve RNA de melhor qualidade.

16.5 Extração de RNA total e síntese do cDNA

A extração de RNA total foi realizada utilizando água, reagentes e plásticos *RNAse-free*. Após estabelecimento da absorbância adequada relativa ao início da fase logarítmica, os tubos com 30 mL de BHI caldo inoculados foram centrifugados a 6000 g por 10 minutos a 4 °C e os *pellets* resuspendidos com 1mL do tampão Tris-EDTA Lisozima (Tris 100mM, EDTA 2mM, pH 8,0, Lisozima 15 mg/mL). Em seguida a suspensão foi transferida para tubos de 2 mL e incubados por 30 minutos em banho-maria a 37 °C.

Novamente então centrifugados a 6000 g por 5 minutos a 4 °C, descartado o sobrenadante e adicionado 1mL de reagente TRIZOL[®] aos tubos e homogeneizado com movimentos de *up-down* e por inversão. Para maximizar a ação do reagente e evitar a degradação do RNA, incubou-se em gelo por 5 minutos, seguindo-se a adição de 200 µL de clorofórmio resfriado e misturou-se vigorosamente por 15 segundos seguidos por incubação com gelo por 2-3 minutos. Efetuou-se centrifugação a 12000 g por 15 minutos a 4 °C, havendo então a separação em uma fase vermelha inferior (fase orgânica), uma fase fenol-clorofórmio (interfase) e uma fase incolor aquosa superior contendo o RNA. Realizou-se a transferência da fase incolor para novos tubos e adicionou-se 500 µL de isopropanol resfriado para precipitar o RNA e desidratar o DNA, incubando em gelo por 10 minutos.

Após centrifugação a 15000 g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resuspendido com 1mL de etanol 75% resfriado (com água DEPC-livre de DNase e RNase) seguido por nova centrifugação a 7000 g por 5 minutos a 4 °C, descartando o sobrenadante e deixando secar em gelo na capela de exaustão.

Foi realizada a ressuspensão do *pellet* de RNA total com 30 µL de água DEPC usando pipeta automática. A determinação da concentração e pureza das amostras de RNA total foi realizada através da leitura em espectrofotômetro. O material foi considerado puro

quando a razão entre as leituras $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ foi igual ou superior a 1,7. A integridade das amostras de RNA foi determinada através da separação eletroforética de 8 μL de cada amostra em géis desnaturantes de agarose a 1,2% (com 1,8% de formaldeído) contendo 0,15 $\mu\text{g/mL}$ de brometo de etídio, em tampão de corrida (20 mM MOPS, 5 mM acetato de sódio e 1 mM EDTA). As imagens digitais dos géis foram obtidas sob luz UV. A presença das duas bandas definidas, correspondentes aos RNAs ribossômicos (23S e 16S) indicou integridade das amostras.

Para obter RNA total livre de resíduos de DNA o mesmo foi tratado com DNase (Invitrogen[®]) de acordo com as recomendações do fabricante (RITZ *et al.*, 2009). A síntese do DNA complementar, cDNA, foi realizada utilizando a enzima de transcrição reversa SuperScript[®] Reverse Transcriptase - Invitrogen, e como iniciadores os *Random Hexamers Primers* - Quiagen[®]. A reação foi realizada segundo recomendações do fabricante.

Todos os procedimentos para obtenção das bactérias para extração de RNA foram realizados em triplicata.

16.6 qRT-PCR e análise da expressão relativa

As análises quantitativas da expressão dos genes foram realizadas através de PCR (*Polimerase chain reaction*) em Tempo Real (qRT-PCR). Para tanto, utilizou-se 300 ng do cDNA de cada amostra na reação de qRT-PCR. Além dos ácidos nucleicos, a reação foi composta de iniciadores específicos para os genes, previamente otimizados, e 10 μL de 2x Power SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems[®]), com volume final de 20 μL . Realizou-se a reação de amplificação através de 40 ciclos térmicos de 95 °C por cinco segundos, 55 °C por cinco segundos e 68°C por 20 segundos. A desnaturação inicial foi feita a 95 °C por cinco minutos.

A escolha dos *primers* utilizados no estudo foi feita baseado em artigo de Wen e colaboradores (2010) (Quadro 4). Para as análises da expressão dos genes selecionados foram monitorados os níveis de expressão de um gene não afetado pela condição analisada (controle endógeno). Tal controle endógeno utilizado foi: Burk16S-F/R correspondente ao gene 16S ribossomal de *Burkholderia* (gênero bacteriano). Foi realizado monitoramento em tempo real da PCR através de um termociclador RealPlex 4S (Eppendorf[®]) pela detecção dos níveis de fluorescência do 2x Power SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems[®]). Todas as reações, tanto dos genes alvo quanto do controle endógeno, foram realizadas em quadruplicatas. As análises dos dados de fluorescência obtidos foram realizadas pelo Realplex Software[®]. Os *Cycle threshold* (*Cts*) utilizados para as análises corresponderam à média aritmética entre as quadruplicatas dos genes-alvo e controle endógeno. A obtenção da expressão relativa foi feita pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ como descrito anteriormente por Livak e Schmittgen em 2001.

Quadro 4 – Lista de *Primers* usados para qRT-PCR, suas seqüências de DNAe amplicon.

<i>Primer</i>	Sequencia de DNA (5'-3')	<i>Amplicon</i>
spaP-Fw	TCCGCTTATACAGGTCAAGTTG	121 pb
spaP-Rv	GAGAAGCTACTGATAGAAGGGC	
gtfB-Fw	AGCAATGCAGCCATCTACAAAT	98 pb
gtfB-Rv	ACGAACTTTGCCGTTATTGTCA	
gbpB-Fw	CGTGTTTCGGCTATTCGTGAAG	108 pb
gbpB-Rv	TGCTGCTTGATTTTCTTGTTGC	
brpA-Fw	CGTGAGGTCATCAGCAAGGTC	148 pb
brpA-Rv	CGCTGTACCCCAAAGTTTAGG	
ldh-Fw	TTGGCGACGCTCTTGATCTTAG	92 pb
ldh-Rv	GTCAGCATCCGCACAGTCTTC	
<i>Burk16S-Fw</i>	TCCAGCAATGCCGCGTGTGT	101 pb
<i>Burk 16S-Rv</i>	CGGTACCGTCATCCGCCACG	

16.7 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e reproduzidos pelo menos três vezes em separado. Diferenças na expressão relativa entre os grupos experimentais e o grupo controle sem tratamento foram analisadas por meio da aplicação do teste One-way ANOVA com Tukey pós teste para comparação entre múltiplas médias, executados com o auxílio do programa GraphPad Prism[®], San Diego California-USA. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

Capítulo 17-Resultados e Discussão

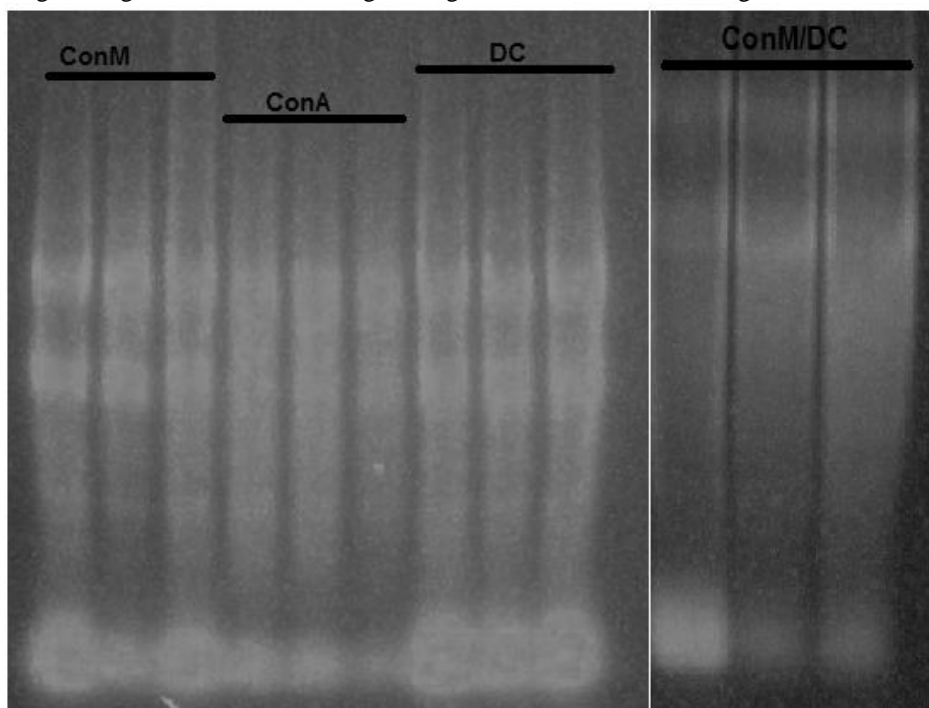
Parte III

17 RESULTADOS E DISCUSSÃO-PARTE III

Foram realizados testes para verificação de possível ação combinada ou sinergismo de substâncias extraídas de plantas. Estas substâncias, lectinas e um diterpeno, apresentam naturezas químicas diferentes e foram previamente testadas e suas atividades antimicrobianas isoladas devidamente comprovadas (CAVALCANTE *et al.*, 2011; SÁ *et al.*, 2011).

Após a realização dos procedimentos para extração do RNA total das culturas bacterianas, foi realizada eletroforese em gel de agarose para observação da integridade do RNA obtido (Figura 25).

Figura 25 - Imagem de gel de eletroforese em gel de agarose demonstrando a integridade do RNA obtido.



São apresentados ainda os dados de otimização da concentração dos *primers* utilizados na tabela 3.

Tabela 3 – Lista dos *primers* sua respectivas concentração após realização de testes de otimização da metodologia de qRT-PCR.

<i>Primer</i>	Concentração otimizada Fw/Rv (nmolar)
spaP	900/100
gtfB	300/900
gbpB	100/900
Brpa	100/900
Ldh	300/900
<i>Burk</i> 16S	300/900

Para as lectinas usadas nestes testes, ConA e ConM, foi verificado que cada uma individualmente apresentava efeito diferente sobre o *S. mutans*; a primeira efeito estimulatório de crescimento e a segunda efeito inibitório, ambos estatisticamente significativos comparado ao controle ($p < 0,01$), como mostrado nos resultados e discussão da parte experimental I. O diterpeno casbano (DC) apresentou atividade inibitória frente ao *S. mutans* demonstrada por SÁ e colaboradores (2011). Desta forma, os possíveis efeitos da combinação destas substâncias frente à bactéria em questão foram observados através de ensaios de verificação da ação antimicrobiana em placas de poliestireno por método de microdiluição e em seguida estudados por verificação da expressão de alguns genes relacionados a formação de biofilmes através de qRT-PCR.

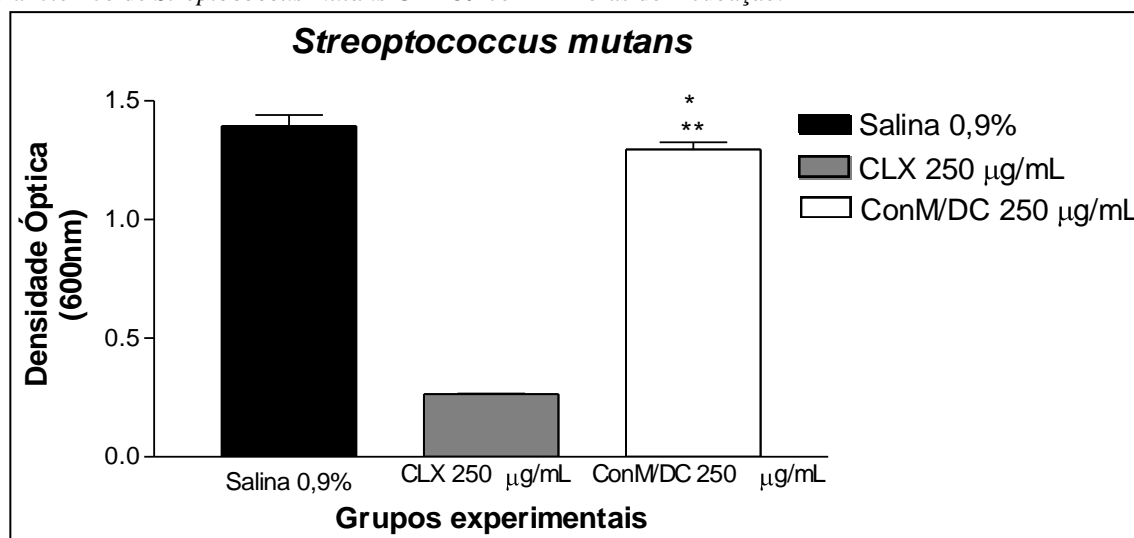
Estas metodologias foram desenvolvidas com a bactéria na sua forma planctônica na tentativa de prever as possíveis alterações na expressão gênica em estágio anterior ao início da formação do biofilme, pois, na presença das substâncias, poderia haver mudanças na expressão gênica alterando a rota metabólica bacteriana de tal forma que não houvesse a formação dos agregados bacterianos culminando em uma comunidade bacteriana madura passível de expressar genes de virulência capazes de promover a instalação da doença cárie.

As soluções foram colocadas em contato com a bactéria e tiveram suas concentrações em teste variando de 250 $\mu\text{g/mL}$ a 15 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados mais significativos para as duas soluções-teste (ConA/DC e ConM/DC) foram na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, e por isso foram analisados estatisticamente e apresentados em gráficos (Figuras 26 e 27). A figura 26 mostra que o grupo teste, ConM/DC apresentou capacidade de inibir o crescimento bacteriano comparado ao controle do crescimento normal ($p < 0,01$), mas, também apresentou efetividade diferente, inferior, à clorexidina. Quando foram realizados testes da ConM

sozinha esta lectina apresentou capacidade inibitória semelhante a ConM/DC, mostrando ter havido, neste teste, apenas atividade combinada ou mesmo indiferente, já que a presença do DC parece não ter potencializado a ação da lectina. No caso do teste com ConA/DC, não houve diferença entre o grupo teste (ConA/DC) e o controle de crescimento normal, mostrando que o efeito estimulatório desta lectina foi anulado pela presença do DC, assim, possivelmente estas substâncias apresentam efeitos antagônicos, o que se poderia supor por seus efeitos em separado (Figura 26 e 27).

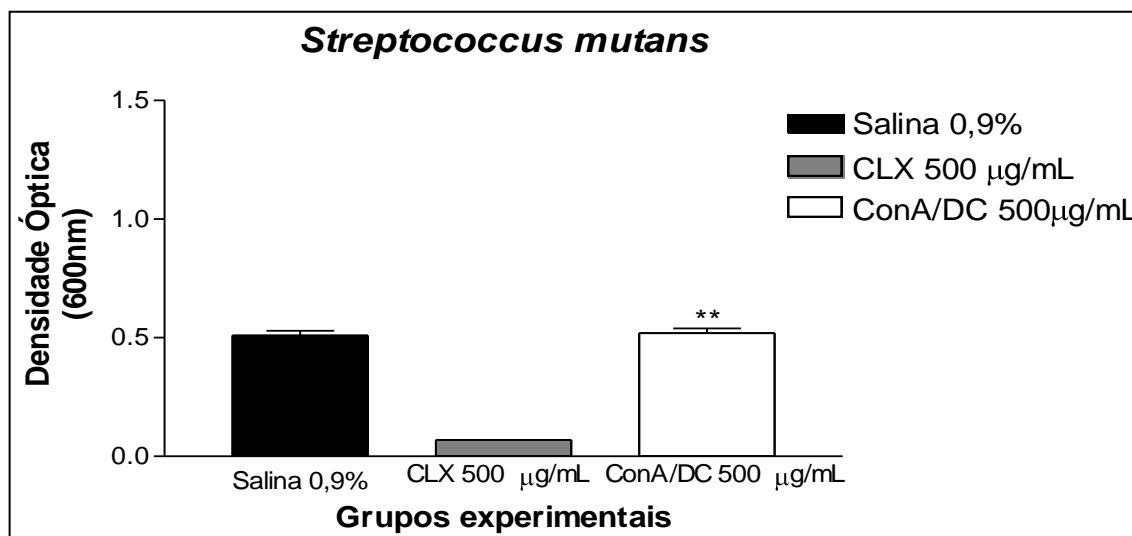
Os resultados exibidos na parte experimental 1 relativos à atividade antimicrobiana e antibiofilme das lectinas ConA e ConM demonstraram o seguinte: 1) a lectina ConA apresentou efeito estimulatório frente ao *S. mutans* na sua forma planctônica, mas, sua ação inibitória da formação de biofilme na concentração de 100 µg/mL; esta ação possivelmente pode ser atribuída à inibição de sítios de ligação bacteriana na película de saliva, sem uma ação direta sobre a bactéria em questão; 2) já a inibição do crescimento planctônico e da formação de biofilme de *S. mutans* atribuídos à ConM, após análise dos resultados de qRT-PCR, podem ser atribuídos à capacidade desta lectina em inibir alguns genes relacionados à virulência e capacidade de formação de biofilmes desta bactéria.

Figura 26 - Gráfico da avaliação do potencial antimicrobiano de ConM/DC 250 µg/mL sobre o crescimento planctônico de *Streptococcus mutans* UA 159 com 24 horas de incubação.



*p < 0,01 diferença estatisticamente significativa em relação à NaCl 0,9% e **p < 0,01 diferença estatisticamente significativa em relação à clorexidina 250 µg/mL.

Figura 27 - Gráfico da avaliação do potencial antimicrobiano de ConA/DC 250 µg/mL sobre o crescimento planctônico de *Streptococcus mutans* UA 159 com 24 horas de incubação.



* $p < 0,01$ diferença estatisticamente significativa em relação a NaCl 0,9% e ** $p < 0,01$ diferença estatisticamente significativa em relação à clorexidina 250 µg/mL.

Compostos antimicrobianos de origem natural têm demonstrado diferentes mecanismos de ação (GREENBERG *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2011). Os diterpenos são uma importante classe na busca por novos agentes antimicrobianos (SOUZA *et al.*, 2011), mas os mecanismos envolvidos na sua atividade antimicrobiana ainda não são bem conhecidos. Matsingou e colaboradores (2005) sugeriram sua possível ação através de danos à membrana celular.

Carneiro *et al.* (2011) relacionaram a atividade antimicrobiana de DC contra bactérias Gram-positivas às características químicas de hidrofobicidade e polaridade destas moléculas, capazes de interagir não especificamente com a membrana fosfolipídica, desestabilizando ligações não covalentes entre os ácidos graxos da bicamada lipídica e, assim, interferindo no desenvolvimento celular.

Recentemente, Urzúa *et al.* (2008) demonstraram que um sistema de anéis lipofílicos decalina vinculados a um grupo doador de hidrogênio (*hydrogen binding donor* - HBD; grupo hidrófilo) estrategicamente posicionado é muito importante para atividade antimicrobiana apresentada por diterpenos. Além disso, Porto *et al.* (2009) relatam que diterpenos do tipo pimaranos possuem uma potente atividade, atribuindo a sua estrutura a capacidade de interagir com as bactérias e destacaram ainda a importância de avaliar as outras

classes de diterpenos, assim como seus derivados semi-sintéticos, pois estes estudos podem ajudar a determinar seu potencial como agentes antimicrobianos.

As lectinas possuem ação antes atestada (TEIXEIRA *et al.*, 2006) em bloquear moléculas receptoras na película adquirida do esmalte, *in vitro*, interferindo com a adesão de colonizadores iniciais da superfície dental, o que poderia evitar o desenvolvimento dos biofilmes cariogênicos. Além disso, possuem ação antimicrobiana e antibiofilme frente ao *Streptococcus mutans* (CAVALCANTE *et al.*, 2011).

Pelo acima exposto, objetivou-se aferir o potencial que estas duas substâncias com atividades antimicrobianas bem referenciadas na literatura poderiam apresentar em agir de forma combinada ou sinérgica.

Sabe-se que outros tipos de metodologias seriam mais apropriados para observações de possíveis efeitos sinérgicos como, por exemplo, ensaios com elaboração de curva de tempo de morte ou verificação da concentração inibitória mínima com variações cruzadas nas doses de cada substância. O presente referencial experimental trata-se de um estudo preliminar para observação de possíveis efeitos promissores, assim, em seguida foram realizados tratamentos de culturas bacterianas para verificação de alterações na expressão de alguns genes relacionados à formação de biofilmes. Através destes testes iniciais as substâncias foram selecionadas para realização de ensaios de qRT-PCR.

Ao comparar os valores da expressão relativa entre os grupos ConM e ConM/DC em separado em relação ao controle (NaCl 0,9%) e comparando entre si, pode-se perceber algumas diferenças quantitativas no nível de expressão gênica. Com relação ao *gtfB*, o grupo tratado com ConM exibiu uma expressão gênica 7,7 vezes menor que o controle e o tratado com ConM/DC 2,6 vezes menor. Já comparando os grupos com relação à *ldh* e *spaP*, observou-se que ConM/DC levou a expressão 13 vezes menor para ambos os genes e ConM 8,5 e 4,2 vezes menor, respectivamente, comparado ao controle. Bactérias tratadas com ConM/DC tiveram expressão 18 vezes menor do gene *gbpB* e 9 vezes menor do gene *brpA*; para estes mesmos genes ConM levou a uma diminuição de 7,7 e 9,5 vezes comparado ao controle para os respectivos genes.

Streptococcus mutans pode desenvolver múltiplos mecanismos para colonizar a superfície dental e, sob certas condições, torna-se uma espécie numericamente significativa em biofilmes cariogênicos (BURNE, 1998). A adesina multi-funcional SpaP, também denominada P1 e PAc1, é o primeiro fator mediador na ligação precoce do *S. mutans* ao esmalte dental quando não se tem a presença de sacarose no meio (BOWEN *et al.*, 1991). três glicosiltransferases (*GtfB*, *GtfC* e *GtfD*), põem ser produzidas por *S. mutans* as quais levam a

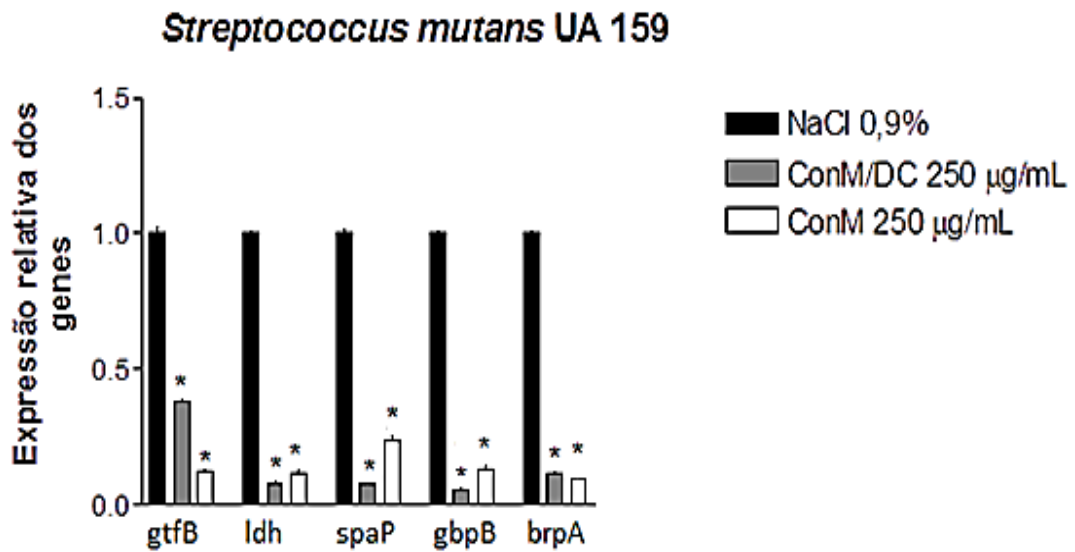
polimerização de motivos glicosil derivados da quebra da sacarose e amido (BURNE, 1998; BANAS; VICKERMAN, 2003). A ação de proteínas ligadoras de glucanas (GbpA, GbpB, GbpC e GbpD) e das Gtfs facilitam a adesão bacteriana às superfícies dentais, adesão interbacteriana e acúmulo das bactérias em biofilmes (BANAS; VICKERMAN, 2003; BANAS, 2004). Gtf B, C e D e GbpA, B, C e D, juntos com os glucanos extracelulares, constituem a rota para o *S. mutans* estabelecer-se na superfície dental na presença de sacarose e são de importância primordial na formação da placa e desenvolvimento da doença cárie (BURNE, 1998; BANAS; VICKERMAN, 2003; BANAS, 2004; HAZLETT; MAZURKIEWICZ; BANAS, 1999; HAZLETT; MICHALEK; BANAS, 1998; OOSHIMA *et al.*, 2001; TSUMORI; KURAMITSU, 1997).

Múltiplas redes regulatórias que integram sinais externos, incluindo o sistema Com-dependente de densidade celular e outros dois sistemas regulatórios componentes, incluindo CiaHR, LiaSR e VicRK, com CiaH, LiaS e VicK sendo as quinases sensoras e CiaR, LiaR e VicR os reguladores de resposta dos sistemas de dois componentes, são necessários para formação de biofilmes (LI *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2002a; LI *et al.*, 2002b; WEN; BURNE, 2004; QI *et al.*, 2004; AHN; WEN; BURNE, 2006; SUNTHARALINGAM *et al.*, 2009). Adicionalmente, um número de outros produtos gênicos, tais como BrpA (uma proteína regulatória do biofilme associada à superfície celular), demonstrou um papel crítico na resposta a estresses ambientais e desenvolvimento do biofilme de *S. mutans* (WEN; BURNE, 2002; WEN; BAKER; BURNE, 2006).

Para todos os genes estudados foi demonstrado que a cultura bacteriana planctônica tratada com ConM 250µg/mL apresentou uma redução estatisticamente significativa comparada ao controle de crescimento normal na expressão dos genes em estudo ($p < 0,01$), e que a presença do DC juntamente com a lectina em questão potencializou o seu efeito, embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa quando comparou-se o grupo tratado com ConM 250µg/mL àquele tratado com ConM/DC 250µg/mL, sendo este último tão efetivo quanto o primeiro ($p > 0,05$) (Figura 28).

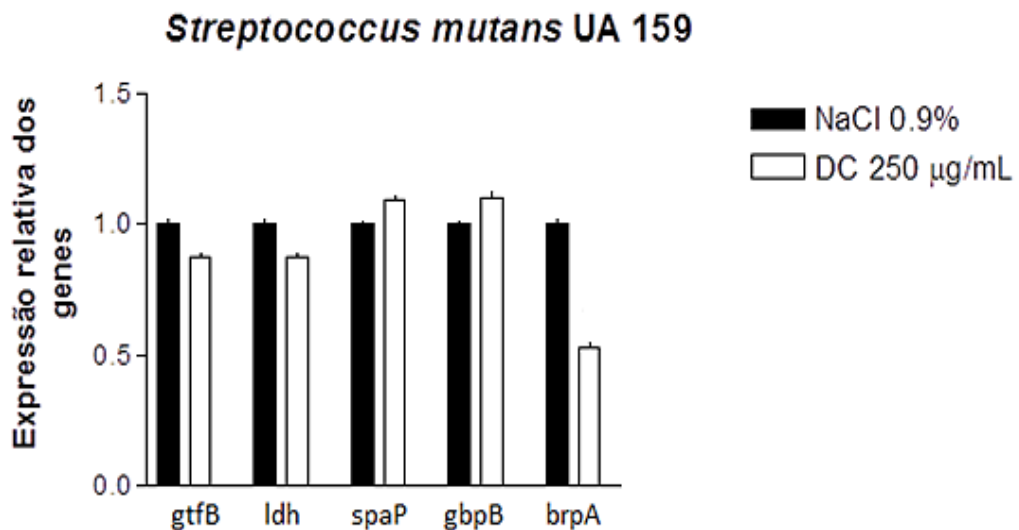
Para confirmar o efeito do DC exatamente sobre os genes em questão foi realizada tratamento de cultura de *S. mutans* com apenas DC e foi verificado que esta substância não apresentou efeito sobre estes genes ($p > 0,05$) quando comparado ao controle de crescimento normal (Figura 29).

Figura 28 - Gráfico da expressão relativa dos genes de virulência de *S. mutans* UA 159 submetido a ConM 250 µg/mL e ConM/DC 250 µg/mL comparado ao controle NaCl 0,9%.



Legenda: *p<0,01 comparado ao controle NaCl 0,9%.

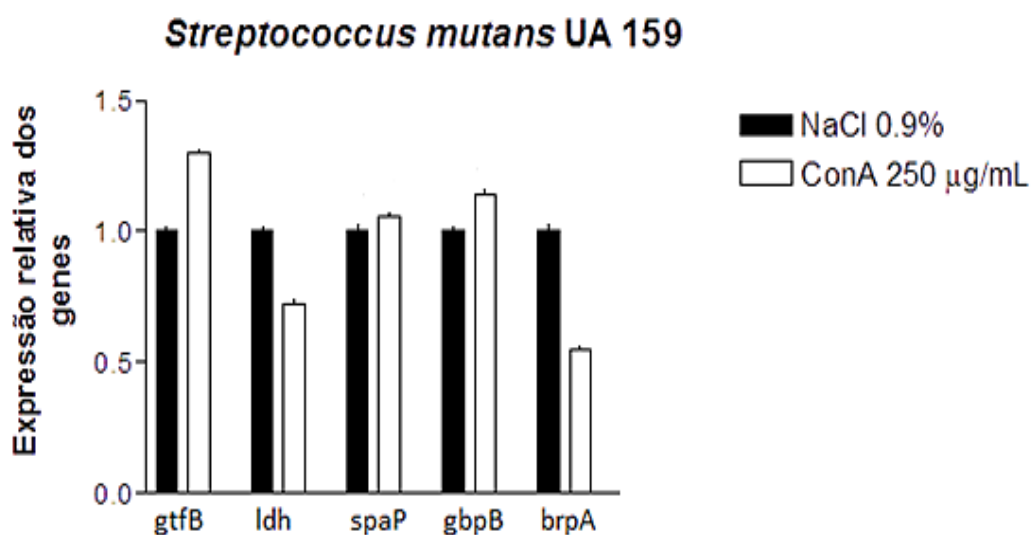
Figura 29 - Gráfico da expressão relativa dos genes de virulência de *S. mutans* UA 159 submetido a DC 250 µg/mL comparado ao controle NaCl 0,9%.



Foi avaliada ainda a expressão dos genes em estudo sob o efeito da lectina ConA, que apresentou efeito estimulatório do crescimento planctônico de *S. mutans* em metodologia realizada através de microdiluição em placas de poliestireno. Foi verificado que ConA não

apresentou efeito sobre a expressão dos genes estatisticamente diferente do controle ($p > 0,05$) (Figura 30).

Figura 30 - Gráfico da expressão relativa dos genes de virulência de *S. mutans* UA 159 submetido a ConA 250 $\mu\text{g/mL}$ comparado ao controle NaCl 0,9%.



Estes resultados destacam a capacidade, antes comprovada por Cavalcante e colaboradores (2011), de ConM em inibir o crescimento planctônico e a formação de biofilmes de *S. mutans* em poliestireno. Mais ainda, destaca sua capacidade de atuar sobre genes de virulência bastante significativos para a capacidade desta bactéria em levar ao desenvolvimento de doenças.

O mecanismo exato de ação da ConM sobre *S. mutans* precisa ainda ser mais bem estudado, embora, possa-se entender que possivelmente estas moléculas desencadeiam ou interrompem vias de sinalização intracelulares que culminam com a menor expressão destes genes. Assim, análises de qRT-PCR mostraram que a expressão de fatores de virulência de *S. mutans* podem ser alterados em resposta a presença de ConM no meio de crescimento. Esforços em direcionar pesquisas futuras que investiguem os mecanismos que levam a alterações na expressão de genes selecionados e o impacto destas alterações sobre a formação de biofilmes podem ser realizados.

Capítulo 18-Conclusões
Parte III

18 CONCLUSÕES: PARTE III

- Avaliar o potencial de efeito sinérgico de soluções das lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis* e *Canavalia maritima* com o composto diterpeno casbano isolado do *Croton nepetaeapholius* (ConA/DC e CoM/DC) no crescimento bacteriano de *Streptococcus mutans* ATCC UA 159 por meio de técnica de microdiluição.
- Estabelecer a diferença de expressão dos genes *spaP*, *gtfB*, *gbpB*, *Idh* e *brpA* de *Streptococcus mutans* ATCC UA 159 na sua forma planctônica submetido a soluções de ComM, ConA, DC, ConM/DC e NaCl 0,9% através de qRT-PCR.

Capítulo 19-Considerações finais

19 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentro dos limites das metodologias realizadas no presente trabalho e dentro dos objetivos definidos anteriormente pode-se concluir que:

- Lectinas de plantas do gênero *Canavalia* podem ser utilizadas em ensaios de toxicidade para posterior aplicação clínica no tratamento de pacientes com alto risco à cárie, podendo estas moléculas interferir no fator micro-organismo envolvido no desenvolvimento da doença.
- Óleos essenciais extraídos de quimiotipos de *Croton zehntneri* podem ser utilizados para ensaios pré-clínicos para desenvolvimento de adjuvantes na terapia anti-biofilme apresentando efeito semelhante ou melhor que seus componentes majoritários, devendo ser levada em consideração seu efeito sinérgico de múltiplos alvos na célula bacteriana.
- Novos estudos na tentativa de observar os mecanismos de ação das lectinas podem ser desenvolvidos no sentido de complementar as informações obtidas a respeito do nível de expressão gênica relacionada à formação de biofilmes e a que ponto, clinicamente, esses achados são relevantes para uso na prevenção à cárie e/ou possível tratamento da doença, além de melhor entender sua atividade em conjunto com diterpeno casbano como possível agente de ação combinada para uso clínico.

Capítulo 20-Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS

- AAS, J.A. *et al.* Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43(11), p. 5721–5732, 2005.
- AAS, J.A.; *et al.* Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p.1407–1417, 2008.
- ABDON, A.P.V. *et al.* Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v. 35(10), p. 1215-1219, 2002.
- ABEE, T *et al.* Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 172–179, 2011.
- ABURJAL, T. *et al.* Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 39-44, 2001.
- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2001.
- 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, p.114-140, 2007.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D. *et al.* Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 472-508, 2008.
- ALENCAR, N. M. N. *et al.* Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p. 919–922, jul. 2005.
- ALMEIDA, J.R.G.S. *et al.* Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* Kunt. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16 (Supl.), p. 638-64, 2006.
- ALVIANO, W.S., *et al.*. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, p. 101-105, 2005.
- AMBROSIO, S. R. *et al.* Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Vigueira* species inhibit vascular smooth muscle contractility. **Life Science**, v. 79, p. 925 – 933, 2008.
- ANDERSON, G.G.; O'TOOLE, G. A. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. **Bacterial Biofilms**, Springer, Heidelberg: Ed Romeo T. v. 322, p. 85–105, 2008.
- ANGÉLICO, E. C. Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *Croton heliotropifolius* Kunt e *Croton blanchetianus* Baill. 2011. 87f. Dissertação (Mestrado em

Zootecnia)- Centro de saúde e tecnologia rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2011.

AOKI H. *et al.* Cloning of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. **Infection and Immunity**, v. 53, p. 587-594, 1986.

APARNA, M. S. Pt, B.D.; YADAV, S. Biofilms: Microbes and Disease. **Journal of Infectious Diseases**, v.12, n. 6, p. 526-530, 2008.

AQIL, F. *et al.* Effect of certain bioactive plant extracts on clinical isolates of β -lactamase producing methicilin resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, p. 106-114, 2005.

BAEHNI, P.C.; TAKEUCHI, Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. **Oral Diseases**, v. 9 (Suppl) 1, p. 23–29, 2003.

BALLS, A.K.; HALE, W.S.; HARRIS, T.H. A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. **Cereal Chemistry**, v. 19, p. 279-288, 1942.

BANAS, J. A.; RUSSELL, R. R.; FERRETTI, J. J. Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* Ingbritt. **Infection and Immunity**, v. 5, p. 667–673, 1990.

BANAS, J.A.; VICKERMAN, M.M. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.**, v. 14, p. 89–99, 2003.

BATATINHA, M. J. M.; SOUZA-SPINOSA, H.; BERNARDI, M.M. *Croton zehntneri*: possible central nervous system effects of the essencial oil in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, p. 53-57, 1995.

BATONI, G. *et al.* Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. **Current Medicinal Chemistry**, v.18, p. 256-279, 2011.

BECKER, M.R. *et al.* Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1001–1009, 2002.

BEECH, I. B.; SUNNER, J. A. HIRAOKA, K. Microbe–surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. **International Microbiology**, v. 8, p.157-168, 2005.

BELLI, W.A.; MARQUIS, R.E. Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57(4), p. 1134–1138, 1991.

BERTUCCI, A. *et al.* Initial antimicrobial activity studies of plants of the riverside forests of the southern Uruguay River. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.1A, p.20-25, 2009.

BEZERRA, E. H. S. Análise estrutural do domínio de reconhecimento à carboidrato da lectina de *Canavalia brasiliensis* e sua relação na indução da produção de óxido nítrico (Mestrado

em Bioquímica)-Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

BEZERRA, G.A. *et al.* Structural analysis of *Canavalia maritima* and *Canavalia gladiata* lectins complexed with different dimannosides: New insights into the understanding of the structure-biological activity relationship in legume lectins. **Journal of Structural Biology**, v. 160, p. 168-176, 2007.

BJARNSHOLT, T. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is *quorum-sensing* dependent. **Microbiology**, n. 151, p. 373–383, 2005.

BJARNSHOLT, T.; *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. **Pediatric Pulmonology**, v.44, p. 547–558, 2009.

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

BORDI, C.; BENTZMANN, S. Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. **Annals of Intensive Care**, v. 19, p. 1-8, 2011.

BOWEN, W.H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans* - Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms **Caries Research**, v. 45, p.69–86, 2011.

BRADING, M.G.; MARSH, P.D. The oral environment: the challenge for antimicrobials in oral care products. **International Dental Journal**, v. 53, p. 353–62, 2003.

BRASIL, D. S. B. *et al.* Essential oil composition of *Croton palanostigma* klotzsch from north Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1188-1192, 2009.

BURNE, R.A. Oral *streptococci* products of their environment. **Journal of Dental Research**, v. 77, p. 445–452, 1998 .

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

BURTON, E. *et al.* Microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 1-4, 2007.

BUTANY, J. *et al.* Prosthetic heart valves with silver-coated sewing cuff fabric: early morphological features in two patients. **The Canadian Journal of Cardiology**., v. 18, p. 733–738, mar. 2002.

BYERS, H.L. *et al.* N-acetylneuraminic acid transport by *Streptococcus oralis* strain AR3. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, p. 375-381, 1999.

CAGLAR, E.; KARGUL, B.; TANBOGA, I. Bacteriotherapy and probiotics' role on oral health. **Oral Disease**., v. 11, p. 131-137, 2005.

CALDERON, A.M.; BUCK, G.; DOYLE, R.J. Lectin-microorganism Complexes. In **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**; van Driessche, E., Beckmans, S., Bog-Hanse, T.C., Eds.; TEXTOP: Hellerup, Denmark, 1997; Volume 12, ISBN number 87-984583-0-2.

CALVETE, J.J. *et al.* Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1430, p. 367-375, jan. 1999.

CAMILLI, A.; BASSLER, B.L. Bacterial small-molecule signaling pathways. **Science**, v. 311, p. 1113–1116, 2006.

CAO, X. *et al.* Purification of lectin from larvae of the fly, *Musca domestica*, and in vitro anti-tumor activity in MCF-7 cells. **Journal of Insect Science**, v. 10, p. 164-169, mai. 2010.

CARLSSON, J. A. Numerical taxonomic study of human oral *streptococci*. **Odontology Review.**, v. 19, n. 2, p. 137-160, mar. 1969.

CARLSSON, J. Microbial aspects of frequent intake of products with high sugar concentrations. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 97, p. 110-114, 1989.

CARLSSON, J.; GRAHNEN, H.; JONSSON, G.; WIKNER, S. Establishment of *Streptococcus sanguis* in the mouths of infants. **Archives of Oral Biology**, v. 15, n. 12, p. 1143-1148, 1970.

CARLSSON, J.; KUJALA, U. EDLUND, M.B. Pyruvate dehydrogenase activity in *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, v. 49, n. 3, p. 674-678, 1985.

CARNEIRO, V. A. Efeito de lectinas e diterpeno sobre biofilmes microbianos de interesse médico (Doutorado em Bioquímica)- Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

CARNEIRO, V.A. *et al.* Casbane diterpene as a promising natural agent against biofilm-associated infections. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 190-201, 2010.

CARVALHO, D. T. Síntese de derivados de d-galactose inibidores potenciais de interação lectina-carboidrato. 2008. 237f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

CARVALHO, E. S.. *et al.* Epidemiologia das doenças bucais em indivíduos na faixa etária entre 35 e 44 anos: o cenário epidemiológico do trabalhador. Porto Alegre, v. 58, n.1, p. 109-114, jan./mar. 2010.

CAVADA, B. S. *et al.* Primary structure and functions of plant lectins. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 2, n.5, p. 193-202, 1993.

CAVADA, B.S. *et al.* Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Science**, v. 2, 123-135, 2001.

CAVALCANTE, T. T. A. *et al.* Effect of Lectins from Diocleinae Subtribe against Oral Streptococci. **Molecules**, v. 16, p. 3530-3543, 2011.

CAWSON, R.A.; ODELL, E.W. **Oral Pathology and Oral Medicine**. 7 ed. Elsevier, 2002.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21(1), p. 99-105, 1998.

CHEN, J., ROSSMAN, M. L.; PAWAR, D. M. Attachment of enterohemorrhagic and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. **Journal of Immunology**, v. 135:564, 1985.

CHIA, J.S. *et al.* A 60-kilodalton immunodominant glycoprotein is essential for cell wall integrity and the maintenance of cell shape in *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 6987-6998, 2001.

CHILDERS, N. K. *et al.* A controlled clinical study of the effect of nasal immunization with a *Streptococcus mutans* antigen alone or incorporated into liposomes on induction of immune responses. **Infection and Immunity**. v.67, p. 618-623, 1999.

CHRISPEELS, M.J. *et al.* Characterization of the endoplasmic reticulum-associated precursor of concanavalina A, Partial amino acid sequence and lectin activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 10021-10024, 1986.

CISAR, J. O. *et al.* Lectin recognition of host-like saccharide motifs in streptococcal cell wall polysaccharides. **Glycobiology**, v.5, p. 655-662, 1995.

CLAFFEY, N. Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, p. 22-24, 2003.

COELHO, M. P. G. *et al.*. Antiarthritic effect and subacute toxicological evaluation of *Baccharis genistelloides* aqueous extract. **Toxicology Letters**, v. 154, p. 69-80, 2004.

COELHO-DE-SOUZA, A.N. *et al.* Effects of the essential oil of *Croton zehntneri*, and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 299-304, 1997.

COELHO-DE-SOUZA, A.N.; CRIDDLE, D.N.; LEAL-CARDOSO, J.H. Selective and modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations of the guinea pig. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 189-194, 1998.

COOK, G. M. Cell surface carbohydrates: molecules in search of a function? **Journal of Cell Science**, v. 4, p. 45-70, 1986.

COSTA, M.P. *et al.* Uma revisão das atividades biológicas da trans-desidrocrotonina, um produto natural obtido de *Croton cajucara*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17(2), p. 275-286, 2008.

COSTERTON, J. W. *et al.* Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v.4, n. 1, p. 435-64, 1987.

COSTERTON, J.W. *et al.* Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.

COSTERTON, J.W. Introduction to biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 11, p. 217 – 221, 1999.

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

COSTERTON, W. *et al.* The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. **Journal of Clinical Investigation**. v.112, p.1466–1477, 2003.

COTTAREL, G.; WIERZBOWSKI, J. Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy. **Trends in Biotechnology**, v. 12, p. 547-555, 2007.

COTTER, P.D.; HILL, C. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, p. 429–453, 2003.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-82, 1999.

CRAVEIRO, A. A. *et al.* Fixed and volatile constituents of *Croton aff. nepetifolius*. **Journal of Natural Products**, v. 43, p. 756-757, 1980.

CROSS, S. E. *et al.* Nanomechanical properties of glucans and associated cell-surface adhesion of *Streptococcus mutans* probed by atomic force microscopy under in situ conditions. **Microbiology**, v. 153, p. 3124–3132, 2007.

CURY, J.A.; *et al.* Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Research**, v. 34, p. 491-497, 2000.

CURY, J. A. Controle químico da placa. In: **Promoção de saúde bucal: paradigma, ciência, humanização**. 3. ed. São Paulo: Artes Médicas, p. 141-152, 2003.

DE BOLLE, M.F. *et al.* Antimicrobial properties from *Mirabilis jalapa* and *Amaranthus caudatus*: Expression, processing, localization and biological activity in transgenic tobacco. **Plant Molecular Biology**, v. 31, p. 993-1008, 1996.

DE LORENZO, J. L. Sacarose e cárie dental: importância da utilização da sacarose na cárie dental - II. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 43(1), p.10-12, jan-fev. 1989.

DECKER, E.M.; DIETRICH, I.; KLEIN, C.; VON OHLE, C. Dynamic Production of Soluble Extracellular Polysaccharides by *Streptococcus mutans*. **International Journal of Dentistry**, p. 1-6, 2011.

DELANO, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System; DeLano Scientific: San Carlos, CA, USA, 2002.

DELATORRE, P. *et al.* Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: New structural insights for old molecules. **BMC Structural Biology**, v. 7, p. 52, 2007.

DEVI, M. R.; MANOHARAN, A. Phytochemical Investigation of *Erythrina variegata* and *Ficus racemosa* leaves. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.**, v.3(6), p.166-172, 2011.

DEWHIRST, F. E. *et al.* The Human Oral Microbiome. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 19, p. 5002–5017, Oct. 2010.

DO, T.; JOLLEY, K.A.; MAIDEN, M.C.J.; *et al.* Population structure of *Streptococcus oralis*. **Microbiology**, v. 155, p. 2593-2602, 2009.

DOBRINDT, U.; HACKER, J. Wole genome plasticity in pathogenic bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, p. 550-557, 2001.

DOERN, C.D.; BURNHAM, C. D. It's not easy being green: the viridans group *streptococci*, with a focus on pediatric clinical manifestations. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 11, p. 3829–3835 nov. 2010.

DONLAN, R. M. Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.322, p. 133-161, 2008.

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

DORMAN, H. J.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.

DOURADO, R. C. M.; SILVEIRA, E. R. Preliminary investigation on the volatile constituents of *Croton sonderianus* Muell. Arg.: habitat, plant part and harvest time variation. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, p. 36-40, 2005.

DUNNE, W.M. Jr. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 155–166, 2002.

EDRIES, A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 308–323, 2007.

EDWARDSSON, S. Characteristics of caries-inducing human streptococci resembling *S. mutans*. **Archives of Oral Biology.**, v. 13, n. 6, p. 637-646, june. 1968.

EISENBERG, D. M. *et al.* Trends in alternative medicine use in United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. **Journal of the American Medical Association**, v. 280, p. 1569-1575, 1998.

CHEN, J., ROSSMANB, M.L., PAWARA, D.M. Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. **LWT-Food Science and Technology**, v.40, p. 249-254, 2007.

ETZLER, M. E. Distribution and function of plant lectins. In LIENER, I.E., SHARON, N., GOLDSTEIN, I.J. **The Lectins. Properties, Function, and Applications in Biology and Medicine**. Eds. Academic Press: Orlando, FL, USA, pp. 371-435, 1986.

FEJERSKOV, O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 25: p. 5–12, 1997.

FEJERSKOV, O.; KIDD, EAM: **Dental Caries**. The Disease and its Clinical Management. Oxford: Ed. Blackwell Munksgaard, 2003.

FENNELL, C. W. *et al.* Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 205-217, nov. 2004.

FILHO, V. C. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no niqfar/univali. **Química nova**, v. 23(5), 2000.

FIRON, N.; OFEK, I.; SHARON, N. Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Salmonella typhimurium*. **Carbohydrate Research**, v. 120, p. 235–249, 1983.

FITZGERALD, R.J., JORDAN, H.V., ARCHARD, H.O. Dental caries in gnotobiotic rats infected with a variety of *Lactobacillus acidophilus*. **Archives of Oral Biology**, v. 11, Issue 5, p. 473-476, may, 1966.

FITZGERALD, R.J.; KEYES, P.H. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. **Journal of American Dental Association**, v. 61, p. 9-19, 1960.

FLINT, S. H.; BREMER, P. J.; BROOKS, J. D. Biofilms in dairy manufacturing plant - description, current concerns and methods of control. **Biofouling**, n. 11, p. 81–97, 1997.

FONTENELLE, R. O. S. *et al.* Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 5, p.1383-1390, 2008.

FOZO, E.M.; KAJFASZ, J.K.; QUIVEY, R.G. Jr. Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 238(2), p. 291–295, 2004.

FOZO, E.M.; QUIVEY, R.G. Jr. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70(2), p. 929–936, 2004.

FRANK, J. F.; EHLERS, J.; WICKER, L. Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing agents under static conditions. **Food Protection Trends**, v.23, p.654-663, 2003.

FUKUSHIMA, K.; IKEDA, T.; KURAMITSU, H. K. Expression of *Streptococcus mutans* *gtf* genes in *Streptococcus milleri*. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 7, p. 2815–2822, 1992.

FUX, C.A. *et al.* Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v.1, p. 667– 683, 2003.

GADELHA, C.A.A. *et al.* Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **Journal of Structural Biology**, v. 152, p. 185-194, 2005.

GERTSCH, J. Botanical Drugs, Synergy, and Network Pharmacology : Forth and Back to Intelligent Mixtures. **Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research**, v. 77, p. 1086–1098, 2011.

GIBBONS, R. J. *et al.* Adsorbed salivary proline-rich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces. **Infection and Immunity**, v. 56, p. 2990–2993, 1988.

GIBBONS, R.J. *et al.* Role of cryptic receptors (cryptitopes) in bacterial adhesion to oral surfaces. **Archives of Oral Biology**, v. 35, p. 1075–1145, 1990.

GILL, A.O.; HOLLEY, R.A. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, 1, p. 170–174, sep. 2006.

GIORDANI, R. *et al.* Enhanced antifungal activity of ketaconoale by *Euphorbia characias* latex against *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 1–5, 2001.

GOMES, M. M. *et al.* Recognition of galactose-deficient O-glycans in the hinge region of IgA1 by N-acetylgalactosamine-specific snail lectins: a comparative binding study. **Biochemistry**, v. 49, p. 5671-5682, jul. 2010.

GREENBERG, M.; DODDS, M.; TIAN, M. Naturally occurring phenolic antibacterial compounds show effectiveness against oral bacteria by a quantitative structure-activity relationship study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11151–11156, 2008

GUGGENHEIM, B. *et al.* Validation of an *in vitro* biofilm model of supragingival plaque. **Journal of Dental Research**, v. 80, p. 363 - 370, 2000.

GUPTA, G.; SUROLIA, A.; SAMPATHKUMAR, S. G. Lectin microarrays for HABASH, M.; REID, G. Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections. **Journal of Clinical Pharmacology**., v. 39, p. 887-898, 1999.

HAGAN, E.C. *et al.* *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection. **PLoS Pathogens**, v. 6, 2010.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W., STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p. 95-108, 2004.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Cellular Envolving concepts in biofilm infections. **Microbiology**, v. 11, p. 1034–1043, 2009.

HAMILTON, I.R. Ecological Basis for Dental Caries in Oral Bacterial Ecology: The Molecular Basis; Kuramitsu, H.K., Ellen, R.P., Eds.; Horizon Scientific Press: Norfolk, UK, p. 219-274, 2000.

HAMILTON, I.R.; BUCKLEY, N.D. Adaptation by *Streptococcus mutans* to acid tolerance. **Microbiology and Immunology**, v. 6, p. 65–71, 1991.

HANADA N, KURAMITSU HK. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtfC* gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. **Infective and Immunity**, v. 56, p. 1999-2005, 1988.

HANADA N, KURAMITSU HK. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtfD* gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. **Infection and Immunity**, v. 57, p. 2079-2085, 1989.

HANSEN, S.K. *et al.* Evolution of species interactions in a biofilm community. **Nature**, v. 445, p. 533-536, 2007.

HATT, J. K.; RATHER, P.N. Role of bacterial biofilms in urinary tract infections. In **Bacterial Biofilms**, Springer, Heidelberg, p. 163–192, 2008.

HAY, D.I. The adsorption of salivary proteins by apatite and enamel. **Archive of Oral Biology**, v. 12, p. 937–947, 1967.

HAY, D.I.; GIBBONS, R.J.; SPINELL, D.M. Characteristics of some high molecular weight constituents with bacterial aggregating activity from whole saliva and dental plaque. **Caries Research**, v. 5, p. 111–113, 1971.

HE, X. *et al.* Achieving probiotic effects via modulating oral microbial ecology. **Advances in Dental Research**, v. 21, p. 53-56, 2009.

HELUANI, C.S. *et al.* Three new diterpenoids based on novel sarcopetalene skeleton from *Croton sarcopetalus*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 222-225, 2000.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI A.K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytochemistry**, v.15, p.639–652, 2008.

HEYDORN, A.*et al.* Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. **Microbiology**, v.146, 2000.

HILLMAN, J. D.; CHEN, A.; SNOEP, J. L. Genetic and physiological analysis of the lethal effect of L-lactate dehydrogenase deficiency in *Streptococcus mutans*: complementation by alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 4319–4323, 1996.

HØIBY, N. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, p. 322-332, april. 2010.

HOLANDA, M. L. *et al.* Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1769-1773, 2005.

HOLETZ, F.B.; *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p. 1027-1031, 2002.

HSU, S.D. *et al.* Adhesive properties of viridans group streptococcal species. **Microbial Ecology in Health and Disease**, p. 125-137, 1994.

INUI, T. *et al.* Counter-current chromatography based analysis of synergy in an anti-tuberculosis ethnobotanical. **Journal of Chromatography**, v. 1151, p.21- 215, 2007.

ISLAM, B.; *et al.* Novel effect of plant lectins on the inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on saliva-coated surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1682-1689, 2009.

IWAMI, Y. YAMADA, T. Intracellular flux of glucose metabolism in streptococcal cells by simultaneous monitoring of fluorescence dependent on reduced nicotinamide adenine nucleotide and acid excretion under strictly anaerobic conditions. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 14, p. 220-224, 1999.

JAKIEMIU, E. A. R. Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) 2008. 90f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)- Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

JAKUBOVICS, N,S,; KOLENBRANDER, P.E. The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. **Oral Diseases**, v. 16, p. 729–739, 2010.

JENKINSON, H. F.; LAMONT, R. J. Streptococcal adhesion and colonization. **Critical Review of Oral Biology and Medicine**. v. 8, p. 175–200, 1997.

JENSEN, M.E.; POLANSKY, P.J.; SCHACHTELE, C.F. Plaque sampling and telemetry for monitoring acid production on human buccal tooth surfaces. **Archives of Oral Biology**, v. 27, p. 21–31, 1982.

JENSEN, M.E.; WEFEL, J.S. Human plaque pH responses to meals and the effects of chewing gum. **Brazilian Dental Journal**, v.167, p. 204–208, 1989.

JESAITIS, A.J. *et al.* Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. **Journal of Immunology**, v. 171, p.4329-4339, 2003.

JESSEN, B.; LAMMERT, L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 51, p. 265-269, 2003.

JONES, F.A. Herbs – useful plants. Their role in history and today. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 8, p. 1227–1231, 1996.

JUDD, W.S. *et al.* **Plant Systematics: a Phylogenetic Approach**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1999.

JUNIOR, I. F. S. *et al.* Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 242-248, 2009.

JUVEN, B. J. *et al.* Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Microbiology**, v. 76, p. 626-631, 1994.

KARLSSON, K. Meaning and therapeutic potential of microbial recognition of host glycoconjugates. **Molecular Microbiology**, v. 29 (1), p. 1-11, 1998.

KASZUBA, M.; LYLE, I.G.; JONES, M.N. The targeting of lectin bearing liposomes to skin associated bacteria. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 4, p. 151-158, 1995.

KATO C, KURAMITSU HK. Carboxyl-terminal deletion analysis of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-I enzyme. **FEMS Microbiology Letters**. v. 60(3), .p. 299-302, nov. 1990.

KELLY, C.G.; YOUNSON, J.S. Anti-adhesive strategies in the prevention of infectious disease at mucosal surfaces. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, n. 9 (8), p. 1711–1721, 2000.

KENNETH J. LIVAK, K.J.; Thomas D. Schmittgen, T. D. analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 22DDCT method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

KIMBLE, B.; RAMIREZ NIETO, G.; PEREZ, D. R. Characterization of Influenza virus sialic acid receptors in minor poultry species. **Virology Journal**, v. 7, p. 365, dez. 2010.

KITADA, M.; KURODA, Y.; DEZAWA, M. Lectins as a Tool for Detecting Neural Stem/Progenitor Cells in the Adult Mouse Brain. **Anatomical record (Hoboken)**., v. 1, p. 1-19, dez. 2010.

KLEEREBEZEM, M. *et al.* *Quorum* -sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 24(5), p. 895-904, 1997.

KLEIN, H.; PALMER, C.E. Dental caries in american indian children. **Public Health Bulletin.**, v. 239, p.1-54, 1937.

KLEIN, M. I. *et al.* Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in *Streptococcus mutans* biofilm development. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 837–841, 2009.

KNOLL-KOHLER, E., STIEBEL, J. Amine fluoride gel affects the viability and the generation of superoxide anions in human polymorphonuclear leukocytes: an *in vitro* study. **Europe Journal of Oral Science**, v. 110, p. 296–301, 2002.

- KOGA, T. *et al.* Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype c. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 289-296, 1990.
- KOLENBRANDER, P. E. *et al.* Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. **FASEB Journal**, v. 7, p. 406–413, 1993.
- KOLENBRANDER, P.E. *et al.* Communication among Oral Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 486 - 505, 2002.
- KRASSE, B. The effect of caries inducing streptococci in hamsters fed diets with sucrose or glucose. **Archives of Oral Biology**, v. 10, p. 223-6, 1965.
- KURAMITSU, H. K. *et al.* Interspecies interactions within oral microbial communities. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, p. 653 - 670, 2007.
- LACHENMEIER, D.W. Safety evaluation of topical applications of ethanol on the skin and inside the oral cavity. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v.3, p. 26-33, 2008.
- LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. Nucleocytoplasmic plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1800, p. 190-201, fev. 2010.
- LAWLESS, J. **The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils**. Shaftesbury, UK: Element Books Ltd, 1995.
- LAZARINI, C.A. *et al.* *Croton zehntneri* essential oil: effects on behavioral models related to depression and anxiety. **Phytomedicine**, v. 7, p. 477-481, 2000.
- LEACH, .S.; SAXTON, C.A. An electron microscopic study of the acquired pellicle and plaque formed on the enamel of human incisors. **Archive of Oral Biology**, v. 11, p. 1081–1094, 1966.
- LEE, N.; YUEN, K.Y.; KUMANA, C.R. Clinical role of b-lactam/ b-lactamase inhibitor combinations. **Drugs**, v. 63, p. 1511-1524, 2003.
- LEE, S. F.; PROGULSKE-FOX, A.; BLEIWEIS, A. S. Molecular cloning and expression of a *Streptococcus mutans* major surface protein antigen, P1 (I/II), in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**. v.56, p. 2114–2119, 1988.
- LEE, S.F. *et al.* Construction and characterization of isogenic mutants of *Streptococcus mutans* deficient in major surface protein antigen P1 (I/II). **Infection and Immunity**, v. 57, p. 3306-3313, 1989.
- LEID, J.G. *et al.* Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 6339-6345, 2002.
- LEME, C.L.D. Anatomia comparada do lenho do caule, raiz e ramo de algumas espécies de Euphorbiaceae da Mata Atlântica. São Paulo, 73p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 1994.

LEMOS, J. A.; ABRANCHES, J.; BURNE, R. A. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. **Current Issues Molecular Biology**, v. 7, p. 95-107, 2005.

LEMOS, T.L.G. *et al.* Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytotherapy Research**, v. 4, p. 82-83, 1990.

LEWIS, K.. Riddle of Biofilm Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 45, n. 4, p. 999-1007, 2001.

LI, R.C.; SCHENTAG, J.J.; NIX, D.E. The fractional maximal effect method: a new way to characterize the effect of antibiotic combinations and other nonlinear pharmacodynamic interactions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 523-531, 1993.

LIAO, W.R. *et al.* Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 433-439, 2003.

LILJEMARK, W.F.; BLOOMQUIST, C.G.; GERMAINE, G.R. Effect of bacterial aggregation on the adherence of oral streptococci to hydroxiapatite. **Infection and Immunity**, v. 31, p. 935-941, 1981.

LIMA, J. E. de O. Cárie dentária: um novo conceito. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**. Maringá, v. 12, n. 6, p. 119-130, nov./dez. 2007.

LIMA, M. R. F. *et al.* Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 137-147, 2006.

LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S.G. Bioactivity of selected plantessential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 82, p. 759–762, 1997.

LOESCHE, W. J. Ecology of *S. mutans* in the human mouth and evidence for its role in caries initiation. In: **Simposium on Current Topics in Dental Caries**, Matsuto, Japan, Proceedings. p. 180-97, 1982.

LOESCHE, W. J. *et al.* Association of *Streptococcus mutans* with Human Dental Decay. **Infection and Immunity**, v. 11, n. 6, p. 1252-1260, june. 1975.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiology Reviews**, v. 50, p. 353–380, 1986.

LOPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R.. Biofilms **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2(7), p. 1-11, Jun, 2010.

LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 5.ed., Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2005.

LYNCH, D.J. *et al.* Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. **FEMS Microbiology Letters**, v. 268, p. 158–165, 2007.

- MACIEL, M.A.M. *et al.* Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, p. 41-55, 2000.
- MAGALHÃES, P.J.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J.H. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 18, p. 539-546, 2004.
- MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends of Microbiol**, v. 9, p. 34-39, 2001.
- MAHADY, G. B. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, p. 2405-2427, 2005.
- MARSH, P.D. Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque. **Proceedings of the Finnish Dental Society**, v. 87, p. 515-525, 1991.
- MARSH, P.D. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. **Journal of Dental Research**, v. 71, p.1431-1438, 1992.
- MARSH, P.D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Advances in Dental Research**, v. 8, p. 263-271, 1994.
- MARSH, P.D. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. **Journal of Dentistry**. v.38, p. S11-S15, 2010.
- MATOS, F.J.A. **Plantas Mediciniais**. 2 ed. Fortaleza:Editora UFC, 2000.
- MATSUI, R.; CVITKOVITCH, D. Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. **Future Microbiology**, v. 5(3), p. 403-417, march. 2010.
- MATSUMOTO-NAKANO, M.; FUJITA, K.; OOSHIMA, T. Comparison of glucan-binding proteins in cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 22, p. 30-35, 2007.
- MATTOS-GRANER, R.O. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 6931-6941, 2001.
- MATZ, C.; KJELLEBERG, S. Off the hook—how bacteria survive protozoan grazing. **Trends of Microbiol**, v.13, p. 302-307, 2005.
- MAUKONEN, J. *et al.* Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, n. 30, p. 327-356, 2003.
- MAYHALL, C.W.; BUTLER, W.T. The carbohydrate composition of experimental salivary pellicles. **Journal of Oral Pathology**, v. 5, p. 358-370, 1976.

- MCCULLOUGH, M.J.; FARAH, C.S. The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes. **Australian Dental Journal**, v.53, p. 302–5, 2008.
- MILLEZI, A.F. *et al.* Ação bactericida de detergente-sanificante à base de óleos essenciais sobre biofilme de *Aeromonas hydrophila*. XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 2010.
- MISHRA, A.K.; DUBEY, N.K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p. 1101–1105, 1994.
- MITTELMAN, M. W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2760-2764, 1998.
- MOOSER G, *et al.* Isolation and sequence of an active-site peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus sobrinus* alpha-glucosyltransferases. **Journal of Biological Chemistry**. v. 15, n. 266(14), p. 8916-22, may 1991.
- MOOSER G, WONG C. Isolation of a glucan-binding domain of glucosyltransferase (1,6-alpha-glucan synthase) from *Streptococcus sobrinus*. **Infection and Immunity**, v. 56(4), p. 880-4, apr. 1988.
- MORAIS, S.M. *et al.* Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil, **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.
- MORE, G.; *et al.* Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 473–477, 2008.
- MOREIRA, R. A. *et al.* Plant lectins chemical and biological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 211-218, 1991.
- MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterisation and behaviour during germination. **Biology Plantarum**, v. 26(2), p. 113-120, 1984.
- MOURA, T. R. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lectin from *Canavalia boliviana* Piper seeds. **Acta Crystallographica**, F65, p. 213-215, 2009.
- MOURA, T.R. Determinação da estrutura tridimensional de uma lectina de sementes de *Canavalia boliviana* por cristalografia de raio x. (Mestrado em Bioquímica)-Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- MUKAMOLOVA, G.V. *et al.* A bacterial cytokine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95 (15), p.8916–21, 1998.
- MURRAY, E.J., STRAUCH, M.A., STANLEY-WALL, N.R. σ^x Is involved in controlling *Bacillus subtilis* biofilm architecture through the AbrB homologue Abh. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 6822-6832, nov. 2009.

NAGORSKA, K. *et al.* Importance of EPS genes from *Bacillus subtilis* in biofilm formation and swarming. **Journal of Applied Genetics.**, v. 51, p. 369-381, mai. 2010.

NAPIMOGA, M.H. *et al.* Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 697-703, 2004.

NARDI A G.M. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory effects of products from *Croton celtidifolius* Bailon on carrageenan-induced pleurisy in rats. **Phytomedicine**, v. 14, n. 2–3, p. 115-117, 2007.

NASCIMENTO, G.G.F. *et al.* Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 3, p. 247-256, 2000.

NASCIMENTO, M. M. *et al.* Adaptive acid tolerance response of *Streptococcus sobrinus*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 6383-6390, 2004.

NEUMEGEN, R.A.; FERNANDEZ-ALBA, A.R.; CHISTI, Y. Toxicities of triclosan, phenol, and copper sulfate in activated sludge. **Environmental Toxicology**, v. 20, p. 160–4, 2005.

NEWBRUN, E. Extracellular polysaccharides synthesized by glucosyltransferases of oral streptococci. Composition and susceptibility to hydrolysis. **Caries Research**, v. 6(2), p.132–147, 1972.

NGUEFACK, J.; BUDDE, B.; JAKOBSEN, M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. **Letters of Applied Microbiology**, v. 39, p. 395–400, 2004.

NICOLSON, K.; EVANS, G.; O'TOOLE, P.W. Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, p. 233–239, 1999.

NIKOLAEV, Y. A.; PLAKUNOV, V. K. Biofilm -“City of Microbes” or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 125–138, 2007.

NJOROGE, J.; SPERANDIO, V. Jamming bacterial communication: new approaches for the treatment of infectious diseases. **EMBO Molecular Medicine**, n. 1(4), p. 201–210, 2009.

NOBBS, A. H. *et al.* Streptococcus Adherence and Colonization. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 3, p. 407–450, sept. 2009.

NOGUEIRA, R.D. *et al.* Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. **Infection and Immunity**. v.73(9), p.5675-84.

NORMAN, R. *et al.* Memory enhancing activities of *Ficus religiosa* leaves in rodents. **International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy**, v. 2(3), p. 834-838, 2011.

NYVAD, B.; KILIAN, M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries inactive individuals. **Caries Research**, v. 24, p. 267-272, 1999.

NYVAD, B.; KILIAN, M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 95, p. 369-380, 1987.

NYVAD, B.; KILIAN, M. Microflora associated with experimental root surface caries in humans. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 1628-1633, 1990.

OFEK, I.; KAHANE, I.; SHARON, N. Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases. **Trends of Microbiology**, v. 4(8), p. 297-299, 1996.

OGAWA, F.; FURUKAWA, S.; FUJITA, S. Inhibition of *Streptococcus mutans* Biofilm Formation by *Streptococcus salivarius*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n.5, p. 1572-1580, mar. 2011.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 1471-1474, 2001.

OLIVEIRA, D. C. *et al.* Redução do índice de placa com Listerine: avaliação do índice de placa em relação ao uso de Listerine e/ou escovação. **Revista Gaúcha de Odontologia**. Porto Alegre, v. 46, n. 2, p. 101-104, 107-108, abr./jun., 1998.

OLIVEIRA, M.D.L. *et al.* Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters of Applied Microbiology**, v. 46, p. 371-376, 2008.

OLIVEIRA, M.R. *et al.* Inhibition of bacterial adherence to saliva-coated through plant lectins. **Journal of Oral Science**, v. 49, p. 141-145, 2007.

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

PACHECO, F.C. Imunologia da Cavidade Oral. In: AROSA, F.A.; CARDOSO, E.M.; PACHECO, F.C. **Fundamentos de Imunologia**. Lisboa: Lidel Edições Técnicas, p. 301-26, 2007.

PAERL, H.W.; PINCKNEY, J.L. A Mini-Review of microbial consortia: their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. **Microbial Ecology**, v. 31, p. 225-247, 1996.

PAES LEME, A. F. *et al.* Identificação de proteínas do biofilme dental formado *in situ* na presença de sacarose. In: Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, **Brazilian Oral Research**, Águas de Lindóia, v. 18, p. 124-124, 2004.

PAES LEME, A.F. *et al.* The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation: new insight. **Journal of Dental Research**, v. 85(10), p. 878-887, oct. 2006.

PALMEIRA JÚNIOR, S.F. *et al.* Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 397-402, 2006.

PALMER, R.J. Jr. *et al.* Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. **Journal of Bacteriol**, v. 185, p. 3400-3409, 2003.

PALOMBO, E. A. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-15, 2011.

PARSEK, M.; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 57, p. 677–701, 2003.

PARSEK, M.R.; GREENBERG, E.P. Sociomicrobiology: the connections between *quorum-sensing* and biofilms. **Trends of Microbiology**, v. 13, p. 27-33, 2005.

PASTER, B. J. *et al.* Prevalent bacterial species and novel phylotypes in advanced noma lesions. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, p. 2187–2191, 2002.

PERAZZO, F.F. *et al.* Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous extract obtained from *Croton cajucara* Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 521-528, 2007.

PEREIRA, A. G.; NEVES, A. M.; TRINDADE, A.C. Imunologia da cárie dentária. **Acta Medica Portuguesa**, v. 23, p. 663-668, 2010.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, p. 1-10, 2004.

PEREZ, G. *et al.* Comparison of the amino acid sequences of the lectins from seeds of *Dioclea lehmanni* and *Canavalia maritima*. **Phytochemistry**, v. 30(8), p. 2619-21, 1991.

PEREZ-AMADOR M. C.; MONROY, M. A. ; BUSTAMANTE, G. Essential oil in leaves of *Croton pseudoniveus* & *C suberosus* (Euphorbiaceae) species. **Phyton**, v 53, p. 109-112, 2003.

PETERSEN, P. E. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century—the approach of the WHO Global Oral Health Programme. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, vol. 31, pp. 3-24, 2003.

PETERSON, S. N. *et al.* Dental caries pathogenicity: a genomic and metagenomic perspective. **International Dental Journal**, n. 61 (Suppl. 1), p. 11–22, 2011.

PEUMANS, W. J.; HAUSE, B.; DAMME, E. J. M. VAN. The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. **FEBS Letters**., v. 477, p. 186-192, 2000.

PEUMANS, W. J.; HAUSE, B.; VAN DAMME E. J. The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular glycomic analysis. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 14, p. 419-436, ago. 2010.

- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, out. 1995.
- PEUMANS, W. J.; HAO, Q.; VAN DAMME, E. J. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? **The FASEB Journal**, v. 15, p. 1493-1506, 2001.
- PHILIP, Marsh; MARTIN, Michael V. **Microbiologia oral**, 4. ed. São Paulo: Editora Santos, p. 34 – 57, 2005.
- PHILLIPSON, J.D.; ANDERSON, L.A. Ethnopharmacology and western medicine **Journal of Ethnopharmacology**. v 25, p.61–72, 1989.
- PORTO, T. S. *et al.*. Antimicrobial ent-pimarane diterpenes from *Viguiera arenaria* against Gram-positive bacteria. **Fitoterapia**, v. 80, p. 432–436, 2009.
- PRABU, G.R.; GNANAMANI, A.; SADULLA, S. Guaijaverin - a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p. 487–95, 2006.
- PRATT, L.A. E; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular Microbiology**. v.30, n.2, p. 285-293, 1998.
- QUIVEY, R. G.; KUHNERT, W.; HAHN, K. Genetics of acid adaptation in oral streptococci. **Critical Review of Oral Biology and Medicine**. v.;12, p. 301-314, 2001.
- RANAU, K.P. *et al.* Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p.89-96, 2004.
- RANI, A. *et al.* Synergistic interaction between synthetic and natural products: a promising tool for the development of environmentally safe potent antimicrobial agents. **World Applied Sciences Journal**, v. 5, p. 59-63, 2009.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001. recognition. **Essays in Biochemistry Issues**, v. 30, p. 59-75, mar. 1995.
- RENISUS – Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS Espécies vegetais. Fevereiro, 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>> acesso em 15 de janeiro de 2012.
- REYNOLDS, J.E.F. Martindale – the Extra Pharmacopoeia 31st edn. London: Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 1996.
- RICKARD, A. H. *et al.* Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends in Microbiology**, v.11, p. 94 – 100, 2003.
- RITZ, M. *et al.* Determination of rpoA as the most suitable internal control to study stress response in *C. jejuni* by RT-qPCR and application to oxidative stress. **Journal of Microbiological Methods**, v. 76, p. 196–200, 2009.

ROCHA, F.F. *et al.* Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory effects of *Croton pulleivar. glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 344-349, 2008.

RODRIGUES, F. *et al.* Genotoxicity of three mouthwash products, Cepacol, Periogard, and Plax, in the *Drosophila* wing-spot test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 48, p. 644–9, 2007.

ROJASA, R. *et al.* Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, Issues 2–3, p. 199–204, 2003.

RÜDIGER, H.; ROUGE, P. Structure and function of plant lectins, Carbohydrates. **Europe**, v. 23, p. 18-22, 1998.

RUHL, S.; SANDBERG, A.L.; CISAR, J.O. Salivary Receptors for the Proline-rich Protein-binding and Lectin-like Adhesins of Oral Actinomyces and Streptococci. **Journal of Dental Research**, v. 83(6), p.505-510, 2004.

RUSSELL, M. W.; LEHNER, T. Characterization of antigens extracted from cells and culture fluids of *Streptococcus mutans* serotype c. **Archives of Oral Biology**, v. 23, p.7–15, 1978.

RUSSELL, R. R. Glucan-binding proteins of *Streptococcus mutans* serotype c. **Journal of General Microbiology**. v. 112(1), p. 197-201, may. 1979.

SACKS, D. L.; HIENY, S.; SHER, A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. **Journal of Immunology**. v. 135, p. 564-9, 1985.

SAIMAN, L. Clinical utility of synergy testing for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis: ‘the motion for’. **Pediatric Respiratory Reviews**, v. 8, p. 249–255, 2007.

SÁNCHEZ, V. *et al.* Alcaloides en especies cubanas del género *Croton* L. I. Estudio químico preliminar. **Revista Cubana Farmácia**, v. 16, p. 39-44, 1982.

SANGWAN, N. S. *et al.* Regulation of essential oil production in plant. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 3-21. 2001

SANTI-GADELHA, T. *et al.* Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, 1050-1055, 2006.

SANTOS, P.M.L.; SCHRIPSEMA, J.; KUSTER, R.M. Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 321-325, 2005.

SANTOS, H.S. *et al.* Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential from *Croton zehntneri*. **Natural Product Communications**, v. 2, p. 1233-1236, 2007.

- SANTOS, H.S. *et al.*. Diterpenos casbanos e acetofenonas de *Croton nepetaefolius* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 601-604, 2008.
- SANTOS, H. S. *et al.* Chemical composition and cholinesterase inhibition of essential oils of three chemotypes from *Croton zehntneri*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 38, n.1, 2010.
- SATO Y,*et al.* *Streptococcus mutans* binding to solid phase dextran mediated by the glucan-binding protein C. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 17(4), p. 252-6, aug. 2002.
- SATO, Y.; YAMAMOTO, Y.; KIZAKI H. Cloning and sequence analysis of the gbpC gene encoding a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**. v.65(2), p. 668-75, 1997.
- SAUER, F. G. *et al.* Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 65–72, 2000.
- SCHACHTER, B. Slimy business-the biotechnology of biofilms. **Nature Biotechnology**, v. 21, 2003.
- SCHEIE, A. A. O papel dos antimicrobianos. In: **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico**. São Paulo: Ed. Santos, p. 179-188, 2007.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento. 5ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, cap. 18, p. 467-495.
- SCHILLING, K. M.; BOWEN, W. H. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**., v. 60, p. 284–295, 1992.
- SCHMIDT, E. *et al.* Antimicrobial testing and gas chromatographic analysis of aroma chemicals. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**., v. 8, p. 99–106, 2005.
- SHAH, D. S. *et al.* Conserved repeat motifs and glucan binding by glucansucrases of oral streptococci and *Leuconostoc mesenteroides*. **Journal of Bacteriol.**, v. 186, p. 8301–8308, 2004.
- SHAPIRO, J.A. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. **Annual Review of Microbiology**, v. 52, p.81-104, 1998.
- SHARMA, M. *et al.* Toluidine Blue-Mediated Photodynamic Effects on Staphylococcal Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 299-305, 2008.
- SHARON, N. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, p. 527-537, 2006.
- SHARON, N. Carbohydrates. **Scientific American**, v. 243, p. 80-97, 1980.

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 2753-2764, 2007.

SHARON, N.; LIS H. Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American.**, v. 268, p.82-88, 1993.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins proteins with sweet tooth: functions in cell recognition. **Essays Biochem.**v.30, p. 59-75, 1995.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, p. 53R-62R, 2004.

SHARON, N.; LIS, H. LECTINS. **Chapman and Hall**. London, 1989.

SHARON, N; LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugarspecific proteins. **Science**, v. 177, p. 949–959, 1972.

SIHORKAR, V.; VYAS, S. P. Biofilm consortia on biomedical and biological surfaces: delivery and targeting strategies. **Pharmaceutical Research**, n. 18, p. 1254–1427, 2001.

SILBER, A.M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: identification of a galactose-binding protein that binds to cell surface of human erythrocytes and is involved in cell invasion by the parasite. **Experimental Parasitology**, v. 100, p. 217–225, apr. 2002.

SILVA JR. S.; SALES, M. F.; CARNEIRO-TORRES, D. S. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**. v. 60 (4), p. 879-901, 2009.

SILVA, M. S. A. *et al.* Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n .2, apr./jun. 2008.

SIMÕES, C. M. O; SPITZER, E. V. Óleos Voláteis, 2003. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, p. 467-495, 2003.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora UFRS/UFSC, 1999.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6.ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2007.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583, 2010.

SINGH, A. *et al.* Phospholipidome of *Candida*: Each Species of *Candida* has Distinctive Phospholipid Molecular Species. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 14, p. 1-14, 2010.

SINGH, G. *et al.* Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. **Food Control**, v. 17, p. 745–752, 2006.

SINGH, S. K.; *et al.* *Leishmania donovani*: Assessment of leishmanicidal effects of herbal extracts obtained from plants in the visceral leishmaniosis endemic area of Bihar. **Indian Experimental Parasitology**, v. 67, p. 1-7, nov. 2010.

SIQUEIRA, W.L. *et al.* F.G. Identification of protein opponents *in vivo* human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. **Journal of Proteome Research**. v. 6, p. 2152–2160, 2006.

SMITH, A. W. Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? **Advances in Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1539–1550, 2005.

SMITH, D.J. *et al.* Antigenicity and immunogenicity of a synthetic peptide derived from a glucan-binding domain of mutans streptococcal glucosyltransferase. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 2899-2905, 1993.

SOMERS, E. B.; WONG, A. C. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat-meat residue. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2218-2229, 2004.

SOUZA, A. B. *et al.* Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 2, p. 215-220, 2011.

SOUZA, M.A.A. *et al.* Composição química do óleo fixo de *Croton cajucara* e determinação das suas propriedades fungicidas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 599-610, 2006.

SOUZA, M.M.; *et al.* Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T.M.B., CECHINEL FILHO, V.(org.). **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Ed. Univali, p. 108-166, 2003.

SOUZA, S.R. *et al.* Composição química do óleo fixo de *Croton cajucara* e determinação das suas propriedades fungicidas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16(Supl.), p. 599-610, 2006.

STEPANOVIC, S. *et al.* A modified microtiterplate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiology Methods**, v. 40(2), p.175-179, 2000.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, **Lancet**, v. 358, p. 135-138, 2001.

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

STOODLEY, P. *et al.* Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: an in situ investigation of biofilm rheology. **Biotechnology and**

Bioengineering, v. 65, n.1, p.83-92, 1999.

SUÁREZ, A.I. *et al.* Essential oil composition of *Croton cuneatus* and *Croton malambo* growing in Venezuela. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 611-614, 2005.

SVENSATER, G. *et al.* Acid tolerance response and survival by oral bacteria. **Oral Microbiology and Immunology**, v.12, p. 266–273, 1997.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. **Caries Research**, v. 42, p. 409–418, 2008.

TAKAHASHI, N.; YAMADA, T. Acid-induced acid tolerance and acidogenicity of non-mutans streptococci. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 14(1), p. 43-8, feb, 1999.

TAKAHASHI, Y. *et al.* Identification and characterization of *hsa*, the gene encoding the sialic acid-binding adhesin of *Streptococcus gordonii* DL1. **Infection and Immunity**, v. 70, p.1209–1218, 2002.

TAKAHASHI, Y. *et al.* Functional analysis of the *Streptococcus gordonii* DL1 sialic acid-binding adhesin and its essential role in bacterial binding to platelets. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 3876–3882, 2004.

TAKAHASHI-ABEE, S. *et al.* Inhibitory effect of sorbitol on sugar metabolism of *Streptococcus mutans* *in vitro* and on acid production in dental plaque *in vivo*. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 16, p. 94-99, 2001.

TAKAMATSU, D. *et al.* Binding of the streptococcal surface glycoproteins GspB and Hsa to human salivary proteins. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 1933–1940, 2006.

TAKAMATSU, D. *et al.* Binding of the *Streptococcus gordonii* surface glycoproteins GspB and Hsa to specific carbohydrate structures on platelet membrane glycoprotein Ib. **Molecular Microbiology**, v. 58, p. 380–392, 2005.

TAM, A. *et al.* Effect of different iodine formulations on the expression and activity of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase and fructosyltransferase in biofilm and planktonic environments. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 57, p. 865-871, 2006.

TANZER, J.M. *et al.* Association of *Streptococcus mutans* virulence with synthesis of intracellular polysaccharide. In: STILES, H.M.; LOESCHE, W.J.; O'BRIEN, T.C., editors. *Microbial aspects of dental caries*. Washington, DC: Information Retrieval;. p. 597-616, 1976.

TAUBMAN, M.A.; NASH, D.A. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. **Nature Reviews Immunology**, v.6(7), p. 555-63, 2006.

TAVARES, W. Introdução ao estudo dos antimicrobianos. In: **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu p.3-13, 1996.

TEIXEIRA, E.H. *et al.* In vitro inhibition of Streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101(1), p. 111-116, 2006.

- TEIXEIRA, E.H. *et al.* In vitro inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1001–1006, 2007.
- TEIXEIRA, K. I. R.; CORTES, M. E. Estado actual de la indicacion de antimicrobianos para la medicacion intracanal. **Acta Odontologica Venezuelana**, v. 43, n. 2, p. 177-80, 2005.
- TERRAS, F.R.G. *et al.* Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2s albumins and by barley trypsin inhibitors. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1311-1319, 1993.
- THURNHEER, T. *et al.* Effects of *Streptococcus mutans* *gtfC* deficiency on mixed oral biofilms *in vitro*. **Caries Research**, v. 40, n. 2, p. 163–171, 2006.
- TORRES, M.C.M. *et al.* Larvicidal and Nematicidal Activities of the Leaf Essential Oil of *Croton regelianus*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, n. 12, p. 2724–2728, 2008.
- TORRICO, F. *et al.* Hypoglycaemic effect of *Croton cuneatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 166-169, 2007.
- ULRICH-MERZENICH, G. *et al.* Application of the “-omic-” technologies” in phytomedicine. **Phytomedicine**, v. 14, p. 70-82, 2007.
- VALDEVITE, L. M. Estudo do efeito *in vitro* de extrato das folhas e do óleo-resina de copaíba sobre fatores de virulência de *S. mutans* relacionados à cárie dentária. USP Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2007.
- VAN DAMME, E. J. *et al.* Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Review in Plant Science**, v. 17, p. 575-692, nov. 1998.
- VAN DAMME, E. J. *et al.* Molecular cloning of the mitogenic mannose/maltose-specific rhizome lectin from *Calystegia sepium*. **FEBS Letters**, v. 397, p. 352-356, nov. 1996.
- VAN DER WAAIJ, D.; BERGHUIS DE VRIES, J.M.; VAN DER WEES, J.E.C. Colonisation resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 69, p. 405-411, 1971.
- VAN HOUTE, J.; LOPMAN, J.; KENT, R. The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces. **Journal of Dental Research**, v. 75, p. 1008–1014, 1996.
- VAN HOUTE, J.; LOPMAN, J.; KENT, R. The predominant cultivable flora of sound and carious human root surfaces. **Journal of Dental Research**, v. 73, p. 1727–1734, 1994.
- VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W.E.; GOLDSTEIN, J. I. Hevein an antifungal protein for rubber-tree (*Havein brasiliensis*) latex. **Plant**, v. 183, p. 258-262, 1998.
- VAN VUUREN, S.; VILJOEN, A. Plant-Based Antimicrobial Studies –Methods and Approaches to Study the Interaction between Natural Products. Plant-Based Antimicrobial Studies. **Planta Medica**, v. 77, p. 1168-1182, 2011.

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. **Glycobiology**, v. 3, p. 97-130, jan. 1993.

VASCONCELOS, M. A. Atividade das lectinas *canavalia brasiliensis* e *canavalia ensiformis* sobre o crescimento in vitro de *Rhizobium tropici*. (Mestrado em Biotecnologia) Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2010.

VELICER, G.J. Social strife in the microbial world. **Trends of Microbiology**, v. 11, p. 330-337, 2003.

VERA, R.; SMADJA, J.; CONAN, J. Y. Preliminary assay of some plants with alkaloids from Reunion Island. **Plant Medicine Phytotherapy**, v. 24, n. 1, p. 50-65, 1990.

VERAN, J. Biofouling in food processing: biofilm or biotransfer potential? **Food and Bioproducts Processing**, v. 80, p. 292–298, 2002.

VIEIRA, M. J.; MELO, L.; PINHEIRO, M. M. Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. **Biofouling**, v. 7, p. 67-80, 1993.

VU, B. *et al.* Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2535–2554, 2009.

WADE, W.G. New aspects and new concepts of maintaining “microbiological” health. **Journal of Dentistry**, v. 38 (Suppl. 1), S21–S25, 2010.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Review (part I) Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytotherapy**, v. 16, p. 97-110, 2009.

WATKINS, W.N. A half century of blood-group antigen research: some personal recollections. **Trends of Glycoscience and Glycotechnology**, v. 11, p. 291-411, 1999.

WEBSTER, G. L. A provisional synopsis of the section of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon**, v. 42, p. 793-823, 1993.

WEIGEL, L.M. *et al.* High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 231-238, 2007.

WEITAO, T. Multicellularity of a unicellular organism in response to DNA replication stress. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 87-88, 2009.

WEN, Z. T. *et al.* Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. **BMC Microbiology**, v. 10 p. 111, 2010.

WEN, Z.T.; BAKER, H. V.; BURNE, R. A. Influence of BrpA on Critical Virulence Attributes of *Streptococcus mutans*. **Journal of Bacteriology**, v. 188 p. 2983–2992, 2006.

WHITE, R.L. *et al.* Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard and E-test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 1914–1918, 1996.

WILLIAMSON, E.M. Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phytomedicine**, v. 8, p. 401–409, 2001.

WIMMEROVÁB, M.; MITCHELLC, E. P.; GILBOA-GARBERD, N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. **Microbes and Infection**, v. 6, Issue 2, p. 221–228 feb. 2004.

WONG, J. H. *et al.* Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p.1221– 1235, 2010.

WONG, J. H.; NG, T.B. Isolation and characterization of a glucose/mannose/rhamnose-specific lectin from the knife bean *Canavalia gladiata*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 439, 1, p. 91–98, 2005.

World Health Organization. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63 (6), p. 965-981, 1985.

WU, A.M.; LISOWSKA, E.; DUK, M.; YANG, Z. Lectins as tools in glycoconjugate research. **Journal of Glycoconjugates**, v. 26, p. 899-913, 2009.

XU, X.; ZHOU, X. D.; WU, C. D. The Tea Catechin Epigallocatechin Gallate Suppresses Cariogenic Virulence Factors of *Streptococcus mutans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n.3, p. 1229–1236, mar. 2011.

YAMAMOTO, H.; OGAWA, T. Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 66, n. 4, p.921-924, 2002.

YAMASHITA, Y. *et al.* Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. **Infection and Immunity**, v.61, p. 3811–3817, 1993.

ZACCHINO, S. Estratégia para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R.A. E CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p. 435-479, 2001.

ZAREMBA M.L. *et al.* Microorganisms in root carious lesions in adults. **Advances in Medical Sciences**, v. 51 (Suppl. 1M), p. 237-240, 2006.

ZERO, D.T.; VAN HOUTE, J.; RUSSO, J. Enamel demineralization by acid produced from endogenous substrate in oral streptococci. **Archives of Oral Biology**, v. 31, p. 229–234, 1986.

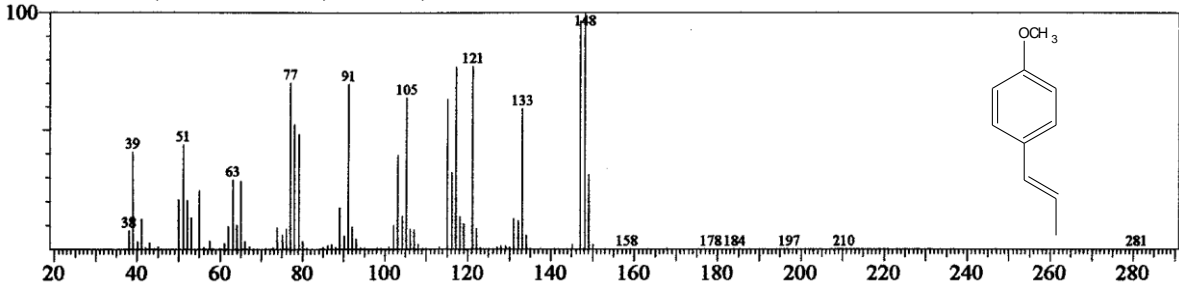
ZHU, H.; WILLCOX, M. D. P.; KNOX, K. W. A new species of oral *Streptococcus* isolated from Sprague–Dawley rats, *Streptococcus orisratti* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 55–61, 2000.

ZIMMERLI, W.; TRAMPUZ, A., OCHSNER, P.E. Prosthetic-joint infections, **The New England Journal of Medicine**, v. 351, p. 1645-1654, 2004.

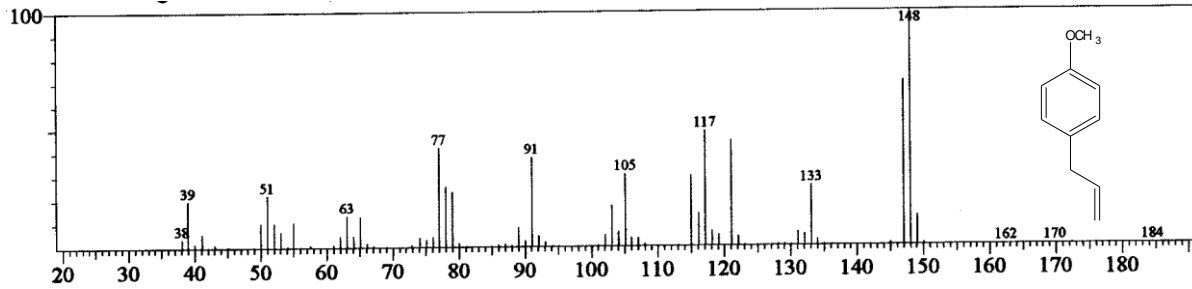
ZOBELL, C. E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **Journal of Bacteriology**, n. 46, p. 39–56, 1943.

Anexos

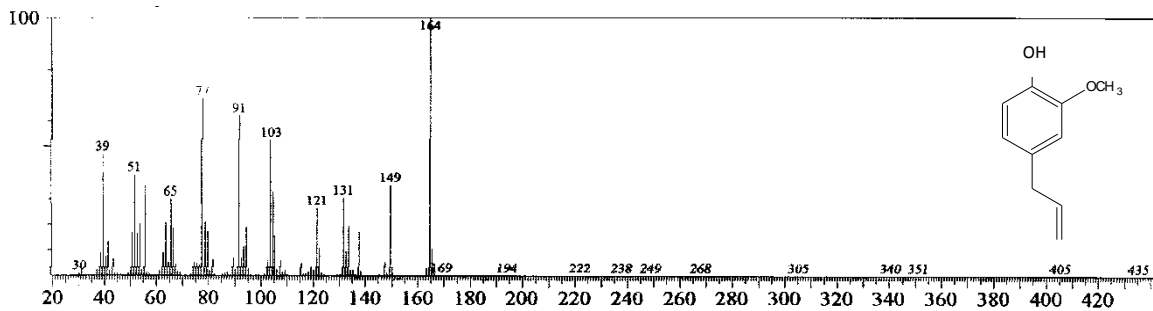
ANEXO A - Espectros de massas dos constituintes químicos voláteis obtidos dos óleos essenciais de *Croton zehntneri*



Espectro de massas do *E*-Anetol



Espectro de massas do Estragol



Espectro de massas do Eugenol

ANEXO B - Composição química dos óleos essenciais dos três quimiotipos de *Croton zehntneri*.

CONSTITUINTES	I.R	QUIMIOTIPO	QUIMIOTIPO	QUIMIOTIPO
		1/Anetol	2/Estragol	3/Eugenol
		Caule (%)	Folha (%)	Caule (%)
Canfeno	954			
β - pineno	979			
1,8 - cineol	1031	5,2		
Z - ocimeno	1037			
E - ocimeno	1050			
Cânfora	1146	2,5		
Borneol	1169	2,6		
α - terpineol	1189			
Estragol	1196	1,2	90,2	
p - anisaldeído	1250	1,8		
Z - anetol	1253			
E - anetol	1285	70,5		14,7
δ - elemeno	1338			0,7
Eugenol	1359			
Isoledeno	1376			
α - copaeno	1377	1,5		6,0
β - elemeno	1391	2,1		11,4
Metileugenol	1404			
α - gurjuneno	1410			
E - cariofileno	1419			4,5
Z - bergamoteno	1435			
Z- Metilisoeugenol	1454	6,3	0,3	53,4
α - humuleno	1455			
Germacreno - D	1485	0,7		

<i>E</i> - Metilisoegenol	1492		
Biclogermacreno	1500	1,7	1,6
δ - cadineno	1523		0,8
Acetato de eugenol	1523		
Germacreno - B	1561		0,9
Óxido de cariofileno	1583		
TOTAL (%)	94,6	93,2	94,3

ANEXO C - Artigos científicos publicados em periódicos (2008-2012).

Microsc. Microanal. 14, 150–158, 2008
doi: 10.1017/S143192760800227

Microscopy
AND
Microanalysis
© MICROSCOPY SOCIETY OF AMERICA 2008

Correlation between *Enterococcus faecalis* Biofilms Development Stage and Quantitative Surface Roughness Using Atomic Force Microscopy

Ricardo P. Santos,^{1,*} Theodora T.P. Arruda,² Cibele B.M. Carvalho,² Victor A. Carneiro,² Lara Q.V. Braga,³ Edson H. Teixeira,⁴ Francisco V.S. Arruda,⁴ Benildo S. Cavada,³ Alexandre Havt,³ Taianá M. de Oliveira,³ Gustavo A. Bezerra,³ and Valder N. Freire^{1,*}

¹Laboratório de Ciência e Tecnologia de Materiais (LCTM-UFC), Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, Campus do Pici, 60455-900 Fortaleza, Ceará, Brazil

²Departamento de Histologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, Campus do Pici, 60455-900 Fortaleza, Ceará, Brazil

³Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (Biomol-Lab), Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6020, Campus do Pici, 60455-900 Fortaleza, Ceará, Brazil

⁴Faculdade de Medicina/Sobral, Universidade Federal do Ceará, Av. Getúlio Rangel s/n, Campus do Derby, 62941-180 Sobral, Ceará, Brazil

Abstract: Biofilms are assemblages of microorganisms and their associated extracellular products at an interface and typically with an abiotic or biotic surface. The study of the morphology of biofilms is important because they are associated with processes of biofouling, corrosion, catalysis, pollutant transformation, dental caries, drug resistance, and so forth. In the literature, biofilms have been examined by atomic force microscopy (AFM), which has proven to be a potent tool to study different aspects of the biofilm development on solid surfaces. In this work, we used AFM to investigate topographical changes during the development process of *Enterococcus faecalis* biofilms, which were generated on sterile cellulose nitrate membrane (CNM) filters in brain heart infusion (BHI) broth agar blood plates after 24, 36, 72, 192, and 360 h. AFM height images showed topographical changes due to biofilm development, which were used to characterize several aspects of the bacterial surface, such as the presence of extracellular polymeric substance, and the biofilm development stage. Changes in the development stage of the biofilm were shown to correlate with changes in the surface roughness as quantified through the mean roughness.

Key words: AFM, biofilm, cellulose nitrate membrane, *Enterococcus faecalis*, EPS, mean roughness, topographical behavior

INTRODUCTION

A biofilm is a complex aggregation of microorganisms marked by the excretion of a protective and adhesive matrix. It is composed of excreted polymeric compounds called EPS (extracellular polymeric substance or exopolysaccharide), which protects the cells within it and facilitates communication among them through biochemical signals. EPS forms water channels that help distribute nutrients and signaling molecules. Biofilms are characterized by surface attachment, structural heterogeneity, genetic diversity, complex community interactions, and the presence of EPS (Allison et al., 2000). Pathogenic bacteria rarely exist in the form of pure planktonic cultures. They prevail adhered to

surfaces within a highly complex ecosystem represented by a structured biofilm established inside the host (Gilbert et al., 1997).

Bacteria have more than one way to make a biofilm. It seems that particular environmental stimuli (growth medium or the substratum, etc.) trigger different developmental pathways, all culminating in the same end point, a mature biofilm (O'Toole, 2003). Several studies have focused on the process of biofilm formation of individual species of bacteria. This process, in general, may be subdivided into the following steps (Fig. 1): (1) initial adherence to the surface, (2) microcolony formation, (3) maturation of microcolonies into a biofilm containing the EPS matrix, and (4) biofilm growth (Leveridge & Graham, 1991).

Biofilms were initially perceived as unstructured accretions of bacterial cells, surrounded by the cells' exopolysaccharide matrix, for the first decade (1978 to 1990) following the discovery of their importance and ubiquity. These per-

Received August 27, 2007; Accepted September 11, 2007.

*Corresponding authors. E-mail: rpsantos2004@yahoo.com (Ricardo P. Santos) or valder@fisica.ufc.br (Valder N. Freire)

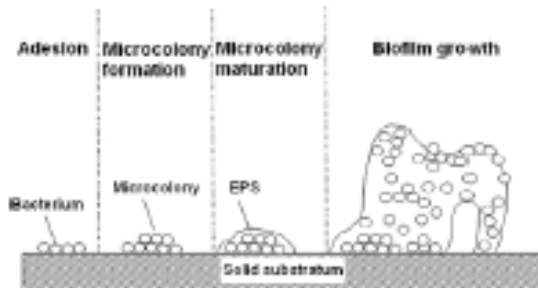


Figure 1. Schematics of biofilm formation on a solid substrate.

ceptions were based on flawed techniques for direct observation of biofilms, in that electron microscopy required complete dehydration of the highly hydrated biofilm matrices, and in that light microscopy was badly distorted by out-of-focus effects. The confocal laser scanning microscope (CLSM) was invented in the 1950s, but it was not used then to study bacterial biofilms because the whole field was fixated on the planktonic phenotype. CLSM produces optical slices of complex structures, so that out-of-focus effects rarely occur. It requires no sample preparation, so that living organisms can be observed if fluorescence is used to visualize the cells. The first examination of living biofilms using CLSM produced a whole series of revelations that are the basis of current biofilm concepts (Donlan & Costerton, 2002).

Kristich et al. (2004) used scanning electron microscopy (SEM) to study biofilm development by an epinegative *Enterococcus faecalis* strain in a chemostat-based biofilm fermentor and described the biofilm characteristics after 4, 8, and 24 h. The results showed that biofilm formation progresses through each of the following stages: initial attachment of individual cells (2 h), microcolony formation (8 h), and development into a mature biofilm with complex architecture containing void spaces, presumably corresponding to water channels (20 h).

Atomic force microscopy (AFM) has enabled researchers to visualize the cell surface architecture of various organisms, including bacteria, yeasts, and viruses (Morris et al., 1999; Camesano et al., 2000; Ahimou et al., 2002). AFM images are generated by sensing the force between a sharp tip and sample surface, supplying surface morphological and physical information in a nondestructive manner (Bustamante & Keller, 1995; Hansma & Pietrasanta, 1998; Dufrene, 2002). Two main techniques, contact and tapping modes, are available for AFM imaging of surfaces. Contact measures topography by sliding the probe tip across the sample surface. The tapping mode measures topography by tapping the surface with an oscillating tip. Tapping is more often used in the study of biological surfaces because it eliminates shear forces, which can damage soft specimens (Binnig et al., 1986; Jena & Horber, 2002). The major

advantages of the use of AFM are the ability to cover the magnification range of both optical and electron microscopy, but under natural imaging conditions with minimal sample preparation, and the production of quantifiable three-dimensional (3D) images of the surfaces.

In the literature, biofilms have been visualized by AFM, which has proved to be a potent tool in the qualitative and quantitative characterization of various aspects of biofilm/substratum interactions (Beveridge & Graham, 1991; Beech et al., 2002; Dufrene, 2004; Parsek & Fuqua, 2004). Razatos et al. (1998) showed that the adhesion force measured by AFM is affected by the length of core lipopolysaccharide molecules on the *Escherichia coli* cell surface. Auerbach et al. (2000) studied physical morphology and surface properties of unsaturated *Pseudomonas putida* biofilms by AFM, determining roughness and adhesion forces in the outer and basal cell layers of fresh and desiccated biofilms. Camesano and Abu-Lail (2002) determined the heterogeneity of bacterial surface macromolecules of *Pseudomonas putida* KT2442 via single-molecule force spectroscopy (SMFS), using AFM. Junior and Teschke (2005) monitored the dynamics of the antimicrobial peptide PGLa action on *E. coli* through AFM analyses: height images, roughness, and force curve measurements. In earlier work, Ahimou et al. (2007) developed a novel AFM (contact-mode) method for reproducibly measuring, *in situ*, the cohesive energy levels of moist 1-day biofilms. They showed that cohesive energy increased with biofilm depth, from 0.10 ± 0.07 to 2.05 ± 0.62 nJ/ μm^2 .

Enterococci are Gram-positive cocci, which often occur in pairs (diplococci) and are difficult to distinguish from *Streptococci* on physical characteristics alone (Fischetti et al., 2000). They are widespread in nature and can be found in soil, water, food, plants, and animals. Several intrinsic characteristics of the genus *Enterococcus* allow them to grow almost everywhere and survive in harsh environments. Important clinical infections caused by *Enterococcus* include urinary tract infections, bacteremia, bacterial endocarditis, diverticulitis, and meningitis (Pelletier, 1996). Among the enterococcal species described so far, *E. faecalis* is usually the most frequent in human clinical specimens. A number of infections caused by *E. faecalis* strains have proved to be particularly difficult to treat with current antibiotic therapies, partly due to their intrinsic antibiotic resistance, their promiscuity in the acquisition and dissemination of mobile genetic antibiotic resistance elements, and their capacity for growing in a biofilm (O'Toole et al., 2000; George et al., 2005).

In clinical studies, biofilms have been implicated as etiological agents of chronic infections. *E. faecalis* biofilms have been described on dental root canals, urethral catheters, and stents and heart valves (Carniol & Gilmore, 2004; Mohamed et al., 2004).

The purpose of this work was to investigate, by atomic force microscopy, the topographical changes in *E. faecalis* biofilm surface during the development process after 24, 36, 72, 192, and 360 h. Height images and roughness analyses

were performed on biofilms grown on cellulose nitrate membrane to characterize the changing pattern of *E. faecalis* biofilms due to its development.

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation

Brain heart infusion (BHI) broth was inoculated with *E. faecalis* (ATCC 29212/Culti-loops-OXOID) from a stock at 2–8°C and incubated at 37°C. Biofilms were generated on sterile cellulose nitrate membrane filters (CNM) of 0.22 µm pore size, 13 mm diameter size (Millipore), and were handled under sterile conditions prior to imaging. The inoculum was prepared in liquid medium as follows. A volume of 50 µl of fresh BHI broth culture of bacteria that had been adjusted to a turbidity of 6 on the MacFarland scale was pipetted onto the membranes placed on BHI blood agar plates (5% defibrinated sheep blood), which were then incubated aerobically (Abdullah et al., 2005). To study the aspects of biofilm development, the inoculated CNM in solid agar medium and BHI (inoculated CNM-BHI) were incubated for 24, 36, 72, 192, and 360 h, at which times they were used for AFM measurements. For a reference blank (control), noninoculated CNM in solid agar medium and BHI (noninoculated CNM-BHI) were also incubated for the same periods of time prior to performing AFM measurements.

AFM Operation

To perform AFM height data, samples of CNM and inoculated and noninoculated CNM-BHI were air-dried for 5 min, cut, and placed on steel sample disks covered with double-sided adhesive. Sample surfaces were scanned in air with a Nanoscope IIIa Multimode AFM (Digital Instruments, Santa Barbara, CA) by the tapping mode at a scan of about 0.400 Hz, resonance frequencies of ca. 200–380 kHz, with crystal silicon cantilevers (Digital Instruments) at a spring constant of approximately 40 N/m and tip radius of 15 nm. The scan sizes performed were 30 × 30 µm, 10 × 10 µm, and 5 × 5 µm. AFM scan controls were properly adjusted (sufficient contact force and high gains) to avoid tip artifacts during the scanning of the samples. The height data were processed with Nanoscope software (Digital Instruments) version 5.12 r3 to the visualization of two-dimensional (2D), 3D, and edge enhance 2D images. Edge enhance is used to accentuate boundaries (edges) between dissimilar areas of an image.

Roughness Analysis

We used Nanoscope software to calculate the surface roughness for the AFM height data with a scan size of 5 × 5 µm. Thirty regions (per sample) were randomly chosen to determine the mean roughness (*Ra*). *Ra* represents the arithmetic

mean of the absolute deviations from the center plane, determined according to the following formula (Sayles, 1982; Digital Instruments, 2001):

$$Ra = \frac{\sum_{i=1}^N |z_i - z_{\varphi}|}{N},$$

where Z_{φ} is the Z value of the center plane, z_i is the current z value, and N is the number of points within a given area.

Statistical Analysis

Statistical data analysis was based on the descriptive statistic—mean value, standard deviation (*SD*), and margin of error (*E*); the Shapiro-Wilk test, to determine whether or not a random sample of values follows a normal distribution; and the hypothesis test, to determine the significance of differences between groups (Lindman, 1974; Lehman, 1975; Mendenhall et al., 1990). *E* is the maximum likely difference between the observed sample mean and the true value of the population mean. When the population mean is unknown, *E* is determined according to the following formula:

$$E = t_{\alpha/2} \frac{SD}{\sqrt{n}},$$

where α is the significance level, n is the number of samples, and $t_{\alpha/2}$ is Student's *t* distribution parameter (it depends of α and n). The significance level used was 0.05. All statistical analyses were performed using Excel 2002 software.

RESULTS

Figures 2a, 3a, and 4a depict the AFM 2D images of CNM at three different resolutions. They show the rough topography formed by projections similar to polyops of polymer material. The irregular surface of the nitrocellulose membrane is evidenced in the height 3D image (Fig. 4a)

The solution used as culture medium (BHI) could be observed at the noninoculated CNM-BHI surface incubated for 24–360 h (Figs. 2b, 3b, 4b, 5a) in the form of globular structures with an average diameter of 500 nm adhered to the CNM. The height 3D image in Figure 4b shows alterations of the membrane irregularity due to the presence of BHI. Details of this structure are shown in the edge enhanced 2D image in Figure 5a. The incubation time did not affect qualitatively the noninoculated CNM-BHI surface (reference blank).

After 24 h of bacterial growth, several *E. faecalis* cells covered the surface of the inoculated CNM-BHI (Figs. 2c, 3c, 4c, 5b). Spheroidal bacterial cells with a smooth surface

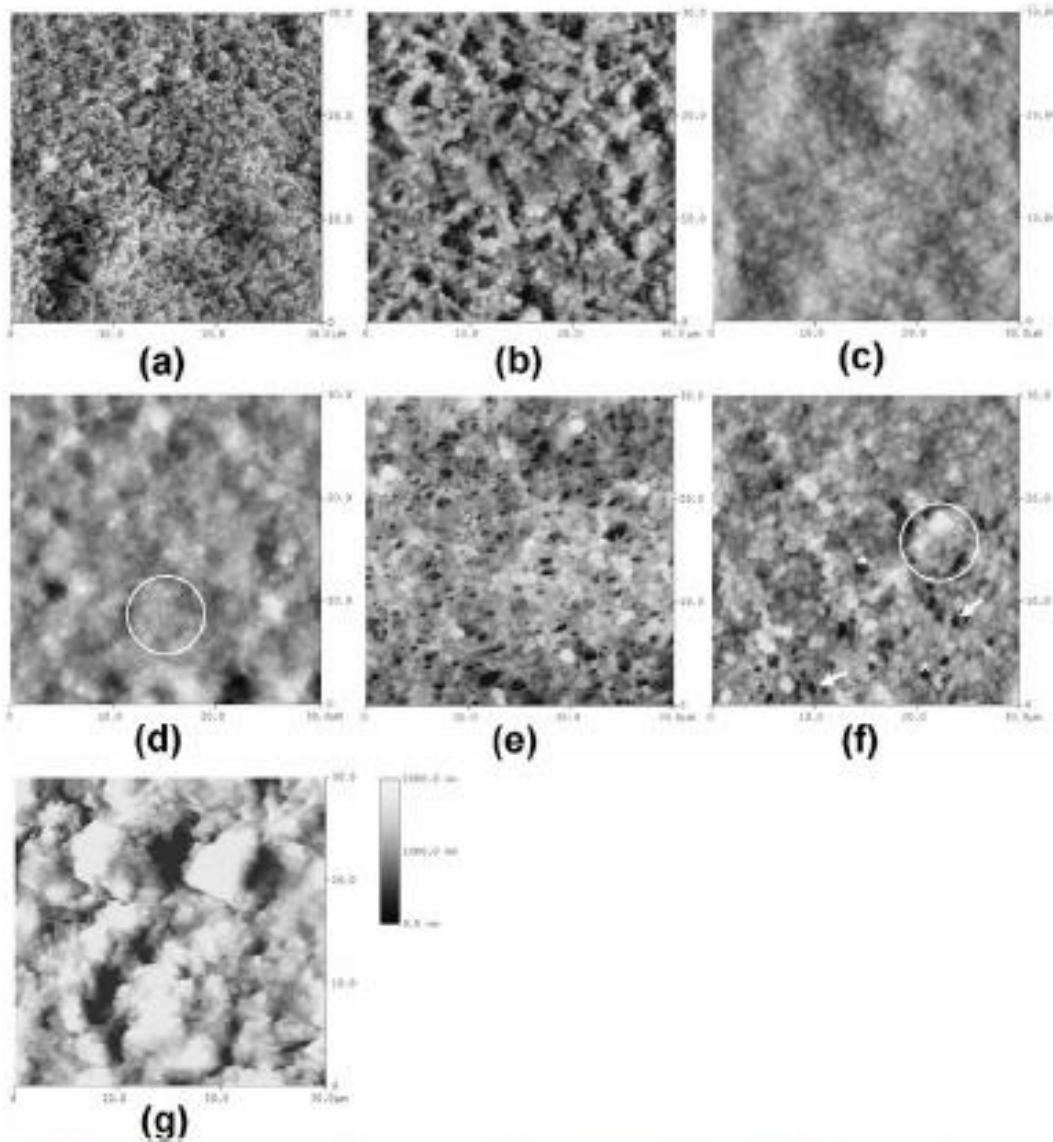


Figure 2. (a) AFM 2D images with scanning of $30 \times 30 \mu\text{m}$ of CNM, (b) noninoculated CNM-BHI after 24–360 h, and inoculated CNM-BHI after (c) 24 h, (d) 36 h, (e) 72 h, (f) 192 h, and (g) 360 h. The circle in d and f indicate the presence of one of the microcolony “islands” on the surface; arrows and asterisks denote the presence of filaments and spaces in the EPS net, respectively. Height scale (color bar): 2000 nm.

in many growth stages and clear distinction of cell borders were observed. The 3D image in Figure 4c shows a decrease in surface irregularity. The edge enhanced 2D image also shows the presence of some transverse septa characteristic of cell division processes (arrows on Fig. 5b). The bacterial cells present topographical differences (size and form) when compared to the BHI globular structures (background).

After 36 h of growth, AFM images of the inoculated membrane were partially obscured due to the presence of EPS (Figs. 2d, 3d, 4d, 5c). Accumulations of cells associated with the formation of microcolonies (circle in Fig. 2d) were also observed. The 3D image shows a higher smoothing of the inoculated CNM-BHI surface (Fig. 4d). Edge enhanced 2D images clearly exhibit the difference of the bacterial cell

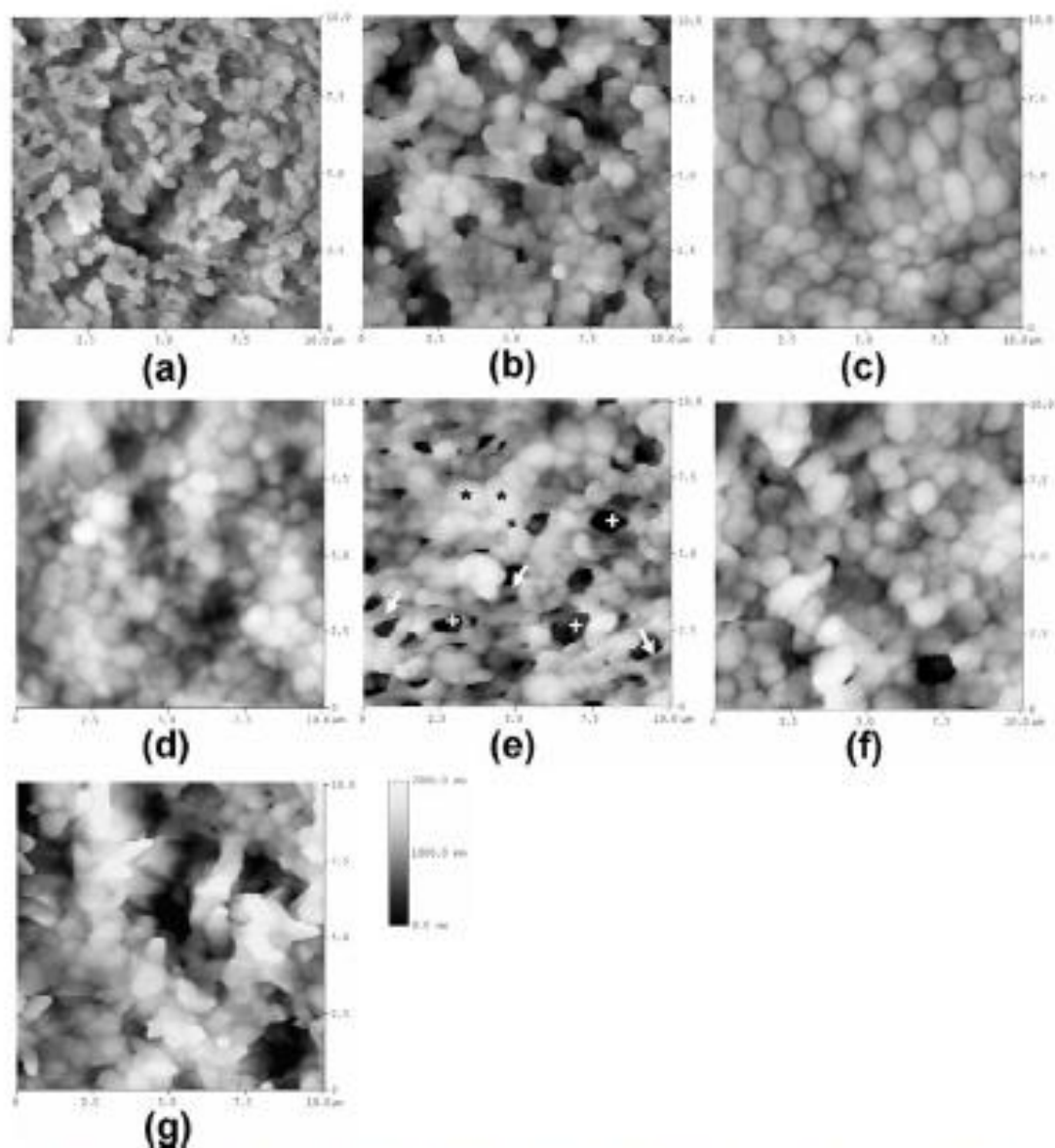


Figure 3. (a) AFM 2D images with scanning of $10 \times 10 \mu\text{m}$ of CNM, (b) noninoculated CNM-BHI after 24–360 h, and inoculated CNM-BHI after (c) 24 h, (d) 36 h, (e) 72 h, (f) 192 h, and (g) 360 h. The asterisks, arrows, and plus signs (e) indicate bacterial cells, filaments, and spaces in the EPS net, respectively. Height scale (color bar): 2000 nm.

surface after 36 h of development (Fig. 5c) when compared to that after 24 h of development (Fig. 5b).

After 72 h of growth, there was an appearance of an EPS net consisting of filaments and spaces that covered cells in earlier stages, that is, before 72 h (Figs. 2e, 3e). Very few bacteria were observed at the surface (asterisks in Figs. 3e and 5d). The presence of filaments (arrows in Fig. 3e point

to some of them) and spaces (plus signs in Fig. 3e) were evident and clearly seen as part of the air-dried biofilm structure. Note that there is an increase in the irregularity of the biofilm surface as compared to the biofilm surface after 36 h of growth (Fig. 4e). The edge enhanced 2D image shows the smooth surface of some bacterial cells in the EPS net (Fig. 5d).

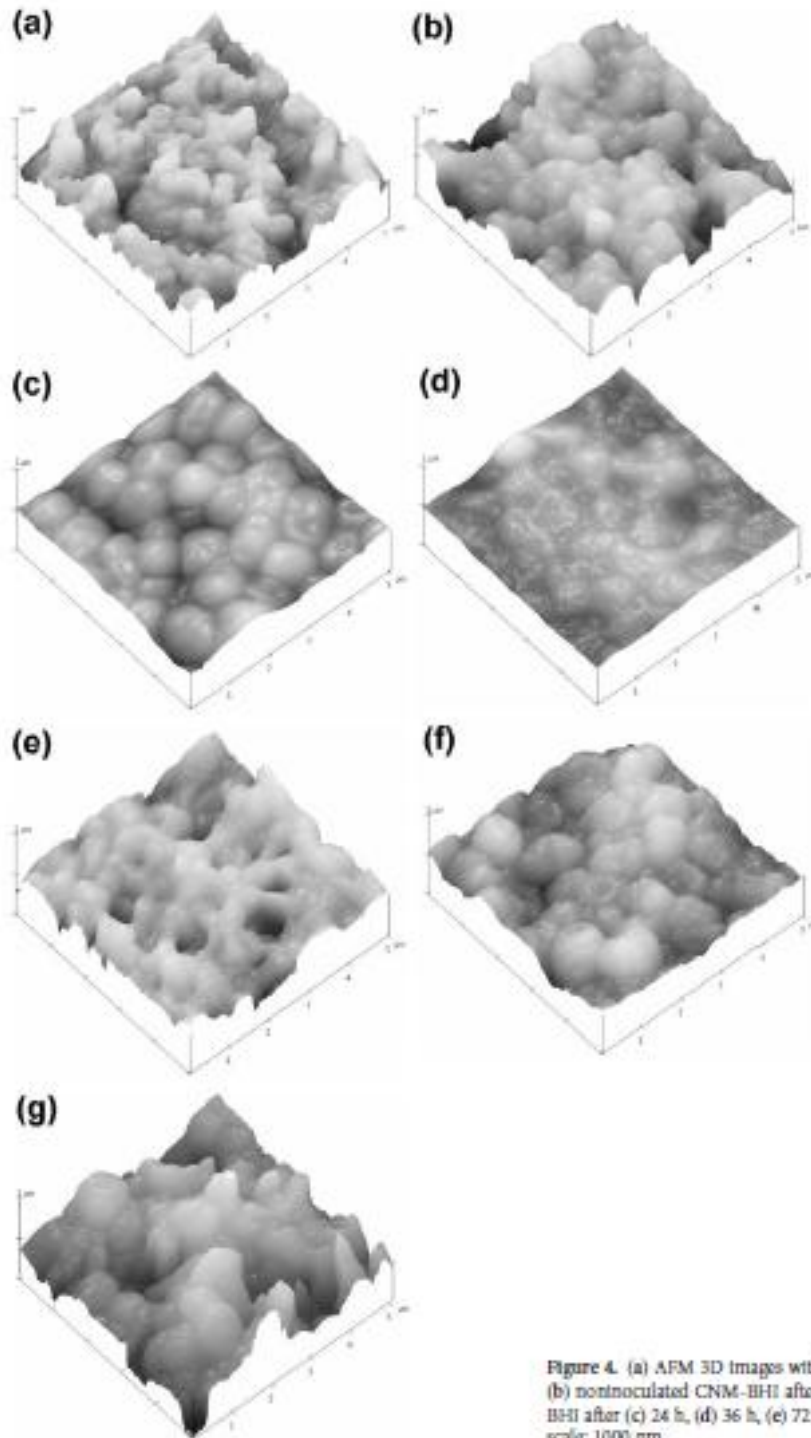
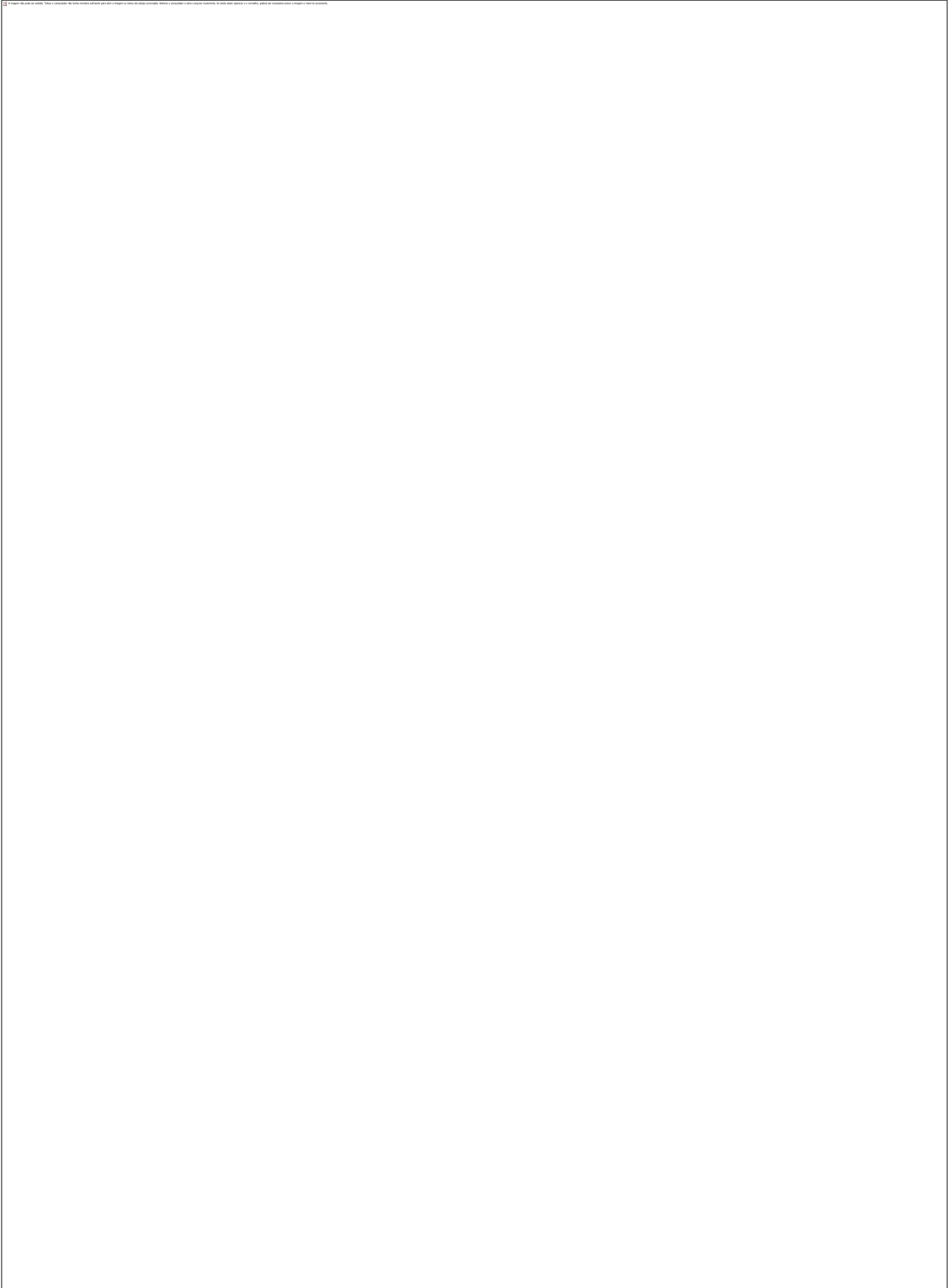


Figure 4. (a) AFM 3D images with scanning of $5 \times 5 \mu\text{m}$ of CNM, (b) noninoculated CNM-BHI after 24–360 h, and inoculated CNM-BHI after (c) 24 h, (d) 36 h, (e) 72 h, (f) 192 h, and (g) 360 h. Height scale: 1000 nm.



© 2000 by the author. This document is the property of the author and is not to be distributed, copied, or reproduced in any form without the author's written permission.

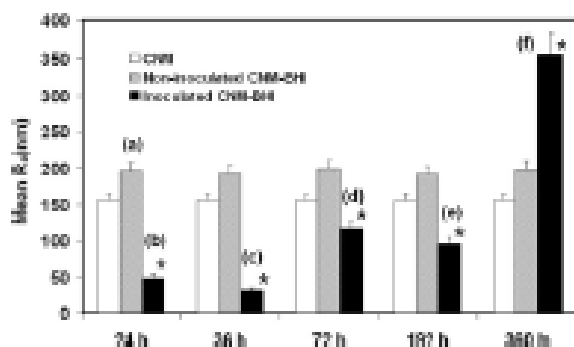


Figure 6. Mean value of R_a (\pm SE) for the surface of CNM, noninoculated CNM-BHI, and inoculated CNM-BHI after 24–360 h. The roughness measurements distinguished the different alterations in the surface topography of nitrocellulose membrane: (a) BHI globular structures adhesion, (b) bacterial adhesion, (c) EPS formation, (d) EPS net, (e) bacterial growth on EPS net, and (f) biofilm growth. The asterisks in the inoculated CNM-BHI bars indicate significant statistical differences in means as compared to each other and to CNM and noninoculated CNM-BHI.

membrane. It is in these regions that bacterial cultures are usually entrenched. In particular, nitrocellulose membranes also show excellent protein-binding characteristics. The microporous structure and protein affinity were responsible for the formation of a complex and organized network of the nutritional medium (BHI) throughout the CNM.

The smooth aspect of the air-dried bacterial cell surface (bacterial S-layer) (Firtel et al., 2004), the clear distinction of the cell borders, and the fact that the transverse septa are so clearly distinguished provide evidence of the reduced amount of EPS over the surface after 24 h of growth. These are the characteristics of the initial stage of biofilm formation, the adhesion phase.

The presence of EPS uniformly distributed, after 36 h, consolidated biofilm formation. The slight reduction in surface roughness (when compared to the one at 24 h of growth) was indicative of a young biofilm and the little influence of the porosity on the irregularity of the biofilm surface. This stage is suggested as corresponding to the maturation of the microcolonies with EPS production.

The EPS net with its filaments and spaces was formed from air-dried EPS on bacterial cells after 72 h. The unobscured surface and well-defined contours of the few bacteria present in it indicated a low amount of EPS over its cell wall (bacterial S-layer). This is a characteristic feature of cells probably originating from those below the extracellular net. The increase in the irregularity of the biofilm surface compared to the biofilm surface after 36 h of growth was due to the spaces present in the EPS net. This phase may represent early stages of biofilm growth.

The cotton ball appearance of bacterial cells after 192 h was due to the great amount of extracellular material depos-

ited over the surface. After 360 h, the biofilm is completely developed and has full potential to grow.

The higher mean R_a values of noninoculated CNM-BHI as compared to that of CNM was due to the presence of globules in the growth medium (BHI); the lower level of inoculated CNM-BHI after 24 h (by 146.75 nm) compared to noninoculated CNM-BHI was due to the presence of bacterial cells on the surface. A decrease of 16.52 nm from inoculated CNM-BHI after 24 to 36 h was due to the formation of EPS, an increase of 85.07 nm from inoculated CNM-BHI after 36 to 72 h was due to the presence of the EPS net, with spaces and filaments, a decrease of 21.80 nm from inoculated CNM-BHI after 72 to 192 h was due to the bacterial growth above the EPS net, and, finally, an increase of 239.58 nm from inoculated CNM-BHI after 192 to 360 h was due to biofilm growth.

Accordingly, the roughness measurements in air can be used to characterize unequivocally the various stages involved in biofilm establishment and its structure:

- 24 h: little or no EPS. Cell borders and septa are distinguishable (roughness represents bacterial disposition on the surface). This is the adhesion phase.
- 36 h: young biofilm consolidated. Bacterial cells are partially obscured (little reduction in roughness on account of EPS formation).
- 72 h: EPS net, with few bacteria at the surface (roughness enhanced because of large amount of spaces all over the net).
- 192 h: establishment of bacterial microcolonies above the EPS net. Cotton-ball-like cells appear as a consequence of EPS deposition over their surfaces (roughness decreases because the spaces are coated with EPS).
- 360 h: EPS-rich biofilm, forming spine-like structures. Impossible to distinguish bacterial cells (expressive roughness enhancement). The biofilm shows its full growth potential.

CONCLUSIONS

Biofilm investigations are very important in modern medicine, because they can have great impact on the treatment of infectious diseases with antibiotics. Bacterial biofilms can be more resistant to antibiotics than the simple culture (Gilbert et al., 1997). Thus, any investigation involving clinical infections caused by bacteria should take into account the formation of biofilm. In this work, we discussed the development of *E. faecalis* biofilm using atomic force microscopy as a tool to characterize its microstructure. We showed that AFM is a powerful and nondestructive technique to perform qualitative studies (height images) as well as quantitative studies (roughness measures) on the evolution of the biofilm surface, permitting a distinction between different developmental stages and topographical structures. This work opens the possibility of studying the effect

of antibacterial agents on biofilm topography, providing relevant data to the treatment of bacterial infection.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the professors, technicians, and students of the Laboratories of Microbiology, Atomic Microscopy (LMA), Science and Technology of Materials (LCTM-UFC), and Biologically Active Molecules (BIOMOL-Lab), of the Federal University of Ceará, CE, Brazil, for the physical infrastructure, technical support, and important suggestions in the elaboration of this work. We also thank the National Council of Research (CNPq) for financial support. Bemildo S. Cavada and Valder N. Freire are senior investigators of CNPq (Brazil). This work received partial financial support from CNPq—Rede Nanobioestruturas 555183/2005-0. Dr. A. Leyva, a native English speaker, provided English editing of the manuscript.

REFERENCES

- ABDULLAH, M., NG, Y.-L., GULABIYALA, K., MOLES, D.R. & SPRATT, D.A. (2005). Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endodon* **31**, 30–36.
- AHIMDU, F., DENIS, F.A., TOUHAMI, A. & DUFRÈNE, Y.F. (2002). Probing microbial cell surface charges by atomic force microscopy. *Langmuir* **18**, 9937–9941.
- AHIMDU, F., SEMMENS, M.J., NOVAK, P.J. & HAUGSTAD, G. (2007). Biofilm cohesiveness measurement using a novel atomic force microscopy methodology. *Appl Environ Microbiol* **73**, 2897–2904.
- ALLISON, D.G., GILBERT, P., LAPPIN-SCOTT, H.M. & WILSON, M. (Eds.). (2000). *Community Structure and Co-operation in Biofilms*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- AUERBACH, I.D., SORENSEN, C., HANSMAN, H.G. & HOLDEN, P.A. (2000). Physical morphology and surface properties of unsaturated *Pseudomonas putida* biofilms. *J Bacteriol* **182**, 3809–3815.
- BEICH, I.B., SMITH, J.R., STEELE, A.A., PENDEAR, I. & CAMPBELL, S.A. (2002). The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. *Colloids Surf Biointer* **23**, 231–247.
- BEVERIDGE, T.J. & GRAHAM, L.L. (1991). Surface layers of bacteria. *Microbiol Rev* **55**, 684–705.
- BINNICI, G., QUATE, C.F. & GREEER, C. (1986). Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* **56**, 930–933.
- BUSTAMANTE, C. & KELLER, D. (1995). Scanning force microscopy in biology. *Phys Today* **48**, 32–38.
- CAMISANO, T.A. & ABU-LAIL, N.I. (2002). Heterogeneity in bacterial surface polysaccharides, probed on single-molecule basis. *Biomacromolecules* **3**, 661–667.
- CAMISANO, T.A., NATAN, M.J. & LOGAN, B.E. (2000). Observation of changes in bacterial cell morphology using tapping mode atomic force microscopy. *Langmuir* **16**, 4563–4572.
- CARNIOL, K. & GILMORE, M.S. (2004). Signal transduction, quorum—Sensing and extracellular protease activity in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *J Bacteriol* **186**, 8161–8163.
- DIGITAL INSTRUMENTS VEeco METROLOGY GROUP. (2001). *Command Reference Manual—Software version 5.12 r3*. Chadds Ford, PA: Digital Instruments Veeco Metrology Group.
- DONLAN, R.M. & COSTERTON, J.W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**, 167–193.
- DUFRÈNE, Y.F. (2002). Atomic force microscopy, a power tool in microbiology. *J Bacteriol* **184**, 5205–5213.
- DUFRÈNE, Y.F. (2004). Refining our perception of bacterial surfaces with the atomic force microscope. *J Bacteriol* **186**, 3283–3285.
- FITTEL, M., HENDERSON, G. & SOKOLOV, I. (2004). Nanosurgery: Observation of peptidoglycan strands in *Lactobacillus heberticus* cell walls. *Ultramicroscopy* **101**, 105–109.
- FISCHETTI, V.A., NOVICK, R.P., FERRETTI, J.J., PORTNOY, D.A. & HOOD, J.L. (Eds.). (2000). *Gram-Positive Pathogens*. Washington, DC: ASM Press.
- GEORGE, S., KISHAN, A. & SONO, K.P. (2005). The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endodon* **31**, 867–872.
- GILBERT, P.J., DAS, J. & FOLEY, L. (1997). Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* **11**, 160–167.
- HANSMAN, H.G. & PIETRASANTA, L. (1998). Atomic force microscopy and other scanning probe microscopes. *Curr Opin Chem Biol* **2**, 579–584.
- JENA, B.P. & HÖRBER, L.K.H. (Eds.). (2002). *Methods in Cell Biology: Atomic Force Microscopy Cell Biology*, vol. 68. London: Cambridge University Press.
- JUNIOR, A.S. & TESCHER, O. (2005). Dynamics of the antimicrobial peptide PGLa action on *Escherichia coli* monitored by atomic force microscopy. *World J Microbiol Biotechnol* **21**, 1103–1110.
- KRISTICH, C.J., LI, Y.-H., CVITKOVITCH, D.G. & DUNSTON, G.M. (2004). Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **186**, 154–163.
- LEHMAN, E.L. (1975). *Nonparametric: Statistical Methods Based on Ranks*. San Francisco: Holden-Day, Inc.
- LINDMAN, H.R. (1974). *Analysis of Variance in Complex Experimental Designs*. San Francisco: W.H. Freeman Company.
- MENDENHALL, W., WACKERLY, D.D. & SCHRAFFER, R.L. (1990). *Mathematical Statistics with Applications*. Boston: PWS-Kent Publishing Company.
- MOHAMMED, J.A., HUANG, W., NALLAPAREDDY, S.R., TENG, F. & MURRAY, B.E. (2004). Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* **72**, 3658–3663.
- MORRIS, V.J., KIRBY, A.R. & GUNNING, A.P. (Eds.). (1999). *Atomic Force Microscopy for Biologists*. London: Imperial College Press.
- O'TOOLE, G. (2003). To build a biofilm. *J Bacteriol* **185**, 2687–2689.
- O'TOOLE, G., KAPLAN, H.B. & KOLTER, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**, 49–79.
- PARISEK, M.R. & FUQUA, C. (2004). Biofilms 2003: Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *J Bacteriol* **186**, 4427–4440.
- PELLETIER, L.L., JR. (1996). Microbiology of the circulatory system. In *Medical Microbiology*, 4th ed., Baron, S., Tenover, R.C., Tenover, D.A., Tenover, M., Kennedy, C.A., Durson Singleton, M.J., Schuenke, S. (Eds.). Galveston, TX: University of Texas Medical Branch.
- RAZATOS, A., ONG, Y., SHARMA, M.M. & GEORGIADIS, G. (1998). Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 11059–11064.
- SATLIS, R.S. (1982). *The Profile as a Random Process: Rough Surfaces*. London: Longman.

Article

Effect of Lectins from *Diocleinae* Subtribe against Oral *Streptococci*

Theodora Thays Arruda Cavalcante ¹, Bruno Anderson Matias da Rocha ¹, Victor Alves Carneiro ¹, Francisco Vassilípe Sousa Arruda ², Antônia Sâmia Fernandes do Nascimento ¹, Nairley Cardoso Sá ³, Kyria Santiago do Nascimento ¹, Benildo Sousa Cavada ¹ and Edson Holanda Teixeira ^{3,*}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine of Sobral, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil; E-Mails: theodorathays@yahoo.com.br (T.T.A.C.); brunoanderson@gmail.com (B.A.M.R.); victorcarneiro@ufc.br (V.A.C.); asamiaf@yahoo.com.br (A.S.F.N.); kyriasantiago@gmail.com (K.S.N.); bscavada@gmail.com (B.S.C.)

² Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), State University of Ceará, 60740-000, Fortaleza, CE, Brazil; E-Mail: vassilípe@gmail.com

³ LIBS, Integrate biomolecules Laboratory, Faculty of Medicine of Sobral, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil; E-Mail: nairleysafirmino@gmail.com

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: edsonlec@gmail.com; Tel: +55-88-3611-8000; Fax: +55-88-3611-2202.

Received: 30 March 2011; in revised form: 20 April 2011 / Accepted: 25 April 2011 /

Published: 27 April 2011

Abstract: Surface colonization is an essential step in biofilm development. The ability of oral pathogens to adhere to tooth surfaces is directly linked with the presence of specific molecules at the bacterial surface that can interact with enamel acquired pellicle ligands. In light of this, the aim of this study was to verify inhibitory and antibiofilm action of lectins from the *Diocleinae* subtribe against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus oralis*. The inhibitory action against planktonic cells was assessed using lectins from *Canavalia ensi formis* (ConA), *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Canavalia maritima* (ConM), *Canavalia gladiata* (CGL) and *Canavalia boliviana* (ConBol). ConBol, ConBr and ConM showed inhibitory activity on *S. mutans* growth. All lectins, except ConA, stimulated significantly the growth of *S. oralis*. To evaluate the effect on biofilm

formation, clarified saliva was added to 96-well, flat-bottomed polystyrene plates, followed by the addition of solutions containing 100 or 200 µg/mL of the selected lectins. ConBol, ConM and ConA inhibited the *S. mutans* biofilms. No effects were found on *S. oralis* biofilms. Structure/function analysis were carried out using bioinformatics tools. The aperture and deepness of the CRD (Carbohydrate Recognition Domain) permit us to distinguish the two groups of *Canavalia* lectins in accordance to their actions against *S. mutans* and *S. oralis*. The results found provide a basis for encouraging the use of plant lectins as biotechnological tools in ecological control and prevention of caries disease.

Keywords: plant lectins; oral *Streptococcus*; biofilm

1. Introduction

Many bacteria in Nature often adopt a sessile biofilm lifestyle attached on surfaces and forming matrix-embedded communities called biofilms that differs greatly from that of other free-living cells [1,2]. Such biological organization provides a sheltered micro environment for the immobilized bacteria [3,4]. Those communities have been implicated in many chronic diseases, such as chronic otitis and tonsillitis, in addition to dental caries and periodontal diseases [5]. Microorganisms form a pathogenic biofilm adhered to dental surfaces, producing acid and cytotoxic products that lead to the demineralization of dental tissues [6,7]. Dental caries is a multifactorial disease, both infectious and transmissible, while demineralizing the dental structure [8]. Factors related to diet, host, microbiota, and time of exposition contributes to caries installation and development. Although the application of good oral hygiene practices and fluoridation are generally considered to be responsible for the continuing decline dental caries in industrialized countries, a significant proportion of the population still suffers from tooth decay [9].

More than 700 bacterial species have been detected in the oral cavity [10], and the presence of pathogenic bacteria in oral biofilms is a major factor associated with dental diseases such as caries and periodontitis [11-13]. For biofilm formation, interactions between bacterial cells and the dental surface have importance for the colonization of the surface at which these communities develop [14]. The first step in this development is the establishment of an acquired enamel pellicle that consists of saliva components, such as proteins, glycoproteins and carbohydrates [15]. The bacteria can interact with the acquired pellicle molecules through a series of specific mechanisms such as lectin interactions involving adhesion between the bacterial surface and the pellicle receptors [16].

Lectins are proteins of non-immune origin that recognize and bind to specific carbohydrate structural epitopes without modifying them [17]. Because of their carbohydrate recognition ability, lectins are involved in several cellular events, beyond symbiotic and pathogenic interaction between microorganisms and hosts [18-20]. Leguminous lectins constitute a wide family of homologous proteins, structurally similar and with distinct carbohydrate specificities. They are the most studied and characterized group of plant lectins [21]. However, leguminous lectins have an essentially similar three-dimensional structure, and high amino acid sequence correspondence, yet they show considerable monomer oligomerization diversity [22,23]. Alterations in the relative orientation of the

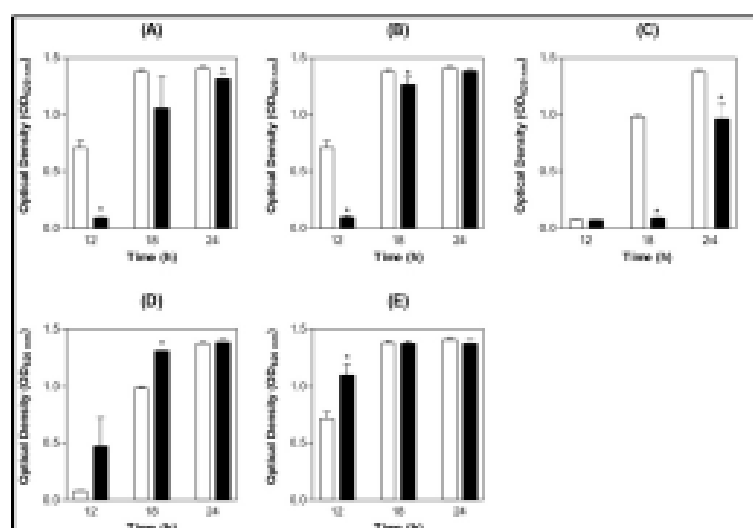
carbohydrate binding sites at the quaternary structure of homologous lectins have been hypothesized as contributing to the differences in biological activity and potency of *Conavaliaeansi formis* and *Conavalia brasiliensis* lectins [24,25].

According with Teixeira and colleagues [26] plant lectins are able to inhibit oral bacteria adherence to enamel acquired pellicles probably through blocking streptococci adhesion. This manner, the aim of this study was to verify the activity of legume lectins from Diocleinae subtribe on *Streptococcus mutans* UA 159 and *Streptococcus oralis* ATCC 10557 during planktonic growth and experimental biofilm formation. The results suggest that lectins have anti-adhesion potential and that they can be explored as a biotechnological tool in studies and also in therapeutics of dental diseases that are closely related to biofilm formation.

2. Results and Discussion

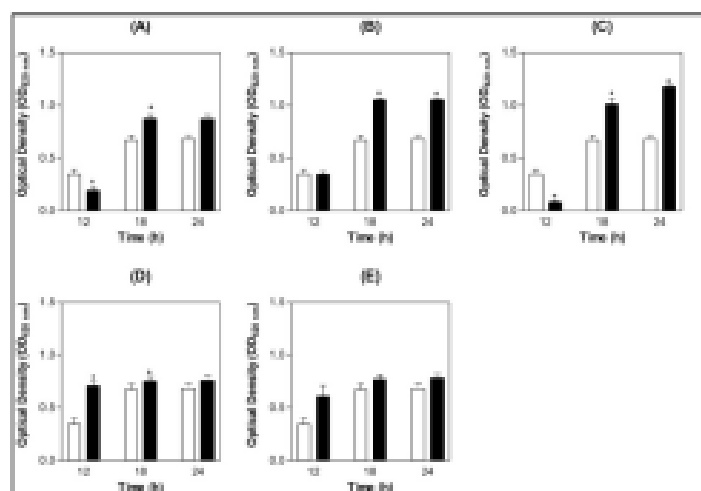
Bacterial growth measurements were made at lectin concentrations ranging from 15.6 to 500 $\mu\text{g/mL}$ and for the control (0.9% NaCl). The concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$ was chosen due to statistical differences from the control. The other concentrations that were assayed, however, did not demonstrate statistically significant differences compared with the control (data not shown). For *S. mutans*, ConBol, ConBr and ConM showed inhibitory activity compared with the control (Figures 1 A, B and C) and CGL and ConA interestingly stimulated the growth of this bacteria compared to the control (Figures 1 D and E).

Figure 1. Bar graph of *S. mutans* at different growth time points under the effect of lectins. (A) ConBol; (B) ConBr; (C) ConM; (D) CGL; (E) ConA. * $p < 0.01$ related to the 0.9% NaCl. (□) 0.9% NaCl (■) Lectin 500 $\mu\text{g/mL}$.



Tests of the same lectins against *S. oralis* showed that ConBol, ConBr and CGL (Figures 2 A, B and D) stimulated bacterial growth compared to the control. ConM showed remarkable growth stimulation (Figure 2 C). When ConA was evaluated no action was seen (Figure 2 E).

Figure 2. Bar graph of *S. oralis* at different growth time points under the effect of lectins. (A) ConBol; (B) ConBr; (C) ConM; (D) CGL; (E) ConA. * $p < 0.01$ related to the 0.9% NaCl. (□) 0.9% NaCl (■) Lectin 500 $\mu\text{g/mL}$.



ConBol and ConA prevented *S. mutans* biofilm formation when the concentration tested was 100 $\mu\text{g/mL}$ and ConM showed the same effect even at 100 $\mu\text{g/mL}$ as 200 $\mu\text{g/mL}$ (Figures 3 A, C and E). No effects were found when ConBr and CGL were tested (Figures 3 B and D). No inhibition or stimulation effects were found on *S. oralis* biofilms (Figures 4 A to E). All statistical analyses were made comparing to a BSA control.

Figure 3. Bar graph of *S. mutans* biofilm content at different growth times under the effect of lectins. The control was Bovine Serum Albumin (BSA) 200 $\mu\text{g/mL}$. (A) ConBol; (B) ConBr; (C) ConM; (D) CGL; (E) ConA. * $p < 0.01$ related to the BSA 200 $\mu\text{g/mL}$. Legend: (□) BSA 200 $\mu\text{g/mL}$ (▨) Lectin 100 $\mu\text{g/mL}$ (■) Lectin 200 $\mu\text{g/mL}$.

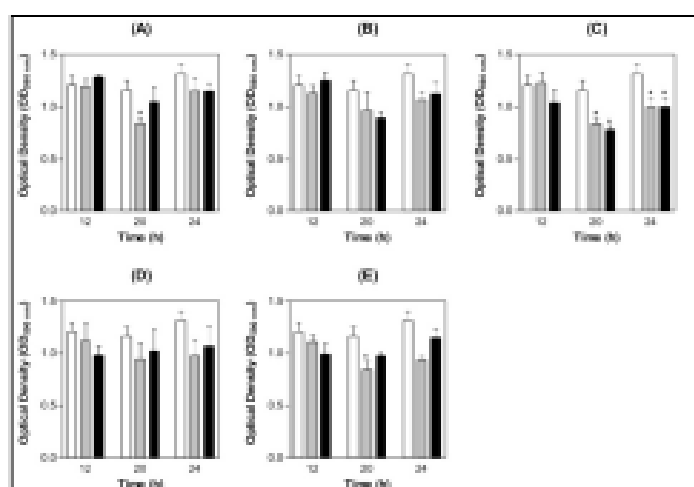
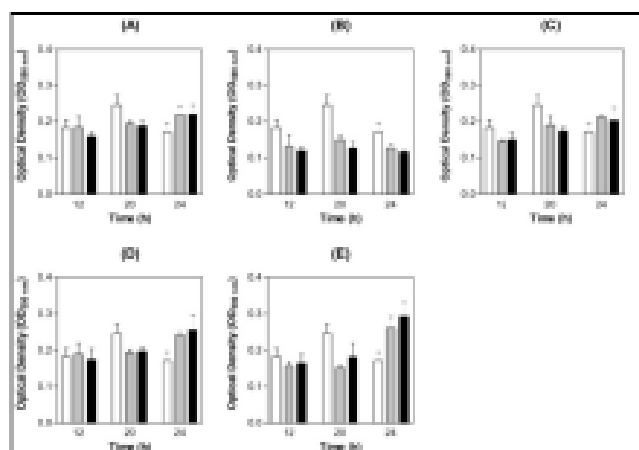
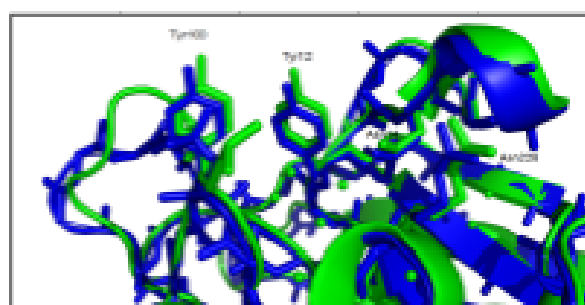


Figure 4. Bar graph of *S. oralis* biofilm content at different growth times under the effect of lectins. The control was Bovine Serum Albumin (BSA) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (A) ConBol; (B) ConBr; (C) ConM; (D) CGL; (E) ConA. * $p < 0.01$ related to the BSA 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Legend: (□) BSA 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (▨) Lectin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (■) Lectin 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



The bacteria growth inhibition assays revealed that *S. mutans* was inhibited by ConBol, ConBr, and ConM, while ConA and CGL stimulated the growth of *S. mutans* when compared with the control. The carbohydrate binding site of these lectins is quite similar and diverges slightly from ConA and CGL; this divergence is mainly linked to distances between amino acid side chains which compose the carbohydrate recognition domain. The main difference observed in the CRD (Carbohydrate Recognition Domain) was a reduction of the deepness of the site (Arg228-Tyr12 and Arg228-Asn14) and of the aperture (Tyr100-Tyr12 and Tyr12-Tyr14) (Figure 5). The aperture and deepness of the CRD permit to distinguish two groups of *Canavalia* lectins in accordance to their actions against *S. mutans*: the inhibitory group formed by ConBol, ConBr and ConM and the stimulatory group composed of ConA and CGL.

Figure 5. Comparison between CGL (stimulatory lectin for *S. mutans* - blue) and ConM (inhibitory lectin for *S. mutans* - green) carbohydrate binding sites. The distances between the amino acids side chains can explain the divergent activity caused by the interaction pattern with surface carbohydrates.



The first report of inhibitory action of peptides against microorganisms dates from 1942, and refers to a protein obtained from wheat flour [27]. Lectins in higher plants defend against pathogenic bacteria and fungi by recognizing and immobilizing the infecting microorganisms via binding, thereby preventing their subsequent growth and multiplication [28]. The inhibition of bacteria and fungi by lectins, such as those of the herbaceous *Amaranthus*, has long been known [29].

The present work aimed to assess antibacterial action and inhibition of biofilm formation by leguminous lectins extracted from the *Diocleinae* subtribe. Determination of antimicrobial action following NCCLS guidelines suggested that in the concentrations used and under the conditions stated, only ConBol, ConBr and ConM had interference at 500 µg/mL diminishing *S. mutans* growth. CGL and ConA had a stimulatory effect against this bacterium. However, at the tests of *S. oralis* all lectins, except ConA, had a stimulatory effect at the same concentration, 500 µg/mL.

The concentration used is quite high compared to the concentrations used in similar studies [30-33]. However, Liao and colleagues [30], testing antimicrobial action of plant and marine algae lectins used concentrations ranging from 102 to 800 µg/mL and found that Con A and WGA from land plants did not inhibit any of the vibrios assayed.

Our results showed that ConM was able to interfere in *S. mutans* growth, what can be attributed to cellular membrane damage. Santi-Gadelha and colleagues [31] showed through electron microscopy the presence of pores and severe disruption of the Gram-positive bacteria membrane demonstrating strong antimicrobial activity and pointing a possible mechanism of inhibition of bacterial growth by lectins. This pores formed at the membrane permit outflowing of cellular contents [33,34].

The carbohydrate-binding site at the bacterial surface, probably plays a key role in this antibacterial activity, being responsible for the recognition of bacteria. It is important to note that differences in antimicrobial action between *S. mutans* and *S. oralis* may be due to differences in characteristic carbohydrate surface composition. Almost all microorganisms express surface-exposed carbohydrates. These carbohydrates may be covalently bound, as in glycosylated teichoic acids to peptidoglycan, or non-covalently bound, as in capsular polysaccharides [31,35]. Every surface-exposed carbohydrate is a potential lectin-reactive site. The ability of lectins to form complexes with microbial glycoconjugates has made it to be employed as probes and sorbents for whole cells, mutants, and numerous cellular constituents and metabolites. Microbial receptors for concanavalin A have been described. For example, polyelectrolyte glucosylated teichoic acid found in many Gram-positive bacteria surfaces [35] and neutral polysaccharides produced by members of the genera *Leuconostoc* and *Streptococcus* [31]. The development of high-affinity ligands capable of selectively recognizing a variety of small motifs in different oligosaccharides would be of significant interest as experimental and diagnostic tools for several bacterial infections. The selective binding of certain lectins to bacteria has been proposed for targeted delivery of antimicrobial agents with *C. ansiformis* lectin targeting *Streptococcus sanguis* and *Corynebacterium hoqfmannii* and *Triticum vulgaris* lectin targeting *Streptococcus epidermidis* "in vitro" [36]. This could be a new perspective area for future studies involving the conjugation of lectins and other products with known bactericidal action.

The resident microflora benefits the host by acting as part of the host defences and preventing colonization by exogenous (and often pathogenic) microorganisms, "colonization resistance" [37]. The concept of microbial ecological change as a mechanism to prevent dental change is an important

one [38]. Our results showed that the lectins of *C. boliviana*, *C. brasiliensis* and *C. maritima* had interference effects against *S. mutans*, and a stimulatory effect on *S. oralis* growth.

S. mutans, an acidogenic bacterium, has been associated with the development of tooth decay, through acid production as a result of carbohydrate fermentation [39]. Microorganisms present at the oral cavity like *S. oralis* are numerically important members of the oral microbiota, isolated from all intraoral surfaces and are pioneering organisms involved in primary colonization at dentition [40,41]. Marsh [42], in the "ecological plaque hypothesis", proposed that changes in environmental factors trigger a shift in the balance of the resident microbiota, and this could predispose a site to disease.

One of many molecular mechanisms involved in adherence of bacteria and the development of mixed-species oral biofilms is specific lectin-carbohydrate interactions between bacteria, such as the interaction involved in lactose-sensitive congregations of *Actinomyces* spp. and *Streptococcus* spp. Because of their role in adhesion and agglutination, lectins are considered to be important in both symbiotic and pathogenic interactions between microorganisms and hosts [32]. With the new understanding of oral microbial community interactions, there is now interest in approaches that selectively inhibit oral pathogens, or modulate the microbial composition of dental plaque to control community based microbial pathogenesis [43].

Our results indicate an inhibition on *S. mutans* biofilm formation and not the same effect to *S. oralis*. According to Islam and colleagues, this could be attributed to the surface carbohydrate differences between the bacteria species. Lectins agglutinate bacteria and their presence in the milieu can be exploited to prevent the long-term attachment of the bacteria on to the tooth surface [44]. Liljemark and collaborators [45] showed the effect of bacterial aggregation on the adherence of oral streptococci to acquired pellicle using lectins. Their results suggest that the formation of large aggregates causes a decrease of the number of adherent bacteria and indicates that independent of a certain lectin concentration, its aggregating activity does not oppose to its blocking effect and even helps decrease the number of adherent streptococci. Significant inhibition of bacterial biofilm growth caused by plant lectins was reported before by Islam and colleagues [44], a fact that can be linked to a surface glycoprotein of *S. mutans* of 60 kDa (with mannose and *N*-acetylgalactosamine) that has been known to be involved in saliva and bacterial interaction [46]. The lesser adherence in the presence of glucose/mannose specific lectins could be because of the interaction with this protein [44].

The differences in the pathway of lectin antimicrobial action are related to quaternary assembly but recent crystallographic studies reveal that the specific carbohydrate binding site orientation determines the biological response of many systems to the presence of the lectin [47,48]. The stimulatory effect of *Canavalia* lectins on *S. oralis* might be due the high frequency of neuraminic acid at cell surface [49], which is not specific to binding *Diocleinae* lectins.

The inhibition of *S. mutans* caused by three lectins out of the five tested is structurally confirmed by the comparison of amino acid side chain distances at the carbohydrate recognition domain (mainly the aperture versus the deepness of the site). These aspects also have been reported for ConM and CGL to increase the selectivity of lectins for disaccharides [47,48,50]. The preference of ConBol, ConBr and ConM to bind and inhibit specifically *S. mutans* strain can be explained by the reduction of the primary carbohydrate binding site and the increase of the specificity of these lectins by specific carbohydrate epitopes, which form more complex interaction patterns with the tested lectins despite ConA and CGL presenting larger primary carbohydrate binding sites. Quantitative differences and interaction path can

exist between lectins that recognize the same terminal monosaccharide residues [51]. Beside this, the same lectins can be more specific for complex carbohydrate structures than for monosaccharide residues [52]. Since the mechanisms of action of leguminous lectins on bacteria cells still remains unknown, this study provides new insights on the molecular basis of lectin-bacteria interactions.

3. Experimental

3.1. Bacterial Strains and Growth Conditions

Bacterial species *Streptococcus mutans* UA 159 and *Streptococcus oralis* ATCC 10557 used in this study were obtained from the Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ collection. The strains were kept in BHI (Brain Heart Infusion-Difco) and glycerol 20% at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; for experimental procedures, 100 μL were inoculated in 10 mL of fresh BHI broth and incubated for 18 h, with CO_2 10% at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. After initial activation, the culture was renewed in 10 mL of sterile BHI broth adding 100 μL of inoculum and grown under the same conditions described above.

3.2. Lectin Purification

The lectins from *Canavalia ensiformis* (ConA) [53], *Canavalia brasiliensis* (ConBr) [54], *Canavalia maritima* (ConM) [55], *Canavalia gladiata* (CGL) [56] and *Canavalia boliviana* (ConBol) [57], were obtained at Biologically Active Molecules Laboratory (Biomol - LAB), Department of Biochemistry and Molecular Biology, Science Center, Federal University of Ceará-UFC, according to its respective purification references.

Briefly, mature seeds were collected at Ceará State, Northeast Brazil. The seeds were ground to a fine powder in a coffee mill and then defatted with *n*-hexane. Soluble proteins were extracted at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 4 h by continuous stirring with 0.9% NaCl (1:10 w/v), followed by centrifugation at 10,000 g at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min. The supernatant was applied to a Sephadex G-50 column ($5 \times 25\text{ cm}$), which had been equilibrated with 0.9% NaCl containing 5 mmol/L CaCl_2 and MnCl_2 . The column was then washed with equilibration buffer at a flow rate of 45 mL/h until the effluent absorbance at 280 nm was below 0.05. The bound lectin was eluted with 0.1 mol/L glycine, pH 2.6, dialyzed extensively against distilled water and lyophilized. The affinity chromatography fraction was further purified using an Akta chromatographic system and Mono-Q column ($5 \times 0.5\text{ cm}$) equilibrated with 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.0, and developed with a linear gradient of 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.0, containing 1.0 mol/L NaCl at a flow rate of 1 mL min $^{-1}$ and a slope of 5% NaCl/min. The lectin preparations, recovered in the unbound fraction, were exhaustively dialyzed against distilled water and freeze-dried. The purity of lectins was assessed by SDS-PAGE.

3.3. Effect of Lectins on Bacterial Growth

After cell growth, the culture was centrifuged at 1,500 g for 20 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, washed twice with 0.9% NaCl and then adjusted for a concentration of 10^8 – 10^9 Colony Forming Units (CFU)/mL. The lectin solutions were prepared by 2-fold serial dilution (concentrations ranging from 15.6 to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubated together with the selected adjusted bacteria for 6 h with 10% CO_2 at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,

without culture broth to avoid possible binding of the lectins to available carbohydrate at the medium. This procedure was based on growth curve experiments with these bacteria on 0.9% NaCl observing the time point of cell viability decrease through bacterial plating each 30 min (Data not show). The assay in polystyrene plates was carried out by adding 200 μ L of fresh BHI broth to each well and 4 μ L of the lectin/bacteria suspension previously incubated at each concentration. The samples were made in triplicate with three separated experiments. The control used was 0.9% NaCl, which represents the normal growth of bacteria using the same procedure for bacteria/lectin incubation. When the plates were ready, an initial measurement at OD_{420nm} (Biotrak II Plate Reader—Amersham Biosciences) was carried out to establish a baseline. Other measurements were made after 12, 18 and 24 h of incubation at 37 °C with 10% CO₂.

3.4. Effect of Lectins on *S. mutans* and *S. oralis* Biofilm Formation on Saliva-coated Surface

3.4.1. Saliva Processing

Saliva was collected and processed according to the protocol of Guggenheim and colleagues [58]. Briefly, whole unstimulated saliva was collected for 1 h per day during several days from volunteers that assigned an informed consent term (Ethical Committee Approval number 217-CONEP/CNS/MS) at least 1.5 h after eating, drinking, or tooth cleaning. Saliva samples were collected in sterile 50 mL polypropylene tubes, chilled in an ice bath or frozen at −20 °C. After 500 mL saliva had been collected, it was pooled and centrifuged (30 min, 4 °C, 27,000 g); the supernatant was pasteurized (60 °C, 30 min) and re-centrifuged in sterile tubes. The resulting supernatant was stored into sterile 50 mL polypropylene tubes at −80 °C. The efficiency of the process was assessed by plating processed saliva samples onto BHI agar; after 72 h at 37 °C no CFUs were observed on incubated plates.

3.4.2. Biofilm Assay

For plate mounting 200 μ L of processed saliva was added to each well for 2 h under agitation (MA-420-Marconi orbital shaking incubator board) at 37 °C. Then, the saliva was removed and 200 μ L of lectins solution at 100 or 200 μ g/mL and bovine serum albumin (BSA) control (200 μ g/mL) were added for 2 h at 37 °C. After this period, the solutions were removed from the wells and 200 μ L of a bacterial suspension adjusted to a concentration of 10⁶–10⁸ CFU/mL were placed remaining for 2 h. In sequence, the bacterial solution was removed and 200 μ L of sterile BHI broth was added and the plate incubated at 37 °C, 10% CO₂. Every step of the experimental protocol was followed by washing procedure with 200 μ L of 0.9% NaCl with up and down movements. As control it was used BSA [31] to observe the action of a protein without antimicrobial action on the medium.

After incubation for 12, 20 and 24 h at 37 °C with 10% CO₂, the media was removed from the microtitre plates. The remaining planktonic cells were removed by gentle washing with sterile water. The wells with the adhered biofilms were fixed with formalin (37%, diluted 1:10) plus 2% sodium acetate for 15 min, and stained with 200 μ L of 0.1% crystal violet for 15 min at room temperature. After two rinses with distilled water, remaining (bound) dye was removed with 100 μ L of 95% ethanol. The plates were then placed in agitation for 5 min to allow full release of the dye. The biofilm

formation was then quantified by measuring the optical density at 570 nm by ELISA plate reader (Biotrak II Plate Reader—Amersham Biosciences) [59]. A total of three plates were mounted for each bacterium and different concentration (12, 20 and 24 h of incubation) by experiment. The overall experiment was repeated three times.

3.5. Structure/Function Analysis

Atomic coordinates for the lectins crystal structures from the Protein Data Bank (PDB) were used to compare the carbohydrate binding sites design, and relate them to biological activity. The PDB codes for the proteins used in the analysis were: 1WUV for *Canavalia gladiata* [47], 2CWM for *Canavalia maritima* [50], *Canavalia ensiformis* (PDB code 1JBC) [53], *Canavalia brasiliensis* (PDB code 3JU9) [54] and *Canavalia boliviana* [57]. The structural analyses were performed using PyMol [60].

3.6. Statistical Analysis

The data are presented as means \pm S.E.M and compared using ANOVA and Bonferroni post hoc test. $p < 0.01$ was considered to be statistically significant.

4. Conclusions

Evaluating all plant lectins tested it was observed that ConM was effective in improving *S. oralis* growth and diminishing *S. mutans* biofilm development. This mode of action can lead to a new mode of dental caries control by biological manipulation of dental sites. Substances that can minimize these communities' way of life can emerge as a new possibility for biotechnological therapy for patients with high streptococci numbers by acting as a biological treatment. Our results indicate a new pathway for prevention of caries disease.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) for financial support.

References and Notes

1. Marsh, P.D. Dental plaque: Biological significance of a biofilm and community life-style. *J. Clin. Periodontol.* **2005**, *32*, 7-15.
2. Karunakaran, E.; Biggs, C. Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: An investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, in press.
3. Bowden, G.H.W.; Hamilton, I.R. Survival of oral bacteria. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **1998**, *9*, 54-85.

4. Hall-Stoodley, L.; Costerton, J.W.; Stoodley, P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 95-108.
5. Oppermann, R.V.; Haas, A.N.; Villoria, G.E.; Primo, L.G.; Serra-Negra, J.M.; Ferreira, E.F.; Panmuti, C.M. Proposal for the teaching of the chemical control of supragingival biofilm. *Braz. Oral Res.* **2010**, *1*, 33-36.
6. Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **1999**, *284*, 1318-1322.
7. Marsh, P.D. Dental plaque as a biofilm: The significance of pH in health and caries. *Compend. Contin. Educ. Dent.* **2009**, *30*, 76-78.
8. Fitzgerald, R.J.; Keyes, P.H. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J. Am. Dent. Assoc.* **1960**, *61*, 9-19.
9. Kuramitsu, H.K. Virulence properties of oral bacteria: Impact of molecular biology. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2001**, *3*, 35-36.
10. Kara, D.; Luppens, S.B.I.; van Marle, J.; Ozok, R.; ten Cate, J.M. Microstructural differences between single-species and dual species biofilm of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula* before and after exposure to chlorhexidine. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *271*, 90-97.
11. Wilson, M. Bacterial biofilms and human disease. *Sci. Prog.* **2001**, *84*, 235-254.
12. Marsh, P.D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* **2003**, *149*, 279-294.
13. Shemesh, M.; Tam, A.; Steinberg, D. Differential gene expression profiling of *Streptococcus mutans* cultured under biofilm and planktonic conditions. *Microbiology* **2007**, *153*, 1307-1317.
14. O'toole, G.; Kaplan, H.B.; Kolter, R. Biofilm formation as a microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **2000**, *54*, 49-79.
15. Orstavik, D.; Kraus, F.W.; Henshaw, C. *In vitro* attachment of streptococci to the tooth surface. *Infect. Immun.* **1974**, *9*, 794-800.
16. Sharon, N.; Ofek, I. Safe as mother's milk: Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases. *Glycoconj. J.* **2000**, *17*, 659-664.
17. Bies, C.; Lehr, C.; Woodley, J.F. Lectin-mediated drug targeting: History and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 425-435.
18. Imberty, A.; Varrot, A. Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 567-576.
19. Vydryakova, G.A.; Bondar, V.S. Location of lectin exhibiting specificity for N-acetyl-D-galactosamine in cells of the symbiotic marine bacteria *Photobacterium phosphoreum*. *Biochem. Biophys.* **2008**, *420*, 155-157.
20. Wayman, A.M.; Chen, W.; McEver, R.P.; Zhu, C. Triphasic force dependence of E-selectin/ligand dissociation governs cell rolling under flow. *Biophys. J.* **2010**, *99*, 1166-1174.
21. Sharon, N. Lectins: Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 2753-2764.
22. Chandra, N.R.; Prabu, M.M.; Suguna, K.; Vijayan, M. Structural similarity and functional diversity in proteins containing the legume lectin fold. *Protein Eng.* **2001**, *14*, 857-866.

23. Srinivas, V.R.; Reddy, G.B.; Ahmad, N.; Swaminathan, C.P.; Mitra, N.; Surolia, A. Legume lectin family, the "natural mutants of the quaternary state", provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1527*, 102-111.
24. Sanz-Aparicio, J.; Hermoso, J.; Graneiro, T.B.; Calvete, J.J.; Cavada, B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from concanavalin A. *FEBS Lett.* **1997**, *405*, 114-118.
25. Calvete, J.J.; Thole, H.H.; Raida, M.; Urbanke, C.; Romero, A.; Grangeiro, T.B.; Ramos, M.V.; Almeida da Rocha, I.M.; Guimarães, F.N.; Cavada, B.S. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1430*, 367-375.
26. Teixeira, E.H.; Napimoga, M.H.; Carneiro, V.A.; de Oliveira, T.M.; Cunha, R.M.; Havt, A.; Martins, J.L.; Pinto, V.P.; Gonçalves, R.B.; Cavada, B.S. *In vitro* inhibition of Streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *101*, 111-116.
27. Balls, A.K.; Hale, W.S.; Harris, T.H. A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chem.* **1942**, *19*, 279-288.
28. Etzler, M.E. Distribution and function of plant lectins. In *The Lectins. Properties, Function, and Applications in Biology and Medicine*; Liener, I.E., Sharon, N., Goldstein, I.J., Eds.; Academic Press: Orlando, FL, USA, 1986; pp. 371-435.
29. De Bolle, M.F.; Osborn, R.W.; Goderis, I.J.; Noe, L.; Acland, D.; Hart, C.A.; Torrekens, S.; van Leuven, F.; Broekaert, N.F. Antimicrobial properties from *Mirabilis jalapa* and *Amaranthus caudatus*: Expression, processing, localization and biological activity in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* **1996**, *31*, 993-1008.
30. Liao, W.R.; Lin, J.Y.; Shieh, W.Y.; Jeng, W.L.; Huang, R. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *30*, 433-439.
31. Santi-Gadelha, T.; Gadelha, C.A.A.; Aragão, K.S.; Oliveira, C.C.; Mota, M.R.L.; Gomes, R.C.; Pires, A.F.; Toyama, M.H.; Toyama, D.O.; de Alencar, N.M.N.; David Neil Criddle, D.N.; Ana, A.M.S.; Cavada, B.S. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *350*, 1050-1055.
32. Oliveira, M.R.; Napimoga, M.H.; Cogo, K.; Gonçalves, R.B.; Macedo, M.L.; Freire, M.G.; Groppo, F.C. Inhibition of bacterial adherence to saliva-coated through plant lectins. *J. Oral Sci.* **2007**, *49*, 141-145.
33. Oliveira, M.D.L.; Andrade, C.A.S.; Santos-Magalhães, N.S.; Coelho, L.C.B.B.; Teixeira, J.A.; Carneiro-da-Cunha, M.G.; Correia, M.T.S. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. *Letts. Appl. Microbiol.* **2008**, *46*, 371-376.
34. Terras, F.R.G.; Schoofs, H.M.E.; Thevissen, K.; Osborn, R.W.; Vanderleyden, J.; Cammue, B.P.A.; Broekaert, W.F. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2s albumins and by barley trypsin inhibitors. *Plant Physiol.* **1993**, *103*, 1311-1319.
35. Calderon, A.M.; Buck, G.; Doyle, R.J. Lectin-microorganism Complexes. In *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*; van Driessche, E., Beckmans, S., Bog-Hanse, T.C., Eds.; TEXTOP: Hellerup, Denmark, 1997; Volume 12, ISBN number 87-984583-0-2.
36. Kaszuba, M.; Lyle, I.G.; Jones, M.N. The targeting of lectin bearing liposomes to skin associated bacteria. *Colloid. Surf. B Biointerfaces* **1995**, *4*, 151-158.

37. van der Waaij, D.; Berghuis de Vries, J.M.; van der Wees, J.E.C. Colonisation resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J. Hyg.* **1971**, *69*, 405-411.
38. Caglar, E.; Kargul, B.; Tanboga, I. Bacteriotherapy and probiotics' role on oral health. *Oral Dis.* **2005**, *11*, 131-137.
39. Hamilton, I.R. *Ecological Basis for Dental Caries in Oral Bacterial Ecology: The Molecular Basis*; Kuramitsu, H.K., Ellen, R.P., Eds.; Horizon Scientific Press: Norfolk, UK, 2000; pp. 219-274.
40. Nyvad, B.; Kilian, M. Microflora associated with experimental root surface caries in humans. *Infect. Immun.* **1990**, *58*, 1628-1633.
41. Do, T.; Jolley, K.A.; Maiden, M.C.J.; Gilbert, S.C.; Douglas, C.; Wade, W.G.; Beighton, D. Population structure of *Streptococcus oralis*. *Microbiology* **2009**, *155*, 2593-2602.
42. Marsh, P.D. Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque. *Proc. Finn. Dent. Soc.* **1991**, *87*, 515-525.
43. He, X.; Lux, R.; Kuramitsu, H.K.; Anderson, M.H.; Shi, W. Achieving probiotic effects via modulating oral microbial ecology. *Adv. Dent. Res.* **2009**, *21*, 53-56.
44. Islam, B.; Khan, S.N.; Naeem, A.; Sharma, V.; Khan, A.U. Novel effect of plant lectins on the inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on saliva-coated surface. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *106*, 1682-1689.
45. Liljemark, W.F.; Bloomquist, C.G.; Germaine, G.R. Effect of bacterial aggregation on the adherence of oral streptococci to hydroxiapatite. *Infect. Immun.* **1981**, *31*, 935-941.
46. Chia, J.S.; Chang, L.Y.; Shun, C.T.; Chang, Y.Y.; Tsay, Y.G.; Chen, J.Y. A 60-kilodalton immunodominant glycoprotein is essential for cell wall integrity and the maintenance of cell shape in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 6987-6998.
47. Delatorre, P.; Rocha, B.A.M.; Souza, E.P.; Oliveira, T.M.; Bezerra, G.A.; Moreno, F.B.; Freitas, B.T.; Santi-Gadelha, T.A.; Sampaio, H.; De Azevedo Junior, W.F.; Cavada, B.S. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: New structural insights for old molecules. *BMC Struct. Biol.* **2007**, *7*, 52.
48. Bezerra, G.A.; Oliveira, T.M.; Moreno, F.B.; de Souza, E.P.; da Rocha, B.A.; Benevides, R.G.; Delatorre, P.; de Azevedo, W.F., Jr.; Cavada, B.S. Structural analysis of *Canavalia maritima* and *Canavalia gladiata* lectins complexed with different dimannosides: New insights into the understanding of the structure-biological activity relationship in legume lectins. *J. Struct. Biol.* **2007**, *160*, 168-176.
49. Byers, H.L.; Homer, K.A.; Tarelli, E.; Beighton, D. N-acetylneuraminic acid transport by *Streptococcus oralis* strain AR3. *J. Med. Microbiol.* **1999**, *48*, 375-381.
50. Gadelha, C.A.A.; Moreno, F.B.M.B.; Santi-Gadelha, T.; Cajazeiras, J.B.; Rocha, B.A.M.; Assreuy, A.M.S.; Mota, M.R.L.; Pinto, N.V.; Meireles, A.V.P.; Freitas, B.T.; Canduri, F.; Souza, E.P.; Delatorre, P.; Criddle, D.N.; De Azevedo, W.F., Jr.; Cavada, B.S. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. *J. Struct. Biol.* **2005**, *152*, 185-194.
51. Wu, A.M. Carbohydrate structural units in glycoproteins and polysaccharides as important ligands for Gal and GalNAc reactive lectins. *J. Biomed. Sci.* **2003**, *10*, 676-688.

52. Wu, A.M.; Lisowska, E.; Duk, M.; Yang, Z. Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconj. J.* **2009**, *26*, 899-913.
53. Sumner, J.B.; Howell, S.F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. *J. Bacteriol.* **1936**, *32*, 227-237.
54. Moreira, R.A.; Cavada, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterisation and behaviour during germination. *Biol. Plant.* **1984**, *26*, 113-120.
55. Perez, G.; Perez, C.; Cavada, B.S.; Moreira, R.; Richardson, M. Comparison of the amino acid sequences of the lectins from seeds of *Dioclea lehmanni* and *Canavalia maritima*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2619-2621.
56. Moreno, F.B.M.B.; Delatorre, P.; Freitas, B.T.; Rocha, B.A.M.; Souza, E.P.; Faco, F.; Canduri, F.; Cardoso, A.L.H.; Freire, V.N.; Lima, J.L.; *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lectin from *Canavalia gladiata* seeds. *Acta Cryst.* **2004**, *60*, 1493-1495.
57. Moura T.R.; Bezerra, G.A.; Bezerra, M.J.B.; Teixeira, C.S.; Bezerra, E.H.S.; Benevides, R.G.; Rocha, B.A.M.; Souza, L.A.G.; Delatorre, P.; Nagano, C.S.; Cavada, B.S. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lectin from *Canavalia boliviana* Piper seeds. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2009**, *65*, 213-215.
58. Guggenheim, B.; Giertsen, W.; Schupbach, P.; Shapiro, S. Validation of an *in vitro* biofilm model of supragingival plaque. *J. Dent. Res.* **2001**, *80*, 363-370.
59. O'Toole, G.A.; Kolter, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **1998**, *30*, 295-304.
60. DeLano, W.L. *The PyMOL Molecular Graphics System*; DeLano Scientific: San Carlos, CA, USA, 2002.

Sample Availability: Contact the authors.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Lectins as Biomarkers of Oral Cavity Tumors: Literature Review

Lectinas como Biomarcadores de Tumores de Cavidade Oral: uma Revisão de Literatura

Lectinas como Biomarcadores de Tumores de la Cavidad Oral: Revisión de la Literatura

Bruno Rocha da Silva¹, Francisco Vassilige de Sousa Arruda², Victor Alves Carneiro³, Theodora Theys Arruda Cavalcante⁴, Andréia Silveira Walter de Aguiar⁵, Kyria Santiago do Nascimento⁶, Benilda Sousa Cavada⁷, Edson Holanda Teixeira⁸

Abstract

Introduction: With the development of cancer research, a peculiar group of proteins has become the subject of great attention, namely the lectins. These proteins have the ability to bind reversibly to carbohydrates with high specificity. Because of changes in cell surface glycoprotein patterns during tumor formation, lectins have an important potential role as biomarkers of neoplastic cells. **Objective:** To review the literature available regarding the use of lectins as biomarkers of premalignant and neoplastic lesions, with a focus on oral cavity tumors, and to assess which groups of lectins and oral lesions have been most widely studied, with the final goal of providing a profile of publications in the field. **Methods:** Articles were searched in the Science Direct, PubMed, and BVS databases. Inclusion criteria were: publication between 1981 and 2010; keywords "lectin" AND "binding" AND "oral" AND "tumor"; and English abstract. A total of 108 articles were selected. Articles were assessed and classified according to predetermined categories, especially number/types of lesion and number/types of lectin analyzed. Results were assessed using the chi-square test. **Results:** An increase throughout the years was observed in the number of articles studying the use of lectins as tumor biomarkers. Squamous cell carcinoma and *Ameloblastoma* (PNA) were the lesion and lectin more frequently assessed, respectively. **Conclusions:** It is possible to conclude that the use of lectins as a therapeutic tool in cancer research has been increasing in importance, probably as a result of its wide applicability, versatility, and reliability.

Key words: Medical Oncology; Lectins; Mouth Neoplasms

¹Cirurgião-Dentista. Mestrando em Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral, Sobral (CE), Brasil. E-mail: brunorocha747@gmail.com.

²Biólogo. Doutorando em Biotecnologia. Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE), Brasil. E-mail: vassilige@gmail.com.

³Biólogo. Doutor em Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE), Brasil. E-mail: victorcarneiro@ufc.br.

⁴Cirurgião-Dentista. Doutoranda em Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE), Brasil. E-mail: theodoratheys@gmail.com.

⁵Cirurgião-Dentista. Doutor em Odontologia. Departamento de Clínica Odontológica da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE), Brasil. E-mail: andrea.aguiar@ufc.br.

⁶Engenheira de Pesca. Pós-Doutor em Biotecnologia. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE), Brasil. E-mail: kyriasantiago@gmail.com.

⁷Engenheiro Agrônomo. Pós-Doutor em Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE), Brasil. E-mail: bcavada@ufc.br.

⁸Cirurgião-Dentista. Doutor em Bioquímica. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará - Campus Sobral, Sobral (CE), Brasil. E-mail: edson@ufc.br.
Autor for Correspondence: Edson Holanda Teixeira, Ph.D. Medicine School, Federal University of Ceará, Rua Geraldo Rangel, 100 - Campus do Derby, Sobral (CE), Brazil. CEP: 62041-040. E-mail: Edson@ufc.br.

INTRODUCTION

Malignant tumors of the oral cavity represent a major public health concern, especially in view of the increasing incidence and prevalence rates observed along the last few years¹. Parkin et al. (1999) estimated about 210,000 new cases per year worldwide². In Brazil, a total of 14,120 new cases of malignant tumors of the oral cavity have been estimated for the year 2010³.

Motivated by this scenario, several studies have been conducted to investigate oral cavity malignancies, with a particular focus on cell differentiation (formation process) and cell identification methods. In particular, some studies have shown that the process of malignancy is associated with a variety of changes in cell surface carbohydrate expression, not to mention the role played by carbohydrates in determining the metastatic capabilities of neoplastic cells^{4,5}.

Nangia-Makker et al. (2002) reported that developing cancer cells use the functional groups of carbohydrate molecules to avoid being recognized by immune cells⁶. During metastasis formation, carbohydrates are involved in interactions between tumor cells, between tumor cells and the extracellular membrane, or between tumor cells and endothelial cells⁷. However, due to the structural complexity of carbohydrates and the scarce knowledge currently available in the field of glycobiology, a better understanding of this mechanism is not yet possible^{8,9,10}.

In an attempt to overcome these difficulties and to better understand the process of malignancy, a unique group of proteins, namely the lectins, has become the subject of special attention. Lectins are proteins of nonimmune origin comprised by several structures that have the ability to bind reversibly to carbohydrates, recognizing and agglutinating specific oligosaccharides or glycoconjugates⁴. Due to these specific features, lectins have been widely used in different biological and medical applications. In immunohistochemical examinations, for example, lectins recognizing different carbohydrates may provide a detection system sensitive to changes in glycosylation and carbohydrate expression at different stages of disease onset/progression, including embryogenesis, growth, and cellular pathology⁴. In addition, studies in the field of tumor lectinology have been able to identify differences between normal tissue and tumor cells in brain¹¹, breast¹², and oral cancer¹³.

The high number of lectins so far submitted to individual investigation has opened a wide variety of possibilities of studies involving these proteins. In order to facilitate and guide future studies designed to investigate the role of lectins as biomarkers of oral cavity tumors, a review of the current literature becomes extremely useful, with a focus on which lectins have already been studied

and which lesions have already been assessed in association with such lectins.

The objective of this study was to review the literature available on the use of lectins as biomarkers of premalignant and neoplastic lesions, with a focus on oral cavity tumors, and to assess which groups of lectins and which groups of oral lesions have been most widely studied, with the final goal of providing a profile of publications in the field.

METHOD

SAMPLE DELIMITATION

The following Brazilian and international journal databases were reviewed: Science Direct, PubMed and BVS (Biblioteca Virtual em Saúde). Selection of these databases was based on the wide range of journals covered by each of them and on our goal to provide an overview of the scientific production devoted to the topic over the long timeframe under analysis.

The following inclusion criteria were considered during the review: a) articles published between January 1981 and June 2010; b) presence of the keywords "lectin" AND "binding" AND "oral" AND "tumor," entered in to the advanced search form; and c) availability of an abstract in English. A total of 108 articles were selected.

SAMPLE CLASSIFICATION

All the 108 abstracts were read and assessed to determine the classification of articles for subsequent quantitative analysis. In cases where the abstract was not enough to allow classification, the full article was read. Each article was classified according to the following attributes: title of article, year of publication (subcategories [quintenniums]: first period, 1981 to 1985; second period, 1986 to 1990; third period, 1991 to 1995; fourth period, 1996 to 2000; fifth period, 2001 to 2005; sixth period, 2006 to 2010), journal name, language of publication, number and types of lesion assessed; and number and types of lectin analyzed in the study. Lesions were classified according to the World Health Organization (WHO)¹⁴ classification for oral cavity diseases; lectins were classified both in terms of kingdom (animal vs. vegetable) and family/group, based on the classifications of Peumans and Van Damme¹⁵ and Varki¹⁶.

STATISTICAL ANALYSIS

Data were entered into Microsoft Excel 2007 spreadsheets and systematically transferred to the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 17.0 for statistical analysis. Frequency distribution calculations were used to assess general sample characteristics, to investigate possible spelling errors in the raw data, and

to obtain an overview of the use of lectins as biomarkers of oral cavity tumors.

RESULTS

STUDIES DISTRIBUTION OVER THE YEARS

Analysis of the distribution of publications over the different quinquenniums revealed a large concentration of studies in the first period (1981 to 1985, 26 studies), followed by a significant decrease in the second period (1986 to 1990, 10 studies). In the fifth period (2001 to 2005), a return to early patterns was observed, with a total of 24 publications (Table 1).

Figure 1 shows the same distribution of studies, however divided into plant vs. animal lectins. It is possible to observe that up to the third period assessed (1981-1995), 100% of the publications focused on plant lectins, whereas studies using animal lectins started to be conducted as of 1996 and accounted for the majority of studies in the two last periods assessed (6 animal vs. 11 plant lectins in the fourth period, 17 vs. 9 in the fifth, and 16 animal vs. 4 plant lectins in the sixth period assessed) (Figure 1).

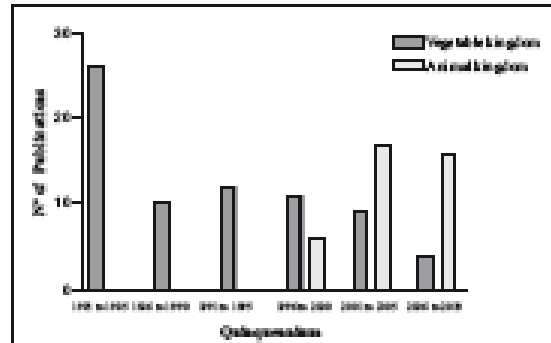


Figure 1. Distribution of publications according to kingdom of the lectin analyzed, by quinquennium

LANGUAGE OF PUBLICATION

Most of the articles reviewed were written in English (91 articles, 84.3%), followed by German (7, 6.5%), Japanese (5, 4.6%), Chinese (4, 3.7%), and French (only 1 article, 0.9%).

NUMBER OF LESIONS AND LECTINS ANALYZED

Of the total of 108 studies, 47 (43.5%) analyzed only one lectin, 29 (26.9%) analyzed two, 15 (13.9%) analyzed three, and only 17 studies (15.7%) analyzed four or more lectins. In addition, 86 articles (79.6%) investigated one type of lesion, 14 (13%) investigated two lesions, and 8 articles (7.4%) investigated three or more types of lesions.

EVALUATION OF STUDIED LESIONS AND LECTINS

The list of lectins and types of lesions analyzed and the respective absolute and relative frequencies are shown in Tables 2 and 3. Among the lesions assessed, there was a predominance of malignant lesions (63.6%), followed by benign lesions (21.4%).

Figure 2 shows the distribution of lesions in the different quinquenniums assessed. It is possible to observe that both malignant and benign neoplasms showed a similar distribution, whereas premalignant lesions showed an important decline in the sixth/last period assessed, in which no study was found.

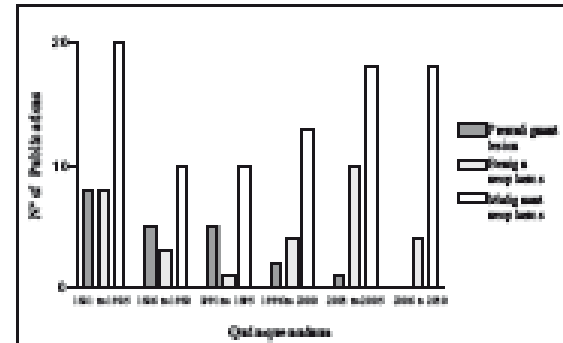


Figure 2. Distribution of the analyzed lesions according to the WHO classification, by quinquennium

Table 1. Distribution of publications from 1981 to 2010, by quinquennium

	Absolute value (n)	Relative value (%)	Cumulative relative frequency (%)
1981 to 1985	26	24.1	24.1
1986 to 1990	10	9.3	33.3
1991 to 1995	12	11.1	44.4
1996 to 2000	16	14.8	59.3
2001 to 2005	24	22.2	81.5
2006 to 2010	20	18.5	100
Total	108	100	

In order to better assess the profile of publications, the distribution of lectins analyzed was assessed in relation to the three major groups of lesions covered by the studies (Table 4). This analysis revealed that the two lectins most commonly present in all three groups of lesions were *Arachis hypogaea* (PNA) and *Ulex europaeus* 1 (UEA-1), both of vegetable origin. Moreover, in the groups of benign and malignant neoplasms, the animal lectin Galectin 3 ranked fourth among the most frequently analyzed lectins, contrasting with a predominance of plant lectins found in these groups. Conversely, in the group of

pre-malignant lesions, animal lectins were virtually absent (only one study analyzing Selectin E).

Finally, the analysis of association between lectins and the most prevalent lesions in each group (leukoplakia among pre-malignant lesions, pleomorphic adenoma among benign neoplasms, and squamous cell carcinoma among malignant neoplasms) revealed a predominant association between studies assessing pleomorphic adenomas and analyzing *Concanavalin* A (ConA) (five studies) rather than PNA, which belongs to the same group; all other lesions were associated with lectins representative of their groups of origin (Table 5).

Table 2. Lectins analyzed in the articles reviewed*

	Absolute value (n)	Relative value (%)	Cumulative relative frequency (%)
Plant lectins			
<i>Arachis hypogaea</i> (PNA)	41	16.5	16.5
<i>Concanavalin</i> A (ConA)	27	10.9	27.4
<i>Dolichos biflorus</i> (DBA)	9	3.6	31
<i>Triticum vulgare</i> (WGA)	24	9.7	40.7
<i>Glycine max</i> (SBA)	14	5.6	46.3
<i>Griffonia simplicifolia</i> B4 (GS 1 B4)	3	1.2	47.5
<i>Helix pomatia</i> (HPA)	3	1.2	48.7
<i>Anticarpus heterophyllus</i> (JFL)	8	3.2	51.9
<i>Lotus tetragonolobus</i> (LTA)	2	0.8	52.7
<i>Maackia amurensis</i> (MAA)	1	0.4	53.1
<i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA)	1	0.4	53.5
<i>Pisum sativum</i> (PSA)	2	0.8	54.3
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i> (WBA)	2	0.8	55.1
<i>Ricinus communis</i> (RCA)	15	6	61.1
<i>Sambucus nigra</i> (SNA)	1	0.4	61.5
<i>Ulex europaeus</i> 1 (UEA-1)	40	16.1	77.6
<i>Vicia villosa</i> B4 (VVA-B4)	2	0.8	78.4
Animal lectins			
Aggrecan	3	1.2	79.6
Galectin 1	13	5.2	84.8
Galectin 3	19	7.7	92.5
Galectin 7	8	3.2	95.7
Galectin 8	3	1.2	96.9
Galectin 9	2	0.8	97.7
Selectin E	4	1.9	99.6
Yerican	1	0.4	100
Total	248	100	

* Note that one lectin was assessed in some articles, therefore the total number of lectins analyzed exceeds the total number of studies reviewed.

Table 3. Lesions assessed (WHO classification) in the articles reviewed *

	Absolute value (n)	Relative value (%)	Cumulative relative frequency (%)
Malignant neoplasms			
Low-grade adenocarcinoma	13	9.3	9.3
Adenosquamous carcinoma	1	0.7	10
Adenoid cystic carcinoma	10	7.1	17.1
Squamous cell carcinoma	57	40.7	57.8
Mucoepidermoid carcinoma	4	2.9	60.7
Verrucous carcinoma	2	1.4	62.1
Osteosarcoma	1	0.7	62.8
Kaposi's sarcoma	1	0.7	63.5
Benign neoplasms			
Pleomorphic adenoma	14	10	73.5
Ameloblastoma	2	1.4	74.9
Hemangioma	1	0.7	75.6
Papilloma	5	3.6	79.2
Giant cell tumor	2	1.4	80.6
Warthin's tumor	6	4.3	84.9
Premalignant lesions			
Oral submucous fibrosis	2	1.4	86.3
Atypical hyperplasia	1	0.7	87
Leukoplakia	18	13	100
Total	140	100	

*More than one lesion was assessed in some articles, therefore the total number of lesions assessed exceeds the total number of studies reviewed.

Table 4. Distribution of lectins according to the type of lesion assessed (WHO classification) in the articles reviewed

	Lectins analyzed																				Total					
	Aggrecan	Avalisil hyaline (PNA)	Concanavalin A (ConA)	Dalmanella trifloris (DBA)	Gal lectin I	Gal lectin II	Gal lectin III	Gal lectin IV	Gal lectin V	Triticum vulgare (TBA)	Gal galactose (TBA)	Galactin complex (G) (G2, G3, G4)	Naja perennis (NPA)	Artemisa lateralis (PL)	Leuco agglutinin (LUA)	Mucilago arvensis (MAA)	Musselid vulgare (PMA)	Phaseolus vulgaris (PVA)	Phaseolus leopoldinus (PLA)	Milvina communis (MCA)		Sambucus nigra (SMA)	Seselin E	Ulex europaeus (UEA-I)	Ulex europaeus (UEA-II)	
Premalignant lesions	N	0	13	7	2	0	0	0	0	0	9	3	2	2	4	1	0	0	2	3	0	1	12	0	0	61
	%	0	3.8	2.1	0.6	0	0	0	0	0	2.7	0.9	0.6	0.6	1.2	0.3	0	0	0.6	0.9	0	0.3	3.6	0	0	10.2
Benign neoplasms	N	1	12	11	4	5	9	3	2	1	7	6	1	2	2	0	0	0	0	6	0	1	12	0	0	85
	%	0.3	3.6	3.3	1.2	1.5	2.7	0.9	0.6	0.3	2.1	1.8	0.3	0.6	0.6	0	0	0	0	1.8	0	0.3	3.6	0	0	25.3
Malignant neoplasms	N	2	29	19	5	12	17	4	1	1	16	10	3	2	8	2	1	2	3	12	1	4	31	1	2	189
	%	0.6	8.7	5.8	1.5	3.6	5.1	1.2	0.3	0.3	4.8	3	0.9	0.6	2.4	0.6	0.3	0.6	0.9	3.6	0.3	1.2	9.3	0.3	0.6	56.5
Total	N	3	54	37	11	17	26	7	3	2	32	19	6	6	14	3	1	2	5	21	1	6	55	1	2	335
	%	0.9	16.1	11.0	3.3	5.1	7.8	2.1	0.9	0.6	9.6	5.7	1.8	1.8	4.2	0.9	0.3	0.6	1.5	6.3	0.3	1.8	16.4	0.3	0.6	100.0

Table 3. Distribution of lectins according to the most prevalent lesions in each group

	Lectins analyzed																				Total					
	Agavezin	Arachis hypogaea (AraH)	Concanavalin A (ConA)	Desialin (DSE)	Oleodin I	Oleodin II	Oleodin III	Oleodin IV	Oleodin V	Tribon valgens (TribV)	Oryzae (Ory)	Galactin (Gal)	Galactin (Gal)	Galactin (Gal)	Galactin (Gal)	Galactin (Gal)	Galactin (Gal)	Galactin (Gal)	Galactin (Gal)	Galactin (Gal)						
Leukoplakia	N	0	12	6	2	0	0	0	0	0	0	3	2	2	3	1	0	0	0	1	2	0	1	10	0	53
	%	0	6.1	3.2	1	0	0	0	0	0	4.1	1.5	1	1	1.5	0.5	0	0	0	0.5	1	0	0.5	5.1	0	27
Pleomorphic adenoma	N	1	3	5	0	3	4	1	0	1	2	1	0	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0	5	0	30
	%	0.5	1.5	2.6	0	1.5	2.1	0.5	0	0.5	1	0.5	0	0.5	0.5	0	0	0	0	0	1	0	0	2.6	0	15.3
Squamous cell carcinoma	N	2	10	9	2	9	7	3	1	1	9	3	3	2	7	2	1	1	1	2	5	1	3	20	1	113
	%	1	9.3	4.6	1	4.6	3.6	1.5	0.5	0.5	4.6	1.5	1.5	1	3.6	1	0.5	0.5	0.5	1	2.6	0.5	1.5	10.3	0.5	57.7
Total	N	3	33	20	4	12	11	4	1	2	19	7	5	5	11	3	1	1	1	3	9	1	4	35	1	196
	%	1.5	16.7	10.3	2.1	6.1	5.6	2.1	0.5	1	9.7	3.6	2.6	2.6	5.6	1.5	0.5	0.5	0.5	1.5	4.6	0.5	2.1	17.8	0.5	100.0

DISCUSSION

Several experimental data on different types of malignancies have been published in recent years^{6,8,13,17}. These studies have revealed that the process of malignancy is associated with several changes in cellular glycosylation and that tumor cells show aberrant patterns in relation to carbohydrates attached to glycoproteins and glycolipids¹. In view of this wide range of studies devoted to the study of malignancies and lectins, we felt the need for conducting a review of studies published in the field along the last decades. To the authors' knowledge, no previous review study has focused on lectins, and therefore we strongly believe that our results will provide an up-to-date overview of the topic and will better guide future efforts to improve our understanding of the role of lectins as tumor biomarkers.

Our review revealed a peak of studies on the use of lectins as markers of oral cavity tumors in the years 1981-1985, when the first lectins were isolated and their biological functions had not yet been established. Over subsequent years, the number of publications in the field decreased due to the belief that lectins did not have an important biological role^{6,10,15}. Then, in the second half of the 1990s, with the discovery of animal lectins, a new research field emerged, encouraging authors to investigate the association between the ability of lectins to bind to carbohydrates and the tumor cell differentiation process¹⁶. This historical movement is illustrated in Figure 1.

The variable characteristics of studies found in our review, especially in terms of the numbers and types of lesions and lectins analyzed, hinders the possibility to

conduct comparisons across studies. For example, there were very few studies addressing the role of multiple lectins in one particular type of lesion, or the role of a single lectin in different lesions. As revealed in our review, most studies addressed the role of one lectin in one particular type of lesion, probably as a result of limitations regarding lectin isolation methods, as pointed out by Goto¹⁸.

An interesting feature observed in our review was a decrease in the number of studies assessing premalignant lesions (Figure 2), whereas studies assessing other groups of lesions maintained a pattern similar to the overall findings of the study (Table 1). Caldera¹⁹ had already emphasized that the search for biomarkers that reflect the biological behavior of leukoplakias was necessary to identify predictive characteristics of malignant transformation, thus contributing to a less empirical approach to these lesions.

Among all lesions assessed in the articles submitted to review, the squamous cell carcinoma was the most prevalent one. According to Oliveira et al.²⁰, this is the most common type of malignancy of the oral cavity, responsible for 55-75% of all cancers affecting this region of the face. This finding is in line with the frequencies observed for premalignant lesions in our review, with leukoplakia being the most frequent lesion. Finally, with respect to benign tumors, variable prevalence rates were found. According to Barbosa et al.²¹, for example, pleomorphic adenomas are the most prevalent type of benign neoplasm affecting the oral cavity.

Plant lectinology has evolved extensively in recent decades, in great part due to technological development. In addition, plant lectins are more easy to obtain when

compared to animal lectins, and they can be conveniently purified using simple and efficient methods such as affinity chromatography^{4,14}. Our study confirmed the wide use of plant lectins in the study of tumors, as revealed by the high numbers obtained: 78.6% vs. only 21.4% of animal lectins (Galectin 3 was the animal lectin most frequently assessed). In the group of plant lectins, PNA, UEA-1, and ConA (all leguminous) were the lectins most frequently assessed and associated with different types of lesions.

The *Leguminosae* family of plant lectins has been widely described in the literature, especially because they contain ions Mn²⁺ and Ca²⁺, which are associated with a series of highly conserved amino acids involved in carbohydrate binding processes^{8,9,12,18}. Usually the lectins in the *Leguminosae* family (subfamily *Papilionaceae*) have similar molecular structures, however they can produce patterns of affinity for different carbohydrates, which directly contributes to the identification of tumor biomarkers^{4,10}.

In the study conducted by Sobral et al.⁸, leguminous lectins ConA and UEA-1 were used as histochemical markers of neoplastic glandular tissue with low, intermediate, and high grade dysplasia. The authors found that ConA localization in the cytoplasm and/or plasma membrane was significantly associated with neoplastic cells of all three grades of severity, whereas UEA-1 was associated with low and intermediate grade dysplasia. Similar results were obtained by the authors in the analysis of other cell regions.

In turn, the use of PNA as a tumor biomarker has been the subject of several studies. Pillai et al.¹² assessed the patterns of PNA binding in different types of lesions, including keratinizing and non-keratinizing epithelia of the oral mucosa, dysplastic and non-dysplastic oral leukoplakias, and squamous cell carcinomas. The authors found a high intensity of lectin binding in normal keratinizing tissue, erosive leukoplakias and squamous cell carcinomas at all three differentiation stages assessed.

Mori et al.¹⁷ assessed the use of several lectins as immunohistochemical markers of benign lesions affecting the jaws, including ameloblastomas and dentinogenic ghost cell tumors (GCT). ConA, PNA, and UEA-1 were significantly more present in ameloblastic cells, whereas GCT showed a high rate of binding for UEA-1 only (ConA and PNA presented low binding rates in this type of tissue).

Among animal lectins, galectins stand out because they have a permanent sequence of about 130 amino acids for the recognition of carbohydrates, in addition to a high affinity for beta-galactosides present in both normal and tumor cells. As a result of this lectin-cell interaction property, galectins are involved in several biological processes, such as cell cycle control, immune response, cell adhesion, apoptosis, and metastasis^{4,22-24}.

Galectin 3 can present both nuclear and cytoplasmic immunohistochemical staining. Cytoplasmic staining is associated with the antiapoptotic function of this lectin, thus promoting tumor progression; however, when expressed in the nucleus, the apoptotic function of Galectin 3 is lost²⁴.

Gillenwater et al.²⁵ analyzed the expression of Galectins 1 and 3 in 35 cases of primary squamous cell carcinoma of the head and neck and found that Galectin 1 was usually expressed in the basal layer of adjacent normal tissue, stroma and at the periphery of invasive tumor islands. Galectin 3, in turn, was found in superficial mucosal layers and adjacent to keratin pearls in areas of invasion. The authors concluded that galectins are expressed in the tumor cell surface, where they may participate in cellular interactions, and that the expression pattern of galectins appears to be associated with tumor grade, suggesting a role of galectins as biological markers in squamous cell carcinomas of the head and neck.

The absence of studies investigating the use of animal lectins in leukoplakias was especially interesting (Table 5). However, this finding can be explained by the predominance of studies assessing these lesions in the first three time periods assessed (1981 to 1995), when animal lectins had not yet been discovered.

CONCLUSION

A relatively high number of studies has been conducted to investigate the role of lectins as biomarkers of oral cavity tumors, covering a variety of lesions and lectins. In our review, studies assessing squamous cell carcinomas and PNA and UEA-1 lectins were the most frequent ones, as well as studies focusing on one specific lectin and one lesion. Further analyses of lectins as biomarkers should be undertaken to improve our understanding of the processes involved in malignant tumor formation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank CNPq for fellowship granted to Bruno Rocha da Silva.

CONTRIBUTIONS

Bruno Rocha da Silva - from initial idea to final draft of the work; Francisco Vasiliepe de Sousa Arruda - initial drafting, assistance in literature review and translation process of the article; Victor Alves Carneiro - assistance in literature review, categorization of studies found and translation process of the article; Theodora Thays Arruda Cavalcante - reading and categorization of studies found, final editing and translation process of the article; Andréa Silvia Walter de Aguiar - from initial idea to final draft

Silva BR, Arruda FVS, Carneiro VA, Cavalcante TTA, Aguiar ASW, Nascimento KS, Cavada BS, Teixeira EH

of the work; Kytia Santiago do Nascimento - statistical analysis, review of final drafting and translation of the article; Benildo Sousa Cavada - review of the methodology; statistical analysis and final editing, and translation of the article; Edson Holanda Teixeira - initial idea of the work, review of the methodological process, review of the final draft and the translation process.

Conflicts of Interest: All authors disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) this work.

REFERENCES

1. Leite ICG, Nunes LC, Moreira RC, Couto CA, Teixeira MTB. Mortalidade por câncer de boca e faringe em cidade de médio porte na região sudeste do Brasil, 1980-2005. *Rev bras cancerol.* 2010;56(1):17-23.
2. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer.* 1999;80(6):827-41.
3. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; c2009. 98 p.
4. Chiang WE, Liu SY, Fang LY, Lin CN, Wu MH, Chen YC, et al. Overexpression of galectin-1 at the tumor invasion front is associated with poor prognosis in early-stage oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2008;44(4):325-34.
5. Gordik E, Galili U, Raz A. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2001;20(3-4):245-77.
6. Pusztai A, Bardocz S, Ewen SW. Uses of plant lectins in bioscience and biomedicine. *Front Biosci.* 2008;13:1130-40.
7. Colombo J, Bahal P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. *Rev bras cancerol.* 2009;55(2):165-74.
8. Sobral AP, Rego MJ, Cavalcanti CL, Carvalho Júnior LB, Beltrão EI. ConA and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucosquamous carcinoma. *J Oral Sci.* 2010;52(1):49-54.
9. Nangia-Makker P, Conklin J, Hogan V, Raz A. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. *Trends Mol Med.* 2002;8(4):187-92.
10. Sharon N, Lis H. Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am.* 1993;268(1):82-9.
11. Beltrão EI, Medeiros PL, Rodrigues OG, Figueiredo-Silva J, Valença MM, Coelho LC, et al. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. *Eur J Histochem.* 2003;47(2):139-42.
12. Korourian S, Siegel E, Kieber-Emmons T, Monzavi-Karbassi B. Expression analysis of carbohydrate antigens in ductal carcinoma in situ of the breast by lectin histochemistry. *BMC Cancer.* 2008;8:136.
13. Pillai KR, Remani P, Kannan S, Sujathan K, Mathew B, Vijayakumar T, et al. Lectin histochemistry of oral premalignant and malignant lesions: correlation of JFL and PNA binding pattern with tumour progression. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1996;32B(1):32-7.
14. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005. 430 p. (World Health Organization Classification of Tumours).
15. Peumans WJ, Van Damme EJ. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 1995;109(2):347-52.
16. Varki A. Discovery and classification of animal lectins. In: Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J, editors. *Essentials of glycobiology.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1999. p. 1-51.
17. Mori M, Kasai T, Nakai M, Sato K, Takeuchi H, Takai Y, et al. Dentinogenic ghost cell tumor: histologic aspects, immunohistochemistry, lectin binding profiles, and biophysical studies. *Oral Oncol.* 2000;36(1):134-43.
18. Goto LS. Estudos estruturais e funcionais sobre duas lectinas: cadeia B recombinante da *Pulchellina* & *Camptosemina* [tese]. São Carlos: Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos; 2007.
19. Caldeira PC. Leucoplasias bucais: estudo comparativo entre o grau histológico de displasia, imunexpressão de hMLH1 e p53 e análise quantitativa de AgNOR [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia; 2010.
20. Oliveira LR, Ribeiro-Silva A, Zucoloto S. Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. *J bras patol med lab.* 2006;42(5):385-92.
21. Barbosa RPS, Meireles SS, Guimarães KB, Costa LJ. Neoplasias malignas de glândulas salivares: estado retrospectivo. *Rev odontol ciênc.* 2005;20(90):361-66.
22. Alves PM. Avaliação imuno-histoquímica das galectinas-1, -3, -4 e -7 em carcinoma epidermóide de língua [tese]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral; 2009.
23. Fukumori T, Kanayama HO, Raz A. The role of galectin-3 in cancer drug resistance. *Drug Resist Updat.* 2007;10(3):101-8.
24. Takenaka Y, Fukumori T, Raz A. Galectin-3 and metastasis. *Glycoconj J.* 2004;19(7-9):543-9.
25. Gillenwater A, Xu XC, Estrov Y, Sacks PG, Lotan D, Lotan R. Modulation of galectin-1 content in human head and neck squamous carcinoma cells by sodium butyrate. *Int J Cancer.* 1998;75(2):217-24.

Resumo

Introdução: Com o advento de novas pesquisas abordando o processo neoplástico, um grupo peculiar de proteínas tem sido amplamente estudado, as lectinas. Estas proteínas possuem a capacidade de se ligarem de forma reversível a carboidratos com alta especificidade. Devido às alterações no padrão glicoproteico de superfície celular durante o processo neoplástico, as lectinas se tornam uma ferramenta potencial como biomarcadores de células neoplásticas. **Objetivo:** Investigar a produção científica da aplicação lectinas como biomarcadores de lesões neoplásticas e potencialmente neoplásticas da cavidade oral e analisar quais grupos de lectinas e lesões orais foram mais extensamente estudados, com o objetivo final de traçar o perfil dessas publicações. **Métodos:** Realizou-se uma pesquisa de artigos científicos integrando periódicos indexados na base de dados Science Direct, Pubmed e BVS. Os critérios de inclusão estabelecidos foram: Tempo – de 1981 a 2010; Descritores – “*lectin*” AND “*biomarker*” AND “*oral*” AND “*tumor*”; Resumo/abstract – língua inglesa. Foi obtido um total de 108 artigos. As publicações foram avaliadas e classificadas em categorias pré-estabelecidas, como número/tipos de lesões e número/tipos de lectinas analisadas. As variáveis estudadas foram correlacionadas e o teste Qui-quadrado foi aplicado. **Resultados:** Houve notadamente um crescimento de estudos utilizando lectinas como biomarcadores tumorais ao longo dos anos, em que a lesão mais amplamente estudada foi o carcinoma espinocelular e a lectina mais avaliada foi a *Arachis hypogea* (PNA). **Conclusão:** Pode-se concluir que a utilização de lectinas como ferramenta de diagnóstico é de crescente importância para a pesquisa em cancerologia devido à sua aplicabilidade, versatilidade e fidedignidade de resultados.

Palavras-chave: Oncologia; Lectinas; Neoplasias Bucais

Resumen

Introducción: Con el desarrollo de nuevas investigaciones sobre el proceso neoplástico, un grupo peculiar de las proteínas se ha convertido en objeto de gran atención, a saber, las lectinas. Estas proteínas tienen la capacidad de unirse de forma reversible a los carbohidratos con alta especificidad. Debido a los cambios en el patrón de glicoproteína de superficie celular durante la formación del tumor, las lectinas tienen un importante rol como marcadores biológicos de las células neoplásticas. **Objetivo:** Investigar la producción científica disponible sobre el uso de lectinas como marcadores biológicos de las lesiones neoplásticas y potencialmente neoplásticas de la cavidad oral y analizar cuáles grupos de las lectinas y de las lesiones orales que han sido más estudiadas, con el objetivo final de ofrecer un perfil de las publicaciones en este campo. **Método:** Se llevó a cabo una investigación de artículos científicos en las bases de datos Science Direct, PubMed, y BVS. Los criterios de inclusión fueron: Tiempo - de 1981 a 2010; Descriptores - “*lectin*” AND “*biomarker*” AND “*oral*” AND “*tumor*”; Resumen/abstract - Inglés. Un total de 108 artículos fueron seleccionados. Las publicaciones fueron evaluadas y clasificadas en categorías predeterminadas, como número/tipos de lesión y número/tipos de lectinas analizadas. **Resultados:** Hubo, a lo largo de los años, un aumento notable en el número de estudios que utilizan lectinas como marcadores biológicos de tumores. La lesión más ampliamente estudiada fue el carcinoma espinocelular y la lectina más evaluada, la *Arachis hypogea* (PNA). **Conclusión:** Es posible concluir que el uso de lectinas como herramienta de diagnóstico ha aumentado en importancia para la investigación en cancerología debido a su aplicabilidad, versatilidad y fiabilidad de resultados.

Palabras clave: Oncología Médica; Lectinas; Neoplasias de la Boca

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/aob>

Antimicrobial and antibiofilm action of Casbane Diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria

Nairley Cardoso Sá^a, Theodora Thays Arruda Cavalcante^b, Amanda Ximenes Araújo^c, Hécio Silva dos Santos^c, Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque^c, Paulo Nogueira Bandeira^c, Rodrigo Maranguape Silva da Cunha^d, Benildo Sousa Cavada^b, Edson Holanda Teixeira^{a,*}

^aLIBS, Integrate Biomolecules Laboratory, Faculty of Medicine of Sobral, Federal University of Ceará, Sobral, CE, Brazil

^bDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^cAcarau Valley State University, Center for Science and Technology, School of Chemistry, Sobral, Ceará, Brazil

^dAcarau Valley State University, Center for Agricultural and Biological Sciences, School of Biology, Sobral, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 30 October 2011

Keywords:

Casbane Diterpene

Biofilm

Oral bacteria

ABSTRACT

Objective: The antibacterial activity of Casbane Diterpene (CD) was evaluated *in vitro* against *Streptococcus oralis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mitis* and *S. sanguinis*. The viability of planktonic cells was analysed by susceptibility tests (MIC and MBC) and antibiofilm action was assayed.

Methods: The minimal inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC) of oral *Streptococcus* were evaluated through microdilution tests. To assay antibiofilm activity, biofilms were generated on 96-wells polystyrene plates under the presence of CD and quantified by a crystal violet technique and colonies forming units counting.

Results: The CD isolated from *Croton nepetaefolius* showed antimicrobial effect on planktonic forms and biofilms of oral pathogens, with MIC values of 62.5 µg/mL against *Streptococcus oralis* and values between 125 and 500 µg/mL against *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mitis* and *S. sanguinis*. CD showed an inhibitory effect on *S. mutans* biofilm formation at 250 µg/mL, and a decrease on viable cell of 94.28% compared to the normal biofilm growth.

Conclusions: The compound CD can be considered as a promising molecule for the treatment against oral pathogens responsible for dental biofilm.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Oral diseases are infections caused by a wide range of microorganisms that colonize the tooth surface at or below the gingival margin.^{1,2} This colonization can lead to pathological states, including dental caries and periodontal diseases with tooth loss as consequence. These pathologies may also involve several serious manifestations that significantly affects the overall health of the infected individual.³

Pioneer bacterial species multiply to form microcolonies, which are dipped in mucus bacterial extracellular polysaccharides and salivary proteins adsorbed, resulting in a confluent film of microorganisms, a biofilm.⁴ The metabolism of these pioneer species creates a suitable condition for colonization by bacteria with higher levels of atmospheric demands. The subsequent development of oral biofilm involves co-aggregations between other genus and the primary colonizers.⁴ The mechanical removal of the dental plaque is the most efficient procedure to prevent caries.

* Corresponding author at: Av. Cmte. Maurocélcio Rocha Ponte, 100, Derby Sobral, Ceará 62042-280, Brazil. Tel.: +55 88 3611 8000x227; fax: +55 88 3611 8000x227.

E-mail address: edson@ufc.br (E.H. Teixeira).

0003-9969/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.archoralbio.2011.10.016

However, the use of chemicals compounds as a complementary method is also necessary and has demonstrated to be of great value with respect to decreasing the tooth biofilm.^{5,6}

Natural products are sources of molecules that can be used as antimicrobial agents, an attempt to overcome drug resistance to old and new antimicrobials used currently in clinical therapy.⁷ This way, trials focusing anti-biofilm substances are relevant because of its importance as aetiology of various persistent and chronic diseases.

Croton is a genus included in Euphorbiaceae family which is widespread in northeastern Brazil. Its use in popular medicine is related to cancer treatment, constipation, diabetes, digestive problems, dysentery, external wounds, fever, hypercholesterolemia, hypertension, inflammation, intestinal worms, malaria, pain, ulcers, and weight-loss.⁸ Previous phytochemical studies have shown that plants of this genus can produce a large number of diterpenoids,⁹⁻¹⁹ a class of natural products that exhibit a wide spectrum of important biological activities,⁸ which we can highlight the antimicrobial activity.²⁰⁻²² Casbane Diterpenes are a class of diterpenoids isolated from a few species of plants from Euphorbiaceae family with mainly anticancer and antibacterial activities.²³⁻³¹

The present study reports, for the first time, the antimicrobial and antibiofilm activities of the Casbane Diterpene named 1,4-dihydroxy-2E,6E,12E-trien-5-one-casbane (CD) isolated from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria.

2. Materials and methods

2.1. Plant materials

Stalks from *C. nepetaefolius* were collected in May, 2004, in Caucaia, Ceará, Brazil. The sample material was identified by Dr. Edson Paula Nunes at Prisco Bezerra Herbarium, Biology Department, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil, where the vouchers specimens (No. 33.582) were deposited.

The bark from stalks (5.0 kg) of *C. nepetaefolius* was powdered and solubilized with ethanol (10 L × 3, at room temperature). The solvent was removed under reduced pressure to form an EtOH extract. The EtOH extract (58.2 g) was fractionated coarsely in a silica gel column, eluted with hexane (fractions 1-15), hexane/EtOAc 1:1 (fractions 16-25), EtOAc (fractions 26-40), and EtOH (fractions 41-48), affording a total of 48 fractions of 100 mL each. The hexane fractions (22.5 g) were pooled and fractionated in a silica gel column using hexane (fractions 1'-10'), hexane/EtOAc 1:1 (fractions 11'-16'), EtOAc (fractions 17'-21') and EtOH (fractions 22'-25'), providing 25 fractions of 100 mL each. Fractions 11'-16' (14.0 g), obtained with hexane/EtOAc (1:1), were fractionated coarsely in a silica gel column eluted with hexane (fraction 1''), hexane/EtOAc 9:1 (fractions 2''-5''), 8:2 (fractions 6''-15''), 7:3 (fractions 16''-32''), EtOAc (fraction 33''), providing 33 fractions of 100 mL each. Fractions 10''-13'', obtained with hexane/EtOAc (8:2), yielded a diterpene named 1,4-dihydroxy-2E,6E,12E-trien-5-one-casbane (CD) (3.0 g, 0.06%) (Fig. 1). The CD was solubilized in Milli-Rios water and dimethylsulfoxide (DMSO) which were diluted in culture medium reaching a maximum concentration of 1% (v/v). This percentage of DMSO does not show interference on microbial growth (data not shown).

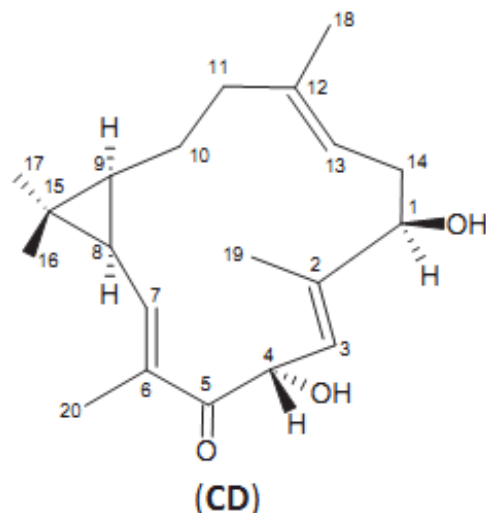


Fig. 1 – Structure of Casbane Diterpene extracted from the stalks of *Croton nepetaefolius*.

1,4-dihydroxy-2E,6E,12E-trien-5-one-casbane (CD). Green oil I.R. (KBr, cm^{-1}): 3400, 2920, 1660, 1618, 1020, 756. ^1H NMR: 0.99 (s, 3H-16), 1.13 (s, 3H-17), 1.23-1.15 (m, H-9), 1.23-1.15 and 0.79-0.72 (m, 2H-10), 1.50 (dd, $J = 10.4$ and 8.3 Hz, H-8), 1.56 (s, 3H-18), 1.66 (s, 3H-19), 1.90 (s, 3H-20), 2.27 (m, 2H-14), 2.27-2.03 and 1.71-1.68 (m, 2H-11), 4.09 (dd, $J = 9.6$ and 6.2 Hz, H-1), 4.66 (dd, $J = 6.3$ Hz, H-13), 5.14 (d, $J = 9.4$ Hz, H-3), 5.24 (d, $J = 9.4$ Hz, H-4), 6.25 (d, $J = 10.4$ Hz, H-7). ^{13}C NMR: 10.15 (C-19), 12.08 (C-20), 15.43 (C-18), 16.12 (C-16), 25.36 (C-10), 27.73 (C-15), 28.08 (C-8), 29.25 (C-17), 31.66 (C-14), 35.67 (C-9), 39.85 (C-11), 67.82 (C-4), 77.64 (C-1), 119.72 (C-13), 125.48 (C-3), 134.61 (C-6), 137.39 (C-12), 144.02 (C-2), 145.11 (C-7), 199.74 (C-5). MS (70 eV, %) m/z 318 ($[\text{M}]^{+}$, absent), 300 (2), 282 (2), 150 (14), 135 (30), 121 (22), 107 (44).

2.2. Bacterial strains and growth conditions

The bacterial strains *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus oralis* were maintained in BHI/glycerol (20%) (Brain Heart Infusion-Difco®) at -80 °C. For the experiments 100 μL aliquot from the stock was inoculated in 10 mL of sterile BHI broth and incubated at a 10% CO_2 condition at 37 °C for 24 h. After this initial activation, the culture was renewed in 10 mL of sterile BHI broth with 100 μL inoculum and grown under the same conditions described above for 18 h. This renewal was made to obtain a microorganism with better growth and development. For antimicrobial activity tests, the cell density was adjusted at a concentration of 10^7 CFU/mL.

2.3. Antimicrobial activity assay

Tests of agar disc diffusion were used as trial for CD antimicrobial action against the bacteria tested. This methodology was developed accordingly with Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Tests: Approved Standard –

Tenth Edition. CLSI document M02-A10. As standard, amoxicillin and chlorhexidine were used.

Antimicrobial action of CD was determined by microdilution test in 96-wells polystyrene plates, standardized according with guideline *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard – Sixth Edition*. CLSI document M7-A6.

Different concentrations of CD were prepared and tested through serial dilution (31.25–500 µg/mL). As positive control it was used chlorhexidine at 250 µg/mL. The MIC (minimal inhibitory concentration) was considered the lowest concentration of CD that resulted in visible absence of bacterial growth. To determine the MBC (minimal bactericidal concentration) 50 µL of bacterial suspension from the wells corresponding to each concentration tested were inoculated in 5 mL of sterile BHI broth medium and incubated for 24 h 37 °C CO₂ 10%. MBC was considered the lowest concentration that inhibited completely bacterial growth at the medium. For statistical analysis the different CD concentration groups were compared with 250 µg/mL chlorhexidine group.

2.4. Antibiofilm activity

2.4.1. Saliva processing

Saliva was collected and processed according to the protocol of Guggenheim and colleagues.³² Briefly, whole unstimulated saliva was collected for 1 h per day during several days from volunteers that assigned an informed consent term (Ethical Committee Approval number 217-CONEP/CNS/MS) at least 1.5 h after eating, drinking, or tooth cleaning. Saliva samples were collected in sterile 50 mL polypropylene tubes, chilled in an ice bath or frozen at –20 °C. After 500 mL saliva had been collected, it was pooled and centrifuged (30 min, 4 °C, 27,000 × g); the supernatant was pasteurized (60 °C, 30 min) and re-centrifuged in sterile tubes. The resulting supernatant was stored into sterile 50 mL polypropylene tubes at –80 °C. The efficiency of the process was assessed by plating processed saliva samples onto BHI agar; after 72 h at 37 °C no CFUs were observed on incubated plates.

2.4.2. Biofilm assay

Streptococcus mutans biofilms were grown on 96-wells microtiter plates through a methodology developed by Stepanovic et al.³³ and Islam et al.³⁴ with some modifications. In a first moment, 100 µL of processed saliva plus 100 µL of carbonate buffer pH 9.3 were added to each well and incubated at 4 °C for 2 h. After this period the wells were washed three times with saline phosphate buffer pH 7.6. In sequence, 100 µL of sterile BHI were distributed in a 96-wells polypropylene tissue culture plates (Orange Scientific®, Braine-l'Alleud, Belgium) (with flat-bottom) followed by placement of 100 µL of DC in concentrations that were prepared using a procedure similar to the one used in the antimicrobial activity tests (MIC) with same initial bacterial cells concentration. All the plates were incubated at 37 °C, CO₂ 10%, during 24 h for biofilm development. After biofilm growth in the presence or absence of CD concentrations, the content of each well was removed and the biofilms were washed twice with 200 µL of sterilized water, to remove cells weakly adhered.

The attached biofilm mass was quantified using crystal violet staining.³⁵ Briefly, the plates containing the biofilms were left to air dry for 30 min, and 200 µL of a solution sodium acetate/formalin 2% were distributed in each well, in order to fix the adhered cells, and left for 15 min. After this time, the solution sodium acetate/formalin 2% was removed and 200 µL of crystal violet 1% (Gram colour-staining set for microscopy – Merck®) were added to each well for 5 min. Following the staining step, the washing procedure, with sterile water, was repeated and the plates were left at room temperature for 1 h. To re-solubilize the dye bounded to biofilms, 200 µL of 95% ethylic alcohol (Merck®) were added to each well and submitted to agitation for 15 min. The crystal violet (CV) solutions obtained were transferred to a new sterile flat bottom 96-wells plate and the optical density of the content was measured using a microtiter plate spectrophotometer (Biotrak II Plate Reader – Amersham Biosciences®) at 570 nm.

2.5. CFU count

The biofilms were generated as described above and after 24 h of incubation at 37 °C, CO₂ 10%, the plates were washed twice using sterile distilled water to remove cells weakly adhered. Then, 200 µL phosphate buffered saline pH 7.2 was added to each well and placed in an ultrasound bath (Sonicor/SC-52®) with 45 Hz for 10 min to release the biofilm-forming cells. A volume of five wells (1 mL) was removed with up-down movement, and collected in a sterile microtube. Then, 20 µL of this cell suspension were serially diluted 10-fold for subsequent plating in Petri dishes with BHI agar medium. The Petri dishes with BHI agar medium were incubated at 37 °C, CO₂ 10% for 24 h. The cells were counted and the result multiplied by the dilution factor and expressed as CFU/mL.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed through GraphPad Prism® version 3.00 for Microsoft Windows®. The method used was one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test. The data were obtained in thirty replicates from three separate experiments. The graphics were presented as mean ± standard deviations. The data were considered significant when $p < 0.01$ or $p < 0.001$.

3. Results

Initial tests to detect CD action over oral *Streptococcus* species were made by disc diffusion method (Data not show) and MIC were also determined by microdilution in 96-wells polystyrene plates.

The MIC values for CD are shown in Table 1. Amongst tested bacteria, CD displayed better activity against *Streptococcus oralis* (62.5 µg/mL). MIC values ranged between 125 and 500 µg/mL against other oral bacteria. In all tests performed the MIC values did not showed statistical difference with the positive control, chlorhexidine ($p > 0.05$). The MBC value was 500 µg/mL for *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* and 125 µg/mL for *Streptococcus oralis*.

Table 1 – Minimal inhibitory concentration (MIC) of Casbane Diterpene (CD) at different times of growth (12, 18 and 24 h) and minimal bactericidal concentration (MBC) against oral pathogens.

Bacteria	MIC ($\mu\text{g/mL}$)/time (h)			MBC ($\mu\text{g/mL}$)
	12 h	18 h	24 h	
<i>S. mutans</i>	125	250	250	500
<i>S. mitis</i>	125	125	125	500
<i>S. sobrinus</i>	250	500	500	500
<i>S. oralis</i>	62.5	62.5	62.5	125
<i>S. salivarius</i>	250	250	250	500
<i>S. sanguinis</i>	125	250	250	500

When interference on *S. mutans* biofilm formation was assessed, biomass was quantified; it was observed inhibitory activity at 250 $\mu\text{g/mL}$ concentration. Analysis of these data showed no statistical difference ($p > 0.05$) between CD and chlorhexidine control (used at 250 $\mu\text{g/mL}$) with comparisons at all concentrations tested of CD (Fig. 2).

4. Discussion

The use of disc diffusion methodology can lead to an irregular distribution of hydrophobic components resulting in unequal concentrations at the agar, causing the formation of regions with antimicrobial activity variation.^{36,37} On the other hand, microdilution tests showed interesting and promising antimicrobial activity. The results obtained by each of these methods may differ due to variations between the tests.³⁷

It is known that the regular use of oral care products containing chlorhexidine are often associated with tooth and restoration staining, changes in the taste of food, and a burning sensation at the tongue tip.^{20,38,39} This way, the search for products with similar or better efficiency as chlorhexidine is interesting to be introduced in dentistry clinic. Chlorhexidine concentration used in this study was 250 $\mu\text{g/mL}$ for MIC assay

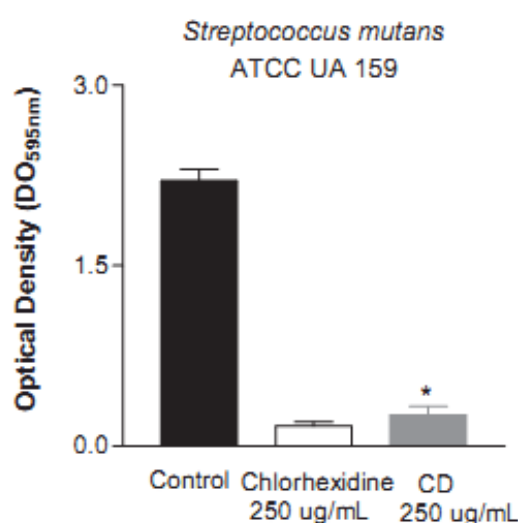


Fig. 2 – Barr graph of biomass quantification of *S. mutans* ATCC UA 159 biofilm submitted to Casbane Diterpene (CD). * $p < 0.01$ related to control (normal growth).

and biofilm tests, which represents a lower value when compared to chlorhexidine concentration used in clinical procedures, 1,200 $\mu\text{g/mL}$ (0.12%). This study could show that DC has an antimicrobial efficiency against the streptococcal species tested similar to chlorhexidine, this way, the possible use of DC instead of chlorhexidine depends of future toxicity and tolerance tests. Its use could substitute chlorhexidine in long time therapy when chlorhexidine side effects may be detected.

The values of MBC found showed that CD has an unspecific action against the bacteria tested. For *S. mutans*, MBC value was 500 $\mu\text{g/mL}$, this way, for experiments of biofilm development it was used the concentration of 250 $\mu\text{g/mL}$ in order to inhibit and not completely eradicate the community. The absorbance readings were made with different times and it was observed that at 12 hours of exposition to the compound CD for *S. mutans*, *S. sobrinus* and *S. sanguinis*, the MIC value was lower compared to the other times of exposition analysed; this can indicate new therapeutic models for future experiments testing CD for minutes or a few hours.

Bacteria are able to grow adhered to almost every surface, forming architecturally complex communities termed biofilms.⁴⁰ Biofilms confer resistance to many antimicrobials and protection against host defenses.⁴¹ Tests to check CD action against biofilms were performed only with *S. mutans*; this pathogen is considered one of the main cariogenic microorganisms, which is responsible for acid production leading to carious lesion.⁴²

At biofilm analysis no difference was found between CD group and chlorhexidine group (Fig. 2). The presence of biomass in the control of chlorhexidine is caused by turbidity of the substance. This is confirmed by the experiment of CFU counting (Colonies Forming Units), in which there is absence of viable cells when the biofilm was subjected to chlorhexidine. In CFUs assays were observed also a considerable decrease in viable cells number when bacterial biofilm was subjected to CD 250 $\mu\text{g/mL}$; this confirms its inhibitory effect. The efficiency of the inhibitory effect on biofilm development is appreciable, considering the well known resistance of these communities. This resistance is related to the presence of an extracellular matrix that protects microbial cells from external aggressions. CD decreased 94.28% on the development of biofilm within 24 h compared to biofilm normal growth. Extracellular matrices also act as a diffusion barrier to small molecules.⁴¹

The antimicrobial activity demonstrated by CD can be explained by the presence of a hydrophobic moiety, and a hydrophilic region possessing two hydrogen-bond-donor groups. These two structural requirements may be responsible for an optimal insertion of this compound into cell membranes through a non-specific interaction with membrane phospholipids, destabilizing the non-covalent interactions between the fatty acids of the lipidic bilayer, and thus interfering on the cellular development. In addition, the effect on biofilm formation seems to be directly related to the growth inhibition, showing non-specific action related to the anti-biofilm activity.^{22,30}

Oral biofilm are one of the factors that contribute to caries development. Natural substances that can optimize the biofilm reduction or eradication could act as adjuvant in therapy for patients with high risk to tooth decay. Casbane

Diterpene showed, for the first time, antimicrobial effect on planktonic forms and biofilm of oral pathogens. These results are very important, because very few natural products are known to inhibit the growth of oral pathogens, some of which (including *Streptococcus*) are responsible for dental plaque.³⁶ So this natural compound can be considered as a promising molecule with potential for treatment against oral pathogens responsible for dental plaque. Additional toxicological studies need to be performed to validate its applicability.

Funding

The research had a financial support from CAPES, CnPq, FUNCAP and Brazilian foment institutions.

Competing interests

There is no interest conflict.

Ethical approval

The saliva collection had a project approved by the Ethical Committee from Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA, under the reference number 217-CONEP/CNS/MS.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Ensino superior) and FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for their financial support and Prof. E. R. Silveira (CENAUREMN-UFC) for obtaining the NMR spectra.

REFERENCES

- Parsek M, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 2003;57: 677–770.
- Wu CD, Wei GX. Tea as a functional food for oral health. *Nutrition* 2002;18(5):443–4.
- Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000 2002;28:12–55.
- Marsh P, Martin MV. *Microbiologia oral*. 4th ed. São Paulo: Editora Santos; 2005.
- Furiga A, Lonvaud-Funel A, Dorignac G, Badet C. In vitro anti-bacterial and anti-adherence effects of natural polyphenolic compounds on oral bacteria. *J Appl Microbiol* 2008;105(5):1470–6.
- Souza AB, Martins CH, Souza MG, Furtado NA, Heleno VC, de Sousa JP, et al. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. *Phytother Res* 2010;25(2):215–20.
- Simões M, Simões LC, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Sci Technol* 2010;43(4):573–83.
- Salatino A, Salatino ML, Fegri G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). *J Braz Chem Soc* 2007;18(1):11–33.
- Murillo RM, Jakupovic J, Rivera J, Castro VH. Diterpenes and other constituents from *Croton draco* (Euphorbiaceae). *Rev Biol Trop* 2001;49(1):259–64.
- Araujo Jr VT, da Silva MS, da Cunha EVL, Agra MD, da Silva RN, Barbosa JM, et al. Alkaloids and diterpenes from *Croton moritibensis*. *Pharm Biol* 2004;42(1):62–7.
- Peres MTL, Monache FD, Pizzolatti MG, Santos ARS, Beirith A, Calixto JB, et al. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmacological criteria used in their isolation. *Phytother Res* 1998;12(3):209–11.
- Maciel MAM, Pinto AC, Arruda AC, Pamplona SGSR, Vanderlinde FA, Lapa AJ, et al. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. *J Ethnopharmacol* 2000;70(1):41–55.
- Graikou K, Aligiannis N, Skaltsounis AL, Chinou I, Michel S, Tillequin F, et al. New diterpenes from *Croton insularis*. *J Nat Prod* 2004;67(4):685–8.
- Guadarrama ABA, Rios MY. Three new sesquiterpenes from *Croton arboreus*. *J Nat Prod* 2004;67(5):914–7.
- McChesney JD, Silveira ER. Ent-clerodanes of *Croton sonderianus*. *Fitoterapia* 1990;61(2):172–5.
- Mekkawy S, Meselhy MR, Nakamura N, Hattori M, Kawahata T, Otake T. Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium*. *Phytochemistry* 2000;53(4):457–64.
- Barbosa PR, Fascio M, Martins D, Guedes MLS, Roque NF. Triterpenes of *Croton betulaster* (Euphorbiaceae). *Biochem Syst Ecol* 2003;31(3):307–8.
- Santos HS, Barros FWA, Albuquerque MRJR, Bandeira PN, Pessoa C, Braz-Filho R, et al. Cytotoxic diterpenoids from *Croton argyrophyloides*. *Nat Prod* 2009;72(10):1884–7.
- Santos HS, Mesquita FMR, Lemos TLG, Monte FJQ, Braz-Filho R. Diterpenoscasbanos e acetofenonas de *Croton nepetaefolius* (Euphorbiaceae). *Quím Nova* 2008;31(3):601–4.
- Porto TS, Furtado NAJC, Heleno VCG, Martins CHG, Costa FB, Severiano ME, et al. Antimicrobial ent-pimarane diterpenes from *Viguiera arenaria* against Gram-positive bacteria. *Fitoterapia* 2009;80(7):432–6.
- Tirapelli CR, Ambrosio SR, da Costa FB, de Oliveira AM. Diterpenes: a new promise for cardiovascular diseases. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2008;3(1):1–8.
- Urzúa A, Rezende MC, Mascayano C, Vásquez L. A structure-activity study of antibacterial diterpenoids. *Molecules* 2008;13(4):882–91.
- Choi YH, Kim J, Pezzut JM, Kinghorn AD, Farnsworth NR. Agrostitachin, a novel cytotoxic macrocyclic diterpene from *Agrostitachys hookeri*. *Tetrahedr Lett* 1986;27(48):5795–8.
- Choi YH, Kim J, Pezzut JM, Kinghorn AD, Farnsworth NR. Plant anticancer agents, XLVI, Cytotoxiccasbane-type constituents of *Agrostitachys hookeri*. *J Nat Prod* 1988;51(1):110–6.
- Burke BA, Chan WR, Pascoe KO, Blount JF, Manchand PS. The structure of crotonitenone, a novel casbane diterpene from *Croton nitens* Sw. (Euphorbiaceae). *J Chem Soc Perkin Trans I* 1981;10:2666–9.
- Kashman Y, Bernat MW, Tischer M, Cardellina JH, Boyd MR. Koubmalones A and B, new casbane diterpenes from *Maprounea africana*. *Nat Prod* 1994;57(3):426–30.
- Vera LA, Monte FJO, Braz-Filho R. A new casbane type diterpenoid from *Croton nepetaefolius*. *Nat Prod* 1990;53(6):1566–71.
- Xu ZH, Sun J, Xu RS, Gin GW. Casbane diterpenoids from *Euphorbia ebracteolata*. *Phytochemistry* 1998;48(1):149–51.
- Bai Y, Yang YP, Ye Y, Hookerianolides A–C. Three novel casbane-type diterpenoid lactones from *Mallotus hookerianus*. *Tetrahedr Lett* 2006;47:6637–40.

30. Carneiro VA, Santos HS, dos Santos. Arruda FVS, Bandeira PN, Albuquerque MRJR, Pereira MO, et al. Casbanediterpene as a promising natural agent against biofilm-associated infections. *Molecules* 2010;16(1):190-201.
31. Liang QL, Dai CC, Jiang JH, Tang YP, Duan JA. A new cytotoxic casbanediterpene from *Euphorbia pekinensis*. *Fitoterapia* 2009;80(8):514-6.
32. Guggenheim B, Giertsen W, Schupbach P, Shapiro S. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* 2001;80(1):363-70.
33. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiterplate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000;40(2):175-9.
34. Islam B, Khan SN, Naeem A, Sharma V, Khan AU. Novel effect of plant lectins on the inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on saliva-coated surface. *J Appl Microbiol* 2009;106:1682-9.
35. Anderson GG, O'Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. In: Romeo T, editor. *Bacterial biofilms*. Heidelberg: Springer; 2008.
36. Chung JY, Choo JH, Lee MH, Hwang JK. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine* 2006;13(4):261-6.
37. López D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010. [10.1101/cshperspect.a000398](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000398).
38. Burton E, Yakandala N, LoVetri K, Madhyastha MS. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2007;34(1):1-4.
39. Saleem M, Nazir M, Ali MS, Hussain H, Lee YS, Riaz N, et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat Prod Rep* 2010;27(2):238-54.
40. Nascimento PFC, Nascimento ALC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Barbosa Júnior AM, et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev Bras Farmacogn* 2007;17(1):108-13.
41. More G, Tshilikalange TE, Lall N, Botha F, Meyer JJM. Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganism. *J Ethnopharmacol* 2008;119(3):473-7.
42. Sokmen A, Gulluce M, Akplat HA, Daferera D, Tepe B, Polissiou M, et al. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control* 2004;15(8):627-34.

