



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

RAFAELA MESQUITA BASTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS COMPOSTOS ISOLADOS
DA PLANTA *Mitracarpus baturitensis* FRENTE À *Streptococcus mutans*.**

SOBRAL

2013

RAFAELA MESQUITA BASTOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS COMPOSTOS ISOLADOS
DA PLANTA *Mitracarpus baturitensis* FRENTE À *Streptococcus mutans*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque

SOBRAL

2013

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

- B331a Bastos, Rafaela Mesquita.
Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos isolados da planta *mitracarpus baturitensis* frente à *Streptococcus mutans*. / Rafaela Mesquita Bastos. – 2013.
77 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2013.
Área de Concentração: Microbiologia.
Orientação: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.
Co-orientação: Prof^ª. Dr^ª. Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque.
1. Streptococcus mutans. I. Título.

RAFAELA MESQUITA BASTOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS COMPOSTOS ISOLADOS
DA PLANTA *Mitracarpus baturitensis* FRENTE À *Streptococcus mutans*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia

Aprovado em ____/____/2013

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dra. Maria Rose Jane R. Albuquerque (Co-orientadora)
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

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

Dedico este trabalho ao meu Senhor e salvador Jesus Cristo pela sabedoria e força para desenvolvê-lo. Aos meus pais João e Célia pelo apoio, e ao meu esposo Camilo pelo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar saúde, força, coragem e determinação para realização deste trabalho.

A minha família pais João e Célia, irmã Renata e esposo Camilo por todo amor, carinho e incentivo ao longo dos anos de minha vida.

Ao Prof. Edson Holanda Teixeira pela sua orientação nesses cinco anos, que para mim foram de grande aprendizado e confiança.

À Professora Maria Rose Jane R. Albuquerque em primeiro lugar por ter cedido a planta de estudo, e em segundo pela confiança, paciência e ensinamentos.

Aos Doutores Victor Carneiro e Vassiliepe Arruda pelos conhecimentos repassados e direcionamentos para realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório Integrado de Biomoléculas de Sobral – LIBS: estudantes de iniciação científica Humberlânia, Victor Aragão e Rondinele, mestrandas Wanderléia, Marianne, Ariana, Ídia e Simone pela amizade ao longo desses anos.

Ao Lucas Ribeiro estudante de iniciação científica pela ajuda inestimável nos experimentos.

Aos queridos estudantes de doutorado, Bruno, Luiz, Nairley e Jean em especial o meu amigo e irmão Flávio Vasconcelos pela amizade, companheirismo e momentos de descontração.

Aos meus colegas de trabalho Aline, Carlos, Keyla, Regina, Francisco, Ângela, Junior, Rúlio, Ismael, Adriano, Joana Paula e aos demais que compõe o corpo técnico-administrativo da UFC, pela amizade e anos de convivência.

Aos meus colegas de mestrado pelos dois anos de convivência.

A querida Andreza pela grande ajuda no isolamento dos compostos, além de sua amizade e incentivo nas horas em que precisei.

A todos os alunos e professores do laboratório de química orgânica da Universidade Vale do Acaraú - UVA.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de desenvolvimento profissional;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, por todo conhecimento repassado durante o mestrado.

A todos que fazem parte de Núcleo de Biotecnologia de Sobral, pela estrutura de pesquisa ofertada no interior do Ceará;

As instituições: Universidade Federal do Ceará (UFC) e Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA).

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu.

Eclesiastes 3:1

RESUMO

A *Mitracapus* (Rubiaceae) é um gênero neotropical, com três centros de diversidades no México, Brasil e Caribe. Em relação à *Mitracarpus baturitensis*, ainda não existe relatos na literatura de estudos fitoquímicos e biológicos, devido à mesma ser uma espécie recém-descoberta. Portanto o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos obtidos do extrato etanólico das partes aéreas de *Mitracarpus baturitensis* contra a bactéria *Streptococcus mutans*. Os triterpenos Ácido 3 β-hidroxi-urs-12-en-28-oico (ácido ursólico – AU) e o ácido 28- O-β-D-glucopiranosil-ester (ácido pomólico) foram isolados do extrato etanólico empregando técnicas cromatográficas usuais como: cromatografia gravitacional em gel de sílica, cromatografia flash e cromatografia de camada delgada. A caracterização estrutural destes compostos foi realizado pelo uso de RNM¹H e ¹³C, além de comparar métodos espectroscópico IV, reações com base na literatura. Após a identificação foram realizados teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM), Curva do Tempo de Morte, ação antibiofilme e ensaio de ataque ao biofilme. O ácido ursólico inibiu o crescimento bacteriano nas concentrações de 500-62,5 µg. mL⁻¹ sendo bactericida na concentração de 500 µg. mL⁻¹. Além disso, o mesmo teve ação sobre a morte de *S. mutans* em apenas 30 minutos de contato. Ácido ursólico também apresentou efeito sobre a formação do biofilme reduzindo a biomassa em 97,37%, não obtendo o mesmo resultado sobre o biofilme formado por 24 horas. Não foram obtidos resultados semelhantes para o ácido pomólico. Assim, ácido ursólico pode ser considerado como um candidato à insumo biotecnológico com impacto na pesquisa de antimicrobianos.

Palavras-chave: *Mitracarpus baturitensis*. *Streptococcus mutans*. Isolamento. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The *Mitracapus* (Rubiaceae) is a neotropical genus with three centers of diversity in Mexico, Brazil and the Caribbean. Regarding *Mitracarpus baturitensis*, there is still no report in literatura phytochemical and biological studies due to it being a newly discovered species. Therefore the aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the ethanolic extract obtained composts of parts of flights *Mitracarpus bauritensis* against the bacteria *Streptococcus mutans*. Compounds ursolic acid (3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oico acid) and pomolic acid (28- O- β -D-glucopiranosil- acid pomólico ester) were isolated from the ethanolic extract by chromatographic assays, CCD and identified through the RNM. After identification were performed testing the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (CBM), curve of the time of the death, action antibiofilm, and assay attack of the biofilm. The increase inhibited bacterial growth at concentrations from 500 to 62,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ and bactericide concentration of 500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Furthermore, the AU had an effect on biofilm formation by reducing the biomass 97,37% same result is not obtained on the biofilm for 24 hours. Similar results were not obtained for the AP. Thus, AU can be analized as a candidate for biotechnological inputs impacting on research antimicrobial

Keyword: *Mitracarpus baturitensis*. *Streptococcus mutans*. Isolation. Antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Glomérulo terminal da <i>Mitracarpus baturitensis</i>	21
FIGURA 2	Fatores que influenciam o aparecimento da cárie.....	22
FIGURA 3	Progressão da cárie dentária.....	24
FIGURA 4	Formação do biofilme oral.....	26
FIGURA 5	<i>Streptococcus mutans</i>	28
FIGURA 6	Ácido 3β-hidróxi-urs-12-eno-28-oico (Ácido ursólico).....	43
FIGURA 7	Espectro de absorção na região do infravermelho de MB-1.....	45
FIGURA 8	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, C ₅ D ₅ N) de MB-1.....	46
FIGURA 9	Espectro de RMN ¹³ C-BB (75 MHz, C ₅ D ₅ N) de MB-1.....	46
FIGURA 10	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT135° (75 MHz, C ₅ D ₅ N) de MB-1.....	47
FIGURA 11	Ácido 3β, 19α-di-hidroxi-urs-12-eno-28-óico (Ácido pomólico).....	49
FIGURA 12	Espectro de absorção na região do infravermelho de MB-2.....	51
FIGURA 13	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, C ₅ D ₅ N) de MB-2.....	51
FIGURA 14	Espectro de RMN ¹³ C-BB (125 MHz, C ₅ D ₅ N) de MB-2.....	52
FIGURA 15	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT135° (125 MHz, C ₅ D ₅ N) de MB-2.....	52
FIGURA 16	Avaliação do potencial antimicrobiano dos compostos AU e AP em diferentes concentrações sobre o crescimento de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	53
FIGURA 17	Avaliação do AU na concentração de 500 µg.mL ⁻¹ sobre curva do tempo de morte de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	54
FIGURA 18	Avaliação antibiofilme dos compostos AU e AP em diferentes concentrações sobre o crescimento de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	55
FIGURA 19	Atividade antibiofilme do AU sobre o biofilme formado por 24 horas. Quantificação através do cristal violeta.....	56
FIGURA 20	Atividade antibiofilme do AU sobre o biofilme formado por 24 horas.....	57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Dados referentes à partição líquido-líquido de EEMB.....	33
TABELA 2	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de FAMB.....	34
TABELA 3	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração CHCl ₃ /AcOEt 50%.....	34
TABELA 4	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração 6- 21.....	35
TABELA 5	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração 51- 142.....	36
TABELA 6	Padrão de hidrogenação determinado por meio da análise comparativa entre os espectros de RMN ¹³ C-BB e DEPT 135° de MB-1.....	42
TABELA 7	Deslocamentos químicos (δ) de RMN ¹³ C (CDCl ₃) de MB-1.....	44
TABELA 8	Padrão de hidrogenação determinado por meio da análise comparativa entre os espectros de RMN ¹³ C-BB e DEPT 135° de MB-2.....	48
TABELA 9	Deslocamentos químicos (δ) de RMN ¹³ C (CDCl ₃) de MB-1.....	49
TABELA 10	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos compostos AU e AP no tempo de 24h de crescimento.....	54

LISTA DE ABREVIATURA

AcOEt	Acetato de Etila
AP	Ácido Pomólico
AU	Ácido Ursólico
EtOH	Álcool Etfílico
BHI	Brain Heart Infusion
BB	Broad Band
KBr	Brometo de Potássio
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CDCl ₃	Clorofórmio
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CV	Cristal violeta
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
DMSO	Dimeltisulfóxido
DEPT	Distortionsless Enhancement by Polarization Transfer
EEMB	Extrato Etanólico das partes aéreas de <i>Mitracarpus baturitensis</i>
FAMB	Fração Acetato de etila de <i>M. baturitensis</i>
FBMB	Fração n- butanólico de <i>M. baturitensis</i>
FHMMB	Fração Hidrometanólica de <i>M. baturitensis</i>
FTS	Frutossiltransferase
Gbp	Glucans binding proteins (Proteínas de Ligação a glucanos)
GTF	Glicosiltransferase
MB-1	Fração 1 de <i>M. baturitensis</i>
MB-2	Fração 2 de <i>M. baturitensis</i>
IV	Infravermelho
MHz	Megahertz
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por mililitro.
mL	Mililitro
Mg	Miligrama
MeOH	Metanol

<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> - Butanol
Ppm	Partes por milhão
PAE	Película Adquirida do Esmalte
R.f	Razão de frente
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPM	Rotação por minuto
SPE	Substância Polimérica Extracelular
TSK	Trimmed Spearman- Karber
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
WapA	Proteína de parede celular

LISTA DE ABREVIACÕES

J	Constante de acoplamento
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
β	Beta
α	Alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Produtos naturais	18
2.2 Família Rubiaceae	19
2.3 Gênero <i>Mitracarpus</i>	19
2.4 Espécie <i>Mitracarpus basturitensis</i>	20
2.5 Cárie	21
2.6 Progressão da cárie	23
2.7 Biofilmes	25
2.8 <i>Streptococcus mutans</i>	27
3 OBJETIVOS	30
3.1 Geral	30
3.2 Específicos	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Parte experimental	31
4.1.1 Métodos de análise	31
4.1.1.1 Métodos cromatográficos	31
4.1.1.2 Métodos físicos	31
4.1.1.2.1 Ponto de fusão	31
4.1.1.2.2 Espectroscopia na região de absorção do infravermelho (IV)	32
4.1.1.2.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	32
4.2 Isolamento, purificação e caracterização dos constituintes químicos isolados	32
4.2.1 Obtenção do material botânico de <i>M. baturitensis</i>	32
4.2.2 Obtenção do extrato etanólico das partes aéreas de <i>M. baturitensis</i>	33
4.2.3 Tratamento cromatográfico do extrato etanólico (EEMB)	33
4.2.4 Fracionamento cromatográfico da fração acetato (FAMB)	33
4.2.5 Fracionamento cromatográfico da fração CHCl₃/AcOEt 50% isolamento do ácido ursólico (AU) e do ácido pomólico (AP)	34
4.3 Solubilização e diluição das substâncias teste	38
4.4 Micro-organismo	38

4.5 Crescimento das estirpes.....	38
4.6 Ajuste da Absorbância.....	38
4.7 Atividade antimicrobiana.....	39
4.8 Curva do tempo de morte.....	39
4.9 Ensaio de inibição da formação do biofilme.....	40
4.9.1 Quantificação da biomassa.....	40
4.10 Ensaio de ataque do biofilme.....	40
4.10.1 Análise da viabilidade celular por Unidades formadoras de colônias UFC.....	40
4.11 Análise estatística.....	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Elucidação estrutural do metabólito bioativo isolado de <i>Mitracarpus baturitensis</i>	42
5.1.1 Determinação estrutural de MB-1.....	42
5.1.2 Determinação estrutural de MB-2.....	47
5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	53
5.3 Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	53
5.4 Curva do tempo de morte.....	54
5.5 Atividade Biológica das substâncias Sobre a Formação de Biofilmes.....	55
5.5.1 Quantificação de biomassa do biofilme por Cristal Violeta (CV).....	55
5.6 Ação da substância sobre o biofilme formado.....	56
5.6.1 Quantificação de biomassa do biofilme por Cristal Violeta (CV).....	56
5.6.2 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (CFU's).....	57
6 DISCUSSÃO.....	58
7 CONCLUSÃO.....	61
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

Muito antes da descoberta dos micro-organismos pela humanidade, já existia a idéia de que certas plantas possuíam o potencial de cura. Desde então, o homem vem se utilizando de vegetais como medicamento tradicional para tratar diversas doenças infecciosas (RÍOS; RECIO, 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 80% da população mundial faz uso de algum medicamento popular para seus cuidados primários na saúde (ABERE; ONYEKWELI; UKOH, 2007). Devido ao consumo destes medicamentos é que etnofarmacologistas, botânicos e microbiologistas, estão em busca de novos fitoquímicos que possam ser utilizados no tratamento de várias doenças (MAHOMOODALLY *et al.*, 2012).

As plantas são constituídas de muitas substâncias químicas, das quais, algumas, atuam como princípios ativos conferindo-lhes propriedades biológicas, enquanto que outras são coadjuvantes facilitando a ação destes (ROMERO; CASTELLA, 2012). Os metabólitos secundários como também são chamados, são bastante empregados nas indústrias farmacêuticas e recentemente nas indústrias nutraceuticas (BOURGAUD *et al.*, 2001). Além disso, seu potencial é largamente empregado em composição de drogas, antibióticos, herbicidas e inseticidas (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006).

Atualmente muito desses princípios ativos possuem comprovação científica de sua ação biológica. Os compostos fenólicos (taninos e flavonóides) que estão presentes na maioria das plantas da caatinga do nordeste brasileiro, possuem atividade antimicrobiana, hipoglicêmica e antiinflamatória. (SIQUEIRA *et al.*, 2012). Outros compostos bastante conhecidos são os diterpenos que se mostram um princípio promissor contra doenças associadas a biofilmes (CARNEIRO *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2012; PORTO *et al.*, 2012).

Os biofilmes são consórcios microbianos que se encontram embebidos por substâncias poliméricas extracelulares aderidas a uma superfície (DONLAN, 2002). Estes podem se fixar em diversos substratos desde que sejam propícios para o seu desenvolvimento (KOLEMBRANDER, 2010). Superfície facilmente colonizada pelos biofilmes são as superfícies dentárias, uma vez colonizadas desencadeia o processo cariogênico resultando na a perda total dos dentes.

A doença cárie representa um significativo problema de saúde pública e individual na maioria dos países, por se tratar da doença infecciosa crônica de maior incidência na espécie humana (LORENZO, 2004). Mesmo nas muitas nações que conseguiram apreciável

controle dessa doença em crianças e jovens, esta patologia continua sendo um sério problema, principalmente a cárie radicular e as cáries secundárias ou recidivantes (LORENZO, 2004). A cárie ainda se constitui na principal causa de perdas dos dentes, notadamente em pessoas com idade inferior a 40 anos, na qual as doenças periodontais passaram a representar causa significativa, cujo impacto aumenta conforme o aumento da idade (LORENZO, 2004).

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produtos naturais

A utilização das propriedades terapêuticas das plantas medicinais é uma prática multimilenar encontrada nos tratados de fitoterapia das grandes civilizações, muitas delas já extintas, como também nas tradições orais de tribos indígenas e povos de todos os continentes (CARVALHO, *et al.*, 2002).

Na idade antiga, muitos venenos foram descobertos da natureza e utilizados para fins de defesa, caça e até mesmo em práticas ilícitas como execução de prisioneiros. Ao passar do tempo muitas substâncias foram sendo descobertas e com elas trouxeram grandes impactos a humanidade (KOSSUGA, 2006). Um exemplo disto é a morfina, substância isolada em 1803 da planta *Papaver somniferum* que ficou conhecida por suas propriedades soporíferas e analgésicas. A partir do isolamento da morfina muitos outros princípios ativos foram sendo descobertos e aplicados pelas indústrias farmacêuticas para o tratamento de várias doenças (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Atualmente, cerca de 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas (FOGLIO *et al.*, 2006) e seus princípios ativos são empregados nos mais variados tratamentos como, por exemplo: artemisinina isolado da planta *Artemisia annua* usada como antimalárico, a atropina extraído da planta *Atropa belladonna* como anticolinérgico e a caféina isolada da *Coffea arábica* bastante usada como estimulante (ROCHA; LOPEZ; SCHWARTSMANN, 2001).

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15 a 20% do total mundial, com destaque para as plantas superiores, nas quais detém aproximadamente 24% da biodiversidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Existem cerca 55 mil espécies de plantas conhecidas, das quais 25 mil são utilizadas por 80% da população no tratamento de varias doenças (CARVALHO; COSTA; CARNELOCI; 2010). Segundo Hostettmann, Queiroz e Vieira (2003) apenas 90 espécies conhecidas possuem comprovação científica e tem seus princípios ativos aplicados em terapias modernas. Vale ressaltar que por uma biodiversidade grande, há possibilidade de achar novas espécies de plantas e princípios ativos com atividades biológicas bastante promissoras.

2.2 Família Rubiaceae

Rubiaceae é uma das maiores famílias de angiosperma, compreendendo cerca de 10.700 espécies distribuídas em cerca de 640 gêneros (ROBBRECHT, 1988). Está dividida em três subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae e Ixoroideae (ROVA *et al.* 2002). No Brasil é relatado cerca de 110 gêneros e 2000 espécies, com significativa representação na Mata Atlântica e Bacia do Amazonas (DELPRETE, 2001).

As maiorias das espécies de Rubiaceae se apresentam como árvores de pequeno porte ou arbustos encontradas em subosques. Esta família pode ser facilmente reconhecida pelas folhas opostas e pela presença de estípulas interpeciolares. A grande variação nas formas, tamanhos e cores das flores atrai um grande número de polinizadores para a família. Os frutos carnosos também variam nas cores e tamanhos, sendo dispersos por pássaros, morcegos ou ainda por pequenos mamíferos (TAYLOR; CAMPOS; ZAPPI, 2007).

2.3 Gênero *Mitracarpus*

Dentre os gêneros pertencentes à família Rubiaceae pode-se destacar o *Mitracarpus*, um gênero neotropical, encontrado no sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina, como uma espécie invasora ocorrendo nos Paleotrópicos. O gênero apresenta três centros de diversidade de espécies: o México, o Caribe e o Brasil (SOUZA; CABRAL; ZAPPI, 2010).

No Brasil o principal centro de distribuição ocorre no Centro-Oeste, áreas do Planalto Central sob o domínio do Bioma Cerrado, onde foram registradas 10 espécies. Outro importante centro de diversidade encontra-se na região Nordeste, entre os Estados da Bahia e Pernambuco, no submédio São Francisco, com 9 espécies encontradas (SOUZA, 2008).

Na literatura podem ser encontradas algumas propriedades relacionadas ao uso dessas espécies de *Mitracarpus*. Estudos realizados por Irobi e Damarola em 1993 com os extratos etanólicos das folhas e inflorescência de *Mitracarpus villosus* demonstraram atividades fungicida e fugistática contra *Trichophyton rubrum*, *Microsporium gypseum*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Fusarium solani*. Além disso, em outro experimento usando o mesmo tipo de extrato apresentou atividade antibacteriana contra gêneros de *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Streptococcus* (IROBI; DAMAROLA, 1994).

Em outros estudos usando diferentes extratos da planta *Mitracarpus frigidus* frente a onze espécies de bactérias e formas promastigotas de duas espécies de *Leshmania*,

apresentaram excelentes atividades biológicas, mostrando ser um potente antileishmanial e antimicrobiana (FABRI *et al.*, 2009). Em análises de células com o extrato etanólico da *M. Frigidus*, o mesmo inibiu a proliferação de células leucêmicas, além de se apresentar como um potente laxativo sem efeito tóxico *in-vivo* (FABRI *et al.*, 2012).

Na África é relatado o uso da espécie de *M. Scaber* na medicina tradicional no combate a dores de cabeça, dor de dente, amenorréia, disperpsia hepática e doenças venéreas. O sulco da planta é bastante usado topicamente em doenças de pele como dermatites infecciosas, eczema e sarna (ADJANONHOUN, 2001).

Pesquisas realizadas por Germanò *et al.*, (1999) o extrato da planta *M. scaber* possui efeito hepatoprotetor contra lesões induzidas por CCL-4 *in-vivo* e *in-vitro*. Além disso, tanto extratos quanto compostos isolados da planta mostram-se efetivos contra fungos e bactérias (BISIGNANO *et al.*, 2000). Já Gbaguidi e colaboradores (2005) observaram que triterpenos isolados da *M. Scaber* apresentava atividade bactericida contra o patógeno *Dermatophilus congolensis* em concentrações inferiores.

2.4 Espécie *Mitracarpus baturitensis*

A planta *Mitracarpus baturitensis* é uma espécie restrita ao Brasil, sendo referida para os Estados do Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Goiás e Mato Grosso. Planta heliófita, encontrada entre 40 e 1000 m de altitude, preferencialmente sobre solos rochosos, lateríticos, ou sobre inselbergs e afloramentos rochosos no Bioma Caatinga e no Cerrado (SOUZA; CABRAL; ZAPPI, 2010).

Esta espécie caracteriza-se pelos caules de ramificação oposta, pela corola com o dobro do comprimento dos maiores lobos do cálice e pelas sementes com depressão cruciforme dorsal. Além disso, sua bainha estipular com 5-7 setas (vs. 3-11 setas em *M. salzmannianus*), folhas opostas (vs. folhas pseudoverticiladas) e sementes com depressão cruciforme dorsal e encaixe ventral em forma de “X” (vs. sementes sem depressão cruciforme dorsal e encaixe ventral em forma de “Y-invertido”) (SOUZA, 2008).

FIGURA 1 - Glomérulo terminal da *Mitracarpus baturitensis*.



Fonte: Arquivo próprio

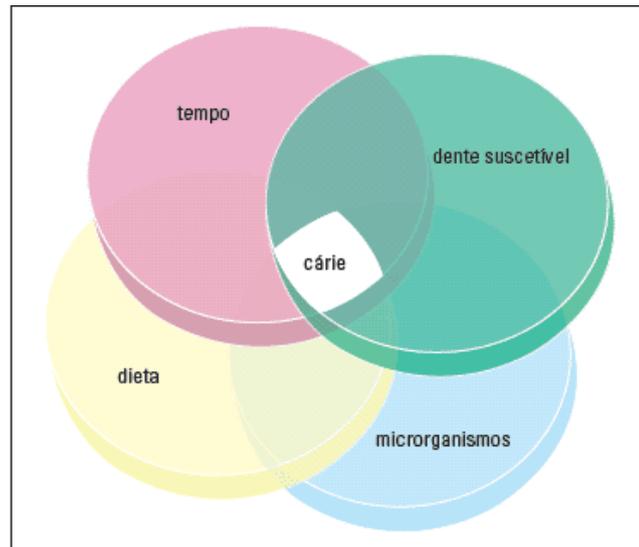
Até o presente momento não foi descrito nenhum estudo sobre atividades biológicas de produtos dessa espécie visto que se trata de uma planta recentemente descoberta no nordeste do Brasil. No entanto com base nos estudos descritos anteriormente, podemos concluir que o gênero, na qual é pertencente esta espécie, possui amplo espectro de atividades antimicrobianas, antifúngicas, antileishmanial e hepatoprotetora. Além disso, foi demonstrado que metabólitos secundários como triterpenos, compostos fenólicos e flavonóides estão envolvidos diretamente nessas atividades.

2.5 Cárie

A cárie é uma patologia infecciosa, transmissível que acomete a maioria da população de diferentes países (HORST *et al.*, 2012). É caracterizada pela destruição da estrutura dentária que se dá pela presença de ácidos orgânicos produzidos no metabolismo dos carboidratos pelas bactérias inseridas no biofilme.

Segundo de Keyes (1960) é uma doença multifatorial que se desenvolve logo após a interação de três fatores como: hospedeiro, dieta rica em carboidratos e micro-organismos presentes. Outro fator acrescentado por Newbrun (1989) conceitua a cárie como sendo uma doença crônica que aparece após um tempo de interação com esses fatores.

FIGURA 2 – Fatores que influenciam o aparecimento da cárie.



Fonte: Lima (2007): Diagrama de Newbrum incluindo o tempo como outro fator etiológico (Modificação do Diagrama de Keyes).

Dentre os fatores citados, os carboidratos presentes na dieta desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da cárie (BOWEN, 2002; TOUGER-DECKER; VAN LOVEREN, 2003; ZERO, 2004; MOYNIHAN, 2005). Dados comprovam que uma dieta rica em açúcares fermentáveis (sacarose, frutose e glicose) predispõe ao indivíduo o aparecimento da cárie dentária (RUGG-GUNN; MURRAY, 1983). Além disso, a sacarose é o carboidrato mais presente na dieta, por tanto é conhecido como o mais cariogênico até mesmo pela facilidade de serem metabolizados pelos biofilmes (AIRES *et al.*, 2006).

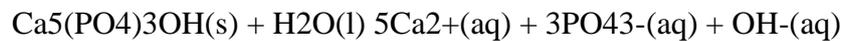
Vale ressaltar que os carboidratos ao serem metabolizados pelas bactérias, promovem à produção de ácidos que atuam desmineralizando a estrutura do dente ou calcificando a placa (MARSH; MARTIN, 2005). Este fator também contribui para a agregação e coagregação de bactérias patogênicas influenciando diretamente no desenvolvimento de um biofilme cariogênico (FIORETTI; HAÏKEL, 2010).

O desenvolvimento da cárie também pode ser influenciado por fatores socioeconômico, demográficos e comportamentais tais como: etnia, renda familiar, educação dos pais, nível de escolaridade, crenças e hábitos de higiene oral (MOREIRA; ROSENBLATT; PASSOS, 2006; LAURIS, 2006; CHU *et al.*, 2010).

2.6 Progressão da cárie

As bactérias ao fermentarem os carboidratos provenientes da dieta começam a produzir ácidos orgânicos principalmente o ácido lático. Estes por sua vez diminuem pH do meio facilitando a desmineralização da camada subsuperficial do esmalte dentário. (LORENZO, 2004).

O esmalte é constituído por 95% de hidroxiapatita, um mineral de fosfato e carbonato pouco solúvel em água, entretanto quando o pH bucal torna-se mais ácido essa substância pode dissolver-se, caracterizando a desmineralização do dente, esse processo é descrito pela equação:



Existem mecanismos intrínsecos ao hospedeiro que atuam equilibrando o ambiente bucal. A saliva, por exemplo, atua como agente tamponante impedindo que faixas de pHs baixo dure por tempo prolongado. (FIORETTI; HAÏKEL, 2010). Sendo assim quando ocorre quedas bruscas do pH pela presença de ácidos orgânicos, a saliva por conter íons de cálcio e fosfato aumenta o pH do meio e ainda remineraliza o esmalte dentário (FIORETTI; NEBOTE, 2006).

O consumo aumentado de carboidratos e um fluxo salivar diminuído cooperam para a progressão da cárie, uma vez que esta se dá lentamente com o aparecimento de uma pequena lesão clinicamente detectável, conhecida como “lesão branca”. Essa lesão deixa o dente opaco e com a superfície rugosa (PAIVA *et al.*, 2006). Nem todas as lesões brancas avançam para uma cavitação podendo estacionar ou remineralizar dependendo do tratamento com agentes químicos (MARSH; MARTIN, 2005). Se o processo desmineralizante tiver seqüência (FIGURA 3), o dano aprofunda-se no sentido de cristais do esmalte, alcança a junção amelo-dentinária onde se dissemina e propaga-se pela dentina chegando até a polpa dental causando a total mortificação do tecido (LORENZO, 2004).

FIGURA 3 - Progressão da cárie dentária.



Fonte: Disponível em: www.odontologiaiwai.com.br/saude_bucal_iframe_lesao_carie.htm:1. 1. A nível de esmalte, ocorre o aparecimento de uma pequena lesão após a desmineralização. 2. A nível de dentina, a carie evolui e atinge a parte da dentina que já possui terminações nervosas e conseqüentemente o surgimento da dor. 3. A nível de polpa, mortificação total do tecido.

À medida que o dente é descalcificado, a dentina vai se tornando cada vez mais sensível a certos fatores como: doce, frio e ácidos, e com isso, o paciente, começa a sentir dores que provocam desconfortos e acabam que por influenciar na sua qualidade de vida (ALEXANDRE *et al.*, 2006).

A progressão da cárie pode ser controlada mediante ao uso de agentes químicos-mecânicos ou através de métodos cirúrgicos-restaurados (NYVAD, 2005). Além disso, boa prática de escovação aliada ao uso de antimicrobianos promove a inibição da formação de biofilmes sobre a superfície dos dentes (MARSH; MARTIN, 2005). O gluconato de clorexidina é um agente antiplaca mais estudado e mais eficaz (FEJERSKOV; KIDD, 2005). É bastante usado como substância padrão para mensuração do potencial de outros agentes devido largo espectro na atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (FEJERSKOV; KIDD, 2005). Porém é comprovado que o mesmo não pode ser usado por tempo prolongado em virtudes dos efeitos colaterais como queimaduras na mucosa e coloração indesejável nos dentes (MARSH; MARTIN, 2005).

O flúor também é um químico importante no controle desta patologia, devido a sua capacidade de remineralizar a estrutura dentária (LYNCH; SMITH, 2012). Atualmente a maioria dos produtos usados para prevenção da cárie é à base de flúor, como por exemplo, os dentífrícos, enxáguatorios, géis e vernizes além de está presente na água de consumo. A ação remineralizante do flúor se dá pela reação com os tecidos dentários formando CaF_2 ou fluorapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2]$ dependendo dos níveis de pH do meio (GABRIEL, 2009). No entanto assim como a clorexidina o flúor possui efeitos colaterais, uma vez que o uso em

excesso ocasiona a fluorose dentária caracterizada pelo aparecimento de manchas esbranquiçadas na superfície do dente.

2.7 Biofilmes

A boca é um ambiente propício para desenvolvimento de micro-organismos. Segundo KOLEMBRANDER (2010) a boca é comparada a uma ilha por ser um ambiente único com presença de água (saliva) e de uma superfície rígida (dentes), além de possuir mudanças na temperatura e na disposição dos nutrientes. Os habitantes dessa ilha são os micro-organismos que se encontram distribuídos por toda a cavidade oral colonizando regiões como mucosas (palato, bochechas, língua etc.), superfícies dentárias (lisas, proximais, fissuras) e o sulco gengival (FEJERSKOV; KIDD, 2005). Vale ressaltar, que colonização microbiana nestes ambientes não é homogênea, pois dados moleculares confirmam a existência de 700 espécies de micro-organismos diferentes, sendo 50% destes não cultiváveis em laboratório (AAS *et al.*, 2005, ZAURA *et al.*, 2009). A maioria destas espécies são inofensivas ao hospedeiro, no entanto algumas foram identificadas como agentes causadores de doenças como a cárie e a periodontite (MEYER; FIVES-TAYLOR, 1998).

As bactérias não se ligam diretamente a superfície do dente, antes é necessária a presença de uma fina camada protéica chamada de película adquirida (FEJERSKOV; KIDD, 2005). Esta película, por sua vez, é rica em proteínas e glicoproteínas proveniente de diferentes fontes, incluído saliva, componentes bacterianos, fluídos creviculares, restos de alimentos e de sangue (SCANNAPIECO, 1994). As glicoproteínas existentes atuam como receptores que são reconhecidos pelas adesinas das bactérias que interagem através forças eletrostáticas (HARA; ZERO, 2010).

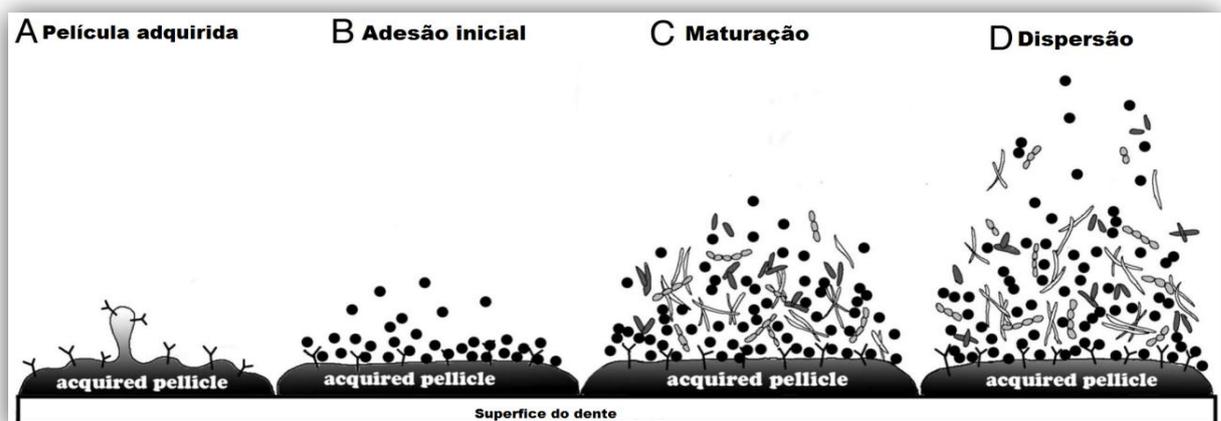
Independente do tipo de superfície do dente os colonizadores iniciais constituem uma parte selecionada da microbiota oral, principalmente os estreptococos do grupo mitis, que incluem *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus gordonii* (BLACK *et al.*, 2004). Juntas, essas espécies de estreptococos somam 95% dos estreptococos e 56% do total da microbiota inicial (NYVAD; KILIAN, 1990). À medida que estas bactérias aderem-se e se multiplicam substâncias poliméricas extracelulares (SPE) são produzidas, facilitando que outras espécies de gênero diferentes interajam, até atingir um biofilme maduro no tempo de duas a três semanas (KOLEMBRANDER, 2010).

Os biofilmes são considerados uma fase do ciclo de vida dos micro-organismos que se diferenciam da vida planctônica (vida em suspensão) (LUCCHESI, 2006). São

definidos como uma associação de células bacterianas e/ou fungos, fixada a umas superfícies, biótica ou abiótica, inclusas em uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas, juntamente com nutrientes capturados para a formação da matriz (CASALINE, 2008).

Segundo Huang, Li e Gregory (2011), a formação do biofilme se dá através de quatro eventos: formação da película, adesão inicial, maturação e dispersão do biofilme (FIGURA 4). Os biofilmes orais são os únicos dentre os biofilmes existentes que necessitam de glicoproteínas salivares para se anexar ao hospedeiro e desenvolver um biofilme. Para isso é necessário o envolvimento do dente pela **película adquirida**, que por sua vez fornece proteínas como a prolina, α -amilase dentre outras necessárias para **adesão inicial**. As bactérias que se encontra na forma planctônica ligam-se reversivelmente à película por interações fracas. As que ficam aderidas (colonizadoras iniciais) começam a produzir EPS (Substância Poliméricas Extracelulares) com a finalidade de manter as células fixas e unidas - neste momento a interação torna-se irreversível. À medida que as células vão se multiplicando e ocupando espaço, outras espécies chamadas de colonizadoras secundárias se ligam a essas bactérias dando início a **maturação** do biofilme. A última etapa da formação do biofilme é a **dispersão das células**, onde as células deixam o biofilme maduro e começam a colonizar outras locais em busca de nutrientes para sua sobrevivência.

FIGURA 4 - Formação do biofilme oral.



Fonte: Huang (2011): A- Revestimento da superfície do dente com saliva formando a película adquirida, B- adesão inicial das bactérias à película, C- maturação do biofilme com a coagregação de outras espécies à bactérias já aderidas e D- dispersão de bactérias para a colonização de outros microambientes.

As bactérias inseridas no biofilme tornam-se 1000 vezes mais resistentes à ação de antibióticos, protozoários, alterações mecânicas, temperatura e sistema imunológico do hospedeiro (TORTORA; FUNK; CASE, 2011; LÒPEZ; VLAMASK; KOLTER, 2010). O

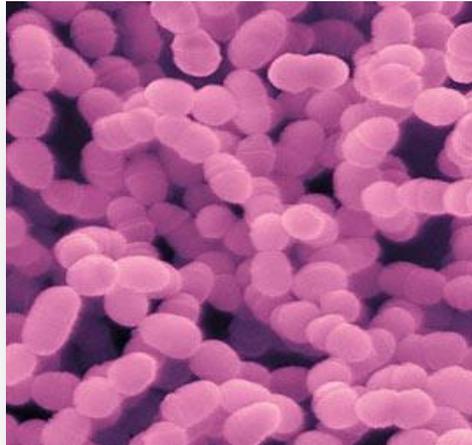
aumento dessa resistência está intimamente relacionado à presença de Substâncias Poliméricas Extracelulares-SPE. Estas SPE atuam como barreira dificultando a passagem de agentes antimicrobianos para dentro do biofilme, bem como a expressão de metabólitos secundários necessários para o bloqueio da ação desses agentes (LEWIS, 2005).

Além da resistência os biofilmes são geralmente patogênicos, essa característica está muitas vezes relacionadas com a presença de determinados patógenos como *Streptococcus mutans* (EGUCHI *et al.*, 2011). Através de estudos realizados *S. mutans* foi encontrado colonizando lesões nas superfícies do dente, além de induzir a formação de cárie em ratos (LOESCHE, 1986).

2.8 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans é caracterizado como um coco gram-positivo (FIGURA 5) de morfologia ovalada, medindo aproximadamente 0,5 a 0,75 µm de diâmetro, na qual agrupam-se aos pares ou em cadeias (TORTORA, FUNKE, CASE, 2011). São bactérias anaeróbias facultativas, capazes de metabolizar uma grande variedade de açúcares (BALLINI; 2011). Encontra-se inserida no grupo mutans, formado por 8 sorotipos (*a-h*), com base na especificidade sorológica e nos antígenos de carboidratos localizados na parede celular (MARSH; MARTIN, 2005; NAKANO; OOSHIMA, 2009). Estão contidas neste grupo sete espécies distintas, tais como: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. macacae*, *S. ferus* e *S. downei* (MARSH; MARTIN, 2005). Dentre estas, *S. sobrinus* dá continuidade ao desenvolvimento da cárie iniciada por *S. mutans* (KÖHLER *et al.*, 2003 *appud* (BALLINI; 2011). *Streptococcus mutans* pode colonizar a orofaringe, o trato gastrointestinal e o trato urinário, além de ocasionar infecções no endocárdio e infecções intra-abdominais (MURRAY, 1998).

FIGURA 5 – *Streptococcus mutans*



Fonte: [http://odontopedia.info/index.php/Streptococcus_mutans:Streptococcus mutans](http://odontopedia.info/index.php/Streptococcus_mutans:Streptococcus_mutans) vista em microscópio eletrônico.

De acordo com os sorotipos, *S. mutans* é classificada em três tipos *c*, *e*, e *f* que se diferenciam pela presença de polímeros de ramnose, glicose na parede celular (NAKANO; OOSHIMA, 2009). Estes polímeros por sua vez, são formados de uma cadeia central com resíduos de ramnose α -1,2 e α -1,3; e cadeias com resíduos glicolíticos β -1,2 sorotipo *e* α -1,2 sorotipo *c*, β -1,2 e α -1,3 sorotipo *f*. A presença na cavidade oral destes sorotipos variam muito como, por exemplo, o sorotipo *c* encontra-se em maior quantidade cerca de 70-80%, seguido do sorotipo *e* 20% e do sorotipo *f* em menor quantidade com 5% (NAKANO; OOSHIMA 2009).

A diferenciação desses açúcares na parede celular bacteriana pode ser apontada como fator de virulência, assim como a capacidade de adesão na superfície, produção de bacteriocinas (mutacinas) (RODRIGUES *et al.*, 2008), produção de ácidos e a tolerância em pH relativamente baixo (ARNOLD *et al.*, 2007). O conjunto destes fatores resulta na modificação da ecologia da placa dentária, favorecendo o aumento de *S. mutans* e de micro-organismos similares (MARSH; MARTIN, 2005) como, por exemplo, *Streptococcus sobrinus* que segundo Köhler, Bikhed e Olsson 1995, em experimentação animal, se mostrou tão acidogênica quanto *S. mutans*.

A adesão de *Streptococcus mutans* a superfície do dente é independente da sacarose resultando na ligação de adesinas bacterianas a glicoproteínas salivares que recobrem a superfície do dente (NOBBS *et al.*, 2009). *Streptococcus mutans* interagem com aglutininas salivares, superfície epiteliais e outras bactérias (BALLINI, 2011). Dentre as adesinas pode-se destacar o Antígeno I / II, e a proteína A, chamada de WapA, presentes na superfície de *S.*

mutans, auxiliam no reconhecimento e na adesão da bactéria à proteínas salivares ricas em prolina (NICOLAS; LAVOIE; 2011).

A bactéria na presença da sacarose expressa enzimas GTF's, glicosiltransferase, e FTS's, futasiltransferase, que quebram a sacarose em glicose e frutose produzindo energia e grande quantidade de ácido láctico (BOWEN; KOO, 2011). As moléculas de glicose são convertidas, através dessas enzimas, em polissacarídeos intracelulares de alto peso molecular (amilopectina ou glicogênio) (MARSH; MARTIN, 2005). Este processo proporciona armazenamento de material para o metabolismo energético quando nenhum substrato exógeno for encontrado. Além disso, na ausência de sacarose, os *S. mutans* podem produzir hidrolases glicosídicas que extraem carboidratos da saliva como fonte energética (KINDBLOM *et al.*, 2012).

Os *S. mutans* produzem pelo menos três GTF's distintas que atuam quebrando sítios de ligação $\alpha(1\rightarrow3)$ e $\alpha(1\rightarrow6)$ ligados a glucanos (BURNE, 1998). A GTF B sintetizam primeiramente glucanos insolúveis, GTF C produz uma mistura de glucanos solúveis e insolúveis, enquanto GTF D forma predominantemente glucanos solúveis (AOKI *et al.*, 1986; HANADA; KURAMITSU, 1989 *appud* BALLINI, 2011). Juntas essas enzimas auxiliam na adesão de *S. mutans* e de outras bactérias a superfície, porém com afinidades diferentes a hidroxiapatita (NAPIMONGA *et al.*, 2005; BOWEN; KOO, 2011), sendo a GTF C com maior afinidade por possuir mais sítios de ligação do que as GTF D ou B (VACCA-SMITH; BOWEN, 1991).

Além das glicosiltransferases, existem proteínas de ligação a glicanos (Gbps) que ajudam o micro-organismo no reconhecimento dos glucanos e assim facilitando seu acúmulo (STIPP *et al.*, 2008). Têm sido identificadas pelo menos 4 tipos de Gbp em *S. mutans*: Gbp A (RUSSELL, 1979), Gbp B (SMITH *et al.*, 1994), Gbp C (SATO; YAMAMOTO, 1997) e Gbp D (GUGGENHEIM; BURCKHARDT, 1974; RUSSELL, 1979; BANAS; VICKERMAN, 2003). Essas Gbp são proteínas extracelulares que se encontram associadas à parede celular da bactéria formando uma "ponte" que liga as superfícies celulares destes micro-organismos à matriz celular de glucanos (NICOLAS; LAVOIE 2011).

2 OBJETIVO

3.1 Geral

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos isolados do extrato etanólico das partes aéreas de *Mitracarpus baturitensis* frente à bactéria *Streptococcus mutans*.

3.2. Objetivos específicos

- Obter o extrato etanólico (EEMB), as frações, assim como o isolar, purificar e caracterizar os metabólitos secundários das partes aéreas de *Mitracarpus baturitensis*;
- Verificar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos metabólitos secundários sobre *Streptococcus mutans*;
- Analisar o efeito dos metabólitos secundários sobre a curva do tempo de morte da bactéria;
- Verificar a formação de biomassa bacteriana no biofilme monoespécie de *S. mutans* quando submetido à ação dos metabólitos secundários;
- Verificar o efeito dos metabólitos secundários do extrato etanólico da *Mitracarpus baturitensis* sobre o biofilme formado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Parte experimental

4.1.1 Métodos de análise

4.1.1.1 Métodos cromatográficos

As cromatografias de adsorção foram executadas utilizando gel de sílica, com granulometria de 70-230 mesh, da marca Vetec (cromatografia gravitacional) e 230-400 mesh da marca merck para cromatografia sob média pressão (cromatografia flash). O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as alíquotas das amostras a serem cromatografadas e com a quantidade de sílica empregada. As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando folhas ou lâminas comerciais de gel de sílica 60, ($\text{\O} \mu\text{m}$ 5-40), com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm (F_{254}) sobre cromatofolha de poliéster, MACHEREY NAGEL ou lâminas de vidro revestidas com gel de sílica 60 (0,063 - 0,200 MM) (70 – 230 MESH).

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

4.1.1.2 Métodos físicos

4.1.1.2.1 Ponto de fusão

Os pontos de fusão das substâncias isoladas foram obtidos em equipamento de Microdeterminação digital da Microquímica com placa aquecedora e uma central de

processamento MQAPF-302. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 2°C/min e não foram corrigidas.

4.1.1.2.2 Espectroscopia na região de absorção do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção, na região do infravermelho, foram registrados em espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 1000-FT, utilizando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr).

4.1.1.2.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo DPX-500, operando na frequência de 500 MHz para hidrogênio e 125 MHz para carbono-13.

O solvente deuterado utilizado na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foi (CDCl_3).

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN ^1H pelo pico de hidrogênio pertencente à fração não deuterada do solvente clorofórmio (δ_{H} 7,27), enquanto que nos espectros de carbono-13 os deslocamentos químicos (δ) foram referenciados pelo pico central do carbono-15 do clorofórmio (577,23).

As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convenção; s (singleto), d (dubleto), dd (duplo dubleto), t (tripleto), quint. (quinteto) e sext. (sexteto).

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através da utilização da técnica DEPT (Distortionsless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulo de nutação de 135° (CH e CH_3 com amplitude em oposição aos CH_2). Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração dos sinais do espectro BB (Broad Band) e DEPT 135°, e segundo convenção: C (carbono não-hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico) e CH_3 (carbono metílico).

4.2 Isolamento, purificação e caracterização dos constituintes químicos isolados.

4.2.1 Obtenção do material botânico de *Mitracarpus baturitensis*.

A planta foi coletada na Serra do Rosário - Distrito de Jordão, estado da Ceará em Março de 2009 e identificada pelo Prof. Elnatan Bezerra de Sousa (Coordenação de Biologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA). A exsicata, correspondente a coleta, encontra-se depositada no Herbário Francisco José de Abreu Matos - UVA, sob o número 14660.

4.2.2 Obtenção do extrato etanólico das partes aéreas de *M. baturitensis*.

As partes aéreas de *Mitracarpus baturitensis* (518,2 g) foram secas a temperatura ambiente, trituradas e extraídas com etanol por um período de 15 dias. A solução resultante foi destilada sob pressão reduzida, seca em banho-maria resultando em 150 g de extrato etanólico, o qual foi codificado de EEMB.

4.2.3 Tratamento cromatográfico do extrato etanólico (EEMB).

Uma alíquota de 100 g de extrato etanólico (EEMB) foi submetida a uma partição sequencial (extração líquido-líquido), onde o material foi inicialmente solubilizado em 100 mL de uma mistura de MeOH/H₂O (7:3). A solução hidrometanólica foi extraída com 70 mL de AcOEt. A fase orgânica foi então separada da fase aquosa, que foi novamente submetida à extração com 70 mL de *n*-BuOH. Cada extração foi repetida por três vezes e as soluções resultantes foram evaporadas a pressão reduzida, fornecendo três frações, descritas na Tabela 1.

TABELA 1 - Dados referentes à partição líquido-líquido de EEMB.

Frações resultantes	Sigla	Peso (g)	Re (%)
AcOEt	FAMB	43,0	43,0
<i>n</i> -BuOH	FBMB	36,3	36,3
Hidrometanólica	FHMMB	6,4	6,4

Fonte: Arquivo próprio

4.2.4. Fracionamento cromatográfico da fração acetato (FAMB).

A fração FAMB (43,0 g) foi misturada a 126,6 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e disposta sobre 140,0 g de gel de sílica em coluna de 250 mL. A eluição foi realizada com os solventes: hexano/ CHCl_3 50%, CHCl_3 , $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 50%, AcOEt e MeOH. As soluções obtidas (1 x 500 mL cada) foram concentradas sob pressão reduzida e, posteriormente, analisadas por CCD resultando em 5 frações, descritas na Tabela 2.

TABELA 2 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de FAMB.

Eluente	Concentrações (%)	Peso (g)
Hexano/ CHCl_3	50	0,8
CHCl_3	100	0,1
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$	50	4,7
AcOEt	100	2,6
MeOH	100	35,3

Fonte: Arquivo próprio.

4.2.5 Fracionamento cromatográfico da fração $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 50% isolamento do ácido ursólico (AU) e do ácido pomólico (AP).

A fração $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 50% (4,7 g), obtida da fração FAMB, foi misturada a 5,77 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e disposta sobre 52,0 g de gel de sílica em coluna de 125 mL. O fracionamento foi realizado com a série de eluentes: hexano, CHCl_3 , AcOEt e MeOH, puros ou em mistura binárias, em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 34 frações de 25 mL cada, de acordo com a Tabela 3.

TABELA 3 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 50%

Eluente	Concentrações (%)	Frações (25 mL)
hexano/ CHCl_3	50:50	1-2
hexano/ CHCl_3	40:60	3-4
hexano/ CHCl_3	30:70	5-6

hexano/CHCl ₃	20:80	7-8
hexano/CHCl ₃	10:90	9-10
CHCl ₃	100	11-12
CHCl ₃ /AcOEt	90:10	13-14
CHCl ₃ /AcOEt	80:20	15-16
CHCl ₃ /AcOEt	70:30	17-18
CHCl ₃ /AcOEt	60:40	19-20
CHCl ₃ /AcOEt	50:50	21-22
CHCl ₃ /AcOEt	40:60	23-24
CHCl ₃ /AcOEt	30:70	25-26
CHCl ₃ /AcOEt	20:80	27-28
CHCl ₃ /AcOEt	10:90	29-30
AcOEt	100	31-32
MeOH	100	33-34

Fonte: Arquivo próprio.

Estas frações foram concentradas sob pressão reduzida e analisadas por CCD, resultando nos seguintes grupos: Fr. 1-2 (12,4 mg), Fr. 3-5 (15,8 mg), Fr. 6-21* (3,9 g), Fr. 22-23 (107,4 mg), Fr. 24-26 (63,8 mg), Fr. 27-29 (33,7 mg), Fr. 30-34 (72,1 mg).

A fração 6-21 (3,9 g) foi misturada a 1,6 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 31,2 g de gel de sílica em coluna de 125 mL. O fracionamento foi conduzido com os solventes: hexano, CHCl₃, AcOEt e MeOH, puros ou em mistura binárias, aumentando gradativamente a polaridade como indicado na Tabela 4. Foram coletadas 153 frações de aproximadamente 10 mL cada, cuja análise por CCD permitiu reuni-las em sete grupos: Fr. 1-7 (17,1 mg), Fr. 8-22 (69,6 mg), Fr. 23-38 (256,6 mg), Fr. 39-50 (282,5 mg), Fr. 51-142* (2,3 g), Fr. 143-153 (50,0 mg).

TABELA 4 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração 6-21.

Eluente	Concentrações (%)	Frações (10 mL)
hexano/CHCl ₃	50:50	1-8
hexano/CHCl ₃	40:60	9-21
hexano/CHCl ₃	30:70	22-33
hexano/CHCl ₃	20:80	34-46

hexano/CHCl ₃	10:90	47-59
CHCl ₃	100	60-71
CHCl ₃ /AcOEt	90:10	72-84
CHCl ₃ /AcOEt	80:20	85-97
CHCl ₃ /AcOEt	70:30	98-109
CHCl ₃ /AcOEt	60:40	110-120
CHCl ₃ /AcOEt	50:50	121-132
CHCl ₃ /AcOEt	10:90	133-143
AcOEt	100	144-149
MeOH	100	150-153

Fonte: Arquivo próprio.

A fração 51-142 (2,3 g) foi misturada a 3,6 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 54,3 g de gel de sílica em coluna de 125 mL. O fracionamento foi realizado com os solventes: hexano, CHCl₃, AcOEt e MeOH, puros ou em mistura binárias, em gradiente crescente de polaridade conforme descrito na Tabela 5. Desta coluna obteve-se 182 frações de 10 mL, as quais após análise por CCD foram reunidas em cinco grupos: Fr. 1-13 (1,2 mg), Fr. 14-44 (36,5 mg), Fr. 45-86* (823,0 mg), Fr. 87-156 *(572,3 mg) e Fr. 157-182 (93,5 mg).

TABELA 5 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração 51-142.

Eluente	Concentrações (%)	Frações (10 mL)
Hexano/CHCl ₃	10:90	1-17
CHCl ₃	100	18-31
CHCl ₃ /AcOEt	90:10	32-85
CHCl ₃ /AcOEt	80:20	86-109
CHCl ₃ /AcOEt	70:30	110-123
CHCl ₃ /AcOEt	60:40	124-136
CHCl ₃ /AcOEt	50:50	137-151
AcOEt	100	152-161
MeOH	100	162-182

Fonte: Arquivo próprio.

A fração 45-86 (823,0 mg) foi misturada a 1,3 g de gel de sílica “flash”, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 178,7 g de gel de sílica “flash”, em uma coluna de 125 mL. A coluna foi empacotada e eluída com $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 50%, obtendo-se 143 frações de aproximadamente 5 mL, que após análise por CCD, foram reunidas dando origem aos grupos: Fr. 1-104 (50,4 mg), Fr. 105-142 (245,1 mg), Fr. 143-153 (286,7 mg) e 154 (55,6 mg). A fração 105-142 (245,1mg) foi novamente submetida a uma coluna “flash”, sendo misturada a 564,4 mg de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 56,6 g de gel de sílica em coluna de 125 mL. O fracionamento foi realizado utilizando uma mistura binária de $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 30%. Deste fracionamento obteve-se 76 frações de aproximadamente 8 mL. A análise por CCD possibilitou reuni-las em cinco grupos: Fr. 1-16 (10,3 mg), Fr. 17-41 (129,7 mg), Fr. 42-57 (18,9 mg), Fr. 58-63 (17,0 mg), Fr. 64-76 (30,7 mg). À fração 17-41, obtida na forma de um sólido branco envolto em um líquido amarelo, foi adicionado acetona, seguida de filtração, resultando em 54,0 mg de um sólido branco, codificado como MB-1, que após comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C com a literatura (FALCÃO; FERNANDES; MENEZES, 2003) foi identificado como sendo o ácido ursólico (AU).

A fração 87-156 (572,3 mg), resultante do fracionamento cromatográfico da fração 51-142, foi misturada a 1,1 g de gel sílica “flash”, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 43,9 g de gel de sílica “flash”, em uma coluna de 125 mL. A coluna foi empacotada e eluída com uma mistura de hexano/acetona 20%, deste procedimento foram obtidas 93 frações de aproximadamente 8 mL, as quais foram reunidas após análise em CCD e resultaram nos seguintes grupos: Fr. 1-16 (23,9 mg), Fr. 17-28 (18,0 mg), Fr. 29-63 (127,9 mg), Fr. 64-68 (116,0 mg), Fr. 69-73 (127,0 mg), Fr: 74-77 (71,9 mg) e Fr. 78-94 (131,3 mg). A fração 29-63 (127,9 mg) foi misturada a 253,3 mg de gel de sílica pulverizada em gral de porcelana e submetida a uma nova coluna “flash” sobre 15,1 g de gel de sílica, em uma coluna de 125 mL. A coluna foi empacotada e eluída com uma mistura binária de hexano/acetona 30%. Desta coluna obteve-se 50 frações de aproximadamente 5 mL, que após análise por CCD foram reunidas da seguinte forma: Fr: 1-4 (14,0 mg), Fr: 5-9 (8,5 mg) e Fr: 10-50 (113,4 mg). A fração 10-50 (113,4 mg) foi novamente submetida a fracionamento cromatográfico utilizando gel de sílica “flash”, sendo misturada a 276,7 mg de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 25,64 g de gel de sílica “flash”. A eluição foi realizada com $\text{CHCl}_3/\text{acetona}$ 10%, foram obtidas 100 frações de aproximadamente 5 mL, das quais as frações 47-64, reunidas de acordo com seus Rfs, após monitoramento por CCD, resultaram em 71,3 mg de um sólido branco misturado com um sólido amarelo. A adição de acetona a

esta mistura, seguido de filtração, resultou em 43,7 mg de um sólido branco, amorfo, codificado de MB-2, que após comparação com substância padrão revelou tratar-se do ácido pomólico (AP).

4.3 Solubilização e diluição das substâncias teste

Para a solubilização dos materiais, levou-se em conta a diferença de polaridade dos mesmos. Dessa forma, os compostos AU e AP, foram solubilizados em dimeltilsulfóxido (DMSO) concentrado, em seguida, dissolvido em água destilada até obter uma concentração final de $1000 \mu\text{g. mL}^{-1}$, com uma porcentagem máxima de 8% de DMSO do volume total. Em seguida, as soluções foram submetidas a diluições seriadas na base dois para obtenção de diferentes concentrações ($500 - 7,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Como controles, foram utilizados clorexidina (controle positivo) nas concentrações decrescentes de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e água estéril com DMSO a 8% (controle negativo).

4.4 Micro-organismo

A espécie Gram-positiva *Streptococcus mutans* ATCC 25175, usada neste estudo, foi gentilmente cedida pelo Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ Rio de Janeiro-Brasil.

4.5 Crescimento da estirpe

Partindo de uma cultura estoque em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) com 20% de glicerol, 50 μL da bactéria foi inoculado em 5 mL de meio BHI caldo fresco e incubada por 24 h, a 37 °C com 10% de CO_2 . Após a ativação inicial, a cultura foi renovada, transferindo-se 50 μL do inóculo para 5 mL de BHI caldo estéril e cultivado sobre as mesmas condições de crescimento anteriormente citadas.

4.6 Ajuste da Absorbância

Após a ativação e crescimento da bactéria, a cultura foi transferida para tubos tipo eppendorf e centrifugados (5000 rpm, 4°C por 5 min), sendo ressuspensa em novo meio BHI caldo estéril duas vezes concentrado e então reunido em tubos falcons de 50 mL, que

com o auxílio do espectrofotômetro (Sunrise-tecam) a 640 nm, teve sua densidade celular ajustada a 2×10^6 CFU mL⁻¹.

4.7 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos AU e AP foi realizada segundo o teste de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços de fundo “U” padronizada segundo a diretriz M7-A 6ª edição (metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico), tradução de uma norma de aplicação global desenvolvida mediante o processo do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).

Cada poço da placa foi preenchido inicialmente com 100 µL da suspensão bacteriana meio BHI caldo (2×10^6 CFU mL⁻¹). Em seguida adicionou-se mais 100 µL das substâncias teste nas concentrações acima citadas, obtendo um volume final de 200 µL.

Em seguida, a placa foi incubada por 24 horas, a 37°C com 10% de CO₂. A avaliação do crescimento bacteriano foi mensurada pela turbidez com auxílio do espectrofotômetro (Sunrise-tecam) a 620 nm. Foi considerado CIM (Concentração Inibitória Mínima) a menor concentração das substâncias testes capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano. Para determinação da CBM (Concentração Bactericida Mínima) foi retirado 10 µL da solução contida nos poços da placa que não apresentaram crescimento microbiano, e inoculados em placas de petri com meio BHI Agar e em seguida incubadas nas mesmas condições do experimento. Após o período de 24 horas avaliou-se o crescimento bacteriano.

4.8 Curva do tempo de morte

Para a realização deste teste, foi adicionado em uma placa de poliestireno de 96 poços 100 µL da solução teste na concentração de 500 µg.mL⁻¹ juntamente com 100 µL de suspensão bacteriana em meio BHI caldo (2x) com a densidade celular (2×10^6 CFU mL⁻¹). O mesmo foi realizado para os controles positivo e negativo. A placa montada foi então incubada em 10% de CO₂ à 37°C. Nos tempos 0, 5, 10, 15, 30, 60 minutos e 1, 5, 12 e 24 horas de incubação, foram coletadas alíquotas de 10 µL de cada poço do teste, controle positivo e negativo, homogeneizados em eppendorf e diluídos seriadamente na base dez em NaCl 0,15%. Em seguida 10 µL de cada diluição foram plaqueadas e incubadas por 48 horas

nas mesmas condições citados anteriormente. Após esse tempo as colônias crescidas foram contadas e corrigidas o número de células, multiplicando o número de UFC na placa pela diluição, expressando o valor em número de UFC mL⁻¹.

4.9 Ensaio de inibição da formação do biofilme

Placas de poliestireno de 96 poços foram preenchidas com 100 µL das soluções teste nas diferentes concentrações, mais 100 µL de suspensão bacteriana com a densidade celular (2×10^6 CFU mL⁻¹) em meio BHI caldo (2x concentrado), suplementado com 2% de sacarose. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas, a 37°C com 10% de CO₂.

4.9.1 Quantificação da biomassa

Após 24 horas de incubação os poços foram lavados com água destilada (3x) para retirada das células fracamente aderidas e adicionado 200 µL de metanol a 95% por 10 minutos para fixação das células em biofilme. Adicionou-se, então, 200 µL de cristal de violeta 0,1% por mais 10 minutos, em temperatura ambiente para corá-lo. Após duas lavagens com água destilada, o corante remanescente foi removido com ácido acético 33% e então as moléculas de biofilme foram quantificadas através da medição da densidade óptica a 570 nm pelo leitor de placas ELISA (BioTrak II Plate Reader-Amersham Biosciences).

4.10 Ensaio de susceptibilidade do biofilme

Em duas placas de microtitulação foram adicionados 200µL de BHI caldo suplementado com 1% de sacarose juntamente com a suspensão bacteriana ajustada para 2×10^6 CFU mL⁻¹. Em seguida as mesmas foram incubadas por 24horas a 37°C em CO₂. Após esse tempo, as células em suspensão foram retiradas e as células fixas foram lavadas com NaCl 0,15% (3x) . Em seguida 100µL do teste na concentração de 500 µg.mL⁻¹ e 100µL de meio BHI (2x) suplementado com 2% de sacarose foram adicionados aos poços de ambas as placas. O mesmo procedimento foi realizado para o controle positivo, já para o controle negativo, houve apenas à troca do meio. As placas foram incubadas durante 1hora nas mesmas condições anteriores. Ao passar o tempo de 1h uma placa foi quantificada a sua biomassa com CV (item 4.7.1) e na outra fez-se a verificação da viabilidade celular pela contagem de UFC.

4.10.1 Análise da viabilidade celular por Unidades formadoras de colônias UFC

Para execução do referido teste através do método de Contagem de Unidade formadora de colônias (UFC), a placa de biofilme crescido foi retirada da estufa e submetida a três lavagens com solução de NaCl 0,15 M. Posteriormente 200 μ L da mesma solução foi adicionado aos poços da placa e levado para o banho ultra-som (Sonicor/SC-52) por 10 minutos para liberação das células formadoras de biofilme. O volume de cinco poços foram retirados, com movimento de up-down e reunidos em um eppendorf esterilizado resultando em um volume final de 1 mL. Em seguida, em uma nova placa de 96 poços realizou-se a diluição seriada na base dez da suspensão de células para posterior plaqueamento e incubação a 37°C durante 24 horas. Após a contagem do número de colônias crescidas em cada placa, foi feito a correção do número de células multiplicando o número de UFC na placa pela diluição, expressando o valor em número de UFC mL⁻¹.

4.11 Análise estatística

Trata-se de um estudo quantitativo experimental. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados dos testes antimicrobianos, foram demonstrados através de gráficos. A diferença entre as médias das triplicatas foi verificada através da aplicação do teste One-way ANOVA com Bonferroni pós-teste, executados com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 3.00 para Windows, Software GraphPad, San Diego California USA. Nesses testes foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,001$.

5 RESULTADOS

5.1 Elucidação estrutural do metabólito bioativo isolado de *Mitracarpus baturitensis*

5.1.1 Determinação estrutural de MB-1

O tratamento cromatográfico da fração hexano/AcOEt 50%, do extrato etanólico das partes aéreas de *M. baturitensis*, de acordo com o procedimento experimental (ITENS 4.2.3), resultou no isolamento de um sólido branco amorfo e com ponto de fusão na faixa de 237,5-241,7°C.

O espectro de absorção na região do infravermelho (FIGURA 7) apresentou uma banda em 3399 cm^{-1} , compatível com a presença de grupo hidroxila, uma banda intensa em 2924 cm^{-1} , característica de deformação axial de ligação C-H; uma banda em 1686 cm^{-1} , compatível com a presença de uma carbonila de ácido carboxílico, além das absorções em 1029 cm^{-1} referente a deformação axial de ligação C-O e 1456 cm^{-1} referente a deformação axial de alcenos.

O espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] (FIGURA 9) apresentou 30 linhas espectrais. Através da interpretação dos espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° (FIGURA 10), foi possível determinar para a estrutura de AU a presença de sete carbonos metínicos, nove carbonos metilênicos, sete carbonos metílicos e seis carbonos não-hidrogenados, observados na Tabela 6. Esses dados forneceram subsídios para deduzir a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}$, a qual apresenta 7 lacunas de insaturação.

TABELA 6 -Padrão de hidrogenação determinado por meio da análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° de MB-1.

C	CH	CH ₂	CH ₃	Fórmula molecular
180,3 (C=O) ^a	78,1 (CO) ^a	39,4	29,2	
139,6	126,0	37,8	24,3	
48,4	56,2	33,9	21,8	
42,9	53,9	31,4	17,9	
40,3	48,4	30,4	17,8	
37,7	39,8	28,4	16,9	

37,6	39,9	25,3	16,4	
		24,0		
		19,2		
6C	7CH	9CH ₂	7CH ₃	C ₃₀ H ₄₈ O ₃

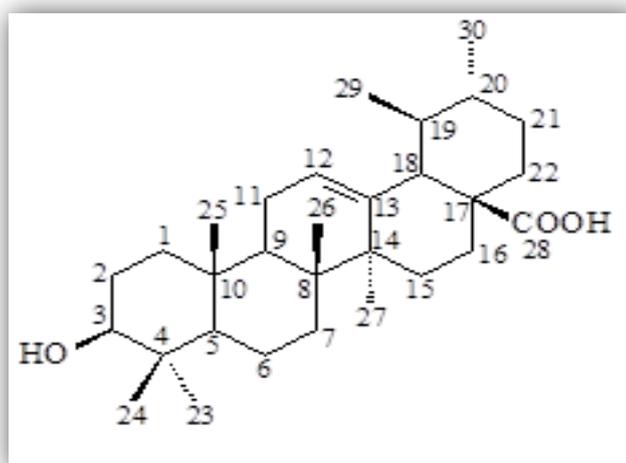
Fonte: Arquivo próprio. ^a- carbonila de ácido; b- oxigênio pertencente a um grupo hidroxila.

O sinal em δ_C 78,5 (CH) caracterizou um carbono oxigenado. Os sinais em δ_C 139,6 (C) e 126,0 (CH) evidenciaram a presença de uma dupla ligação trissubstituída.

O espectro de RMN ¹H [300 MHz, C₅D₅N] (FIGURA 8) apresentou um singlete largo em δ_H 5,52 (1H, sl, H-12), característico de hidrogênio olefínico. Um sinal em δ_H 3,48 (1H, t, $J = 8,1$ Hz, H-3), referente a hidrogênio pertencente ao carbono carbinólico e sete sinais correspondentes a grupamentos metílicos, cinco deles apresentando-se como singlete δ_H 0,91, 1,04, 1,07, 1,25 e 1,27 e dois como um dublete em δ_H 0,97 e 1,01.

Com base na análise exposta acima, e comparação com dados obtidos de RMN ¹H e RMN ¹³C registrados na literatura (GOHARI *et al.*, 2009), de acordo com a tabela 7, pág. 44, concluiu-se que MB-1 tratava-se do triterpeno de esqueleto ursano, ácido 3 β -hidroxi-urs-12-eno-28-óico, usualmente conhecido como ácido ursólico, isolado de *Mitracarpus scaber* (GBAGUIDI *et al.*, 2005).

FIGURA 6 - Ácido 3 β -hidróxi-urs-12-eno-28-óico (Ácido ursólico)



Fonte: Arquivo próprio

TABELA 7 -Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3) de MB-1.

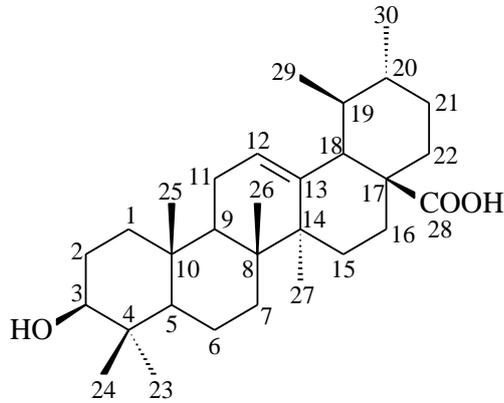
C	MB1	Lit.*
	δ_{C}	δ_{C}
1	39,4	39,4
2	28,4	28,1
3	78,5	78,1
4	37,7	39,1
5	56,2	55,8
6	19,2	18,8
7	33,9	33,6
8	40,3	40,0
9	48,4	48,0
10	37,6	37,3
11	24,0	23,6
12	126,0	125,7
13	139,6	139,3
14	42,9	42,5
15	30,4	28,7
16	25,3	24,9
17	48,4	48,0
18	53,9	53,6
19	39,9	39,5
20	39,8	39,4
21	31,4	31,1
22	37,8	37,5
23	29,2	28,8
24	16,9	16,6
25	16,4	15,7
26	17,9	17,5
27	24,3	23,9
28	180,3	179,9
29	17,8	17,5

30

21,8

21,4

Fonte: Arquivo próprio.*Deslocamentos químicos da literatura (GOHARI *et al.*, 2009).



Ácido 3 β -hidróxi-urs-12-eno-28-oi (Ácido ursólico)

FIGURA 7 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr)de MB-1

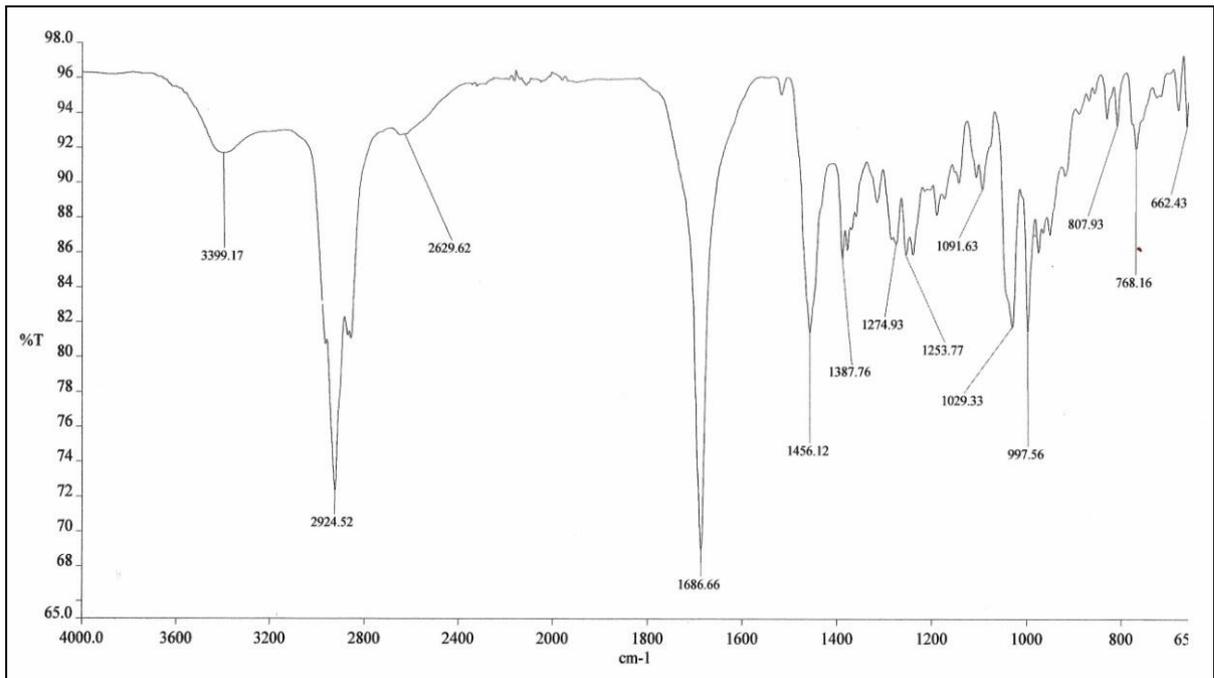


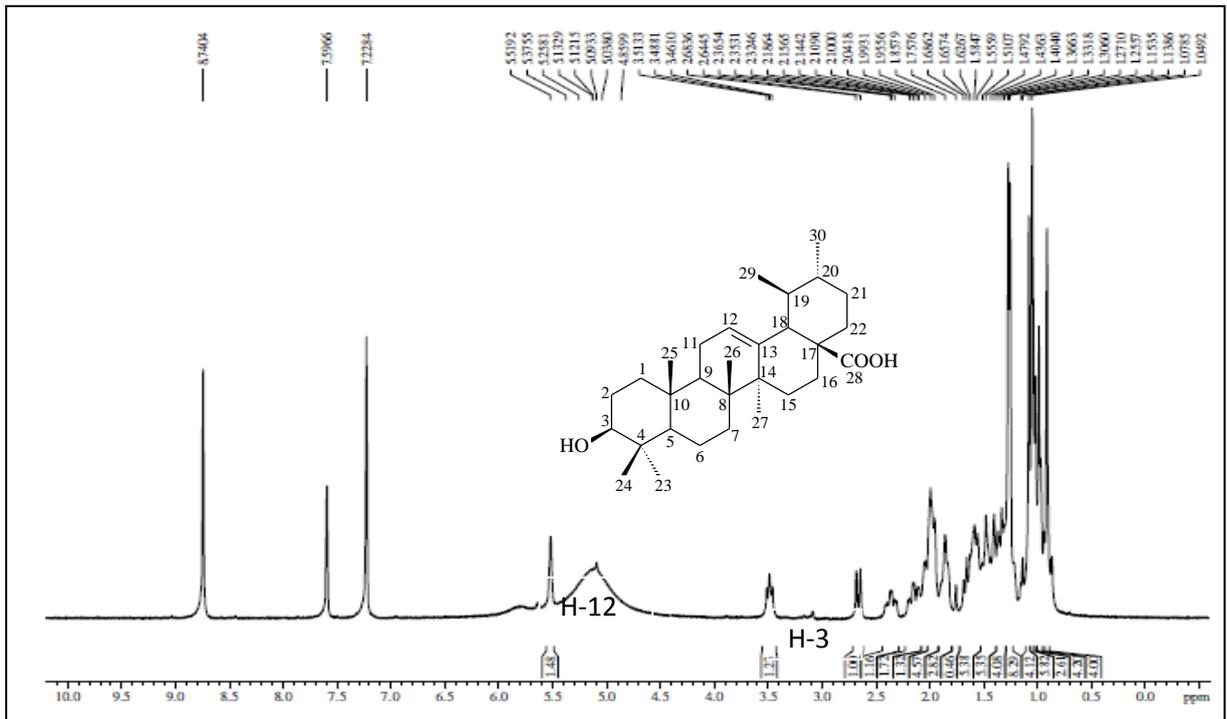
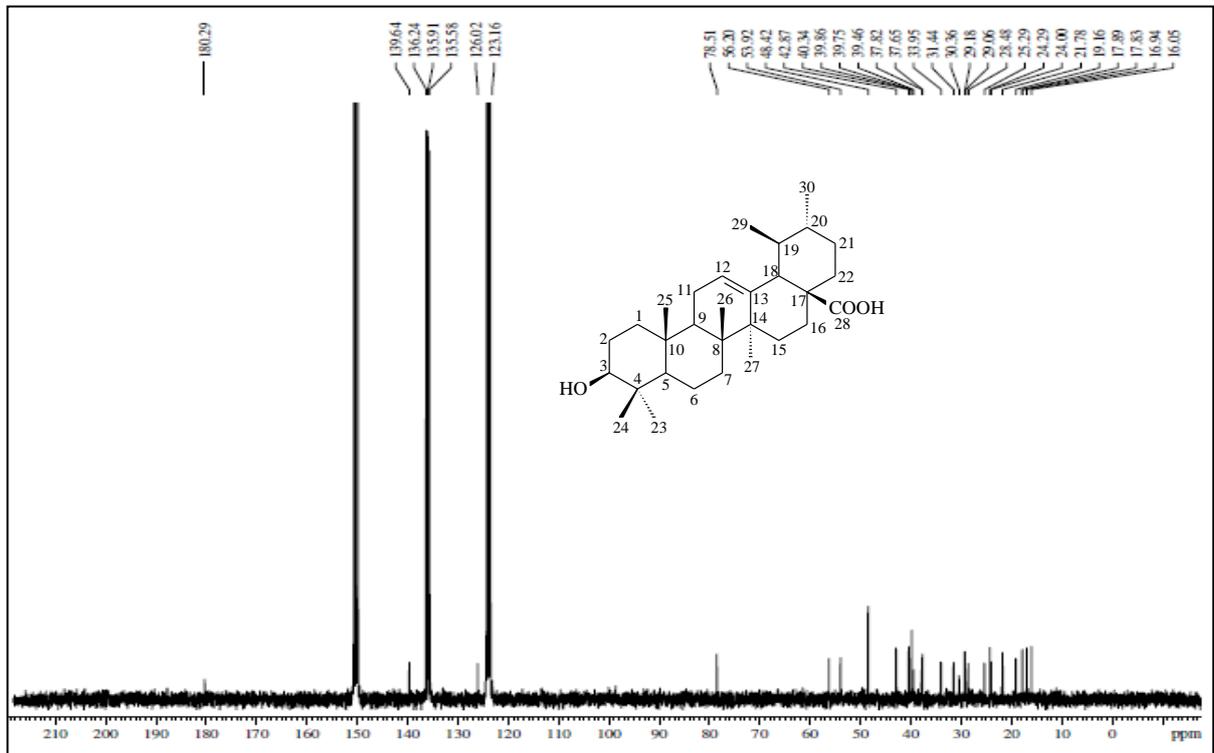
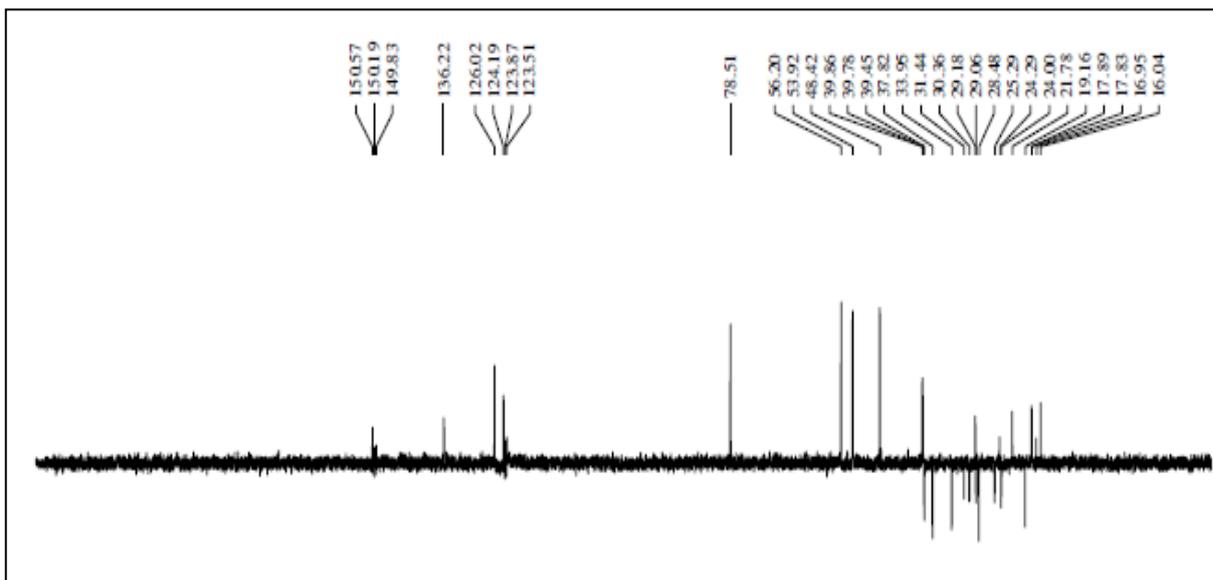
FIGURA 8 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de MB-1.FIGURA 9 - Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de MB-1.

FIGURA 10 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 $^{\circ}$ (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de MB-1.



5.1.2 Determinação estrutural de MB-2

O tratamento cromatográfico da fração $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 50%, do extrato etanólico das partes aéreas de *M. baturitensis*, de acordo com o procedimento experimental (ITEM 4.2.5) pág. 34, resultou no isolamento de um sólido branco amorfo e com ponto de fusão na faixa de 305,3-307,7 $^{\circ}\text{C}$.

O espectro de absorção na região do infravermelho (FIGURA 12) apresentou uma banda em 3383 cm^{-1} , que juntamente com a banda em 1685 cm^{-1} , evidenciaram a função ácido carboxílico. Bandas em 2927 e 2872 cm^{-1} , foram indicativas de deformação axial de ligação C-H; enquanto as bandas na faixa de 1046-1027 cm^{-1} foram atribuídas a deformação axial de ligação C-O.

O espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] (FIGURA 14) exibiu 30 linhas espectrais revelando a natureza terpenoídica do composto. A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135 $^{\circ}$ (Fig. 15, pág. 53), permitiu determinar para a estrutura de MB-2 a presença de seis carbonos metínicos, dos quais o sinal em $\delta_{\text{C}} 78,5$ corresponde a um carbono carbinólico; nove carbonos metilênicos, sete carbonos metílicos e oito carbonos não-hidrogenados, sendo o sinal em $\delta_{\text{C}} 73,1$ associado a um carbono sp^3 oxigenado (TABELA 8) pág.48.

O sinal em $\delta_{\text{C}} 181,0$ foi atribuído a um carbono carbonílico de ácido carboxílico, confirmado pelas bandas em 3383 e 1685 cm^{-1} , observadas no espectro de infravermelho. Os

sinais em δ_C 140,3 (C) e 128,4 (CH) são compatíveis com a presença de uma dupla ligação trissubstituída.

O espectro de RMN 1H [300 MHz, C_5D_5N] (FIGURA 13, PÁGINA52) apresentou um singlete largo em δ_H 5,64 (1H, sl, H-12), característico de hidrogênio olefínico. Um sinal em δ_H 3,47 (1H, dd, $J = 9,6$ e $6,3$ Hz, H-3), referente a hidrogênio pertencente a carbono carbinólico e sete sinais correspondentes a grupamentos metílicos, seis deles apresentando-se como singlete δ_H 0,94, 1,05, 1,13, 1,26 e 1,48, 1,75 e um como um dubleto em δ_H 1,13 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, H-30).

TABELA 8 -Padrão de hidrogenação determinado por meio da análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° de MB-2.

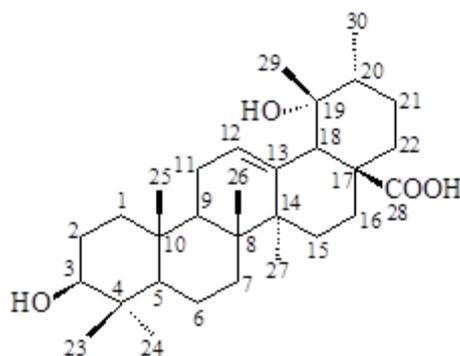
C	CH	CH ₂	CH ₃	Fórmula molecular
181,0 (C=O) ^a	78,5 (C-O) ^b	39,4	29,1	
140,3	128,4	38,9	27,3	
73,1(C-O) ^b	56,2	33,9	25,0	
48,7	55,0	29,2	17,5	
42,5	48,1	28,5	17,1	
40,7	42,7	26,7	16,9	
39,7		29,7	15,9	
37,7		24,4		
		17,6		
8C	6CH	9CH ₂	7CH ₃	C ₃₀ H ₄₈ O ₄

Fonte: Arquivo próprio.^acarbonila de ácido; b- oxigênio pertencente a um grupo hidroxila.

Com base na análise exposta acima, e comparação tabela 9, pág. 49, com dados obtidos de RMN 1H e RMN ^{13}C registrados na literatura (CHENG *et al.*, 2010), concluiu-se que MB-2 tratava-se do triterpeno de esqueleto ursano, ácido 3 β , 19 α -di-hidroxi-urs-12-eno-28-

óico, denominado usualmente de ácido pomólico, isolado pela primeira vez no gênero *Mitracarpus*.

FIGURA 11 - Ácido 3 β , 19 α -di-hidroxi-urs-12-eno-28-óico (Ácido pomólico)



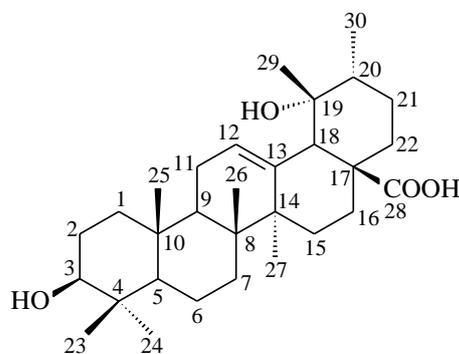
Fonte: Arquivo próprio.

TABELA 9 -Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C (CDCl_3) de MB-1.

C	MB2	Lit.*
	δ_c	δ_c
1	39,4	39,4
2	29,2	28,1
3	78,5	78,2
4	39,7	39,4
5	56,2	55,9
6	17,6	18,9
7	33,9	33,6
8	40,7	40,3
9	48,1	47,8
10	37,7	37,3
11	24,4	24,0
12	128,4	128,0
13	140,3	140,0
14	42,5	42,1
15	29,7	29,3
16	26,7	26,4

17	48,7	48,4
18	55,0	54,6
19	73,1	72,7
20	42,7	42,4
21	28,5	26,9
22	38,9	37,3
23	29,1	28,8
24	17,1	16,8
25	15,9	16,5
26	17,5	17,4
27	25,0	24,7
28	181,0	180,8
29	27,3	27,1
30	16,9	16,5

Fonte: Arquivo próprio.*Deslocamentos químicos da literatura (CHENG *et al.*, 2010).



Ácido 3 β , 19 α -di-hidroxi-urs-12-eno-28-óico

FIGURA 14 - Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de MB-2.

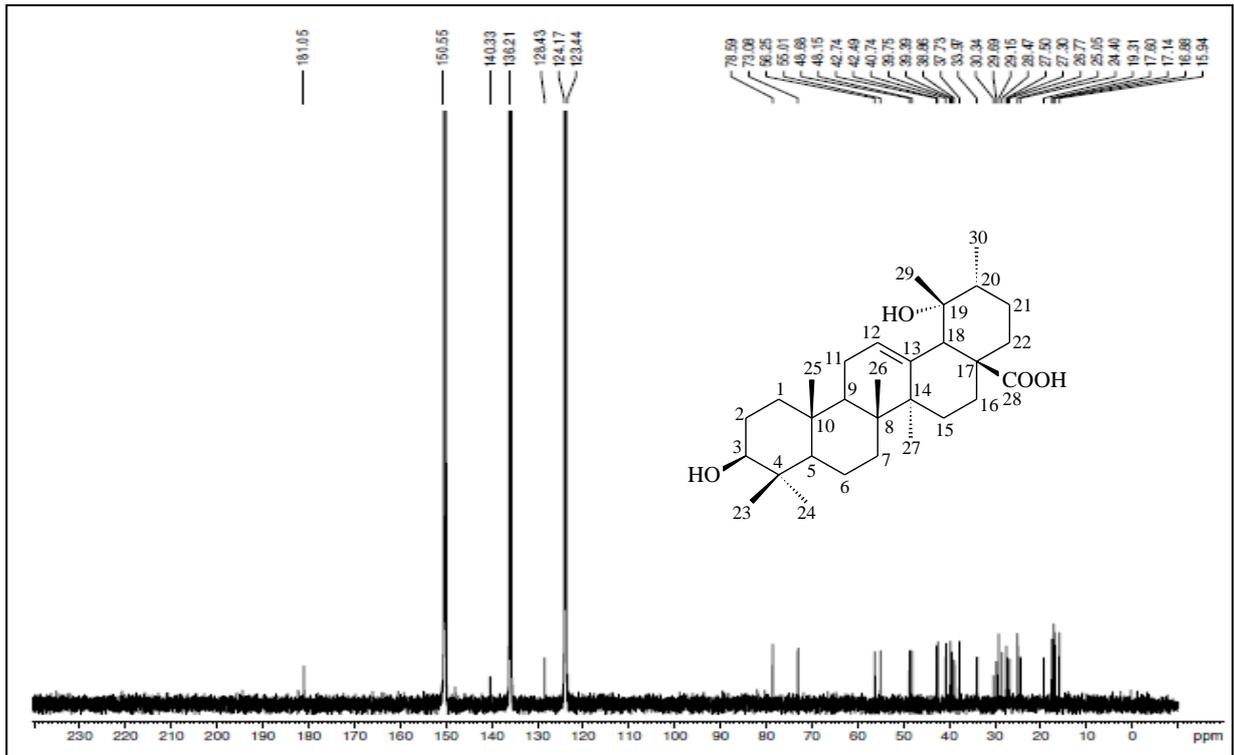
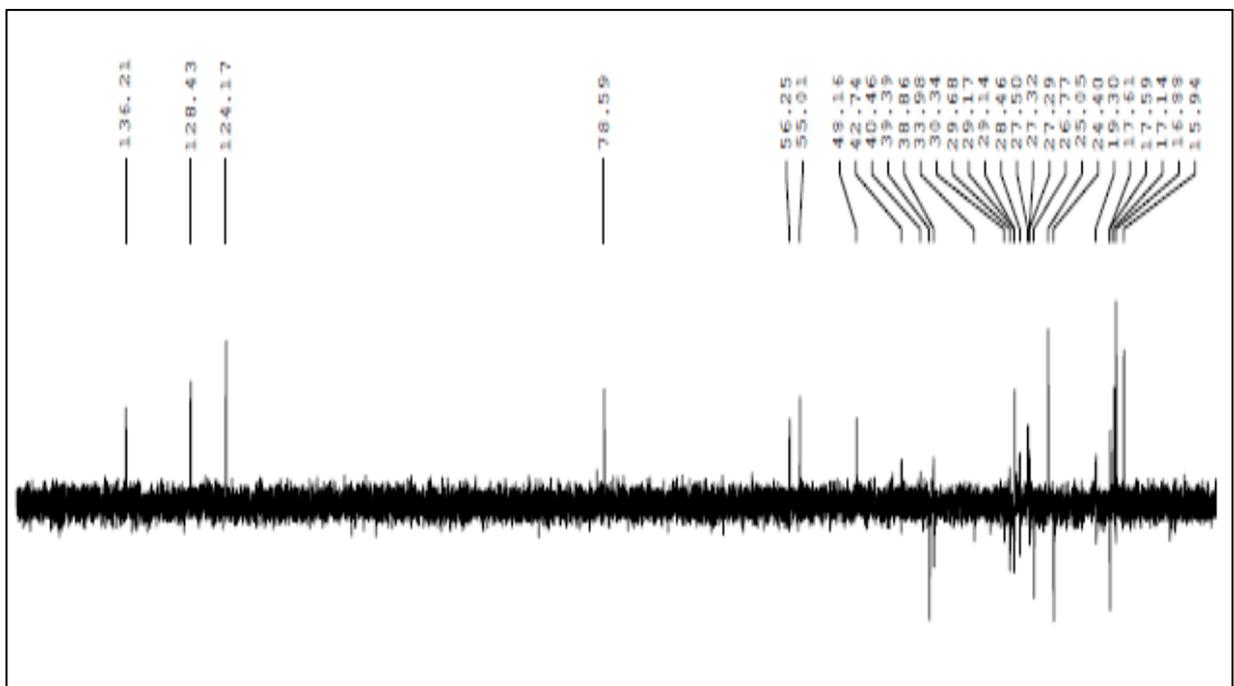


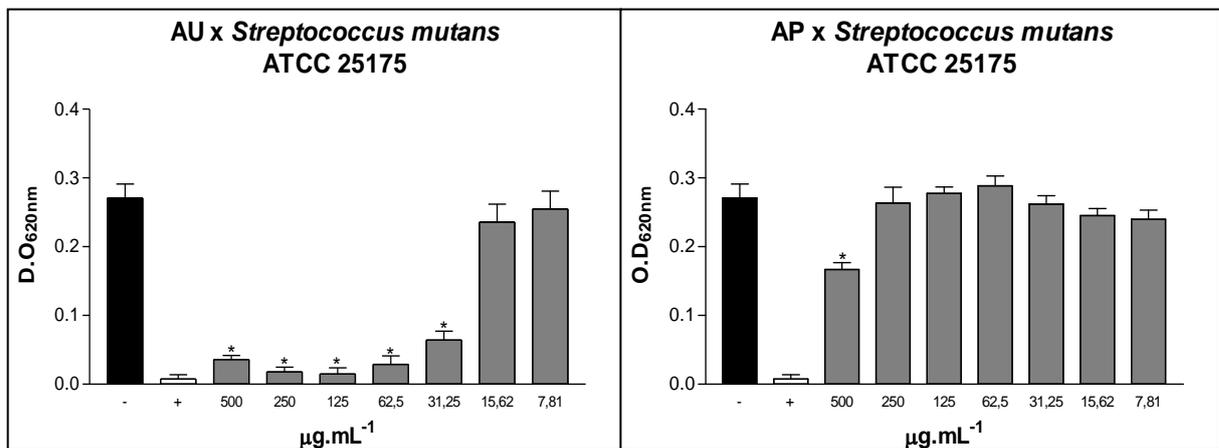
FIGURA 15 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 $^{\circ}$ (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de MB-2.



5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A ação dos triterpenos ácido ursólico (AU) e ácido pomólico (AP) sobre a inibição do crescimento de *Streptococcus mutans* foi realizado através da técnica de microtitulação em placa de poliestireno de 96 poços. A concentração inibitória mínima foi analisada como a menor concentração que visualmente não se observou crescimento. De acordo com a análise estatística, pode se observar que os compostos AU e AP apresentaram resultados diferentes sobre o crescimento da cepa de *S. mutans*.

FIGURA 16 - Avaliação do potencial antimicrobiano dos compostos AU e AP em diferentes concentrações sobre o crescimento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.



Fonte: Arquivo próprio: (■) Controle com água e 8% de DMSO, (□) Clorexidina 500µg.mL⁻¹ e (■) Composto em varias concentrações. * do controle negativo $p < 0,001$.

De acordo com a figura 16, observou-se que apenas o AU foi capaz de inibir o crescimento bacteriano nas concentrações de 500-31,25 µg. mL⁻¹, obtendo uma diferença significativa de $p < 0,001$ quando comparado ao controle negativo (agua/DMSO 8%), não apresentando diferença significativa quando comparado ao controle positivo (clorexidina a 500 µg. mL⁻¹). O AP interferiu levemente no crescimento de *S. mutans* na concentração de 500 µg. mL⁻¹.

5.3 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A ação bactericida foi determinada através do teste de Concentração Bactericida Mínima (CBM), com a maior diluição das amostras (menor concentração), em que nenhum

crescimento visual ocorreu sobre as placas de ágar. As concentrações de 500 – 62,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ foram submetidas às análises inoculando em placa de petri contendo BHI ágar.

TABELA 10 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos compostos AU e AP no tempo de 24h de crescimento.

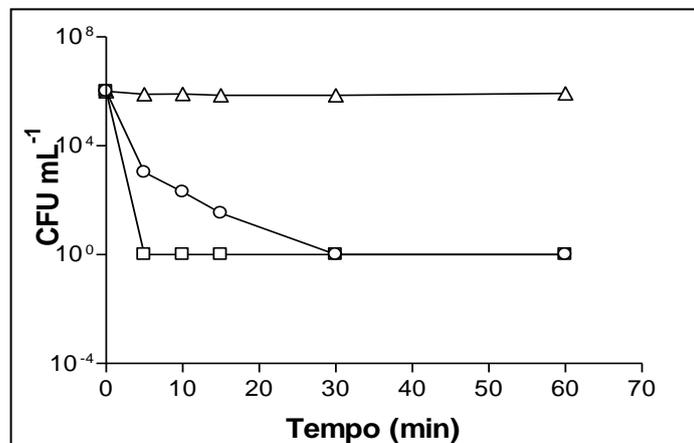
Composto	CIM	MBC
	$(\mu\text{g. mL}^{-1})$	
<i>Ácido ursólico</i>	62,5	500
<i>Ácido pomólico</i>	-	-

O composto AU revelou CIM de 62,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ e CBM 500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ enquanto que o AP não apresentou CBM, concluindo que o AU foi bactericida na concentração mais alta enquanto que o AP não matou a bactéria confirmando os dados apresentados anteriormente para CIM.

5.4 Curva do tempo de morte

Neste teste foi analisado o tempo em que o metabólito secundário começa a fazer efeito sobre a morte da bactéria. O AU na concentração de 500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ mostrou um tempo de ação efetivo sobre a morte *Streptococcus mutans*.

FIGURA 17 - Avaliação do AU na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre curva do tempo de morte de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.



Fonte: Arquivo próprio. (\circ) Composto na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (\square) controle positivo (Clorexidina 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e (Δ) controle negativo (Água/DMSO 8%).

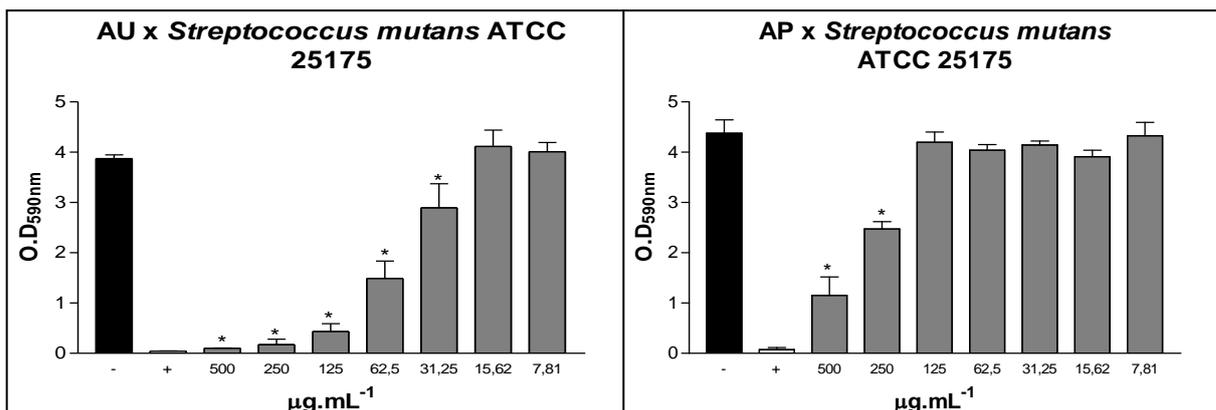
O AU reduz a contagem de UFC's logo nos primeiros minutos. O AU tem efeito tempo-dependente sobre a bactéria, pois a medida que o tempo aumentava, a viabilidade celular diminuía até não apresentar nenhuma colônia. Esse resultado foi alcançado com 30 min de contato. O controle positivo (clorexidina 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) teve um efeito sobre a bactéria num espaço de tempo menor que AU, ou seja, com 5 minutos de contato já não apresentava mais crescimento bacteriano. O controle negativo com água/DMSO 8% a bactéria cresceu normalmente sem nenhuma interferência.

5.5 Atividade Biológica das Substâncias Sobre a Formação de Biofilmes

5.5.1 Quantificação de biomassa do biofilme por Cristal Violeta (CV)

Nos ensaios de atividade biológica sobre a produção de biofilmes monoespécie de *Streptococcus mutans*, os compostos testados demonstram interferência sobre o crescimento do biofilme de 24 horas. A análise dos dados das amostras testadas, mostram diferença estatística * $p < 0,001$ em relação ao controle negativo, água/DMSO 8% (500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) como mostra a Figura 18.

FIGURA 18 - Avaliação antibiofilme dos compostos AU e AP em diferentes concentrações sobre o crescimento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.



Fonte: Arquivo próprio: (■) Controle com água e 8% de DMSO, (□) Clorexidina 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e (■) Composto em varias concentrações. * do controle negativo $p < 0,001$.

O AU inibiu a formação do biofilme nas concentrações de 500 - 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ o que levou à uma diferença significativa do controle negativo. Em comparação com o controle positivo, não houve diferença estatística 500-125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, mostrando que o AU é tão

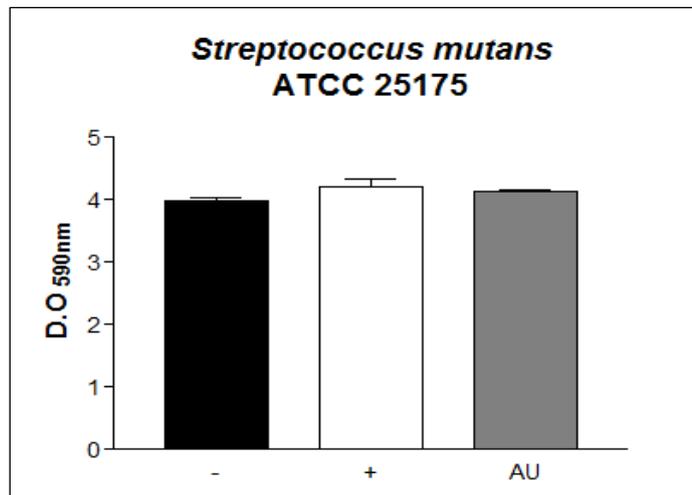
eficiente quanto à clorexidina na inibição da biomassa. Este mesmo resultado não foi observado para o AP, que apresentou uma leve interferência nas concentrações de 500 e 250 $\mu\text{g. mL}^{-1}$.

5.6 Ação da substância sobre o biofilme formado

5.6.1 Quantificação de biomassa do biofilme por Cristal Violeta (CV)

O biofilme de *S. mutans* foi crescido durante 24 horas em condições anaeróbicas, em seguida, foi testada a ação do composto AU na concentração de $500\mu\text{g.mL}^{-1}$. Tanto o composto quanto os controles foram colocados em contato com o biofilme durante 24 horas e em seguida quantificados com CV, Figura 19.

FIGURA 19 - Atividade antibiofilme do AU sobre o biofilme formado por 24 horas. Quantificação através do cristal violeta.



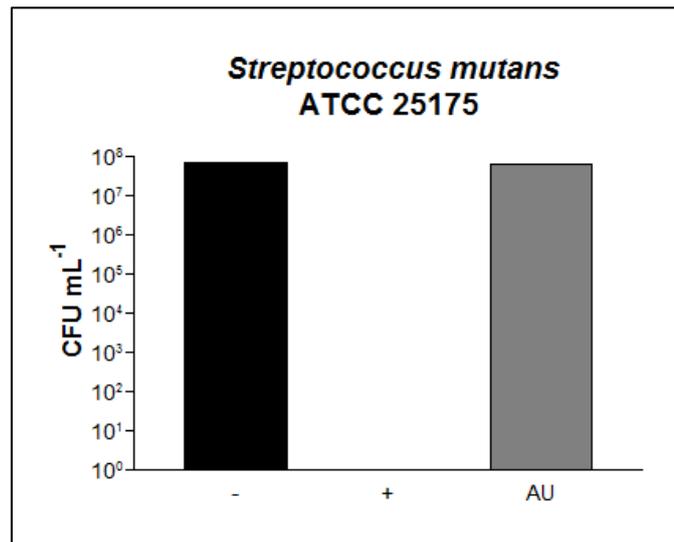
Fonte: Arquivo próprio: (■) Controle com água e 8% de DMSO, (□) Clorexidina $500\mu\text{g.mL}^{-1}$ e (■) Composto na concentração de $500\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tanto a substância teste como o controle positivo não diferenciaram estatisticamente do controle negativo, o que indica que a biomassa das primeiras 24 horas de crescimento foi quantificada pelo cristal violeta. Quanto à viabilidade deste biofilme foi mensurada pela contagem de unidades formadoras de colônias CFU.

5.6.2. Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (CFU's)

Após 24 horas de formação do biofilme *S. mutans* o mesmo foi submetido ao contato com AU por mais 24h, em seguida realizado a contagem de CFU para verificação da viabilidade celular.

FIGURA 20 - Atividade antibiofilme do AU sobre o biofilme formado por 24 horas.



Fonte: Arquivo próprio: (■) Controle com água e 8% de DMSO, (□) Clorexidina 500µg.mL⁻¹ e (■) Composto em varias concentrações.

De acordo com este resultado a substancia teste não teve ação sobre o biofilme formado, pois o mesmo continuou a crescer. Já o controle positivo (clorexidina 500 µg.mL⁻¹) inviabilizou as células no biofilme, aponto de impedir a sua continuação.

6 DISCUSSÃO

As plantas contêm infinidades de substâncias químicas que podem ser utilizadas na agricultura como inseticidas, e até na medicina natural no combate a diversas doenças (MULAUDZI *et al.*, 2012). Trabalhos publicados nas três últimas décadas confirmam o potencial antimicrobiano do extrato de plantas medicinais e compostos isolados sobre diferentes gêneros bacterianos, incluindo cepas resistentes a antibióticos (HABILA *et al.*, 2012).

Mitracarpus baturitensis por ser uma espécie recém-descoberta no nordeste Brasileiro (SOUSA, 2008), ainda é pouco explorada pela comunidade científica. Entretanto, outras espécies do mesmo gênero, como referido anteriormente no texto, possuem atividade biológica contra diversos tipos de bactérias, fungos e protozoários (ALI-EMMANUEL *et al.*, 2003; KPOROU *et al.* 2010; SANOGO *et al.*, 1996).

Os metabólitos secundários ácido 3 β -hidroxi-urs-12-eno-28-oico (ácido ursólico - AU) e ácido 3 β , 19 α -di-hidroxi-urs-12-eno-28-oico (ácido pomólico - AP) foram isolados da fração acetato do extrato etanólico das partes aéreas de *Mitracarpus baturitensis*. O isolamento destes metabólitos está sendo relatados pela primeira vez nesta espécie, apesar do ácido ursólico ser comum neste gênero, visto que o mesmo já foi isolado do extrato alcoólico de *Mitracarpus scaber* (GBAGUIDI *et al.*, 2005). Ambos os compostos são triterpenos pentacíclicos, constituídos de cinco anéis com estrutura bastante similares (FIGURA 6 e 11). Segundo Grudniak e colaboradores (2011) essa classe é bastante conhecida por está associadas às atividades antimicrobianas que muitas das vezes usadas na medicina popular. Além disso, esses triterpenos requerem bastante atenção pelo fato de estarem também, envolvidas em atividades biológicas do tipo antitumoral e anti-inflamatória (LIU, 2005; YOGESWARI; SRIRAM, 2005). Ambos se apresentaram como sólidos branco amorfo com rendimentos de 5,4% para AU e 4,37% para AP, ou seja, para cada 100 g de material verde (partes aéreas) foram obtidos cerca de 54 mg para ácido ursólico e 43,7 mg para o ácido pomólico.

Nos testes de concentração bacteriostática e bactericida, pode-se perceber, que o composto AU apresentou efeito antimicrobiano sobre a cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Esse composto apresentou efeito bactericida na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e bacteriostática entre as concentrações de 62,5 - 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Enquanto que o composto AP apresentou leve interferência no crescimento na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sem apresentar efeito bactericida.

Nos testes de inibição da formação de biofilme, o composto AU inibiu significativamente a biomassa de *Streptococcus mutans* em percentuais de 25,32% a 97,37% nas concentrações de 31,25 até 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ao passo que o AP demonstrou uma leve interferência nas concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ em percentuais de 43,56 a 73,69%.

Em relação à análise da susceptibilidade do biofilme formado, o AU não foi capaz de eliminar e nem mesmo diminuir a biomassa formada, pois não reduziu o número de células viáveis pelas análises de contagem de unidades formadoras de colônias - CFU e nem biomassa quantificado por cristal violeta – CV. Concluindo que o AU é capaz de prevenir a formação de biofilme, mas não de erradicá-lo.

Além disso, o metabólito AU possui um efeito sobre a *Streptococcus mutans* tempo-dependente, ou seja, à medida que o tempo de contato aumenta, a quantidade de células viáveis diminui. Através deste teste foi possível constatar que a turbidez mensurada pelo espectrofotômetro na concentração de 500 $\mu\text{g.mg}^{-1}$, não era de células bacterianas e sim do próprio composto.

As substâncias isoladas neste estudo, mostraram diferença na atividade biológica que pode estar associada à uma pequena diferença estrutural. Essa mudança pode ser observada no anel E de ambos os compostos, no qual o ácido pomólico apresenta um grupo hidroxila posicionado no carbono 19, característica essa não apresentada pelo ácido ursólico. Esta diferença na atividade biológica em função da estrutura, também foi observada por Fontanay e colaboradores (2008), em que a posição de um grupo metil no anel E colaborou para uma diferença significativa na atividade biológica entre dois triterpenos.

Segundo estudos de Jiménez e colaboradores (2005) o AU isolado de *Chamaedora tepejilote* (Palmae), inibiu cerca 99% do crescimento de *M. tuberculosis*. Em outro estudo o mesmo composto purificado de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) apresentou concentração inibitória mínima de 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra a cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina MRSA (FILHO *et al.*, 2008). Esta atividade antimicrobiana também pode ser presenciada no gênero *Salvia*, através da espécie *Salvia officinalis* que segundo Horiuchi e colaboradores (2007) o ácido ursólico foi capaz de eliminar em concentrações de 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ cepas de *Enterococcus faecalis* (VRE) resistentes à vancomicina.

Assim, com base nas informações acima citado, o ácido ursólico possui um elevado potencial farmacológico em se tratando de atividade antimicrobiana. Concluindo assim, que o efeito bactericida e bacteriostático encontrados neste estudo corrobora com os achados na literatura científica.

Em relação à formação do biofilme, há registros na literatura quanto à interferência de triterpenos pentacíclicos na formação dessas comunidades microbianas. O estudo realizado por Raja e colaboradores (2011), mostra que o ácido bosélico isolado de *Boswellia serrata* inibiu a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, além de reduzir biofilmes pré-formados desses mesmos micro-organismos. Em outros estudos, triterpenos não possuíam a capacidade de inibir a formação do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, mas aumentaram a susceptibilidade dessa bactéria para um posterior tratamento com antibióticos. Isso mostra que estes triterpenos potencializam a ação dos antibióticos contra bactérias gram-negativas (GARO *et al.*, 2007). Já o ácido ursólico isolado de *D. dendo*, planta comum da África, foi capaz de reduzir significativamente a formação de biofilmes de *P. aeruginosa* e *Escherichia coli* numa concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (REN *et al.*, 2005).

Os triterpenos pentacíclicos são importantes agentes no combate a formação de biofilmes microbianos inclusive o ácido ursólico. De acordo com essas informações pode-se concluir que os efeitos antibiofilme apresentados neste trabalho pelo ácido ursólico corroboram com os resultados encontrados na literatura.

O mecanismo de ação destes triterpenos pentacíclicos pode estar relacionado com interação com a membrana celular. Após ocorrer contato, o composto pode afetar o metabolismo do peptídeoglicano e alterar a morfologia da bactéria, inibindo o crescimento e a sobrevivência das espécies bacterianas, inclusive as patogênicas (GRUDNIAK *et al.*, 2011; KUREK *et al.*, 2010; SZAKIEL *et al.*, 2008). Além disso, estes compostos podem interferir na expressão genes relacionados ao stress bacteriano, bem como inibir do metabolismo energético, causado por inibição da NADH-citocromo redutase (REN *et al.*, 2005; BERNARD *et al.*, 1997; PLAPER *et al.*, 2003).

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que os compostos isolados das partes aéreas de *Mitracarpus baturitensis* apresentaram efeitos distintos sobre o crescimento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. O triterpeno ácido ursólico apresentou uma ação bactericida e bacteriostática na forma planctônica e biofilme, enquanto que o ácido pomólico apresentou uma leve interferência em ambas às formas. Assim, o ácido ursólico pode ser considerado como um possível insumo biotecnológico para o tratamento e prevenção de doenças relacionadas à *S. mutans*, como a cárie dental.

8 REFERÊNCIAS

- AAS, J. A.; PASTER, B. J.; STOKES, L. N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.43, n. 11, p. 5721–5732, nov. 2005.
- ABERE, T. A.; ONYEKWELI, A. O.; UKOH, G. C. In vitro antimicrobial activity of extract of *Mitracarpus scaber* leaves formulated as syrup. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Benin City, v. 6, n.1, p.679 - 682, mar. 2007.
- ADJANONHOUN, E. J. La médecine traditionnelle au Bénin: recensement des savoir-faire traditionnels. **Revue Médecine Pharmacologie Afrique**, Bénin, v. 15, p. 103–111, 2001.
- AIRES, C. P.; TABCHOURY, C. P. M.; DEL, B. E. L.; CURY, A. A.; KOO, H.; CURY, J. A. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed *in situ* and enamel demineralization. **Caries Research**, New York, v. 40, n. 1, p. 28-32. 2006.
- ALEXANDRE G. C. NADANOVSKY P.; LOPES C. S.; FAERTEIN E. Prevalência e fatores associados à ocorrência da dor de dente que impediu a realização de tarefas habituais em uma população de funcionários públicos no Rio de Janeiro, Brasil **Cadernos de Saúde Publica**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 5, p.1073-8, mai. 2006.
- ALI-EMMANUEL, N.; MOUDACHIROU, M.; AKAKPO, J. A.; QUETIN-LECLERCQ, J. Treatment of bovine dermatophilosis with *Senna alata*, *Lantana camara* and *Mitracarpus scaber* leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 86, n. 2-3, p.167–171, jun. 2003.
- ARNOLD, W. H; HAASE, A; HACKLAENDER, J; GINTNER, Z; BÁNÓCZY, J; GAENGLER, P. Effect of pH of amine fluoride containing tooth pastes on enamel remineralization *in vitro*. **BMC Oral Health**, London, n.1, v.7, p. 14, jan. 2007.

- BALLINI, M. B. **Estudo de fatores de virulência de *Streptococcus mutans* e componentes da saliva na susceptibilidade à cárie em crianças**. 2011. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de São Francisco, Bragança Paulista, 2011.
- BAMUAMBA, K.; GAMMON, D. W.; MEYERS, P.; DIJOUX-FRANCA, M. G.; SCOTT, G. Anti-mycobacterial activity of five plant species used as traditional medicines in the Western Cape Province (South Africa). **Journal Ethnopharmacol**, Lausanne, v.117, n. 2, p. 385-390, mai. 2008.
- BANAS, J. A.; VICKERMAN, M. M. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. Critical reviews in oral biology and medicine, **Boca Raton**, v. 14, n. 2, p. 89–99, nov.2003.
- BERNARD, F. X.; SABLE, S.; CAMERON, B.; PROVOST, J.; DESNOTTES, J. F.; CROUZET, J.; BLANCHE, F. Gly-cosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, Vitry-sur-Seine, v. 41, n. 5, p. 992–998, mai. 1997.
- BISIGNANO, G.; SANOGO, R.; AQUINO, A. M. R.; ANGELO, V. D.; GERMANO, M. P.; DE PASQUALE, R.; PIZZA, C. Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 30, p. 105 - 108, 2000.
- BLACK, C.; ALLAN, I.; FORD, S. K.; WILSON, M. MCNAB, R. Biofilm-specific surface properties and protein expression in oral *Streptococcus sanguis*. **Archives Oral Biology**, Oxyford, v. 49, n. 4, p. 295-304, abr. 2004.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Planta Science**. v. 161, n. 5, p. 839–851, out. 2001.

- BOWEN, W. H.; SCHILLING, K.; GIERTSEN, E.; PEARSON, S.; LEE, S. F.; BLEIWEIS, A.; BEEMAN, D. Role of a cell surface-associated protein in adherence and dental caries. **Infect Immunology**, Washington, v.59, n. 12, p.4604-4609, 1991.
- BOWEN, W. H. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? **Critical reviews in oral biology and medicine**, Boca Raton, v. 13, n. 2, p. 126-31. 2002.
- BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*. Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. **Caries Research**, Basel, v.45, n.1, p. 69–86, fev. 2011.
- BURNE, R.A. Oral streptococci. Products of their environment. **Journal of Dental Research**, Chicago ,v.77, n.3, p.445-452, 1998.
- CARDOSO SÁ, N.; CAVALCANTE, T.T.; ARAÚJO, A.X.; DOS SANTOS, H.S.; ALBUQUERQUE, M.R.; BANDEIRA, P.N.; DA CUNHA, R.M.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H. Antimicrobial and antibiofilm action of Casbane Diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. **Archives Oral Biology**, Oxford, v.57, n.5, p.550-555, mai. 2012.
- CARNEIRO, V. A.; SANTOS, H. S.; ARRUDA, F. V.; BANDEIRA, P. N.; ALBUQUERQUE, M. R.; PEREIRA, M. O.; HENRIQUES, M.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H. Casbane diterpene as a promising natural antimicrobial agent against biofilm-associated infections. **Molecules**, Basel, v.16, n. 1, p. 190-201, dez. 2010.
- CAROUNANIDY, U.; SATHYANARAYANAN, R. Dental caries: a complete changeover (Part II) - Changeover in the diagnosis and prognosis. **Journal of Conservative Dentistry**, Amritsar, v.12, n.3, p.87-100, 2009.
- CARVALHO, R. A.; LACERDA, J. T.; OLIVEIRA, E. F.; SANTOS, E. S. **Extratos de Plantas Medicinais como Estratégia para o Controle de Doenças Fúngicas do**

Inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste. *In:* SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2., 2002. João Pessoa. Anais... João Pessoa: Emepa, 2002, p.99-112.

- CARVALHO, L. M.; COSTA, J. A. M.; CARNELOSSI, M. A. G. Qualidade em plantas medicinais. 2010. Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2010/doc_162.pdf>. Acesso em: 04 de março de 2013.
- CASALINI, J. **Biofilmes microbianos na indústria de alimentos.** 2008, 46f. Monografia (Bacharelado em Química de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2008.
- CHATTOPADHYAY, D.; MATI, K.; KUNDU, A. P.; CHAKRABORTY, M. S.; BHADRA, R.; MANDAL, S. C. Antimicrobial activity of *Alstonia macrophylla*: a folklore of bay islands. **Journal Ethnopharmacology**, Lausanne, v.77, p.49-55, 2001.
- CHENG, J.-J.; ZHANG, L.-J.; CHENG, H.-L.; CHIOU, C.-T.; LEE, I.-J.; KUO, Y.-H. Cytotoxic Hexacyclic Triterpene Acids from *Euscaphis japonica*. **Journal of Nature Products**, Cincinnati, v. 73, n.1, p. 1655–1658, set. 2010.
- CHU, K. Y.; YANG, N. P.; CHOU, P.; CHIU, H. J.; CHI, L. Y. Factors associated with dental caries among institutionalized residents with schizophrenia in Taiwan: a cross-sectional study. **BMC Public Health**, Londres, v.10, p. 482, ago. 2010.
- CROZIER, Alan; CLIFFORD, Mike. N. ASHIHARA, Hiroshi; **Plant Secondary Metabolites Occurrence, Structure and Role in the Human Diet.** 1. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. 384 p.
- DELPRETE, P. G. Notes on some South American species of *Psychotria* subgenus *Heteropsychotria* (Rubiaceae), with observations on rubiaceae taxonomic characters. **Brittonia**, New York, v. 53, n. 3, p. 396-404, set. 2001.

- DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**. Atlanta, v. 8, n. 9, p. 881-90, set. 2002.
- EGUCHI, Y.; KUBO, N.; MATSUNAGA, H.; IGARASHI, M.; UTSUMI, R. Development of an antivirulence drug against *Streptococcus mutans*: repression of biofilm formation, acid tolerance, and competence by a histidine kinase inhibitor, walkmycin C. **Antimicrob Agents Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1475-84, abr. 2011.
- FABRI, R. L.; NOGUEIRA, M. S.; BRAGA, F. G.; COIMBRA, E. S.; SCIO, E. *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidante effects. **Bioresource Technology**, England, v. 100, n. 1, p. 428-33. jan. 2009.
- FABRI, R. L.; OLIVEIRA A. D. M.; FLORÊNCIO, J. R.; CARDOSO, G. M.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; CASTANON, M. C.; SCIO, E. *In-vivo* laxative and toxicological evaluation and *in-vitro* antitumour effects of *Mitracarpus frigidus* aerial parts. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. London, v.64, n. 3, p. 439-48. mar. 2012.
- FALCÃO, D. Q.; FERNANDES, S. B. O.; MENEZES, F. S. Triterpenos de *Hyptis fasciculata* Benth. **Revista Brasileira Farmacognosia**, Maringá, v. 13, n. 1, p. 81-83, 2003.
- FEATHERSTONE, J. D. The science and practice of caries prevention. **Journal American Dental Association**, Chicago, v.131, n. 7, p. 887-899, jul. 2000.
- FEJERSKOV, Olie.; KIDD, Edwina. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico**. 1. ed. São Paulo: Santos; 2005. 390 p.
- FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; OLIVEIRA, I. M. S.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência**, Campinas, n.1, v. 7, out. 2006.

- FILHO, A. A. S.; SOUSA J. P.; SOARES, S.; FURTADO, N. A.; ANDRADE E SILVA, M. L.; CUNHA, W.R.; GREGÓRIO, L. E.; NANAYAKKARA, N. P.; BASTOS, J. K. Antimicrobial activity of the extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Z Naturforsch C.** v. 63, v.1-2, p. 40-6. Jan./Feb. 2008.
- FIORETTI, F.; NEBOT, D. Sécheresse buccale chez la personne âgée : le point sur les lésions carieuses. **Alpha Oméga News**, California, v. 101, p. 21-5, 2006.
- FIORETTI, F.; HAÏKEL, Y. Carie et sucres. **Médecine des maladies Métaboliques**, v. 4, n. 5, p. 543–549, out. 2010.
- FONTANAY, S.; GRARE, M.; MAYER, J.; FINANCE, C.; DUVAL, R. E. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectivity indexes. **Journal of ethnopharmacology**, Lausanne, v. 120, n. 2, p. 272-6, nov. 2008.
- GABRIEL, A. E. S. **Progressão da lesão de carie no esmalte dental após aplicação de compostos fluoretados e irradiação com laser de CO₂**. 2009. 77f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- GARO, E.; ELDRIDGE, G. R.; GOERING, M. G.PULSINI, E. D.; HAMILTON, M. A.; COSTERTON, J. W.; JAMES, G. A. Asiatic acid and corosolic acid enhance the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to tobramycin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 5, p. 1813-7, mai. 2007.
- GBAGUIDI, F.; ACCROMBESSI, G.; MOUDACHIROU, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. HPLC quantification of two isomeric triterpenic acids isolated from *Mitracarpus scaber* and antimicrobial activity on *Dermatophilus congolensis*. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analyze**. Oxford, v. 39, n. 5, p. 990-995, jul. 2005.

- GERMANÒ, M. P.; SANOGO, R.; COSTA, C.; FULCO, R.; D'ANGELO, V.; TORRE, E. A.; VISCOMI, M. G.; PASQUALE, R. Hepatoprotective properties in the rat of *Mitracarpus scaber* (Rubiaceae). **The Journal of pharmacy and pharmacology**, London, v. 51, n. 6, p. 729-34, jun 1999.
- GOHARI, A. R.; SAEIDNIA, S.; SHAHVERDI, A. R.; YASSA, N.; MALMIR, M.; MOLLAZADE, K.; NAGHINEJAD, A. R. Phytochemistry and antimicrobial Compounds of *Hymenocrater calycinus*. **EurAsia Journal BioScience**, v. 9, n. 3, p. 64-68, jul. 2009.
- GRUDNIAK, A. M.; KUREK, A.; SZARLAK, J.; WOLSKA, K. I. Oleanolic and Ursolic Acids Influence Affect the Expression of the Cysteine Regulon and the Stress Response in *Escherichia coli*. **Current microbiology**, New York, v.62, n.4, p. 1331–1336, abr. 2011.
- GUGGENHEIM, B.; BURCKHARDT, J. J. Isolation and properties of a dextranase from *Streptococcus mutans* OMZ 176. **Helvetica Odontologica Acta**, Zürich, v. 18, n. 2, p. 101–113, out. 1974.
- HABILA, J. D.; SHODE, F. O.; NDUKWE, G. I.; AMUPITAN, J. O.; NOK, A. J.; Effect of C-3 Modification of Oleanolic Acid on *Candida* spp., *Trichophyton tonsurans* and *Microsporium canis* Inhibition. **Pharmacologia**, London, v. 3, n. 8, p.313-324, ago. 2012.
- HARA, A. T.; ZERO, D. T. The Caries Environment: Saliva, Pellicle, Diet, and Hard Tissue Ultrastructure. **Dental Clinics of North America**, Philadelphia, v.54, n.3, p.455-467, jul. 2010.
- HORIUCHI, K.; SHIOTA, S.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). **Biological & pharmaceutical bulletin**, Tóquio, v. 30, n.6, p. 1147-1149, jun. 2007.

- HORST, J. A.; PIEPER, U.; SALI, A.; ZHAN, L.; CHOPRA, G.; SAMUDRALA, R.; FEATHERSTONE, J. D. Strategic protein target analysis for developing drugs to stop dental caries. **Advances in Dental Research**, Washington, v. 24, n. 2, p. 86-93, set. 2012
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. 1. ed. São Carlos: EDUFSCAR, 2003. 152 p.
- HUANG, R.; LI, M.; GREGORY, R. L. Bacterial interactions in dental biofilm. **Virulence**, Austin, v. 2, n. 5, p. 435-44, set./out. 2011.
- IROBI, O. N.; DARAMOLA S. O. Antifungal activities of crude extracts of *Mitracarpus villosus*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.40, n. 2, p. 137-140, out. 1993.
- IROBI, O. N.; DARAMOLA, S. O. Bactericidal properties of crude extracts of *Mitracarpus villosus*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.42, n. 1, p.39-43, mar. 1994.
- ISLAM, B.; KHAN, A. V. Dental caries: from infection to prevention. **Medical science monitor**, Warsaw, v. 13, n. 11, p. 196-203, nov. 2007.
- JIMÉNEZ, A.; MECKES, M.; ALVAREZ, V.; TORRES, J.; PARRA, R. Secondary metabolites from *Chamaedora tepejilote* (Palmae) are active against *Mycobacterium tuberculosis*. **Phytotherapy research : PTR**, London, v.19, n.4, p. 320-322, abr. 2005.
- KEYES, P. H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. **Archives Oral Biology**, Oxford, v. 1, p. 304-320, mar. 1960.
- KINDBLÖM, C.; DAVIES, J. R.; HERZBERG, M. C.; SVENSÄTER, G.; WICKSTRÖM, C. Salivary proteins promote proteolytic activity in *Streptococcus mitis* biovar 2 and *Streptococcus mutans*. **Molecular Oral Microbiology**, Copenhagen, v. 27, n. 5, p. 362-72, out. 2012.

- KÖHLER, B.; BIRKHED, D.; OLSSON, S. Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. **Caries Research**, Basel, v. 29, n.5, p. 402–406, 1995.
- KOLEMBRANDER, P. E.; JR PALMER, R. J.; PERIASAMY, S.; JAKUBOVICS, N. S. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.8, p.471-480, jul. 2010.
- KOSSUGA, M. H. **Metabólitos secundários Bioativos de invertebrados marinhos, Isolamento, Determinação estrutural e Atividades Biológicas**. 2006. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de química São Carlos, São Paulo, 2006.
- KPOROU, E. K.; KOFFI ADOU KRA, M.; OUATTARA, S.; GUEDE-GUINA, F. Evaluation of Antifungal Activity of *Mitracarpus scaber*, a Rubiaceae MISCA Codified on *Candida glabrata*. **Therapie**, Paris, v. 65, n. 3, p. 271-274, mai./jun. 2010.
- KUREK, A.; GRUDNIAK, A. M.; SZWED, M.; KLIČKA, A.; SAMLUK, L.; WOLSKA, K. I.; JANISZOWSKA, W.; POPOWSKA, M. Oleanolic acid and ursolic acid affect peptidoglycan metabolism in *Listeria monocytogenes*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 97, n. 1, p. 61-8, jan 2010.
- LAURIS, J. P. **Cárie dentária em criança de 12 anos no Brasil: Estudo retrospectivo dos levantamentos epidemiológico de 1980 a 2005**. 2006. 153f. Tese (Doutorado em Livre Docência em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Bauru. 2006.
- LEWIS, K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)*. **Biochemistry Biokhimiia**. New York, v.70, n. 2, p. 267–274, fev. 2005.
- LIMA, J. E. O. Cárie dentária: um novo conceito. **Revista Dental Press de Ortodontia Ortopedia Facial**, Maringá, v. 12, n. 6, p. 119-130, nov./dez. 2007.

- LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.100, n.1-2, p. 92–94, 2005.
- LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiological review**, Washington, v. 50, n. 4, p. 353-380, 1986.
- LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, Woodbury, v. 2, n. 7, jun. 2010.
- LORENZO, José Luiz. **Microbiologia para estudantes de odontologia**. 1. ed. São Paulo: Ateneu, 2004. 274 p.
- LYNCH R. J. M.; SMITH S. R. Remineralization Agents – New and Effective or Just Marketing Hype? **Advances in dental research**, Washington, v. 24, n. 2, p. 63-67, set. 2012.
- LUCCHESI, E. G. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes in vitro e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- MAHOMOODALLY, F.; MESAİK, A.; CHOUDHARY, M. I.; SUBRATTY, A. H.; GURIB-FAKIM, A. In vitro modulation of oxidative burst via release of reactive oxygen species from immune cells by extracts of selected tropical medicinal herbs and food plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, **Singapore**, v.5, n.6, p.440-7. jun. 2012.
- MARSH, Philip; MARTIN, Michael V. **Microbiologia oral**. 4. ed. São Paulo: Livro Santos, 2005. 192 p.
- MEYER D. H.; FIVES-TAYLOR, P. M. Oral pathogens: from dental plaque to cardiac disease. **Current opinion in microbiology**, London, v.1, n. 1, p. 88-95. fev. 1998.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso. 2006. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnpic.pdf>> acesso em 20 fevereiro 2012.
- MOREIRA, P. V. L.; ROSENBLATT, A.; PASSOS, I. A. Prevalência de cárie em adolescentes de escolas públicas e privadas na cidade de João Pessoa, Paraíba, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 5, p. 1229-1236, out. 2007.
- MOYNIHAN, P. J. The role of diet and nutrition in the etiology and prevention of oral diseases. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, n. 9, p. 694-99, set. 2005.
- MULAUDZI, R. B.; NDHLALA, A. R.; KULKARNI, M. G.; VAN STADEN, J. Pharmacological properties and protein binding capacity of phenolic extracts of some Venda medicinal plants used against cough and fever. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.143, n.1, p.185-193, ago. 2012.
- MURRAY, J. Prevalence of dental caries: retrospect and prospect. **Dental Update**, Londres, v. 25, n. 9, p. 374-378, nov. 1998.
- NAKANO, K.; OOSHIMA, T. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. **Future Microbiology**, London, v.4, n.7, p. 891-902, set. 2009.
- NAPIMONGA, M. H.; HÖFLING, J. F. KLEIN, M. I.; KAMIYA, R. U.; GONÇALVES, R. B. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. **Journal Oral Science**. Tokyo, v. 47, n. 2, p. 59-64, jun. 2005.
- NEWBRUN, Ernest. **Cariology**. 2ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. 389 p.
- NICOLAS, G. G.; LAVOIE, M. C. *Streptococcus mutans* et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. **Canadian Journal of Microbiology**, Montreal Road, v. 57, n. 1, p.1-20, jan. 2011.

- NOBBS, A. H.; LAMONT, R. J.; JENKINSON, H. F. *Streptococcus* adherence and colonization. **Microbiology and molecular biology reviews**. Washington, v. 73, n. 3, p. 407–450. set. 2009.
- NYVAD, B.; KILIAN, M. (1990) Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries inactive individuals. **Caries Research**, Basel, v. 24, n. 4, p. 267-272, 1990.
- NYVAD, B. **O papel da higiene bucal**. In: Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. 2. ed. São Paulo: Santos, 2005, p. 171 - 178.
- PAIVA, F. P. F; PASSOS, I. A.; MADEIRO, A.T.; OLIVEIRA, A. F. B.; CHAVES, A. M. B. Aspectos Clínicos e Histológicos da Cárie Aguda x Cárie Crônica. **Revista Odontológica de Araçatuba**, Araçatuba, v. 27, n. 1, p. 49-53, jan./jun. 2006.
- PLAPER, A.; GOLOB, M.; HAFNER, I.; OBLAK, M.; SOLMAJER, T.; JERALA, R. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and biophysical research communications*, New York, v. 306, n. 2, p. 530–336, jun. 2003.
- PORTO, T. S.;SIMÃO, M. R.; CARLOS, L. Z.; MARTINS, C. H.; FURTADO, N. A.; SAID, S.; ARAKAWA, N. S.; DOS SANTOS, R. A.; VENEZIANI, R. C.; AMBRÓSIO, S. R. Pimarane-type Diterpenes Obtained by Biotransformation: Antimicrobial Properties Against Clinically Isolated Gram-positive Multidrug-resistant Bacteria. **Phytotherapy Research**, London, nov. 2012.
- RAJA, A. F.;A LI, F.; KHAN, I. A.; SHAWL, A. S.;ARORA, D. S.; SHAH, B. A.;TANEJA, S. C. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of acetyl-11-keto- β -boswellic acid from *Boswellia serrate*.**BMC Microbiology**, V. 11, p. 54, mar. 2011
- REN, D.; ZUO, R.; GONZÁLEZ BARRIOS, A. F.; BEDZYK, L. A.; ELDRIDGE, G. R.; PASMORE, M. E.; WOOD, T. K. Differential Gene Expression for Investigation of

Escherichia coli Biofilm Inhibition by Plant Extract Ursolic Acid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 7, p.4022–4034, jul. 2005.

- RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 100, p. 1-2, p. 80-4, ago. 2005.
- ROBBRECHT, E. Tropical woody Rubiaceae. **Opera Botanica Belgica**, Belgica v.1, p.1-271, dez. 1988.
- ROCHA, A. B.; LOPEZ, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Currenty Opinion in Pharmacology**, England, v.1, n.4, p. 364-369, ago. 2001.
- RODRIGUES, M. R.; MACIEL, S. M.; FERREIRA, F. B. A.; PIOVEZAN, A.; PIERALISI, F. J. S.; POLI-FREDERICO, R. C. Analysis of serotypes and gene for mutacins in streptococcus mutans isolated from preschool children with different caries experiences. **Ciência Odontologica Brasileira**, São José dos Campos, v. 11, n. 4, p. 40-46, 2008.
- ROMERO, G. B.; CASTELLA, R. M. T. Actualización en fitoterapia y plantas medicinales. **Terapéutica en APS**, v. 19, n. 3, p. 149-60, 2012.
- ROVA, J. H. E.; DELPRETE, P. G.; ANDERSSON, L.; ALBERT, V. A. A trnL-F cpDNA sequence study of the Condamineeae-Rondeletieae-Sipaneeae complex with implications on the phylogeny of the Rubiaceae. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 89, n.1, p. 145-159, jan. 2002.
- RUGG-GUNN A. J.; MURRAY, J. J. The role of sugar in the etiology of dental caries. 2. The epidemiological evidence. **Journal of dentistry**, Kidlington, v. 11, n. 3, p. 189-213, set. 1983.

- RUSSELL, R. R. Glucan-binding proteins of *Streptococcus mutans* serotype c. **Journal of general microbiology**, Londres, v. 112, n. 1, p. 197–201, mai. 1979.
- SANOGO, R.; GERMANO, M. P.; PASQUALE, R.; KEITA, A.; BISIGNANO, G. Selective antimicrobial activities of *Mitracarpus scaber* Zucco against *Candida* and *Staphylococcus* sp. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 2, n. 3, p. 265-268, jan. 1996.
- SATO, Y.; YAMAMOTO, K. H. Cloning and sequence analyses of the gbpC gene encoding a novel glucan binding protein of *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 65, n. 2, p. 668-675, fev. 1997.
- SCANNAPIECO, F. A. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. **Critical review in oral biology and medicine**, Boca Raton, v. 5, n. 3-4, p. 203–248, 1994.
- SILVA, A. A. F.; SOUSA, J. P.; SOARES, S., FURTADO, N. A., ANDRADE, E.; SILVA, M. L., CUNHA, W. R.; GREGÓRIO, L. E.; NANAYAKKARA, N. P.; BASTOS, J. K. Antimicrobial activity of the extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae), **Zeitschrift Für Natur For Schung**, v. 63, n. 1-2, p. 40-46, jan./fev. 2008.
- SIQUEIRA, C. F. Q.; CABRAL, D. L. V.; SOBRINHO, T. J. S. P.; AMORIM, E. L. C.; MELO, J. G.; ARAÚJO, T. A. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Levels of Tannins and Flavonoids in Medicinal Plants: Evaluating Bioprospecting Strategies. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2012, p. 1-7, jan. 2012.
- SMITH, D. J.; AKITA, H.; KING, W. F.; TAUBMAM, M. A. Purification antigenicity of a novel glucan-binding protein of *streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 6, p. 2545- 2552, jun. 1994.
- SOUZA, E. B. **Estudos sistemáticos em *Mitracarpus* (rubiaceae - spermacocee) com ênfase em Espécies brasileiras**. 2008. 196f. Tese (Doutorado em Ciências-Botânica) – Universidade Federal de Feira de Santana, Bahia, 2008.

- SOUZA, E. B.; CABRAL, E. L.; ZAPPI, D. C. Revisão de *Mitracarpus* (Rubiaceae – Spermaceae) para o Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v.61, n.2, p.319-352, 2010.
- STIPP, R. N.; GONÇALVES, R. B.; HÖFLING, J. F.; SMITH, D. J.; MATTOS-GRANER, R. O. Transcriptional analysis of *gtfB*, *gtfC*, and *gfpB* and their putative response regulators in several isolates of *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 23, n. 6, p. 466-73, dez. 2008.
- SZAKIEL, A.; RUSZKOWSKI, D.; GRUDNIAK, A.; KUREK, A.; WOLSKA, K.I.; DOLIGALSKA, M.; JANISZOWSKA, W. Antibacterial and antiparasitic activity of oleanolic acid and its glycosides isolated from marigold (*Calendula officinalis*). *Planta Medica*, Stuttgart, v. 74, n.14 p.1709–1715, nov. 2008.
- TAYLOR, C. M.; CAMPOS, M. T. V. A.; ZAPPI, D. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae, **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 3, p.549-616, 2007.
- THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cardiologia clínica**. 3. ed. São Paulo: Santos, 2001. 421p.
- TOUGER-DECKER, R.; VAN LOUREN, C. Sugars and dental caries. **American Society for Clinical Nutrition**, Bethesda, v.78, n. 4, p. 881S-92, out. 2003.
- TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine. L. **Microbiologia**. 10^a ed. Artmed, 2010.
- TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 289-306, abr./jun., 2006.
- VACCA-SMITH, A. M.; BOWEN, W. H. *In situ* studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. **Archives Oral Biology**, Oxyford, v.45, n. 4, p. 277-291, abr. 2000.

- WOLSKA, K.I.; GRUDNIAK, A.M.; FIECEK, B.; KRACZKIEWICZ-DOWJAT, A.; KUREK, A. Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. **Central European Journal Biology**, Warsaw, v.5, n.5, p.543-553, out. 2010.
- YOGEE SWARI, P.; SRIRAM, D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v.12, n. 6, p.657–666, 2005.
- ZAURA, E.; KEIJSER, B. J.; HUSE, S. M.; CRIELAARD, W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. **BMC Microbiology**, London, v.9, p.259, dez. 2009.
- ZERO, D. T.; Sugars-The arch criminal? **Caries Research**, Basel, v. 38, n. 3, p. 277-85, mai./jun. 2004.