UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

LAURA MARTINS VALDEVITE

Estudo do efeito *in vitro* de extrato das folhas e do óleo-resina de
copaíba sobre fatores de virulência de *Streptococcus mutans*,
relacionados à cárie dental

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo do efeito *in vitro* de extrato das folhas e do óleo-resina de
copaíba sobre fatores de virulência de *Streptococcus mutans*,
relacionados à cárie dental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientada: Laura Martins Valdevite

Orientador: Prof. Dr. Augusto César C. Spadaro

Ribeirão Preto

2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Valdevite, Laura Martins

Estudo do efeito *in vitro* de extrato das folhas e do óleo-resina de copaíba sobre fatores de virulência de *Streptococcus mutans*, relacionados à cárie dental.

128p.; il.; 30cm.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. *Copaifera langsdorffii*.
2. Copaíba.
3. Cárie dental.
4. Fatores de virulência.
5. *Streptococcus mutans*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Laura Martins Valdevite

Estudo do efeito *in vitro* de extrato das folhas e do óleo-resina de Copaíba sobre fatores de virulência de *Streptococcus mutans*, relacionados à cárie dental.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Defendida e aprovada pela Comissão Julgadora em: _____

Ao Professor Augusto César Cropanese Spadaro, que aceitou me orientar mesmo sem muito me conhecer, sabendo apenas que eu era uma principiante em pesquisa. Depositou em mim confiança. Apreendi muito nestes últimos dois anos, e por isso agradeço.

Ao grupo de pesquisa, à Dr. Denise Pimenta da Silva Leitão, ao Ms. Mateus Freire Leite e a Ana Cristina Morseli Polizello, que tornaram possível a concretização desse trabalho.

“Se pude ver mais longe foi porque me apoiei em ombros de gigantes.”

Albert Aeistein

À minha família, meus pais João Clério Valdevite e Leda Maria Ávila Martins Valdevite, por estarem sempre ao meu lado, me incentivando e me apoiando, a minha irmã Nara Martins Valdevite pela amizade. A vocês dedico este trabalho.

*E a esta força que nos guia, nos ampara e nos acalma, que me permitiu chegar até aqui.
Agradeço pela vida que me foi dada.*

Agradecimentos

Ao prof. Dr. Osvaldo de Freitas e a prof. Dr. Mônica Freiman Ramos, pela contribuição direta para a realização deste trabalho, sempre prestativos.

Ao prof. Dr. Norberto Peporine Lopes e ao seu grupo de pesquisa pela colaboração.

Aos professores do laboratório de Bioquímica da FCFRP - USP, profa. Dra. Ana Isabel de Assis Pandochi, profa. Dra. Caren Gledes Vargas Rechia, prof.Dr. Carlos Curti, e profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valin.

As funcionárias e pesquisadoras do laboratório de Bioquímica da FCFRP – USP, Ana Elisa Caleiros Seixas Azzolini, Ieda Maria Razaboni Prado, pela dedicação e pela ajuda na realização deste trabalho.

Ao Alcides Silva Pereira e a Nadir Mazzucato pela alegre convivência, pela ajuda e dedicação..

À Maria Regina de Pila Raphaeloski sempre atenciosa e prestativa.

Aos alunos de Iniciação Científica do laboratório de Bioquímica, Helga Namie Ferreira Murakami, João Paulo de Mello, pela importante colaboração.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, Anaísa Fernandes Calgaro Helena, Cássio de Barro Pontes, Cláudia da Silva Bittencourt, Daiani cristini Oliveira Andrade, Daniel Junqueira Danta, Fabiana da Silva Paula, Fernando Aparecido Marianao de Souza, Luciana Mariño Kabeya, Alexandre Kanashiro, Wagner Rodrigo de Souza, Juliano Geraldo Amaral, Cezar Rangel Pestana pela agradável convivência.

A Flávia Balderi, bióloga da ONG – Pojeto Copaíba, pela colaboração na realização do projeto.

Ao prof. Dr. Wilson Roberto Malfará, meu orientador de iniciação científica, que fez despertar em mim o interesse pela pesquisa.

Ao prof. Dr. Luiz Maçao Sakamoto e o prof. Dr. Rubens Ferracini, pela amizade.

Aos meus companheiros de trabalho na farmácia da Santa Casa de Serrana, Ângela Carolina Monteiro e Guilherme Grossi Santos, pela compreensão e amizade.

À administração da Santa Casa de Serrana, Florence Garnier Cavallheri e Líbia Galdino, ao setor de recursos humanos, Célia Pinhaneli, pelo apoio e adequação dos horários, viabilizando a realização deste trabalho.

À todos os meus amigos e companheiros da Santa Casa de Serrana, pela convivência e momentos passados juntos.

Ao amigo Marcos Soares de Araújo pelos conselhos e incentivos.

Ao Vinícius de Moraes Pereira – de vez em quando encontramos alguém que se alegra por nós quando tudo vai bem e que sempre nos ouve quando temos algo para contar, e que nos compreende como poucos conseguem fazer.

Aos meus amigos Marcela Barbin, Tatiana Guiomara Ramos, Leonardo Martini, José Eduardo Bidinelo, Tarcisio de Moraes Pereira, Michele Valdevite, Fernanda Bidinelo, Dario de Moraes Pereira, Marina Pessoto Matins, Vanessa Agnes Azzuz, Maximiliano Teoro, Sarah Cristina Freitas de Mello, e a todos que tornaram os dias mais alegres.

A todos da III turma de Farmácia do Centro Universitário Barão de Mauá, em especial à Aline Faccini Meneghelli, Paula Renata Vila Pretel, Rita de Cássia Garcia, Gláucia Maira Pásaro, Olívia Sabaine, Carolina Souza Cruz, Marcela de Souza, Sandra Akemi, Grazieli Nascimento de Barros, Camila Carolina Correa, Viviane São Julião, Brenno Fioravante de Castro, pelos momentos que passamos juntos e pelo apoio nesta nova etapa. Saudades!

A tia Ely Martins pelos ensinamentos e incentivos frequentes.

A Ms. Silvia Renata Barbin pela confiança em mim depositada.

A tia Ione Martins do Bem pela dedicação a mim.

Aos meus avós, Albertina Aparecida Ávila Martins, Maria da Silva e João Valdevite pelas orações, e Arsênio Ramos Martins pelas “portas abertas”.

E a todos que de forma direta ou indireta estiveram envolvidos no desenvolvimento deste projeto.

*A pior coisa que pode acontecer na vida de uma pessoa não é quando o seu projeto não dá certo, seu plano de ação não funciona ou quando a viagem termina no lugar errado. O pior é não começar.
Esse é o maior naufrágio.”*

Amyr Klink

RESUMO

VALDEVITE, L.M. Estudo do efeito *in vitro* do extrato das folhas e do óleo-resina de Copaíba sobre fatores de virulência de *Streptococcus mutans*, relacionados à saúde bucal. 128 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A cárie dental, uma doença multifatorial de caracter bacteriana associada à dieta alimentar, que danifica a estrutura dos dentes, se mantém como um problema de saúde pública mundial. A produção de ácidos por bactérias acidogênicas, como o *Streptococcus mutans* é considerada um importante fator etiológico no desenvolvimento de cáries. Este microorganismo está sempre presente no biofilme dental potencialmente cariogênico. Além disso, há uma clara e forte evidência que a produção de glucanas é essencial para a expressão da virulência de *S. mutans*, contribuindo para a aderência efetiva da bactéria à superfície dental, pela exposição à sacarose. Neste trabalho, estudamos a ação do extrato bruto hidroetanólico das folhas (EF), do óleo-resina (OR) e de suas frações, a fração volátil (FV) e a fração resinosa (FR), de Copaíba sobre fatores de virulência de *S. mutans*. O efeito inibitório na produção de ácido foi monitorado pelo registro potenciométrico de pH da suspensão bacteriana em função do tempo de incubação, tratadas com concentrações seriadas dos produtos naturais de copaíba. Para o ensaio da atividade antibacteriana, a concentração inibitória mínima (CIM) e a bactericida mínima (CBM) foram determinadas e comparadas. Glucanas sintetizadas a partir da sacarose por glucosiltransferases isoladas de *S. mutans* (GTFs) em presença dos produtos de copaíba foi quantificada pelo método do fenol-sulfúrico. Os valores de CI_{50} estabelecidos nos ensaios de potencial acidogênico foram iguais a 0,36 mg/mL (EF), e 0,06 mg/mL (FV). Enquanto a CIM foi estabelecida em 1 mg/mL (EF) e 0,2 mg/mL (FV). No entanto, tanto o EF quanto a F não apresentaram nenhum efeito bactericida nas concentrações testadas, sugerindo que eles exercem um efeito bacteriostático. Por outro lado, o OR exibiu um efeito bacteriostático em baixa concentração (CIM = 0,4 mg/mL) e um efeito bactericida em concentrações maiores (0,8 mg/mL). O OR também apresentou um maior efeito inibitório sobre a produção de ácidos bacterianos quando comparado ao EF, em concentrações menores ou igual a 2,0 mg/mL,

porém em concentrações maiores este efeito inibitório foi equivalente. OR inibiu a síntese de glucanas insolúveis em um perfil dose-dependente e suprimiu a atividade das GTFs-AC e GTFs-EC em 70% e 50%, respectivamente, na concentração de 20 µg/mL. Igualmente o OR suprimiu a síntese de glucanas solúveis pelas GTFs-EC (60%) na mesma concentração. Por outro lado, o EF não apresentou efeito acentuado sobre a atividade de GTFs-AC e GTFs-EC.

Palavras-chave: *Copaifera langsdorffii*, Óleo de copaíba, Cárie dental, *Streptococcus mutans*, Fatores de virulência, Glucosiltransferases.

ABSTRACT

VALDEVITE, L. M. Study of the *in vitro* of extract from leaves and oil-resin of Copaíba upon virulence factors of *Streptococcus mutans*, related to the dental caries. 128 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Dental caries, a diet-bacterial disease which damages the structure of teeth, continues to be a major public health problem worldwide. Acid production by acidogenic bacteria, such as *Streptococcus mutans*, which are embedded in a biofilm termed “dental plaque” is a key aspect of the pathogenesis of dental caries. In addition, there is clear and unequivocal evidence that glucan production is essential for the expression of virulence by mutans streptococci and contribute for the effective adherence of bacteria on dental surfaces formed when exposed to sucrose. In this work, we have evaluated the effect of the hydroethanolic crude extract from the leaves of copaiba (EF), as well as, the wood oil resin from copaiba (OR) and its volatile fraction (FV) upon virulence factors of *Streptococcus mutans*. The inhibitory effect on bacteria acid production was evaluated through the potentiometric measurement of pH from bacterial suspensions treated with serial concentrations of natural products. For the antibacterial activity assay, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) were determined and compared. Glucans synthesized from sucrose by streptococci glucosyltransferases (GTFs), in the presence of Copaiba natural products, were quantified by phenol-sulphuric method. The IC₅₀ values established for the acidogenic potential assay were 0.36 mg/mL (EF) and 0.06 mg/mL (FV), while the MIC values were 1.0 mg/mL (EF) and 0.2 mg/mL (FV). However, both EF and FV did not display any bactericidal effect at the tested concentration range, suggesting that they exert a bacteriostatic, rather than a bactericidal effect. On the other hand, OR exerted a bacteriostatic effect at low concentrations (MIC = 0.4 mg/mL) and a bactericidal effect at higher concentration (MBC = 0.8 mg/mL). OR also displayed a higher inhibitory activity on bacterial acid production when compared to EF, at concentrations less than or equal to 2.0 mg/mL, but at higher concentrations their inhibitory effects were equivalent. OR inhibited insoluble glucan synthesis

in a dose-dependent profile and suppressed GTFs-AC and GTFs-EC activities by 70% and 50%, respectively, at a concentration of 20 µg/mL. Similarly, OR suppressed soluble glucans synthesis by GTFs-EC (60%), at the same concentration. On the other hand, the EF did not affect significantly the activity of the GTFs-AC and GTFs-EC.

Key-words: *Copaifera langsdorffii*, Dental caries, *Streptococcus mutans*, virulence factors, glucosyltransferases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diagrama ilustrando a possível regra de coagregação no desenvolvimento de múltiplas espécies no biofilme dental.....	25
Figura 2 -	Representação esquemática simplificada da via de metabolização de carboidratos e excreção de ácidos em uma célula de <i>Streptococcus mutans</i>	36
Figura 3 -	Configuração molecular da bisbiguanida - Clorhexidina.....	40
Figura 4 -	Protocolo experimental para a padronização da concentração do inóculo e do indicador azul de nitrotetrazólio, para os ensaios de CIM.....	60
Figura 5 -	Protocolo experimental do ensaio para determinação de CIM dos extratos.....	63
Figura 6 -	Representação da curva de crescimento de <i>Streptococcus mutans</i> cultivado em caldo BHI contendo glucose 1% a 37°C, sob agitação de 130 rpm.....	73
Figura 7 -	Curva de calibração de ácido gálico (AG) para dosagem de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu.	76
Figura 8 -	Atividade inibitória do óleo-resina de copaíba e extrato hidroetanólico das folhas de <i>C. langsdorffii</i> , 1 mg/mL sobre a produção de ácidos por <i>Streptococcus mutans</i>	77
Figura 9 -	Curvas relacionando a produção de ácidos por <i>S. mutans</i> ATCC 25175, expressa em concentração de íons H ⁺ em função do tempo de incubação com glucose 55,6 mmol/L após tratamento com concentrações seriadas de (A) extrato das folhas e (B) óleo-resina de copaíba.....	78
Figura 10 -	Curvas relacionando a produção de ácidos por <i>S. mutans</i> ATCC 25175, expressa em concentração de íons H ⁺ em função do tempo de incubação com glucose 55,6 mmol/L após tratamento com concentrações seriadas de (A) fração volátil e (B) fração resinosa do óleo-resina de copaíba.....	80

Figura 11 -	Atividade inibitória do óleo-resina e de suas frações, 0,1 mg/mL, sobre a produção de ácidos por <i>S.mutans</i>	81
Figura 12 -	Curva dose-efeito relacionando o percentual de inibição do potencial acidogênico de <i>S.mutans</i> ATCC 25175 em função da concentração do óleo-resina de copaíba, de sua fração volátil e do extrato das folhas de copaíba.....	82
Figura 13 -	Fotografia da placa de microcultivo em que foi feita a padronização do inóculo e da concentração do indicador NBT.....	86
Figura 14 -	Fotografia da microplaca de cultura de <i>S.mutans</i> ATCC 25175 tratada com extrato das folhas e óleo-resina de Copaíba.....	87
Figura 15 -	Fotografia do gel de poliacrilamida da análise eletroforética das preparações brutas de GTFs	88
Figura 16 -	Efeito do extrato das folhas e do óleo-resina bruto de copaíba sobre a síntese de glucanas insolúveis, pela preparação bruta de glucosiltransferase associada à célula e extracelular.....	91
Figura 17 -	Efeito do extrato das folhas e do óleo-resina bruto de copaíba sobre a síntese de glucanas solúveis, pela preparação bruta de glucosiltransferase associada à célula e extracelular.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência relativa dos terpenóides detectados em maior quantidade em amostras de óleo-resina de Copaíba.....	46
Tabela 2 – Teor de fenólicos totais nos produtos naturais obtidos de copaíba.....	75

LISTA DE SIGLAS

AcetilCoA	Acetil – coenzima A
ADP	Adenosina – difosfato
AG	Ácido gálico
AI	Área integrada da curva
ANOVA	Análise da variância
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina – trifosfato
ATPase	Transportador ativo de membrana que hidrolisa ATP
BHI	Infuso de cérebro e coração
BSA	Albumina de soro bovino
CBM	Concentração bactericida mínima
Cl ₅₀	Concentração inibitória de 50% do efeito
CIM	Concentração inibitória mínima
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE – CL	Extrato hidroetanólico 70% de <i>Copaifera langsdorffii</i>
OR	Óleo-Resina de Copaíba
FV	Fração volátil do óleo-resina de Copaíba
Res	Fração resinosa do óleo-resina de Copaíba
GTFs	Enzimas glucosiltransferases
GTFs-AC	Preparação de glucosiltransferases associadas à célula
GTFs-EC	Preparação de glucosiltransferases extracelulares
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NBT	Azul de nitrotetrazólio
NCCLS	National Committee for Clinical and Laboratory Standard
SDS-PAGE	Dodesilsulfato de sódio – gel de eletroforese de poliacrilamida
PBS	Solução salina tamponada
Tampão FC	Tampão fosfato de sódio com cloretos
TYGSF	Caldo tripton, extrato de levedura, glucose, sacarose e frutose
ufc	Unidades formadoras de colônias

LISTA DE SÍMBOLOS

$\cong$	Aproximadamente igual a
μL	Microlitros
μm	Micrômetro
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
g	Gravidade
g	Grama
g/L	Grama por litro
h	Hora
KDa	KiloDaltons
K_s	Constante de saturação
L	Litro
Log_{10}	Logarítmo na base dez
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama por mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol/L	Milimol por litro
mol/L	Mol por litro
n	Número de amostras
nm	Nanômetro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
ρ	Coefficiente de significância estatística
m/m	Massa por massa
m/v	Massa por volume
rpm	Rotações por minuto
v/v	Volume por volume
%	Percentual

SUMÁRIO

1. Introdução	22
1.1. Cárie dental	22
1.2. Biofilme dental	24
1.3. <i>Streptococcus mutans</i>	27
1.3.1. Fatores de virulência associados ao <i>S. mutans</i>	28
1.3.2. Aderência inicial à superfície dos dentes	29
1.3.3. Enzimas glucosiltransferases	30
1.3.4. Metabolização de carboidratos por <i>S. mutans</i>	31
1.3.5. Caráter acidúrico do <i>S. mutans</i>	37
1.4. Desmineralização do esmalte dental	38
1.5. Medidas preventivas no controle da cárie dental	39
1.5.1. Os produtos naturais na prevenção da cárie dental	43
1.6. O gênero <i>Copaifera</i>	44
 2. Objetivos	 49
 3. Material e Métodos	 51
3.1. Meio de cultura e soluções	51
3.2. Bactéria.....	51
3.3. Cultivo de <i>S.mutans</i>	52
3.3.1. Determinação da curva de crescimento bacteriano	52
3.3.2. Propagação bacteriana e armazenamento	52
3.3.3. Contagem de microorganismos viáveis	53
3.3.4. Determinação de proteínas totais.....	54

3.3.5. Determinação da massa seca de células de <i>S.mutans</i>	54
3.4. Preparação dos produtos de copaíba.....	55
3.4.1. Extrato das folhas de Copaíba	55
3.4.2. Óleo-resina de Copaíba	55
3.5. Determinação de compostos fenólicos totais nos produtos de copaíba.....	55
3.6. Avaliação do efeito dos produtos de copaíba sobre o potencial acidogênico de <i>S. mutans in vitro</i>	56
3.7. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos produtos de copaíba.....	58
3.7.1. Padronização do inóculo.....	58
3.7.2. Padronização da concentração do indicador azul de nitrotetrazólio	59
3.7.3. Ensaio para a determinação da CIM.....	61
3.8. Isolamento e caracterização da classe de enzimas glucosiltransferases de <i>S.mutans</i>	64
3.8.1. Condições de cultivo de <i>Streptococcus mutans</i> para isolamento de glucosiltransferases.....	64
3.8.2. Preparação de glucosiltransferases extracelular	65
3.8.3. Preparação de glucosiltransferase associada à parede celular bacteriana	66
3.8.4. Caracterização eletroforética em gel de poliacrilamida de glucosiltransferases.....	66
3.8.5. Avaliação do efeito do extrato e do óleo-resina de copaíba sobre a atividade de glucosiltransferases isoladas de <i>S. mutans</i>	69
3.8.5.1. Glucanas insolúveis	69
3.8.5.2. Glucanas solúveis.....	70
3.8.5.3. Determinação de carboidratos totais.....	70
3.9. Tratamento dos resultados e análise estatística.....	71

4. Resultados e Discussão	73
4.1. Padronização do cultivo de <i>S.mutans</i>	73
4.2. Determinação dos compostos fenólicos totais presentes nos produtos de copaíba	74
4.3. Avaliação do efeito do extrato das folhas e do óleo-resina de Copaíba sobre o potencial acidogênico de <i>Streptococcus mutans in vitro</i>	76
4.4. Determinação das curvas dose-efeito do extrato das folhas e do óleo-resina de copaíba sobre o potencial acidogênico de <i>Streptococcus mutans</i>	82
4.5. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato das folhas e do óleo-resina de copaíba sobre o crescimento de <i>S. mutans</i> ...	83
4.5.1. Padronização do inóculo e da concentração do indicador azul de nitrotetrazólico utilizado no ensaio de CIM	83
4.5.2. Ensaio para determinação da CIM	86
4.6. Purificação da classe de enzimas glucosiltransferases de <i>S.mutans</i>	88
4.7. Avaliação do efeito do extrato das folhas e óleo-resina bruto de copaíba sobre a atividade de glucosiltransferases isoladas de <i>S. mutans</i>	89
 5. Conclusão	 97
 6. Referências Bibliográficas	 100
 Anexos	 126

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cárie dental

A cárie dental é uma doença multifatorial de caráter bacteriana associada à dieta alimentar e continua sendo um processo infeccioso com elevado índice de prevalência em seres humanos. Não obstante o volume de pesquisas científicas dedicadas a este assunto e os inúmeros produtos farmacêuticos lançados no mercado, com a finalidade de reduzir sua incidência (BOWEN, 2002).

O processo carioso tem sido intensivamente estudado (HAMADA e SLADE, 1980; LOESCHE, 1986; BOWEN, 2002), sendo caracterizado primariamente como uma erosão ou desmineralização do tecido dentário mais externo provocada por ácidos, em especial o ácido lático, produzido através da fermentação de carboidratos por microrganismos presentes no biofilme bacteriano que se forma na superfície dos dentes (MARSH, 1999).

O desenvolvimento da cárie depende da interação de alguns fatores, tais como: o hospedeiro (anatomia dos dentes), a microbiota constituinte do biofilme dental e a dieta alimentar, modelo este proposto por Keyes (1962). Em 1988, foi sugerida a inclusão de um quarto fator, o tempo, considerando que o processo de desmineralização não é instantâneo (NEWBRUN, 1988). Esses quatro fatores são denominados fatores essenciais à formação da lesão de cárie, ou fatores primários. Os fatores secundários estão relacionados com as características da saliva (WEYNE, 1992), destacando-se a velocidade de seu fluxo e os seus componentes (KRASSE, 1988).

A saliva é uma mistura complexa de vários componentes (água, íons, glicoproteínas), formada principalmente por secreções das glândulas salivares, fluido gengival, células epiteliais descamadas, microrganismos, leucócitos e resíduos alimentares, dentre outros componentes, sendo essencial para manutenção da saúde bucal por ajudar a controlar a invasão da cavidade bucal por microrganismos. Os componentes antimicrobianos da saliva incluem imunoglobulinas, lisozimas, lactoferrinas, peroxidases, amilases e proteínas aniônicas.

Um fluxo salivar aumentado pode diminuir a concentração microbiana na cavidade bucal e a falta da mesma resulta em um aumento do número de bactérias (TENOVUO, 1998). Além disso, a saliva reveste a mucosa oral e a protege contra irritação, forma reservatório de íons para a remineralização dentária, apresenta função de tamponamento do pH bucal, participa da formação da película adquirida que recobre o esmalte dental, realiza a digestão enzimática do amido e da sacarose promovendo ainda, as sensações gustativas por sua ação solvente. Por outro lado, seus componentes orgânicos, especialmente as glicoproteínas também funcionam como nutrientes para os microrganismos bucais. Estima-se que a saliva possua em média 10^9 bactérias por mililitro e sabe-se que as proteínas salivares podem ser degradadas por proteases produzidas, por exemplo, por *S. mutans* e *S. sanguis* (BARBIERI, 2005).

1.2. Biofilme dental

Dentre os fatores primários citados, o biofilme dental bacteriano é considerado o principal fator etiológico para o desenvolvimento de cáries e doenças periodontais. Trata-se de uma película incolor, aderente e não mineralizada, composta por diversas espécies bacterianas, sustentadas por uma matriz de proteínas salivares, polissacarídeos, células descamadas, leucócitos e restos alimentares, que se forma sobre a superfície dos dentes e tecidos gengivais em diferentes sítios da cavidade bucal (MARSH e BRADSHAW, 1997; BARRIS e ALIAGA, 1998).

A análise química de amostras de biofilme dental recolhidas de seres humanos e animais revelou que aproximadamente 20% de sua massa seca é composto por carboidratos (HOTZ et al., 1972; BOWEN et al., 1977; CURY et al., 2000). As células bacterianas podem constituir 60 a 70% da massa do biofilme, o qual pode conter de 10^5 a 10^{11} microrganismos por grama (ORTH, 1993; RAMBERG et al., 2003; LI et al., 2004).

O processo de adesão e/ou adsorção específica de certas espécies bacterianas presentes na cavidade oral à película salivar ou película adquirida que reveste a superfície dos dentes é a primeira etapa de formação do biofilme (YAO et al., 2003). A colonização dos dentes ocorre em duas fases distintas e aparentemente independentes (GIBBONS e NYGAARD, 1968). O início da colonização ocorre através de interações específicas de proteínas, especialmente glicoproteínas salivares, da película adquirida do esmalte, que funcionam como receptores para proteínas presentes na parede celular bacteriana, as adesinas (GONÇALVES e PEREIRA, 2003). Esta primeira etapa é reversível. O passo

seguinte está relacionado ao acúmulo de *S. mutans* através do seu crescimento e produção de glucanas extracelulares, envolvendo diferentes processos de interação, coaderência e coagregação com outros microrganismos bucais (KOLENBRANDER e LONDON, 1993).

Fig.1. Diagrama ilustrando a possível regra de coagregação no desenvolvimento de múltiplas espécies no biofilme dental. (a) Colonizadores primários “revestem” os substratos nas condições do biofilme, composto por polissacarídeos e proteínas; (b) Células em crescimento e divisão, e produção de polissacarídeos extracelulares (PEC) iniciam o desenvolvimento de microcolônias; (c) Coadesão de células únicas, coagregados celulares e grupos de células idênticas formam uma comunidade jovem de múltiplas espécies no biofilme; (d) maturação e formação de mosaicos clonais com múltiplas espécies no biofilme. (Adaptado de: RICKARD et al, 2003 – Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms).

O biofilme garante a vida da colônia bacteriana em ambientes instáveis, por proporcionar uma série de vantagens, tais como, melhor comunicação entre as células por estabelecer continuidade entre elas, facilitação das reações

bioquímicas, melhor proliferação e acesso a recursos que não poderiam ser utilizados por células isoladas, além da defesa coletiva contra fatores antagônicos (LEITE et al, 2001). Mas, ao contrário do que se possa supor, a colonização microbiana dos dentes pode ser benéfica, na medida em que contribui para a defesa da cavidade bucal contra a instalação de microrganismos patogênicos, através de mecanismos de competição. A microbiota residente no biofilme dental é uma comunidade relativamente estável com alta diversidade de espécies que podem variar de um sítio para outro, coexistindo através de interações metabólicas altamente relacionadas (van der HOEVEN e CAMP, 1994; SMITH e PIPPIN, 1998). Todavia, para permanecerem na cavidade bucal, as espécies bacterianas devem estar aptas a tolerar flutuações bruscas e substanciais do meio em que vivem, sobretudo no que diz respeito ao pH e aos nutrientes disponíveis (LEMOS et al., 2005).

No biofilme existe um equilíbrio dinâmico. A lesão de cárie ocorre, então, quando o equilíbrio processo físico-químico, de des-remineralização, é quebrado, ou seja, quando a composição e as atividades metabólicas desta complexa comunidade que o compõe são modificadas (BURNE, 1998). Assim, no processo dinâmico de formação do biofilme dental potencialmente cariogênico, uma comunidade microbiana, composta por um patógeno predominante, interage com o hospedeiro, dividindo espaço e recursos disponíveis com outros microrganismos oportunistas.

As bactérias metabolicamente ativas que colonizam o biofilme dental, consumindo carboidratos fermentáveis, causam flutuações no pH do meio, que podem culminar com a desmineralização do esmalte dental (MANJI et al, 1991), e

assim, as lesões cariosas resultam da interação entre as bactérias fermentadoras de carboidratos que colonizam a superfície dos dentes com os constituintes da dieta alimentar, sobretudo a sacarose. Portanto, o desenvolvimento do biofilme dental é a primeira evidência clínica desta interação (VACCA-SMITH et al., 1996).

1.3. *Streptococcus mutans*

A literatura tem mostrado dados consistentes de que o grupo mutans de bactérias gram positivas, particularmente, o *Streptococcus mutans*, são os microrganismos específicos sempre presentes no biofilme dental potencialmente cariogênico, desempenhando papel-chave na patogênese de cáries dentais em humanos (HAMADA et al., 1984; LOESCHE, 1986; LI e BURNE, 2001).

Existem vários trabalhos discutindo e correlacionando esses microorganismos com a cárie dental. Segundo Saramanayake (1996) as evidências do papel do *Streptococcus mutans* com a cárie dental incluem algumas características, tais como: (1) a existência de correlação entre contagem de *S. mutans* na saliva e no biofilme bacteriano com a prevalência e incidência da cárie; (2) o isolamento freqüente de *S. mutans* de superfícies dentárias antes do início de lesões da cárie; (3) produção de polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose pela maioria das cepas isoladas, e que podem atuar como reserva de carboidratos para suprir o metabolismo bacteriano; (4) metabolização rápida de açúcares produzindo ácido lático e outros ácidos orgânicos; (5) habilidade de atingir valores de pH considerados críticos para a desmineralização do esmalte, mais rapidamente que outras bactérias do biofilme bacteriano; (6) habilidade em

manter o crescimento e continuar a produzir ácidos em baixos valores de pH. Além disso, observou-se que a imunização de animais com *S. mutans* reduziu significativamente a incidência de cárie.

Lindquist e Emilson (1990) encontraram *Streptococcus* do grupo *mutans* em 40% das superfícies dentárias examinadas, em seres humanos.

Estudos usando métodos fenotípicos/genotípicos sugerem fortemente que a “mãe” (cuidador) é a principal fonte de infecção das crianças por *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrius* (KLEIN et al, 2004) e a saliva é o principal veículo de transmissão. No entanto, a detecção de genótipos que não são encontrados nas mães e em outros membros da família indicam que estes microrganismos podem ser adquiridos por outros meios. Esta variabilidade na transmissão pode estar associada a susceptibilidade de cada criança, incluindo o período definido como janela imunológica, condição imunológica da criança (CAUFIELD et al, 1993), a presença de hiperplasia do esmalte, o consumo de sacarose (MATTOS-GRANER et al, 1998), além da ação de fatores não específicos da saliva e sistema imune da mucosa bucal (LI e CAUFIELD, 1995).

1.3.1. Fatores de virulência associados ao *Streptococcus mutans*

A virulência de uma bactéria consiste em propriedades que promovem sua entrada, colonização e crescimento no organismo do hospedeiro.

A capacidade do *S. mutans* em iniciar uma cárie depende da associação de vários fatores de virulência, incluindo (1) aderência inicial à superfície dos dentes por meio de proteínas de adesão, (2) capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares insolúveis, por meio de enzimas glucosiltransferases (GTFs), o que

promove o acúmulo e permanência do microrganismo na superfície dos dentes, (3) alta capacidade para catabolizar carboidratos e produzir ácidos que desmineralizam o esmalte dental, o que lhe confere caráter acidogênico e, (4) habilidade para crescer e dar continuidade a metabolização de carboidratos em baixo pH, o que lhe confere caráter acidúrico (KURAMITSU, 1993; BURNE, 1998).

Características genéticas podem estar relacionadas a diferenças na virulência entre as cepas de *S. mutans*. A habilidade da bactéria sobreviver e persistir na cavidade bucal irá depender de sua plasticidade genética, que determina a sua capacidade para responder às flutuações locais das condições ambientais ou de estresse (DOBRINDT e HACKER, 2001). A microbiota residente do biofilme dental está sujeita a variações, tais como, redução na disponibilidade de nutrientes e redução do pH, devido à exposição aos ácidos orgânicos (CARLSSON, 1989; NASCIMENTO et al, 2004).

1.3.2. Aderência inicial à superfície dos dentes

Os processos iniciais de colonização da cavidade bucal incluem diversas populações microbianas. Bactérias do gênero *Streptococcus* do grupo viridans podem ser consideradas algumas das pioneiras neste processo (LI e CAULFIELD, 1995). Os *Streptococcus mutans* não são considerados bons colonizadores primários dos dentes, já que outros estreptococos bucais, como *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. gordonii*, e *S. oralis*, apresentam adesinas, glicoproteínas, com maior afinidade à película adquirida (KOLENBRANDER e LONDON, 1993). Todavia, a adesina (AgI/II) e a proteína β *glucan-binding* são antígenos do *S. mutans* que

parecem estar associados com a capacidade deste microrganismo em aderir e acumular no biofilme dental (NOGUEIRA et al, 2005; PECHARKI et al, 2005). A colonização inicial por *S. mutans* na superfície dental envolve interações entre a superfície da célula bacteriana e receptores da película adquirida. Este mecanismo é considerado independente de sacarose. Em seguida, com a disponibilidade de sacarose, a célula bacteriana ativa as enzimas glucosiltransferases, que sintetizam glucanas extracelulares. A aderência dependente de sacarose e o acúmulo de *Streptococcus mutans* são fatores que contribuem para o desenvolvimento de um biofilme dental patogênico, estreitamente relacionada à cárie dental (HAMADA e SLADE, 1980; LOESCHE, 1986; MARSH, 1994).

1.3.3. Enzimas glucosiltransferases

Streptococcus mutans e *Streptococcus sobrinus*, dentre outros estreptococos bucais do grupo mutans, são capazes de produzir enzimas conhecidas como glucosiltransferases. Estas enzimas hidrolisam a sacarose proveniente da dieta humana em glucose e frutose, unindo as unidades de glucose entre si por meio de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$ e $\alpha(1\rightarrow4)$ para formar polissacarídeos denominados glucanas. Essas glucanas conferem ao *S. mutans* a capacidade de aderir às superfícies lisas dos dentes e formar a matriz do biofilme dental, onde outros microrganismos também poderão se acumular (LOESCHE, 1986).

As enzimas glucosiltransferases (GTFs) são altamente específicas para a sacarose e não catalisam a polimerização de glucose livre ou glucose proveniente

de outros dissacarídeos (JORDAN e KEYES, 1966; TANZER, 1972; GERMAINE et al., 1974; ZERO, 2004). A espécie bacteriana *S. mutans* produz diferentes tipos de GTFs que sintetizam tanto glucanas solúveis quanto insolúveis, cuja principal finalidade é promover a adesão bacteriana na superfície dos dentes (JOHNSON et al., 1974; TANZER et al., 1974; FUJIWARA et al., 1996). A síntese destas glucanas insolúveis, a partir de dieta rica em sacarose aumenta o potencial cariogênico do biofilme dental por promover a aderência e grande acúmulo de *Streptococcus mutans* na superfície dental de humanos e animais (HAMADA e SLADE, 1980; LOESCHE, 1986).

A matriz polissacarídica do biofilme dental, formada inicialmente, pela ação destas glucanas, funciona ainda como uma forma de proteção para os *Streptococcus mutans* frente a bruscas variações de pH do meio, atuando como uma barreira protetora (HOJO et al, 1976), e reserva de nutrientes para suprir os períodos em que a disponibilidade de substratos é insuficiente (GIBBONS, 1968).

Diferenças na síntese de glucanas insolúveis podem estar associadas aos diferentes genótipos bacterianos, com diferentes graus de virulência. A produção destas glucanas modifica as propriedades físico-químicas do biofilme dental, incluindo uma menor concentração de cálcio, fósforo e fluoreto (CURY et al, 1997), bem como, o aumento da porosidade da matriz do esmalte dental (ZERO et al, 1992) tornando o dente mais suscetível à cárie.

1.3.4. Metabolização de carboidratos por *Streptococcus mutans*

A produção de ácidos e a capacidade de metabolização de substratos em meio ácido foram os primeiros fatores de virulência atribuídos a microrganismos

específicos relacionados à etiologia da cárie dental (LOESCHE, 1986; KOHLER et al, 1995).

A principal fonte energética para os *Streptococcus mutans* provém da dieta alimentar humana. Reações químicas do metabolismo bacteriano envolvendo processos de oxido-redução utilizam como substrato os carboidratos provenientes da alimentação, principalmente sacarose e glucose, fornecendo energia armazenada na forma de ATP, a qual é utilizada por estes microrganismos na manutenção de processos vitais da célula.

Segundo Loesche (1993), a maior parte da sacarose utilizada pelo *S. mutans* resulta na geração de ATP e ácido láctico através da via glicolítica bacteriana. Para que a glucose possa ser utilizada como substrato para estas reações, ela deve ser transportada para o citoplasma bacteriano. O transporte de glucose para o citoplasma, através da membrana celular, requer a presença de proteínas transportadoras de membrana específicas (DILLS et al., 1980). O *S. mutans* possui dois sistemas transportadores de glucose: o sistema de co-transporte de prótons ligado a permease (HAMILTON e St. MARTIN, 1982) e o sistema enzimático fosfotransferase (SCHACHTELE e MAYO, 1973; VADEBONCOEUR e PELLETIER, 1997). O sistema fosfotransferase tem alta afinidade pela glucose (constante de saturação K_s , igual a 5,0 $\mu\text{mol/L}$), apresentando atividade máxima quando a disponibilidade deste substrato é baixa e o pH do meio está próximo ao neutro. Por outro lado, a permease de membrana tem baixa afinidade pela glucose ($K_s = 100,0 \mu\text{mol/L}$), funcionando apenas quando a concentração desse substrato é alta e o pH do meio está baixo (ELLWOOD et al., 1979; VADEBONCOEUR e PELLETIER, 1997).

No interior da célula bacteriana, a glucose é fosforilada a glucose-6-fosfato e degradada a piruvato, pela via metabólica de Embden-Meyerhorf-Parnas, provocando um aumento da concentração intracelular de NADH, pela ação da enzima gliceraldeído-fosfatodesidrogenase (TAKAHASHI-ABBE et al, 2001). Para garantir o equilíbrio óxido-redutor da célula, este NADH em excesso precisa ser oxidado a NAD^+ , garantindo a continuidade do processo glicolítico (CARLSSON e HAMILTON, 1994).

Em condições de aerobiose, o *S. mutans* converte o piruvato em AcetilCoA, através da enzima piruvato desidrogenase, e este último intermediário é reintroduzido nas vias metabólicas bacterianas (CARLSSON et al, 1985). Quando em anaerobiose, particularmente em condição de excesso de substrato, o piruvato é reduzido a L-ácido láctico, através da lactato desidrogenase. Durante este processo, NADH é oxidado à NAD^+ , preservando o balanço óxido-redutor da célula (IWAMI e YAMADA, 1999).

Algumas moléculas de glucose provenientes da catabolização da sacarose são convertidas em polissacarídeos intracelulares de alta massa molecular (amilopectina ou glicogênio), o que garante o armazenamento de substrato para o metabolismo energético quando nenhum substrato exógeno estiver disponível. Além disso, o *S. mutans* é capaz de produzir hidrolases glicosídicas que extraem carboidratos da saliva para a utilização como fonte de energia (GRONROOS, 2000 apud BARBIERI, 2005). Quando a concentração de substrato é baixa, nas mesmas condições de anaerobiose, é acionada a via formato-liase, que apresenta dois ramos: (1) o ramo que leva a formação de etanol e formato, e (2) o ramo que leva à formação de acetato e formato (TAKAHASHI et al, 1987). O ramo de

formação do etanol envolve dois passos, onde duas moléculas de NADH são oxidados a NAD⁺. No *S. mutans*, onde o AcetilCoA é convertido em acetaldeído, e então em etanol, a catalização destas reações é feita por uma enzima bifuncional, denominada álcool-acetaldeído desidrogenase. No ramo de formação do acetato, um ATP extra é gerado, visto que o AcetilCoA é primariamente convertido em acetilfosfato, com a concomitante conversão de ADP em ATP. Neste ramo da via glicolítica, as quantidades de formato produzidas são equivalentes à quantidade total de acetato e etanol (LEN et al, 2004).

A produção de ácidos por *S. mutans*, pode ser influenciada por condições ambientais, como pH, temperatura e tensão de O₂ (CONCHA et al, 1996). O *S. mutans* produz uma quantidade maior de formato e acetato em meio de cultura neutro (pH 7,0) enriquecido com sacarose, por outro lado quando o pH do meio diminui para 5,5, amostras de *S. mutans* produzem quantidades maiores de lactato, e menores de acetato e formato (SOET et al 1989, IWAMI et al 1992, DASHPER e REYNOLDS, 1996).

Através da via metabólica anaeróbica de fermentação de carboidratos, as bactérias presentes no biofilme dental produzem ácidos orgânicos que provocam uma queda de pH. Esses resíduos ácidos difundem-se através do fluído do biofilme até a superfície do esmalte dental, provocando a sua dissolução por alterar a composição de cálcio, fosfato e fluoretos, num processo denominado desmineralização. Os metabólitos gerados são capazes de reduzir o pH do biofilme a valores abaixo do pH crítico (pH=5,5) de solubilização da hidroxiapatita, principal constituinte do esmalte dental, provocando uma desmineralização da

superfície do dente e proliferação bacteriana no tecido lesado (MacPHERSON e DAWES, 1994; LEMOS et al, 2005).

Testes *in vivo* demonstraram que o consumo destes açúcares, por estas vias metabólicas, podem resultar em uma redução do pH do biofilme de 3 pontos em poucos minutos dependendo da idade, composição do biofilme, e obviamente, da concentração de carboidratos provenientes da dieta (McNEILL e HAMILTON, 2003).

Fig.2. Representação esquemática simplificada da via de metabolização de carboidratos e excreção de ácidos em uma célula de *Streptococcus mutans*. O transporte de glucose extracelular para o citoplasma é realizado pelo (1) Sistema de co-transporte de prótons ligado à permease de membrana e pelo (2) sistema enzimático fosfotransferase (3) A glucose é degradada a piruvato pela via glicolítica de Ebden-Meyerhof-Parnas; (4) NADH é oxidado a NAD⁺ pela via da lactato desidrogenase e (5) via da formato-liase. O pH intracelular é mantido acima do pH extracelular através da (6) translocação de prótons H⁺ via ATPase e (7) através de um gradiente eletroquímico mediado por carreador. FPM: força próton-motora da Permease; EnzII: Sistema fosfoenoltransferase. Ilustração adaptada de Carlsson e Hamilton (1994) e Vadeboncorur e Pelletier (1997), In: LEITÃO, 2005 – Tese de doutorado.

1.3.5. Caráter acidúrico do *S.mutans*

Durante a oxidação de NADH em NAD⁺ tanto a via da lactato desidrogenase como a via da formato liase levam ao aumento da concentração hidrogeniônica no citoplasma da célula bacteriana.

O *Streptococcus mutans* possui um sistema de transdução de sinal que garante a sua sobrevivência no biofilme dental. Esse microrganismo consegue perceber as mudanças ambientais de pH e, em resposta, sua expressão gênica pode sofrer alterações. O componente regulador desse sistema consiste de uma proteína histatina quinase associada à membrana, que estimula uma resposta citoplasmática, quando as condições externas de pH são alteradas (LI et al, 2002).

Hamilton e Svensater demonstraram que, quando se expõe ao pH 5,5 uma cepa de *S.mutans* mantida a pH 7,5 ocorre alteração na sua produção protéica, originando 36 proteínas ácido-reguladoras. Esse fato permite aumentar o potencial acidúrico do microrganismo, elevando assim a sua resistência aos ácidos presentes no meio (HAMILTON e SVENSATER, 1998).

O pH intracelular de *S.mutans* é mantido acima do pH extracelular, do biofilme dental, através da translocação de prótons (H⁺) via ATPases de membrana (STURR e MARQUIS, 1992), ou através de um processo elétron neutro mediado por carreador de membrana celular e sem gasto de energia, onde os prótons são expelidos junto com os metabólitos celulares (DASHPER e REYNOLDS, 1992).

Assim, estes mecanismos protegem o *S. mutans* do acúmulo de intermediários da via glicolítica no citoplasma, fazendo com que seja capaz de sobreviver em condições de baixo pH externo. Todavia, tal microrganismo

acidifica o biofilme dental, provocando a desmineralização do esmalte e formação da cárie (HAMILTON, 1994).

1.4 . Desmineralização do esmalte dental

O esmalte do dente recém erupcionado é imaturo, poroso. Com o passar do tempo ocorre a maturação deste tecido devido à deposição de íons cálcio e fosfato, presentes na saliva. Simultaneamente, acontece um processo de desmineralização natural, que mantém um equilíbrio mineral entre o esmalte e o microambiente bucal. Os dentes estão expostos a contínuos processos de desmineralização e remineralização no ambiente oral. Em particular a intermitente mudança na composição do biofilme pode interferir neste ciclo (GAO et al, 2001).

A composição do biofilme dental, bem como a dieta, a concentração de íons fluoreto na saliva e esmalte dental e a viscosidade da secreção salivar, influenciam na magnitude das flutuações de pH, selecionando uma microbiota resistente a esta variação, e que são capazes de reagir ao estresse nutricional, interferindo também, no equilíbrio do processo cíclico de desmineralização e remineralização, ocasionando uma lesão cáries (FEJERSKOV, 1997). A infecção crônica dos tecidos duros do dente, resulta numa desmineralização acentuada, ocasionada por estas bactérias, que na presença de carboidratos fermentáveis, produzem ácidos orgânicos (FEATHERSTONE et al, 1979; van DIJK et al, 1983).

A cárie dental deve ser considerada, portanto, um processo dinâmico, dependente das condições da interface biofilme dental esmalte-dentina, em que

a concentração de íons hidrogênio e íons de compostos inorgânicos presentes no biofilme estabeleceram condições de supersaturação ou subsaturação que favoreceram, respectivamente, a remineralização ou desmineralização do esmalte dental (CURY, 1992). Se o processo de desmineralização predominar por um grande período, e a taxa de desmineralização se sobrepor a de remineralização, o resultado é a perda gradual de minerais do dente, originando a formação de uma cavidade irreversível (AOBA, 2004).

1.5. Medidas preventivas no controle da cárie dental

Tendo em vista que a dieta humana é constituída, frequentemente, por altas proporções de carboidratos fermentáveis, os métodos para prevenção e controle da cárie dental estão orientados, seja diretamente ou indiretamente, à modificação da atividade do biofilme dental para estados compatíveis com a saúde. Partindo-se deste conhecimento prévio, o estabelecimento de medidas que se interponham a qualquer uma das propriedades fisiológicas de bactérias potencialmente cariogênicas podem resultar na prevenção da cárie dental.

A prevenção e o controle na formação do biofilme bacteriano é a medida mais importante para se manter a saúde gengival e dental. Estudos realizados por Axelsson (1976) demonstraram que a escovação e o uso de fio dental para remoção mecânica do biofilme é um meio seguro e eficaz, quando realizados regularmente. Porém, muitos trabalhos têm mostrado a dificuldade de reduzir o *S.mutans* de fissuras e das superfícies proximais dos dentes apenas com o uso destes mecanismos, desta forma o uso de agentes químicos como coadjuvantes da higienização bucal pode ser necessário para o controle eficaz do biofilme, agindo

de diferentes formas: interferindo na adesão bacteriana à superfície do dente, prevenindo a proliferação microbiana e removendo o biofilme pré-existente, ou ainda, alterando a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis que é um mecanismo particularmente importante na aderência bacteriana (TWETMAN, PETERSON e PAKHOMOV, 1996; RIBEIRO e BUSSADOR, 2000).

O agente antimicrobiano mais eficaz usado no controle da cárie dental é a cloro-hexedina, uma bisbiguanida catiônica (ALMEIDA, 2001). A clorexedina é um composto químico, sintetizado em laboratório desde 1954, que apresenta uma molécula simétrica, consistindo de dois anéis 4-clorofenil e dois grupos biguanida conectados por uma cadeia de hexametileno central (1,1'-hexametenobis [5-(p-clorofenil)biguanida]).

Fig.3. Configuração molecular da bisbiguanida – **Cloro-hexedina**.

Pode apresentar-se na forma de diversos sais, como o gluconato, digluconato, acetato e hidrocloreto, sendo que a digluconato é a mais indicada, por ter maior solubilidade em água e em pH fisiológico, dissociando-se para liberar o componente catiônico. A fórmula molecular é $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2 C_6H_{12}O_7$, MM = 897,77, densidade = 1,06 g / cm³, ponto de ebulição = 134 °C (USP, 2002).

A apresentação na forma de bochecho é aceita tanto pelo FDA como pela ADA para a redução da inflamação gengival, sendo o enxaguatório antibacteriano mais estudado (CARRANZA e NEWMAN, 1997).

Está bem demonstrado que a clorexedina inibe a formação do biofilme dental quando aplicada duas vezes por dia sob a forma de bochecho em uma concentração de 0,2%. Foi comprovado que ela reduz a incidência da lesão de cárie em animais e humanos (EMILSON, 1994). É também capaz de inibir a formação de ácidos no biofilme já estabelecido, por algumas horas, após uma aplicação. Poucos agentes antibacterianos possuem um efeito semelhante no biofilme dental. Tudo indica que a característica especial que lhe permite ser tão eficiente é a capacidade que esse composto possui de se reter na cavidade oral por muitas horas após o bochecho. A clorexedina tem ainda alta afinidade pela hidroxiapatita do esmalte dental e tem sido sugerido que este mecanismo de combinação poderia explicar os seus efeitos clínicos prolongados, além do que a mucosa oral é o sítio de maior retenção da droga, e a sua lenta liberação, mais do que a absorção inicial, é o fator essencial para o seu efeito prolongado (TWETMAN, 2004). Em concentrações relativamente altas, pode eliminar parcialmente o biofilme bacteriano e afetar, em um certo nível, o metabolismo das bactérias remanescentes. No espaço de tempo entre os bochechos, o forte efeito inicial bactericida parece converte-se numa ação bacteriostática, inibindo a formação de ácidos no biofilme por algumas horas após o bochecho. Além disso, a cada aplicação subsequente de clorexedina o nível de *Streptococcus mutans* reduz significativamente (PIOVANO et al, 2005). Porém, apesar de eficiente no combate à cárie dental, apresenta efeitos adversos, causando o aparecimento de manchas

marrons na superfície dental, além de deixar gosto metálico na boca, provocar náuseas e vômitos, dores abdominais, hipersalivação, dessensibilização das papilas gustativas e conseqüente perda do paladar (TEREZAN et al, 1992; ALMEIDA, 2001; JUNIOR, 2001).

Embora as indústrias farmacêuticas e químicas tenham produzido uma imensa variedade de antibióticos nos últimos tempos, cada vez mais tem sido observado um aumento da resistência das bactérias a essas drogas usadas para fins terapêuticos (COHEN, 1992).

O antiséptico considerado ideal é aquele que apresenta alta substantividade, ou seja, persistência de ação, manutenção da atividade antimicrobiana, especificidade e ausência de efeitos colaterais. Os agentes anti-sépticos incluem os grupos de antibióticos, enzimas, bisbiguanidas, compostos de amônio quaternários, fenóis e óleos essenciais, fluoretos, sais de metais, agentes oxidantes, e produtos naturais (MORETTI, 2004). Dentre os agentes microbianos sintéticos utilizados temos: (1) os compostos fenólicos como o timol e o triclosan, que agem alterando a permeabilidade celular, levando a morte dos microrganismos e desnaturação protéica; (2) os compostos catiônicos, dentre eles o cloreto de cetilpiridínio, além da clorexedina, que interferem na adesão bacteriana, e provocam o rompimento da parede e membrana celulares bacterianas; (3) os íons metálicos como o zinco, cobre e o estanho, que inibem as enzimas bacterianas glucosiltransferases, interferindo desta forma, na formação de glucanas e acúmulo do biofilme, além de inibir a síntese protéica, alterando o metabolismo bacteriano (SIMIONATO, 2005).

1.5.1. Os produtos naturais na prevenção da cárie dental

O desenvolvimento de resistência de microrganismos a antimicrobianos e compostos sintéticos usuais tem levado pesquisadores de diversas áreas a buscar alternativas em produtos naturais empregados na medicina popular de diversas regiões do mundo (GRAVENMADE e JENKINS, 1986; WU-YUAN et al., 1990; OOSHIMA et al., 2000; LEITÃO et al, 2004; LEITÃO et al, 2005; LEITE, 2005).

O uso destes produtos tem sido uma das estratégias mais bem sucedidas para a descoberta de novos fármacos (HARVEY, 2000), sendo que cerca de 70% de novos antibióticos e 61% de novas drogas antitumorais aprovadas entre 1981 e 2002 pelo FDA (Food and Drug Administration) e entidades similares de outros países, são produtos naturais ou seus derivados (NEWMAN et al, 2003).

Extratos vegetais e compostos fitoquímicos têm sido usados com maior frequência para fins medicinais. A Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998) estima que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependem das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (GONÇALVES, 2005). Os vegetais superiores são capazes de produzir diversas substâncias, através de seu metabolismo secundário, como sistema de defesa do vegetal contra predação por microrganismos, insetos e herbívoros (GOTTLIEB, 1982; KAPLAN et al, 1983).

Os principais grupos de compostos com atividade biológica, extraídos de plantas incluem terpenóides e óleos essenciais (TORSSEL, 1989), alcalóides (FESSENDEN, 1982), lectinas e polipeptídios (TERRAS et al., 1993; ZHANG e LEWIS, 1997) bem como substâncias fenólicas e polifenóis, que são os fenóis simples, ácidos fenólicos, as quinonas (STERN et al., 1996), flavonóides

(FESSENDEN, 1982), taninos (SCALBERT, 1991) e cumarinas (O'KENNEDY e THORNES, 1997).

Diversos trabalhos relatam o uso bem sucedido de produtos farmacêuticos à base de extrato vegetal. A ausência de efeitos colaterais associada ao baixo custo de produção é considerado ponto de fundamental importância para o seu desenvolvimento. Extrato de *Sanguinaria canadensis*, empregado na forma de colutório, é bastante eficaz na redução do biofilme dental, apresentando atividade anti-cárie por interferir na atividade de enzimas bacterianas através da oxidação de grupamentos SH (grupos tiol), além de inibir a adesão bacteriana e alterar a permeabilidade celular (MORETTI, 2004). Assim, a diversidade química de derivados de produtos naturais pode ser cada vez mais relevante para o futuro da descoberta de novas drogas (HARVEY, 2000).

1.6. O gênero *Copaifera*

O gênero *Copaifera* L. pertence à família Leguminosae Juss., sub-família Caesalpinoideae Kunth., com 28 espécies catalogadas, das quais 16 são endêmicas do Brasil, principalmente nos biomas amazônico e do Cerrado. Espécies deste gênero são conhecidas popularmente como Copaíba. As copaíbas são árvores nativas da região tropical da América latina e também da África Ocidental. Na América Latina são encontradas espécies na região que se estende do México ao norte da Argentina. No Brasil, a espécie *C. langsdorffii* é particularmente importante por estar distribuída por todo o território, particularmente, do Amazonas a Santa Catarina, distribuindo-se ainda em áreas das regiões Nordeste e Centro-Oeste (VEIGA JR. e PINTO, 2002). Os trabalhos

realizados sobre o gênero *Copaifera* estão, em sua maioria, relacionados com as propriedades químicas e farmacológicas do óleo secretado do tronco destas árvores. Todavia, apesar de extensivamente estudado, poucas referências discriminam a espécie de *Copaifera* de onde o exudato foi obtido. Somente cinco espécies têm sua composição química descrita na literatura. *C. multifuga* Hayne, abundante na região amazônica, *C. langsdorffii*, encontrada na região do cerrado, nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, *C. cearensis* Huber ex Ducke, proveniente do Nordeste brasileiro, bem como *C. officinalis* L. e *C. reticulada* Ducke encontradas ao Norte da Amazônia Ocidental, na região que se estende até a Venezuela (VEIGA JR. e PINTO, 2002). As propriedades desta árvore tão apreciadas pelos índios, que usavam sua resina principalmente como cicatrizante e antiinflamatório, fez com que a copaíba fosse uma das primeiras espécies a serem descritas pelos cronistas portugueses. O “Food and Drug Administration (FDA), órgão de regulamentação de fármacos e alimentos do governo americano, aprovou o óleo de copaíba em 1972 (VEIGA JR. e PINTO, 2002). Entre as propriedades medicinais atribuídas a este gênero, as mais estudadas foram a atividade antiinflamatória e o efeito analgésico (BASILE et al, 1988; FERNANDES et al, 1992). Óleos de copaíba comerciais mostraram atividade protetora contra a penetração de *Schistosoma mansoni* (GILBERT et al, 1972), propriedade cercaricida e repelente de insetos (LACEY et al, 1981). Atividades antimicrobianas e antibacterianas também são relatadas na literatura (VEIGA Jr e PINTO, 2002).

O óleo-resina é uma resina líquida rica em sesquiterpenos e diterpenos em diferentes concentrações. Sua fração volátil, mais leve, é composta por

sesquiterpenos, enquanto a fração pesada, resinosa, é composta por diterpenos (MONTI et al, 1996; BARATA, 1997; VEIGA JR. e PINTO, 2002). O óleo-resina de copaíba apresenta uma grande variabilidade em sua composição química, tendo sido identificados 72 sesquiterpenos e 27 diterpenos (VEIGA JR e PINTO, 2002). Um composto sempre presente no óleo-resina de copaíba é o beta-cariofileno, um sesquiterpeno, a Tabela 1 mostra a frequência relativa dos terpenóides detectados em maior quantidade em amostras comerciais do óleo-resina (RIGAMONTE-AZEVEDO et al, 2004).

Tabela 1. Frequência relativa dos terpenóides detectados em maior quantidade em amostras de óleo-resina de Copaíba.

Substância	Frequência
β – Cariofileno	100,00 %
α – Humuleno	62,50 %
β – Bisaboleno	62,50 %
σ – Cadineno	50,00 %
Bergamoteno	37,50 %
α – Copaeno	37,50 %
δ – Cadineno	37,50 %
Ácido Copálico	75,00 %
Ácido Hardwickiico	75,00 %
Ácido Colavênico	75,00 %
Ácido Caurenóico	62,50 %

Tabela extraída de RIGAMONTE-AZEVEDO et al, 20004

A *Copaifera langsdorffii* é conhecida por conter terpenos e compostos fenólicos com comprovada propriedade antimicrobiana (MARSAIOLI, 1975 apud VEIGA Jr e PINTO, 2002). O óleo essencial obtido das folhas de *Copaifera langsdorffii* foi caracterizado quimicamente (GRAMOSA e SILVEIRA, 2005),

apresentando como compostos majoritários o germacreno-d, germacreno-b, α -cadinol, δ -cadineno, e o β -cariofileno.

A utilização de extratos e óleo de copaíba vem sendo aplicada com finalidade odontológica. Bandeira (2000) estudou a composição do óleo essencial separado da resina de *Copaifera multifuga* e sua compatibilidade biológica em molares de rato, quando associado ao veículo hidróxido de cálcio, observando atividades bactericida e bacteriostática em duas frações do extrato bruto. Tais estudos revelaram que enquanto o óleo essencial apresentou melhor ação bactericida frente ao *S. mutans*, a resina apresentou-se apenas bacteriostática. Em um *screening* feito no Centro Universitário de Lavras (MG), com 32 espécies vegetais, observou-se que a *Copaifera langsdorffii* apresentava potencial para emprego no controle de *Streptococcus mutans*. Este estudo, contudo, limitou-se a estabelecer a medida do halo de inibição em ágar produzido pelos extratos vegetais, tendo como referência o halo provocado pela clorexedina (BRAGA et al, 2004). Desta maneira, estudos complementares que confirmem o efeito inibitório de extratos de *Copaifera langsdorffii* sobre a fisiologia de bactérias cariogênicas como o *S. mutans* ainda se fazem necessários.

Objetivos

2 . OBJETIVOS

2.1. Objetivos específicos

- 2.1.1. Avaliar o efeito *in vitro* do extrato bruto hidroetanólico das folhas e do óleo-resina de Copaíba, bem como das frações volátil e resinosa do óleo-resina sobre a produção de ácidos orgânicos por *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- 2.1.2. Estabelecer, para os produtos naturais obtidos de Copaíba, concentrações que inibem em 50% (CI₅₀) o potencial acidogênico bacteriano através do estabelecimento de curvas dose-resposta;
- 2.1.3. Avaliar o efeito de extratos brutos, hidroetanólico das folhas e do óleo-resina de Copaíba, sobre a viabilidade celular de *S. mutans*, em suas respectivas CI₅₀.
- 2.1.4. Estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos brutos hidroetanólico das folhas e do óleo-resina de Copaíba sobre o crescimento de *S. mutans in vitro*.
- 2.1.5. Avaliar o efeito do extrato bruto das folhas e do óleo-resina de Copaíba sobre a atividade de glucosiltransferases isoladas de *S. mutans*.

Material e Métodos

3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1. Meio de cultura e soluções

O Infuso de Cérebro e Coração contendo 1,0 % de glucose (m/v) foi preparado com meio de cultura Brain Heart Infusion (Oxoid) 6,0 g, glucose (Merck) 2,0 g, e água destilada 200,0 mL, sendo, posteriormente, autoclavado a 120°C, por 15 minutos, em erlenmeyer de 400,0 mL.

A solução salina fosfatada tamponada (PBS) pH 7,4 foi preparada com Na_2HPO_4 1,15 g/L, NaCl 8,0 g/L e KCl 0,2 g/L.

A solução de sais, utilizada como meio de suspensão para as células bacterianas, foi preparada com KCl 3,728 g/L e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2033 g/L (PHAN et al, 2004).

Todos os sais são de procedência Merck. Todas as soluções, exceto os meios de cultura, foram preparadas com água destilada e deionizada por sistema MilliQ® (Millipore). Os meios de cultura foram preparados em água destilada. As soluções PBS e Tampão FC foram autoclavadas a 120°C, por 15 minutos.

3.2. Bactéria

A linhagem de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, selecionada para este estudo, foi adquirida através do Instituto André Tosello (SP) na forma liofilizada e sua reativação foi feita no laboratório de bioquímica da FCFRP-USP.

Culturas estoque de *S. mutans* ATCC 25175 em Caldo BHI (Oxoid), enriquecido com glucose 1,0% (m/v) e glicerol 20,0% (m/v) foram mantidas a -70°C. Antes de sua utilização experimental, as culturas foram descongeladas em banho-maria a 37°C, transferidas para Caldo BHI (Oxoid) enriquecido com

glucose 1,0% e incubadas a 37°C por 24h, em estufa horizontal com agitação de 130 rpm. As culturas foram, posteriormente, repicadas (50 µL) em tubos contendo 5,0 mL do mesmo caldo de cultura, incubadas por 24h, e utilizadas como inóculo em procedimentos de propagação de células.

3.3. Cultivo de *S. mutans*

3.3.1. Determinação da curva de crescimento bacteriano

Cinco mililitros de uma suspensão de *S. mutans* em BHI (incubada a 37°C, por 24 horas), apresentando uma absorvância igual a 0,12 em 660 nm, foram semeados em BHI (200,0 mL) enriquecido com 1,0% glucose (m/v). A cultura foi incubada a 37°C, sob agitação de 100 rpm, em estufa horizontal. Paralelamente, alíquotas de 1,0 mL do meio de cultura recém-semeado foram transferidas para cubetas de espectrofotômetro Shimadzu modelo CPS - 240A com agitação magnética e temperatura constante de 37°C, e sua absorvância foi registrada em um comprimento de onda de 660 nm (TAKAHASHI et al., 1996). Um microcomputador Pentium 233, conectado ao aparelho, registrou a curva de crescimento da cultura bacteriana e o tempo de incubação necessário para atingir a fase exponencial de crescimento.

3.3.2. Propagação bacteriana e armazenamento

Cinco mililitros de uma suspensão de *S. mutans* em caldo BHI, incubada a 37°C, por 24 horas, apresentando uma absorvância de aproximadamente 0,12 a 660 nm, foram semeados em 200,0 mL de BHI enriquecido com 1,0% de glucose (m/v), seguido de incubação a 37°C, sob agitação de 130 rpm, em estufa horizontal

com agitação orbital. O processo de incubação foi interrompido durante a fase exponencial do crescimento bacteriano, onde os microrganismos expressam ao máximo os seus caracteres fisiológicos. Nesta etapa, a cultura bacteriana foi recolhida, centrifugada a 6.000 x g por 15 min a 4°C (Centrífuga Sorvall® modelo Superspeed RC2-B) em frascos pré-pesados e o sedimento obtido foi lavado três vezes com PBS esterilizado. O sedimento lavado teve sua massa úmida determinada e foi ressuspenso em Tampão FC contendo glicerol 20,0% (p/v), sob agitação magnética de aproximadamente 130 rpm, em volume suficiente para se obter uma concentração de microrganismos equivalente a 5,0 mg/mL. Essa suspensão bacteriana foi pré-incubada a 37°C por 30 minutos para depletar a reserva de glucose intracelular, e posteriormente, dividida em alíquotas de 1,0 mL, em tubos de polietileno (Eppendorf) esterilizados e armazenadas a -70°C, por um período não superior a seis meses. Essas alíquotas foram usadas para os ensaios de potencial acidogênico. Todo o material empregado nesta etapa, incluindo vidrarias, frascos de centrífuga, pipetas, ponteiras e material plástico descartável, foi devidamente esterilizado, e, todos os procedimentos, foram executados assepticamente. A homogeneidade das alíquotas bacterianas armazenadas foi verificada através da contagem de células viáveis, dosagem de proteínas totais e determinação do peso seco de células bacterianas.

3.3.3. Contagem de microrganismos viáveis

Amostras de 1,0 mL de suspensão de células bacterianas em solução de glicerol 20,0% (m/v), armazenadas a -70°C, foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37°C e alíquotas de 100,0 µL de cada suspensão foram

transferidas para tubos contendo 9,9 mL de solução de NaCl 0,9% (m/v) esterilizada. Diluições centesimais seriadas em solução de NaCl 0,9% (m/v) foram semeadas, pelo método de *pour plate*, em placas contendo Agar BHI (Oxoid) e incubadas sob capnofilia, a 37°C, por 24/48 h, com a finalidade de se determinar o número total de unidades formadoras de colônia (UFC) nas amostras (cada diluição da amostra foi feita em duplicata).

3.3.4. Determinação de proteínas totais

O teor de proteínas totais, nas alíquotas de células bacterianas, foi determinado pelo método de BRADFORD (1976). Nesta reação colorimétrica, realizada em microplacas com 96 cavidades de fundo plano (CoStar – Corning Inc, NY), o reagente de cor Bio-Rad Protein Assay (BioRad) foi adicionado (40 µL) sobre as amostras de células bacterianas diluídas 1:4 em solução de tampão FC (160 µL) ou soluções padrão de albumina de soro bovino (BSA, Sigma) na faixa de concentração de 5,0 a 25,0 µg/mL (160 µL), seguido de rápida homogeneização. Após uma incubação de 5 minutos, a temperatura ambiente, foi feita a leitura espectrofotométrica das amostras a 600 nm, em um aparelho leitor de ELISA. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

3.3.5. Determinação do peso seco de células de *S.mutans*

Alíquotas de células bacterianas armazenadas a -70°C foram descongeladas em banho-maria a 37°C, transferidas para tubos de polipropileno pré-pesados, e centrifugadas (centrífuga Incibrás, modelo Spin I) a 15.300g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi submetido a processo de secagem

em estufa de ar circulante a 40°C, até peso constante. A determinação do peso seco de células foi realizada em pelo menos 6 alíquotas com valor médio e desvio padrão calculados através de estatística descritiva.

3.4. Preparação dos produtos obtidos da Copaíba

3.4.1. Extrato das folhas de Copaíba

As folhas de *Copaifera langsdorffii*, coletadas no Bairro do Rio do Peixe, no município de Socorro – SP (bioma Mata Atlântica) no mês de Abril de 2006 (Anexo 1), foram secas até peso constante e, então, pulverizadas. O processo extrativo realizado foi a maceração com solução aquosa de etanol a 70% (v/v) até o esgotamento do material. A tintura obtida foi filtrada em funil de Büchner e rotaevaporada a 40°C para eliminação do solvente. A eliminação dos resíduos de água foi realizada por meio de liofilização.

3.4.2. Óleo-resina de copaíba

O óleo resina de copaíba foi cedido pelo prof. Dr. Osvaldo de Freitas, laboratório de farmacotécnica, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), assim como as suas duas frações: a fração volátil e a fração resinosa.

3.5. Determinação de compostos fenólicos totais nos produtos de copaíba

Os compostos fenólicos totais solúveis, presentes no extrato hidroetanólico das folhas de *Copaifera langsdorffii* e no óleo-resina de Copaiba foram

determinados com o reagente de Folin-Ciocalteu, segundo método descrito por Slinkard e Silgleton (1977). Nesta reação colorimétrica, à 50 µL de cada amostra de extrato (solução de extrato 20,0 mg/mL, m/v) em meio de solução aquosa de ácido acético 7% (v/v) adicionou-se 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (Imbralab), diluído cinco vezes em H₂O destilada. Posteriormente, adicionou-se solução saturada de carbonato de sódio (50 µL) e o volume final da reação foi ajustado para 1,0 mL pela adição de solução de metanol/água 60% (v/v). A reação permaneceu 90 minutos no escuro, a temperatura ambiente e após este período foi feita a leitura da absorvância das amostras a 725 nm, em espectrofotômetro (Beckman, modelo DU-70). O ácido gálico (AG) (Merck) foi usado como padrão de composto fenólico e os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico por unidade de volume (mg AG /mL ou mmol AG/L). Todas as determinações foram feitas em triplicata.

3.6. Avaliação do efeito dos produtos de copaíba sobre o potencial acidogênico de *S. mutans in vitro*.

Os ensaios de potencial acidogênico foram realizados segundo metodologia descrita por PHAN et al, (2004). Os extratos foram diluídos convenientemente para se obter soluções-estoque em concentrações seriadas. As soluções dos extratos foram preparadas imediatamente antes do ensaio, em todos os experimentos.

Alíquotas de 4,0 mg (peso seco) de *S. mutans*, armazenadas em solução de glicerol 20,0% (m/v), a -70°C, foram descongeladas em banho-maria a 37°C, por 5 minutos. Em seguida, foram centrifugadas (centrífuga Incibrás, modelo Spin I) a

15.300 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas cuidadosamente, com o auxílio de pipeta automática, em 970 µL da solução de KCl 50mmol/L e MgCl₂ 1mmol/L, contendo glucose 55,6 mmol/L como substrato. A cada suspensão bacteriana, foram adicionados 20 µL de uma solução-estoque do extrato 50 vezes mais concentrada e o pH desta solução foi ajustado para 7,2 com a adição de solução de KOH 20 mmol/L. Estas suspensões de células foram incubadas em banho-maria a 37°C e a elas foi introduzido um eletrodo de bulbo fino (modelo 8103, RossTM, Orion) para leitura de pH. O pHmetro, modelo 710A (Orion) conectado a uma porta serial de impressora modelo Epson LX - 300 foi programado para registrar o pH da amostra a cada 1 minuto, durante um período de 15 minutos. A metabolização de glucose pelos *Streptococcus mutans* com conseqüente produção de compostos ácidos foi monitorada pela queda do pH do meio de suspensão, em função do tempo de incubação. O controle consistiu de uma suspensão de células bacterianas que recebeu o substrato (glucose 55,6 mmol/L) e 20 µL do solvente. Para o extrato das folhas de *Copaifera langsdorffii* foi utilizado o dimetilsulfóxido como solvente. O óleo-resina, bem como, suas frações foram avaliados na forma de emulsão, utilizando partes iguais de tween 80 e propilenoglicol.

A produção bacteriana de ácidos foi expressa em mmol de íons H⁺ por miligramas de células bacterianas (peso seco).

Os valores de área integrada (AI) das curvas que relacionam a variação da concentração de íons H⁺ em função do tempo de incubação das células foram utilizados como parâmetro para a determinação das porcentagens de inibição produzidas por concentrações seriadas dos extratos sobre o potencial acidogênico

bacteriano. Uma vez calculados, os valores de porcentagem de inibição foram dispostos graficamente em função da concentração dos extratos para a construção de curvas dose – efeito. As concentrações que inibem em 50% (CI₅₀) o potencial acidogênico bacteriano foram estabelecidas para os produtos de copaíba analisados.

3.7. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos produtos de copaíba

3.7.1. Padronização do inóculo

A padronização do número de unidades formadoras de colônia (ufc) de *S. mutans* no inóculo do ensaio para determinação da CIM se fez necessária para estabelecer uma quantidade fixa de células por cavidade da microplaca de cultivo.

Primeiramente, realizou-se a calibração da escala McFarland com a finalidade de se estabelecer o número de unidades formadoras de colônia por mililitro de uma suspensão de *S. mutans* na escala 0,5 McFarland.

Culturas de *S. mutans* ATCC 25175 com 24 horas de incubação em meio BHI (5,0 mL) foram assepticamente transferidas para tubos de polipropileno esterilizados e centrifugadas a 15.300 x g, por 2 minutos. O meio de cultura sobrenadante foi removido com auxílio de uma pipeta automática. O sedimento de células foi recolhido com auxílio de uma alça de platina e utilizado na preparação de uma suspensão de células em 10,0 mL de solução de NaCl 0,9% (m/v) esterilizada, equivalente à escala 0,5 McFarland (segundo recomendação do National Committee for Clinical and Laboratory Standard, 1993). Uma alíquota de

1,0 mL desta suspensão foi transferida para um tubo contendo 9,0 mL de solução de NaCl 0,9% (m/v) esterilizada, e a partir deste tubo, foram preparadas diluições centesimais seriadas em solução de NaCl 0,9% as quais foram semeadas (250 µL) em placas contendo Agar BHI (Oxoid) e incubadas sob capnofilia, a 37°C, por 24/48 h, quando foi feita a contagem de ufc.

Em seguida, diluições apropriadas das suspensões de *S. mutans* na escala 0,5 MacFarland foram preparadas para se obter inóculos com concentração bacteriana variando na faixa de 2×10^4 a 2×10^6 ufc/mL. Cada um destes inóculos foi semeado (10 µL) sobre 190 µL de BHI presentes nas cavidades de uma placa de microcultivo. As microculturas foram incubadas a 37°C por 15 h e reveladas com solução de azul de nitrotetrazólio.

3.7.2. Padronização da concentração do indicador azul de nitrotetrazólio

A padronização da concentração de azul de nitrotetrazólio (cloreto de 2,2'-di-*p*-nitrofenil-5,5'-difetil-3,3'- [3,3'-dimetoxi-4,4'-difetileno] ditetrazólio, Sigma) utilizado como indicador de crescimento bacteriano foi realizada conforme descrito por Gabrielson et al. (2002). Microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo arredondado (CoStar – Corning Inc., NY) estéreis foram utilizadas. A cada cavidade, adicionou-se 190 µL de caldo de cultura BHI (Oxoid) e 10 µL de uma suspensão de *S. mutans* contendo cerca de 2×10^4 a 10^6 ufc/mL (preparada a partir da diluição da suspensão bacteriana 0,5 McFarland), obtendo-se, com isso, cerca de 10^3 a 10^5 ufc por cavidade. A microplaca de cultivo foi incubada a 37°C, por 15 horas. Após o período de incubação, adicionou-se às cavidades da microplaca, sobre cada cultura, 50 µL de solução salina contendo o indicador azul

de nitrotetrazólio (NBT) na faixa de concentração de 0,02% a 0,4% (m/v) (concentração final). A menor concentração do indicador capaz de revelar a presença de células bacterianas viáveis na microcultura foi adotada nos ensaios para determinação da CIM. Cada concentração do indicador foi testada em quadruplicata. A Figura 4 mostra o protocolo experimental pelo qual se fez a padronização do inóculo e da concentração do indicador azul de nitrotetrazólio.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10^3 0,01%	10^3 0,01%	10^3 0,025%	10^3 0,025%	10^3 0,05%	10^3 0,05%	10^3 0,1%	10^3 0,1%	10^3 0,2%	10^3 0,2%	10^3 0,4%	10^3 0,4%
B	10^3 0,01%	10^3 0,01%	10^3 0,025%	10^3 0,025%	10^3 0,05%	10^3 0,05%	10^3 0,1%	10^3 0,1%	10^3 0,2%	10^3 0,2%	10^3 0,4%	10^3 0,4%
C	10^4 0,01%	10^4 0,01%	10^4 0,025%	10^4 0,025%	10^4 0,05%	10^4 0,05%	10^4 0,1%	10^4 0,1%	10^4 0,2%	10^4 0,2%	10^4 0,4%	10^4 0,4%
D	10^4 0,01%	10^4 0,01%	10^4 0,025%	10^4 0,025%	10^4 0,05%	10^4 0,05%	10^4 0,1%	10^4 0,1%	10^4 0,2%	10^4 0,2%	10^4 0,4%	10^4 0,4%
E	10^5 0,01%	10^5 0,01%	10^5 0,025%	10^5 0,025%	10^5 0,05%	10^5 0,05%	10^5 0,1%	10^5 0,1%	10^5 0,2%	10^5 0,2%	10^5 0,4%	10^5 0,4%
F	10^5 0,01%	10^5 0,01%	10^5 0,025%	10^5 0,025%	10^5 0,05%	10^5 0,05%	10^5 0,1%	10^5 0,1%	10^5 0,2%	10^5 0,2%	10^5 0,4%	10^5 0,4%
G	0,01%	0,01%	0,025%	0,025%	0,05%	0,05%	0,1%	0,1%	0,2%	0,2%	0,4%	0,4%
H	Caldo BHI	Caldo BHI	Caldo BHI	Caldo BHI	Caldo BHI	Caldo BHI	Caldo BHI	Caldo BHI	Caldo BHI	Caldo BHI	Caldo BHI	Caldo BHI

Fig. 4. Protocolo experimental para a padronização das concentrações do inóculo e do indicador azul de nitrotetrazólio, para os ensaios de CIM. Fileiras A e B = 10^3 células/poço; fileiras C e D = 10^4 células/poço; fileiras E e F 10^5 células/poço; fileira G = controle do NBT (não contém inóculo), fileira G = controle do BHI. Colunas 1 – 12 = diferentes concentrações finais de NBT.

3.7.3. Ensaio para determinação da CIM

Soluções-estoque de extrato, óleo-resina de copaíba ou suas frações (4,0 e 5,0 mg/mL (p/v) foram preparadas em caldo BHI contendo dimetilsulfóxido (DMSO) 2% (v/v) e esterilizado através de membrana filtrante 0,2 µ GV Millex estéril (Millipore).

Paralelamente, microplacas de cultivo com 96 cavidades foram preenchidas com 200 µL de inóculo de células contendo 2×10^5 ufc/mL em caldo BHI com DMSO 2% (v/v) (equivalente a 10^4 ufc/poço) e cada cavidade recebeu a solução-estoque do produto natural em estudo através de diluições seriadas na própria placa de cultivo de maneira a obter-se concentrações finais na faixa de 1,6 a 1000 µg/mL (v/v). O controle positivo consistiu de uma seqüência de cavidades com diluições seriadas de digluconato de clorexidina na faixa de concentração de 0,06 a 120 µg/mL. As microculturas foram incubadas a 37°C por 15 h. O volume final em cada cavidade foi de 200,0 µL. Controles de crescimento da cultura foram preparados com o meio de cultura e o inóculo de células. Os controles de esterilidade do caldo de cultura e do digluconato de cloroxedine (Concentração final igual a 3,0 µg/mL) não receberam inóculo de células. O protocolo experimental adotado para cada extrato encontra-se representado na Figura 5.

Após o período de incubação, adicionou-se a cada cavidade 50 µL de uma solução aquosa de NBT 0,125% (m/v) para se obter uma concentração final de NBT igual a 0,025%. A microplaca foi incubada a 37°C por um breve período e o crescimento de *S. mutans* foi indicado pela coloração azul do derivado de formazan produzido pela metabolização bacteriana do sal de tetrazólio (ELOFF, 1998). A menor concentração de extrato onde não mais se observou crescimento

bacteriano visível (ausência de coloração) foi estabelecida como a concentração inibitória mínima (CIM).

Para determinar a concentração bactericida mínima (CBM) do extrato ou óleo-resina de copaíba, uma alíquota de 250 µL da cultura de cada cavidade da placa foi semeada, pelo método de *pour plate*, em ágar BHI e incubada sob capnofilia, a 37° C, por 24/48 h. A CBM foi estabelecida como a menor concentração de extrato que impossibilitou o crescimento bacteriano sobre o ágar (99,9% de morte celular).

Fig.5. Protocolo experimental do ensaio para determinação de CIM dos extratos. Representação esquemática de uma microplaca com cultura de *S.mutans* ATCC 25175 incubada com: (fileiras A - F) diluições seriadas de um único extrato em cada fileira; (fileiraG) diluições seriadas de digluconato de clorexedina. As concentrações finais estão representadas em azul. BHI = caldo Brain Heart Infusion; E1 = solução –estoque, 4 mg/mL; E2 = solução-estoque, 5 mg/mL; P = Periogard® (digluconato de clorexedina).

3.8. Isolamento e caracterização da classe de enzimas glucosiltransferase de *S.mutans*

3.8.1. Condições de cultivo de *S.mutans* para isolamento de glucosiltransferases

Culturas estoque de *S.mutans* ATCC25175, mantidas à -70° C em caldo BHI enriquecido com glucose 1,0% (m/v) e glicerol 20% (m/v) foram descongeladas em banho-maria a 37°C, e então replicadas (50 µL) em 5 mL de meio de cultura TYGSF contendo triptona 2,5%, extrato de levedura 1,5%, glucose 0,3%, sorbitol 1%, frutose 1%, MgSO₄ 0,1% e K₂HPO₄ 0,5% (VACCA-SMITH et al, 2000) com a adição de Tween 80 0,0025% (v/v) (TOMITA et al, 1998) , e incubada a 37°C por 24 horas, em estufa com agitação de 120 rpm. Após este período, esta cultura foi utilizada como pré-inóculo de 500 mL do mesmo caldo de cultura TYGSF. Foi, então incubada a 37°C, sob agitação de 120 rpm, em estufa horizontal com agitador orbital (VACCA-SMITH et al, 2000). Paralelamente alíquotas do meio de cultura recém-semeado foram transferidas para cubetas de espectofotômetro modelo OPS-240A (Shimadzu – Japão) com agitação magnética e temperatura constante de 37°C, e sua absorvância foi registrada em um comprimento de onda de 660 nm, para o monitoramento da curva de crescimento bacteriano, utilizando caldo TYGSF esterilizado com “branco”. A pré-cultura foi recolhida na fase exponencial de crescimento bacteriano e submetidas a centrifugação (6.000 g , 15 min, a 4°C) em centrífuga modelo Superspeed RC2-B Sorvall®, utilizando frascos pré pesados. O sedimento bacteriano obtido foi incubado em 1,5 L de caldo TYGSF e novamente incubado a 37°C, sob agitação de 120 rpm, por 24 horas. As culturas foram recolhidas e submetidas à centrifugação. O meio de cultura

sobrenadante e o sedimento de células bacterianas foram separados e mantidos em banho de gelo (0°C).

3.8.2. Preparação de glucosiltransferase extracelular

Para obtenção de GTFs extracelulares secretadas pelo *S. mutans*, foi utilizado o meio de cultura sobrenadante, que foi submetido a processo de ultrafiltração para purificação parcial, lavagem e concentração das enzimas através de membrana de filtração com corte de massa molecular (*cut-off*) igual a 100.000 Daltons (100 KDa), utilizando-se de um sistema de filtração Pellicon® associada a uma bomba peristáltica modelo Masterflex I/P (Millipore-Bedford, MA, USA) ajustada para um fluxo de 100 mL/min. Após a concentração, o caldo de cultura foi submetido a exaustivas lavagens com tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L pH 6,5 a 4°C, através do mesmo sistema de ultrafiltração, até tornar-se límpido, atingindo um volume de 70 mL. A concentração protéica da preparação foi estimada através de leitura espectrofotométrica de sua absorvância a 280 nm. A partir desta estimativa, a preparação enzimática foi concentrada em polietilenoglicol 20.000 e posteriormente dialisada em tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L, pH 6,5 a 4°C, utilizando-se de membrana de celulose para diálise com corte de massa molecular na faixa de 12 a 14 KDa. O procedimento foi realizado segundo VACCA-SMITH et al (2000). A preparação de GTFs extracelulares foi então, armazenada a -70°C após a adição de glicerol 20% (v/v) (concentração final).

3.8.3. Preparação de glucosiltransferase associada à parede celular bacteriana

A preparação de glucosiltransferase associada à parede celular bacteriana foi realizada através de metodologia descrita por Yanagida et al (2000). O sedimento de células bacterianas foi lavado três vezes com tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L, pH 6,5 refrigerado. Foram, então, ressuspensas em 30 mL de solução de uréia 8 mol/L e mantidas sob agitação magnética suave, a 4°C, por 1 hora. A suspensão de células foi centrifugada a 3500 g, por 15 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi recolhido. Esta etapa foi repetida três vezes. Os sobrenadantes foram reunidos e dialisados contra tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L, pH 6,5, utilizando uma membrana de celulose para diálise com corte de massa molecular na faixa de 12 a 14 KDa. A concentração protéica da preparação dialisada foi estimada pela leitura da absorvância em 280 nm. Foi armazenada a -70°C, após a adição de glicerol 20% (v/v) (concentração final).

3.8.4. Caracterização eletroforética em gel de poliacrilamida de glucosiltransferases

A caracterização eletroforética das preparações enzimáticas foi feita em gel de poliacrilamida desenvolvida em um sistema para eletroforese Sigma (St.Louis, MO, U.S.A.). O gel de separação apresentando 10,0% de acrilamida e o gel de empilhamento preparado com 5% de acrilamida foram preparados de acordo com o protocolo descrito a seguir:

Soluções	Gel de empilhamento (5%)	Gel de corrida (10%)
Acrilamida 30,0%/bis-acrilamida 0,8%....	340 µL	2,7 mL
Tampão TRIS – HCl 1,5 mol/L pH 8,8.....	—	3,0 mL
Tampão TRIS – HCl 0,5 mmol/L pH 6,8...	500 µL	—
H ₂ O deionizada.....	1,1 mL	2,1 mL
SDS 10,0%.....	40 µL	160 µL
TEMED 10,0%.....	10 µL	40 µL
Persulfato de amônio 10,0%.....	10 µL	40 µL

Um volume de 50,0 µL da preparação enzimática concentrada foi diluída em 50,0 µL de tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L pH 6,5 contendo glicerina 25,0% (m/v) e azul de bromofenol 0,005% (m/v). As amostras foram aplicadas diretamente no gel de poliacrilamida, em duplicata, não excedendo a concentração de 10,0 µg de proteína por poço. Utilizou-se padrões de alta massa molecular (220 – 40 KDa), BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen® Life Technologies – USA). A eletroforese foi desenvolvida sob corrente constante de 10 mA, a 4°C, utilizando-se tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 6,5 como tampão de corrida. Após a eletroforese, metade do gel de poliacrilamida foi submetido à coloração de proteínas com Comassie brilliant blue R-250 (Sigma-St.Louis, CA, USA).

A outra metade do gel, correspondente a duplicata das amostras analisadas, foi utilizada para verificação da atividade enzimática através da coloração de glicoproteínas com fucsina. O gel foi primeiramente lavado em solução aquosa contendo 2,5% (m/v) de Triton X-100, para remoção de SDS, durante 30 minutos a 37°C e enxaguado com água deionizada para remoção do

Triton X-100. Em seguida, foi incubado por 48 a 72 horas, a 37°C, com o substrato enzimático que consistiu de uma solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 6,5 contendo sacarose 5,0% (m/v), dextratna T-10 (Amersham Biosciences, Uppsala – Sweden) 120 µmol/L e timerosal 0,01% (m/v). Após o período de incubação, a localização das bandas de GTFs se fez pela observação de depósitos de polissacarídeos glucanas com coloração branca, produto da atividade enzimática. A visualização destas bandas foi otimizada pela sua coloração com fucsina. O preparo da solução de fucsina utilizada nesta coloração é feito da seguinte forma: 1 g de fucsina é dissolvido, cuidadosamente, em 200 mL de água fervente, e esfriada a 50°C, para a adição de 2,5 g de metabissulfito de sódio, seguido de 1 mL de ácido clorídrico concentrado, esta solução deve ficar incolor ou ligeiramente marron. Nesta técnica de revelação o gel é mergulhado em TCA 2,5% por 30 minutos, então, lavado com água destilada, é coberto por uma solução de ácido periódico 1% e ácido acético 3% por 50 minutos, e lavado com água destilada. O gel é colocado na solução de fucsina por 30 minutos, no escuro. Após este período é lavado com metabissulfito de potássio 0,5% durante 2 horas trocando a solução 4 vezes. A revelação positiva é caracterizada pelo desenvolvimento de bandas vermelhas contra um fundo marrom pálido. Os géis foram fotografados. As bandas apresentando o mesmo fator de retenção (R_f), coradas simultaneamente por Comassie blue e Fucsina, em ambos os géis, indicam a presença de enzima glucosiltransferase.

Espera-se observar até três bandas de atividade, correspondente às três isoformas da enzima GTF, apresentando massas moleculares na faixa de 140 a 180 KDa.

3.8.5. Avaliação do efeito do extrato e do óleo-resina de Copaíba sobre a atividade de glucosiltransferases isoladas de *Streptococcus mutans*

O ensaio para a avaliação do efeito dos extratos de Copaíba sobre a atividade de glucosiltransferases isoladas de *S. mutans* foi realizado segundo metodologia descrita por OOSHIMA et al (2000) e HAYACIBARA et al (2004).

A reação foi preparada em tubos de polipropileno (2 mL). O meio reacional consistiu de preparação bruta de GTFs (10 µg de proteínas totais), dextrana T-10 40 µmol/L e timerosal 0,01% como conservante, em tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L (pH 6,5). Ao meio de reação adicionou-se o extrato hidroetanólico das folhas de *Copaifera langsdorffii* ou o óleo-resina de Copaíba em concentração final entre 10 a 100 µg/mL e sacarose 100 mmol/L (concentração final) para um volume final de 1 mL. Os tubos controle receberam apenas o solvente. O meio de reação foi incubado a 37°C (banho-maria) por 4 horas. Preparou-se triplicatas para cada tubo. Após este período a reação enzimática foi interrompida mergulhando-se os tubos em banho de água fervente (100°C) por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 14.000 g, por 15 minutos, a 4°C. Separou-se cuidadosamente o sedimento, contendo glucanas insolúveis do sobrenadante, contendo glucanas solúveis.

3.8.5.1. Glucanas insolúveis

Os sedimentos foram ressuspensos em 1 mL de água MilliQ, e alíquotas de 200 µL foram utilizadas para a determinação de carboidratos totais.

3.8.5.2. Glucanas solúveis

Alíquotas de 200 μ L de sobrenadante foram transferidos para tubo tipo eppendorf e receberam 800 μ L de etanol absoluto gelado (80%, concentração final). As amostras foram mantidas sob refrigeração (4°C) por 18 horas, para precipitação das glucanas solúveis. Após este período, foram centrifugadas a 14.000 g, por 15 minutos, 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de água MilliQ e alíquotas de 200 μ L foram utilizadas para a determinação de carboidratos totais.

3.8.5.3. Determinação de carboidratos totais

O conteúdo de carboidratos totais, das frações de glucanas, foi determinado através do método de fenol-sulfúrico descrito por DUBOIS et al (1956). Nesta reação, 200 μ L da amostra (diluída ou não), ou solução controle, foi misturada a 200 μ L de fenol 5% (m/v). Em seguida, adicionou-se a esta reação 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, de forma rápida, diretamente sobre a superfície da solução, sem tocar nas paredes do tubo. Este meio reacional foi mantido em repouso por 10 minutos (para esfriar), antes de agitar vigorosamente em vortex. Após 30 minutos, foram determinadas as leituras de absorvâncias das amostras a 492 nm, em aparelho leitor de ELISA. Soluções-padrão de glucose (Merck – Hohenbrun, Germany) em concentrações conhecidas (20,0 a 100,0 μ g/mL) foram preparadas da mesma maneira e utilizadas na construção de uma curva de calibração.

3.9. Tratamento dos resultados e análise estatística

Os valores médios de ufc e concentração de proteínas totais nas alíquotas de células bacterianas, bem como seus respectivos valores de desvio padrão, foram obtidos através de cálculos de estatística descritiva.

Variações inter-grupo de diferentes parâmetros foram estimadas pela análise estatística de variância (ANOVA). Tratamentos qualitativos foram comparados usando o teste de Dunnett, com intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O teste t de Student foi utilizado para verificar o pareamento e comparar a variação entre dois grupos de tratamento. Os cálculos estatísticos bem como todas as representações gráficas foram elaborados através do programa GraphPad Prism[®] versão 4.0 e cálculos adicionais foram realizados com auxílio do programa Microsoft[®] Excel 2000.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1. Padronização do cultivo de *S. mutans*

O tempo de cultivo de *S. mutans* foi estabelecido, dentro das condições experimentais padronizadas, como sendo o ponto médio da fase de crescimento exponencial da cultura, identificado através da curva de crescimento bacteriano, que relaciona a absorvância do meio de cultura em função do tempo de incubação a 37°C. O ensaio foi realizado em triplicata e o tempo de cultivo foi fixado em 6 horas e 30 minutos.

Fig.6. Representação da curva de crescimento de *Streptococcus mutans* cultivado em caldo BHI contendo glucose 1% a 37°C, sob agitação de 130 rpm. A curva relaciona a absorvância, a 660 nm, do meio de cultura em função do tempo de incubação (horas).

O valor médio do número de unidades formadoras de colônia (ufc) por alíquota de células bacterianas ($\sim 4,0$ mg de peso seco, SD = 0,096 mg), armazenadas a -70°C , foi igual a $1,64 \times 10^7 \pm 1,39 \times 10^7$ ufc ($n = 6$) com uma concentração protéica estimada em $14,3 \pm 3,0$ $\mu\text{g/mL}$.

4.2. Determinação dos compostos fenólicos totais presentes nos produtos de copaíba.

A concentração de compostos fenólicos totais (expressos em equivalentes de ácido gálico), bem como, sua proporção em relação à massa de extrato liofilizado é apresentada na Tabela 2. As determinações foram feitas nas soluções-estoque dos extratos a 20 mg/mL (m/v), e fornecem uma estimativa do teor de compostos fenólicos presentes nas soluções dos extratos, sob uma mesma relação massa/volume. A dosagem de compostos fenólicos totais presentes no óleo-resina e no extrato hidroetanólico das folhas foi feita considerando as evidências de que estes compostos, geralmente, compreendem a maior parte dos princípios ativos em vegetais, principalmente quanto a atividade antimicrobiana. Porém, diante dos resultados o que se nota é que o óleo-resina de copaíba e sua fração volátil apresentam baixo teor destes compostos, indicando que a sua atividade biológica está relacionada à presença de outras substâncias, como diterpenos e sesquiterpenos (VEIGA JR e PINTO, 2002), ao contrário do extrato das folhas, que apresenta um teor mais elevado de compostos fenólicos.

Tabela 2 . Teor de fenólicos totais nos produtos obtidos da Copaíba

Extrato	polifenóis totais	polifenóis totais	polifenóis/extrato
	mmol (eq. AG) ^a /L	mg (eq. AG) ^b /mL	% m/m
EE – CL	2,043 ± 0,021	0,3843 ± 0,017	1,92 ± 0,019
OR	0,092 ± 0,028	0,0173 ± 0,006	0,087 ± 0,007
FV	0,074 ± 0,018	0,0139 ± 0,004	0,070 ± 0,005
Res	—	—	—

EE – CL = Extrato hidroetanólico 70% (v/v) das folhas de *Copaifera langsdorffii*, OR = Óleo-resina de copaíba; FV= Fração volátil do óleo-resina de copaíba, FR= Fração resinosa do óleo-resina de copaíba.

^a O valor médio da concentração de polifenóis totais é expresso em equivalentes de ácido gálico

O óleo-resina bruto de Copaíba e sua fração volátil apresentaram valores percentuais de compostos fenólicos bastante próximos, 0,087% e 0,070% (m/m), respectivamente. A fração resinosa não apresentou compostos fenólicos, detectáveis por este método de dosagem. O extrato hidroetanólico das folhas de *Copaifera langsdorffii* apresentou uma concentração de compostos fenólicos superior ao óleo-resina e suas frações, com valor de compostos fenólico próximos de 1,92 % (p/p). A curva de calibração para a determinação de compostos fenólicos totais apresentou coeficiente de correlação linear igual a 0,9955, conforme apresentado na Figura 7.

Fig. 7. Curva de calibração de ácido gálico (AG) para dosagem de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu. Coeficiente de correlação linear (r) = 0,9955.

4.3. Avaliação do efeito do extrato das folhas e do óleo-resina de copaíba sobre o potencial acidogênico de *S. mutans in vitro*

Avaliou-se o efeito inibitório do extrato bruto hidroetanólico 70% (v/v) das folhas de *Copaifera langsdorffii*, bem como do óleo-resina de copaíba e de suas frações, a fração volátil e a fração resinosa, sobre a produção de ácidos em *S. mutans* incubado com excesso de substrato (glucose 55,6 mmol/L). Os valores de área obtidos com as curvas de potencial acidogênico foram utilizados como parâmetro para a determinação do percentual de inibição produzido pelas diluições seriadas do extrato hidroetanólico e do óleo-resina de Copaíba. O valor de AI do controle foi considerado como equivalente a 100% de produção de ácidos pelos *Streptococcus mutans* e, a partir deste valor, calculou-se o percentual de inibição do potencial acidogênico produzido pelo tratamento das amostras com as diluições seriadas do extrato.

O extrato bruto das folhas e o óleo-resina foram avaliados sob uma mesma concentração, correspondente a 1 mg/mL (m/v), o resultado obtido está

apresentado na Figura 8. Tanto o óleo-resina como o extrato das folhas de copaíba apresentaram atividade inibitória satisfatória sobre o potencial acidogênico bacteriano: 97,34% (óleo-resina) e 91,29% (extrato bruto das folhas).

Fig. 8. Atividade inibitória do óleo-resina de Copaíba (OR) e extrato bruto das folhas de *Copaifera langsdorffii* (EF), 1 mg/mL, sobre a produção de ácidos por *S. mutans*.

Em seguida, a produção de ácidos por *S. mutans*, na presença destes produtos naturais, foi novamente avaliada, desta vez com o intuito de se estabelecer os seus respectivos perfis dose-efeito. As curvas que relacionam a concentração de íons H^+ em função do tempo de incubação encontram-se representadas na Figuras 9. As Figuras 9A e 9B mostram, respectivamente, o aumento na concentração de íons H^+ no meio de suspensão de células de *S. mutans*, incubadas com excesso de glucose, que receberam tratamento com concentrações seriadas do extrato hidroetanólico 70% (v/v) das folhas de *Copaifera langsdorffii* (0,1 a 4 mg/mL) e do óleo-resina de copaíba (0,05 a 4 mg/mL). O controle corresponde à suspensão bacteriana tratada apenas com o substrato glucose e o solvente (DMSO 2% para EF e Tween 80 : Propilenoglicol

1:1 2% - concentração final para o óleo-resina). Comparando com o controle negativo, na qual a suspensão bacteriana foi tratada apenas com o substrato observou-se que estes solventes não afetam significativamente a atividade metabólica das células bacterianas. Tanto o óleo-resina como o extrato das folhas de copaíba reduziram a produção de ácidos bacterianos de forma dose-dependente.

Fig. 9. Curvas relacionando a produção de ácidos por *S. mutans* ATCC25175, expressa em concentração de íons H⁺ em função do tempo de incubação com glucose 55,6 mmol/L após tratamento com concentrações seriadas de (A) Extrato hidroetanólico das folhas de *Copaifera langsdorffii* e (B) Óleo-resina de Copaíba.

A partir do óleo-resina de copaíba obteve-se por fracionamento a fração volátil e a resina, as quais foram igualmente testadas. A fração volátil inibiu a produção bacteriana de ácidos em um perfil dose-dependente, bastante próximo ao do óleo-resina bruto, apresentando percentual de inibição máximo igual a 99% para uma concentração de 4 mg/mL (Figura 10 A) . Devido a sua baixa solubilidade no meio reacional, a fração resinosa foi testada apenas na concentração 0,1 mg/mL (Figura 10 B) apresentado um percentual inibitório sobre a produção de ácidos inferior (15,0%), quando comparada à mesma concentração de óleo-resina (89,2%) e de fração volátil (82,5%), contudo este efeito inibitório produzido pela fração resinosa a 0,1 mg/mL foi estatisticamente significativo quando comparado ao controle (Figura 11).

Fig. 10. Curvas relacionando a produção de ácidos por *S. mutans* ATCC25175, expressa em concentração de íons H^+ em função do tempo de incubação com glucose 55,6 mmol/L após tratamento com concentrações seriadas de (A) Fração volátil do óleo-resina e (B) Fração resinosa do óleo-resina de Copaíba.

Fig. 11. Atividade inibitória do óleo-resina de Copaíba (OR), da fração volátil do óleo-resina (FV) e da fração resinosa do óleo-resina de Copaiba (FR) 0,1 mg/mL, sobre a produção de ácidos por *S.mutans*.

Diante destes resultados, sugere-se que a atividade inibitória do potencial acidogênico do óleo-resina de copaíba está relacionada a componentes presentes, em sua maioria, na fração volátil. Segundo dados da literatura os principais componentes químicos encontrados no óleo-resina de Copaíba são terpenóides, sendo que a fração volátil é rica em sesquiterpenos, enquanto a resina apresenta diterpenos em maior quantidade (RIGAMONT-AZEVEDO et al, 2004).

A atividade inibitória produzida pelo extrato das folhas de copaíba também pode estar relacionada a estas classes de substâncias, as quais estão presentes no óleo essencial das folhas de *Copaifera langsdorffii* e que são extraíveis por maceração em álcool etílico 70% (v/v), método este empregado na obtenção do extrato das folhas (GRAMOZA e SILVEIRA, 2005). Além disso, detectou-se a presença de compostos fenólicos, no extrato das folhas de *Copaifera langsdorffii* através do método de Folin-Ciocalteu, e de acordo com dados da

literatura esta espécie de Copaíba contém compostos fenólicos com atividade antimicrobiana (Gonçalves et al, 2005).

4.4. Determinação das curvas dose-efeito do extrato das folhas e do óleo-resina de Copaíba sobre o potencial acidogênico de *S.mutans* *in vitro*.

As curvas que relacionam a concentração de H⁺ bacterianas em função do tempo de incubação, representadas nas figuras 9 e 10, refletem a produção de ácidos pelo consumo bacteriano de glucose em suspensões de *S.mutans* que receberam tratamento com concentrações seriadas do extrato bruto das folhas de Copaíba e do óleo-resina. Os valores de inibição calculados para as concentrações seriadas do extrato hidroetanólico, do óleo-resina de Copaíba e sua fração volátil foram usados para a construção de curvas dose-efeito, conforme representado na figura 12.

Fig.12. Curvas dose-efeito relacionando o percentual de inibição do potencial acidogênico de *S.mutans* ATCC 25175 em função da concentração do óleo-resina (OR) de Copaíba, da fração volátil do óleo-resina (FV) e do extrato hidroetanólico das folhas de Copaíba (EF). Inserto: Relação dose-efeito da inibição do potencial acidogênico em função do log da concentração de extrato.

A relação entre a concentração do óleo-resina de Copaíba e a magnitude do efeito, aqui representado como porcentagem de inibição do potencial acidogênico de *S. mutans*, forneceu uma curva dose-resposta sigmóide (Figura 12). Observa-se uma relação dose-resposta linear na faixa de concentração de óleo que varia de 0,05 a 0,5 mg/mL, e para o extrato bruto hidroetanólico das folhas, de 0,1 a 2 mg/mL. A partir de 0,5 mg/mL o óleo-resina e a fração volátil de Copaíba alcançaram o seu efeito inibitório máximo ($\sim 99,00\% \pm 2$) e o extrato a partir de 2 mg/mL ($\sim 99,00\% \pm 2$) sobre o parâmetro bioquímico avaliado, e variações significativas deste efeito não foram observadas até uma concentração de 4 mg/mL. Para facilitar a visualização do efeito inibitório e determinação da CI_{50} produzido pelo extrato hidroetanólico das folhas e o óleo-resina de Copaíba sobre o potencial acidogênico bacteriano, a magnitude do efeito foi colocada em gráfico com o logaritmo da concentração do extrato (inserto da Figura 12). A concentração do extrato das folhas de Copaíba e da fração volátil do óleo-resina que inibe em 50% o potencial acidogênico de *S. mutans* (CI_{50}) foi estabelecida em 0,359 mg/mL e 0,057 mg/mL, respectivamente, para o óleo-resina bruto esta concentração não foi determinada, pois para a menor concentração testada a taxa de inibição foi de 61,76%, não estando a CI_{50} dentro dos limites da curva traçada.

4.5. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato de *Copaifera langsdorffii* e óleo-resina de Copaíba sobre o crescimento de *S. mutans*.

4.5.1. Padronização do inóculo e da concentração do indicador azul de nitrotetrazólio utilizado no ensaio de CIM.

Suspensões de *S. mutans*, com turbidez equivalente à escala 0,5 McFarland, preparadas nas condições anteriormente descritas apresentaram, em

média, $4,5 \times 10^8 \pm 0,6 \times 10^7$ ufc/mL.

Primeiramente avaliou-se o tamanho do inóculo mais adequado para o ensaio de CIM em escala reduzida de microculturas. Foram testados três tamanhos diferentes de inóculo: 10^3 (fileiras A e B), 10^4 (fileiras C e D) e 10^5 (fileiras E e F) células bacterianas por cavidade da placa como pode ser observado na Figura 13. O inóculo 10^5 mostrou-se demasiadamente grande para o volume final da cultura (250 μ L de caldo BHI), de maneira que a revelação intensa do crescimento bacteriano, proporcionada pelo sal NBT dificultou a visualização nítida dos *pellets* de bactérias. Por outro lado, o inóculo 10^4 mostrou-se mais adequado em proporção ao volume de caldo de cultura por cavidade da placa, além de possibilitar uma visualização mais nítida e delimitada do crescimento bacteriano.

Os sais de tetrazólio têm sido utilizados como indicadores de crescimento bacteriano desde a década de 1940. Estes sais solúveis e geralmente incolores detectam sistemas enzimáticos oxidativos por atuarem como aceptores de elétrons, tornando-se coloridos e insolúveis em meio aquoso quando reduzidos por vias metabólicas bacterianas (TENGERDY et al., 1967). Desta maneira, esses sais, quando adicionados a culturas de microrganismos, facilitam a observação do crescimento celular.

Para a padronização da concentração do indicador azul de nitrotetrazólio (NBT), esse sal foi adicionado na faixa de concentração de 0,01% a 0,4% (m/v). Para inóculos de 10^3 , 10^4 e 10^5 células, observou-se que uma concentração de NBT igual a 0,01% permitiu a visualização do crescimento bacteriano porém de forma pouco reprodutível. Quando o NBT foi utilizado nas concentrações de 0,025% e

0,05%, não se observou diferenças significativas na cor e tamanho dos sedimentos bacterianos. Com o aumento da concentração de NBT (0,01 – 0,4%) notou-se a intensificação da cor dos sedimentos bacterianos, dificultando a delimitação e observação de seu crescimento (Figura 13).

É desejável minimizar o quanto possível a concentração do indicador visto que o indicador pode reagir com outros componentes químicos adicionados ao meio de cultura, ocasionando resultados falso positivos. Por outro lado, um certo excesso de indicador de crescimento no meio de cultura torna-se necessário para que a sua quantidade não se torne um fator limitante para se obter a intensidade máxima de cor para o sedimento bacteriano ou meio de cultura, conforme observado por Gabrielson et al (2002). Durante os ensaios de padronização realizados, a menor concentração possível do indicador NBT estabelecida para os ensaios de CIM foi de 0,025% (concentração final, m/v).

O protocolo para este ensaio pode ser observado na Figura 4 na seção de Material e Métodos. A Figura 14 mostra a fotografia de uma placa de 96 cavidades onde foi realizado o ensaio de padronização do inóculo e da concentração de NBT, utilizadas para os ensaios de CIM. As microculturas de *S. mutans* apresentam cor azul escuro após a metabolização do sal NBT. Controles do indicador mais o caldo BHI, sem o inóculo bacteriano, foram preparados com a finalidade de se detectar possíveis interferências ou reações cruzadas do sal de tetrazólio com elementos do caldo de cultura, ou ainda, evidenciar a presença de eventuais contaminações bacterianas, o que levaria à interpretações equivocadas dos resultados experimentais.

Fig. 13. Fotografia da placa de microcultivo em que foi feita a padronização do inóculo e da concentração do indicador NBT. Fileiras A e B = 10^3 células/poço; fileiras C e D = 10^4 células/poço; fileiras E e F = 10^5 células/poço; fileira G = controle do NBT (não contém inóculo), fileira H = controle do BHI. Colunas 1 – 12 = diferentes concentrações finais de NBT (1 e 2 = 0,01%; 3 e 4 = 0,025%; 5 e 6 = 0,05%; 7 e 8 = 0,1%; 9 e 10 = 0,2%; 11 e 12 = 0,4%). O destaque indica a condição padronizada para a determinação da concentração inibitória mínima para extratos de Copaíba.

4.5.2. Ensaios para a determinação da CIM

Microculturas inoculadas com 10^4 ufc de *S. mutans* foram tratadas com diluições seriadas do extrato de *Copaifera langsdorffii*, obtendo-se concentrações finais na faixa de 0,0016 a 1 mg/mL (v/v). A Figura 14 apresenta a fotografia da placa de microcultivo, revelada com azul de nitrotetrazólio para a identificação da concentração inibitória mínima (CIM). A identificação da placa pode ser feita através de sua própria legenda. A CIM estabelecida para o extrato hidroetanólico das folhas de Copaíba foi igual a 1 mg/mL, para o óleo-resina de copaíba a CIM foi estimada em 0,400 mg/mL e para a fração volátil, 0,200 mg/mL. A fração resinosa apresentou uma concentração inibitória mínima igual a 1000 μ L/mL

para um inculo de 10^4 células incubadas por 15 h em caldo BHI. A CBM foi estimada para o óleo-resina bruto de copaíba em 0,800 mg/mL. Para as frações FV e FR do óleo-resina e para o extrato hidroetanólico das folhas não foi possível determinar a concentração bactericida mínima dentro da faixa de concentração avaliada. A menor concentração de clorexedina capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano para um inóculo de 10^4 células, foi de 0,97 µg/mL.

Fig.14. Fotografia da microplaca de cultura de *S.mutans* ATCC 25175. As fileiras de A – F constituem culturas bacterianas incubadas com diluições seriadas de: fileira A = extrato bruto hidroetanólico de Copaíba; fileira B = Óleo-resina bruto de Copaíba; fileira C = resina da copaíba; fileira D = fração volátil do óleo-resina de Copaíba. Na fileira E são incubadas com diluições seriadas de clorexedina (controle positivo). Na fileira F têm se os controles de esterilidade da solução de digluconato de clorexedina (colunas 1 – 3) e do caldo BHI (colunas 4 – 6), onde não há crescimento bacteriano, Controle da cultura (colunas 7 – 9), onde se observa crescimento da cultura devido a ausência de substâncias antimicrobianas.

4.6. Purificação da classe de enzimas glucosiltransferase de *S.mutans*

A análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das preparações brutas de GTFs extracelulares (GTFs-EC) e GTFs associadas à célula (GTFs-AC) encontra-se representada na Figura 15. O perfil eletroforético da preparação da GTFs-AC, permite distinguir 13 bandas de proteínas reveladas pela coloração de Comassie-Brilliant Blue R-205, que apresentam massas moleculares (MM) entre 25 e 210 KDa. Dentre elas identificamos quatro bandas com massas moleculares próximas àquelas documentadas para GTFs (BANNAS e VICHERMAN, 2003), e estimadas em 105 KDa, 117 KDa, 139 KDa e 210 KDa. Estas mesmas bandas revelaram depósitos de carboidratos, no ensaio para a verificação da atividade enzimática, revelado pela coloração com fucsina. A preparação de GTFs-EC revelou apenas duas bandas, com massas moleculares estimadas em 149 KDa e 210 KDa, mas apenas a banda protéica com massa molecular de 149 KDa apresentou atividade enzimática característica para glucosiltransferases.

Fig. 15. Análise eletroforética das preparações brutas de GTFs de *S.mutans* em SDS-PAGE 10%. (A) coloração para proteínas com Comassie brilliant blue R-250; poço 1, padrões de alta massa molecular (220 – 40 KDa) (BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen®) ; poço 2, preparação bruta de glucosiltransferases associada à célula (GTFs-AC); poço 3, preparação bruta de glucosiltransferases extracelulares (GTFs-EC); (B) revelação da atividade enzimática com coloração por fucsina; poço 4, preparação de GTFs-AC; poço 5, preparação de GTFs-EC.

O *S. mutans* produz, pelo menos, três tipos de GTFs: GTF_B que sintetiza polímeros de glucanas insolúveis com ramificações $\alpha(1\rightarrow3)$, GTF_C, que sintetiza uma mistura de glucanas insolúveis com ligações $\alpha(1\rightarrow3)$ e glucanas solúveis com ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ e GTF_D que sintetiza glucanas solúveis com ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ (AOKI et al, 1986. HANADA e KURAMITSU, 1988, HANADA e KURAMITSU, 1989, YAMASHITA et al, 1993).

As glucosiltransferases apresentam massa molecular na faixa de 140 a 175 KDa (BANAS e VICHERMAN, 2003), contudo variações desses valores são encontrados em diferentes trabalhos de purificação e podem ser decorrentes do fato destas enzimas existirem em formas agregadas na preparação bruta, o que lhes confere um valor de massa molecular maior (MUKASA et al, 1985).

4.7. Avaliação do efeito do extrato das folhas e do óleo-resina bruto de Copaíba sobre a atividade de glucosiltransferases isoladas de *S. mutans*.

Os efeitos do extrato hidroetanólico das folhas de *Copaifera langsdorffii* e do óleo-resina bruto de Copaíba sobre a atividade enzimática de GTFs isoladas de *S. mutans* encontram-se representado nas Figuras 16 e 17. Os dados experimentais foram dispostos em gráficos que relacionam a atividade enzimática relativa da preparação de GTFs em função da concentração do produto natural.

A porcentagem da atividade enzimática de GTFs foi calculada considerando que o controle, o qual recebeu apenas os solventes utilizados na preparação das soluções-estoque, apresentou atividade enzimática máxima, isto é, a quantidade de glucanas produzidas no tubo controle foi equivalente a 100% de atividade da preparação bruta de GTFs.

Avaliamos o efeito do extrato das folhas e do óleo-resina de Copaíba sobre a atividade de ambas as preparações parcialmente purificadas de glucosiltransferases, associadas à célula (GTFs-AC) e extracelulares (GTFs-EC), tanto para a produção de glucanas solúveis como para a produção de glucanas insolúveis.

A Figura 16 mostra o efeito do extrato hidroetanólico das folhas (EF) e do óleo-resina (OR) de copaíba sobre a produção de glucanas insolúveis pelas preparações parcialmente purificadas de glucosiltransferases associadas à célula, GTFs-AC (Figura 16A) e de origem extracelular, GTFs-EC (Figura 16B).

Fig. 16. Efeito do óleo-resina bruto e do extrato das folhas de Copaíba sobre a síntese de glucanas insolúveis, pela preparação bruta de (A) glucosiltransferase associada à célula (GTFs-AC) e (B) glucosiltransferase extracelular (GTFs-EC). Cada concentração do produto natural, foi avaliada em triplicata. A porcentagem da atividade de GTFs foi calculada considerando que o controle apresentou atividade enzimática de 100% (OR= óleo-resina; EF= extrato bruto das folhas; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Com relação ao efeito dos produtos de copaíba sobre a atividade de GTFs-AC (Figura 16A), observamos que o óleo-resina (OR) apresentou efeito inibitório sobre a síntese de glucanas insolúveis dentro de um perfil dose-dependente, na faixa de concentração de 20 a 100 µg/mL. Em presença de uma concentração de OR igual a 20 µg/mL, a síntese de glucanas insolúveis pela preparação GTFs-AC decaiu para 30% em relação ao controle, o que significa um efeito inibitório de 70%. Este efeito sobre a atividade de GTFs-AC aumentou em até 85% (síntese de glucanas insolúveis correspondeu a 15% do controle) para uma concentração de óleo-resina igual a 100 µg/mL. Por outro lado, o extrato das folhas de copaíba (EF) pareceu estimular a síntese de glucanas insolúveis por GTFs-AC, porém este efeito não foi estatisticamente significativo.

Com relação ao efeito dos produtos de copaíba sobre a atividade de GTFs-EC (Figura 16B), observamos efeitos similares àqueles observados para a atividade de GTFs-AC. O óleo-resina (OR) apresentou, igualmente, acentuado efeito inibitório sobre a síntese de glucanas insolúveis dentro de um perfil dose-dependente, na faixa de concentração de 20 a 100 µg/mL. Em uma concentração de 20 µg/mL, o OR inibiu a síntese de glucanas insolúveis pela preparação GTFs-EC em 50%, atingindo um efeito inibitório de até 85% para uma concentração de óleo-resina igual a 80µg/mL (síntese de glucanas insolúveis foi igual a 15% do controle). O extrato das folhas de copaíba (EF), não apresentou diferença estatisticamente significativa sobre a síntese de glucanas insolúveis dentro da faixa de concentração avaliada, quando comparadas ao controle.

A Figura 17 mostra o efeito do extrato hidroetanólico das folhas (EF) e do óleo-resina (OR) de copaíba sobre a produção de glucanas solúveis pelas preparações

parcialmente purificadas de glucosiltransferases associadas à célula, GTFs-AC (Figura 17A) e extracelular, GTFs-EC (Figura 17B).

Fig. 17. Efeito do óleo-resina bruto e do extrato das folhas de Copaíba sobre a síntese de glucanas solúveis, pela preparação bruta de (A) glucosiltransferase associada à célula (GTFs-AC) e (B) glucosiltransferase extracelular (GTFs-EC). Cada concentração do produto natural, foi avaliada em triplicata. A porcentagem da atividade de GTFs foi calculada considerando que o controle apresentou atividade enzimática de 100% (OR= óleo-resina; EF= extrato bruto das folhas; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Com relação ao efeito dos produtos de copaíba sobre a atividade de GTFs-AC (Figura 17A), tanto o óleo-resina como o extrato bruto das folhas, não interferiu, de forma estatisticamente significativa, sobre a síntese de glucanas solúveis.

No entanto, quando avaliado o efeito dos produtos de copaíba sobre a atividade de GTFs-EC, observou-se que o óleo-resina apresentou acentuado efeito inibitório sobre a síntese de glucanas solúveis, mas este efeito não parece ser dose-dependente na faixa de concentração de 20 a 100 µg/mL. Em presença de uma concentração de OR igual a 20 µg/mL, a síntese de glucanas solúveis pelas GTFs-EC decaiu para 40% em relação ao controle, o que significa um efeito inibitório de 60%. O menor efeito inibitório observado, nesta faixa de concentração foi igual a 70% (síntese de glucanas solúveis de 30%).

O EF apresentou efeito oposto ao do óleo-resina, estimulando a síntese de glucanas solúveis por GTFs-EC, em cerca de 60%, para concentrações na faixa de 20 a 60 µg/mL. Todavia, concentrações maiores de EF, na faixa de 80 a 100 µg/mL, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas sobre a síntese de glucanas solúveis.

Não há dados experimentais disponíveis na literatura mostrando o efeito de extratos do gênero *Copaifera* sobre a atividade de glucosiltransferases ou demais fatores de virulência de *Streptococcus mutans*. Os dados experimentais obtidos neste ensaio mostram que o óleo-resina de Copaíba apresentou atividade inibitória, estatisticamente significativa, sobre a síntese de glucanas solúveis e insolúveis pelas glucosiltransferases extracelulares, e sobre as glucanas insolúveis pelas glucosiltransferases associada à célula, sem interferir na

produção de glucanas insolúveis. Já o extrato hidroetanólico das folhas de *Copaifera langsdorffii* inibiu de forma significativa, a síntese de glucanas insolúveis pela GTFs-EC, porém o mesmo não ocorreu com GTFs-AC. O mesmo extrato parece não interferir na atividade de GTFs-AC e GTFs-EC, com relação à produção de glucanas solúveis. Porém, são as glucanas insolúveis que facilitam mais intensivamente o acúmulo de *Streptococcus mutans* na superfície dentária e a sua agregação intercelular via receptores da superfície celular (HAMADA e SLADE, 1980; Li e CAUFIELD, 1995; WOOD e BOWEN, 2000).

Conclusão

5. CONCLUSÃO

5.1. O extrato hidroetanólico das folhas de *Copaifera langsdorffii* inibiu o potencial acidogênico de *S.mutans* em um perfil dose-dependente. O efeito inibitório máximo obtido foi de $99\% \pm 2$ de inibição para concentrações na faixa de 2 a 4 mg/mL. A CI_{50} foi estabelecida em 0,36 mg/mL.

5.2. O óleo-resina de copaíba inibiu o potencial acidogênico de *S.mutans* em um perfil dose-dependente. O efeito inibitório máximo obtido foi de $99\% \pm 2$ de inibição para concentrações na faixa de 0,5 a 4 mg/mL. A CI_{50} não foi determinada pois os percentuais de inibição obtidos na faixa de concentrações avaliada foi superior a 50%.

5.3. A fração volátil do óleo-resina apresentou um perfil dose-dependente semelhante ao do óleo-resina bruto, com valores de inibição do potencial acidogênico de *S.mutans* bastante próximos. A CI_{50} foi estabelecida em 0,057 mg/mL. Para a fração resinosa do óleo-resina não foi possível traçar a curva dose-resposta.

5.4. Os valores de CIM foram estabelecidos em: 1,0 mg/mL para o extrato hidroetanólico das folhas de copaíba, 0,4 mg/mL para o óleo-resina e 0,2 mg/mL, para a fração volátil. A concentração bactericida mínima do óleo-resina de copaíba foi estabelecida em 0,8 mg/mL, para um inóculo de 10^4 ufc/mL. Para os demais produtos de copaíba a CBM não pode ser estimada nas concentrações testadas.

5.5. O extrato bruto das folhas de *Copaifera langsdorffii*, na faixa de concentração de 20 a 100 µg/mL, apresentou efeito inibitório moderado sobre a síntese de

glucanas insolúveis pela preparação GTFs-EC, mas não interferiu na síntese de glucanas solúveis desta mesma preparação.

5.6. O extrato bruto das folhas de *Copaifera langsdorffii*, na faixa de concentração de 20 a 100 µg/mL não interferiu, de forma significativa, na síntese de glucanas pela preparação GTFs-AC.

5.7. O óleo-resina bruto de copaíba, na faixa de concentração de 20 a 100 µg/mL, apresentou efeito inibitório sobre a síntese de glucanas solúveis e insolúveis, pela preparação GTFs-AC.

5.8. O óleo-resina bruto de copaíba, na faixa de concentração de 20 a 100 µg/mL, apresentou efeito inibitório sobre a síntese de glucanas insolúveis pela preparação GTFs-EC, mas não interferiu na síntese de glucanas solúveis desta mesma preparação.

Os resultados obtidos neste estudo mostram dados consistentes de que produtos naturais extraídos de copaíba, sobretudo o óleo-resina obtido de seu tronco, apresentaram atividade biológica significativa sobre os fatores de virulência de *Streptococcus mutans*, aqui avaliados, sugerindo que os mesmos apresentam potencial terapêutico em formulações farmacêuticas para higiene bucal. No futuro, este mesmo potencial terapêutico deverá ser avaliado sobre outros microrganismos cariogênicos bem como patógenos associados a processos a doenças periodontais, no intuito de avaliar o espectro de ação e o potencial terapêutico dos produtos derivados de Copaíba

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, B.S. Uso de clorexedina associada com a escovação no controle da placa dentária de escolares. **Revista Gaúcha de odontologia. Porto Alegre**, v.49, n.3, p.133-138. Jul – Ago – Set, 2001.

AOBA, T. Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis is of dental caries. **Review article. Oral Disease**, v.10, p.249-257, 2004.

AOKI, H.; SHIROZA, T.; HAYAKAWA, M.; SATO, S.; KURAMITSU, H.K. Cloning of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. **Infect Immun**, Oxford, v.53, p.587-594, 1986.

AXELSSON, P. The effect of various plaque control measures on gingivitis and caries in school children. **Community Dental Oral Epidemiol**, v.4, p.232-239, 1976.

BANAS, J.A.; VICKERMAN, M.M. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. **Crit Rev Oral Biol Med**, Stanford, v. 14, n. 2, p. 89-99, 2003.

BANDEIRA, M. F. C. L. Estudo comparativo da compatibilidade biológica do óleo essencial e da resina da copaifera multijuga associados ao hidróxido de cálcio em diferentes níveis de pesquisa: farmacológico, microbiológico e molares de ratos. Odontologia Araraquara – UNESP. Tese de doutorado, 2000.

BARATA, L.E.S; MEMDONÇA, C. Copaíba: Propriedades farmacológicas, etnofarmacologia, usos. Rio de Janeiro: GEF/Instituto Pró-Natura, 1997. (Relatório 1).

BARBIERI, D.S. Análise da aderência “in vitro” de *streptococcus mutans* e *candida albicans* na superfície dentária. Dissertação (mestrado) . 124p. – Universidade Federal do Pará, Curitiba, 2005.

BARRIS, D.; ALIAGA, A. Cáries e doenças periodontais. **Offarm**, v.5, p.45-53, 1998

BASILE, A. C., SERTIÉ, J. A A.; FREITAS, P. C. D.; ZANINI, A. C. Anti-inflammatory activity of oleoresin from brasilian copaífera. **J. Ethnopharm**, v. 22, p. 101-109, 1988.

BOWEN, W.H. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? **Crit Rev Oral Biol Med**, Stanford, v. 13, n. 2, p. 126-131, 2002.

BOWEN, W.H.; VELEZ.; AGUILA, M.; VELÁSQUEZ, H.; SIERRA, L.I.; GILLESPIE, G. The microbiology and biochemistry of plaque, saliva, and drinking water from two communities with contrasting levels of caries in Colombia, S.A. **J Dent Res**, Chicago, v.56, p.C32-C39, 1977. Número especial.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal Biochem v.72, n.7, p.248-254, May, 1976.

BRAGA, P.T.; BARREIRA, M.E.S.; OLIVEIRA, D.F.; ARGENTA, J.A.

Identificação de plantas do centro de pesquisa do unilavras ativas contra *Streptococcus mutans*. **Pro Homine**, v. 3, n. 3, jan./dez. 2004

BURNE, R.A. Oral streptococci: products of their enviroment. **J Dent Res**, Chicago, v.77, p.445-452, 1998.

CARLSSON, J. Microbiol aspects of frequent intake of products with high sugar concentrations. **Scand J Dent Res**, v. 97, p. 110-114, 1989.

CARLSSON, J.; KUJALA, U.; EDLUND, M.B. Pyruvate dedydrogenase activity in *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 674-678, 1985.

CARLSSON, J.; HAMILTON, I.. Metabolic activity of oral bacteria. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. (eds). **Textbook of Clinical Cariology**. 2ed. Copenhagen: Muksgaard, p. 71-88, 1994.

CARRANZA JR, F. A.; NEWMAN, M. G. **Periodontia Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

CAUFIELD, P.W.; CUTTER, G.R.; DASANAYAKE, A.P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. **J Dent Res**, v. 72, p. 32-45, 1993.

CONCHA, M.L. et al. Initial pH as a determining factor of glucose consumption and lactic and acetic acid production in oral streptococci. **Microbios**, v.87, p.207-216, 1996.

COHEN, M.L.; Epidemiology of drug resistance: implications for a post antimicrobial era. **Science**. v. 257, p.1050, 1992

CURY, J.A. Uso do flúor. In: BARATIERI, L.N. et al. **Dentística – procedimentos invasivos e restauradores**. 2ed. Rio de Janeiro: Quintessence, p. 42-46, 1992.

CURY, J. A.; REBELO, M. A.; CURY, A. A.; DERBYSHIRE, M. T.; TABCHOURY, C.P. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res**. v. 34, p. 491-497, 2000.

CURY, J.A.; REBELLO, M.A.B.; Del Bel Cury, A.A. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Cvaries Res**, v. 31, p.356-360, 1997.

DASHPER, S. G.; REYNOLDS, E. C. pH regulation by *Streptococcus mutans*. **J. Dent. Res.**, v. 71, p. 1159-65, 1992.

DASHPER, S. G.; REYNOLDS, E. C. Lactic acid excretion by *Streptococcus mutans*. **Microbiology**. v. 142, p. 33-39, 1996.

Van DIJK, J. W. E.; BORGGREVEN, J. M. P. M, DRIESSENS, F. C. M Difusion in mammalian tooth enamel in relation to the caries process. **Arch Oral Biol**, v. 28, p. 591-597, 1983.

DILLS, S.S.; APPERSON, A.; SCHIMIDT, M.R.; SAIER Jr, M.H.. Carbohydrate transport in bacteria. **Microbiological Review**. v. 44, p. 385-418, 1980.

DOBRINDT, U.; HACKER, J. Wole genome plasticity in pathogenic bacteria. **Curr Opin Microbiol**, v. 4, p.550-557, p.2001.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERR, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal Chem**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.

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

ELWOOD, D.C.; PHIPPS, P.J.; HAMILTON, J.R. Effect of growth rate and glucose concentration on the activity of the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system in *Streptococcus mutans* Ingritt grow in continuous culture. **Infection and Immunity**, v. 23, p.224-231, 1979.

EMILSON, C. G. Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. **J Dent Res**, v. 73, p. 682–691, 1994.

FEATHERSTONE, J.D.B; DUNCAM, J.F.; CUTRESS, T.W. A mechanism for dental caries basead on chemical process and diffusion phenomena during in vitro caries simulation on human tooth enamel. **Arch Oral Biol**, v. 24, p. 101-112, 1979.

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

FERNANDES, R. M., PEREIRA, N. A., PAULO, L. G. Anti-inflammatory activity of copaiba balsam. **Rev Bras Farm** . v. 73, p. 53-6, 1992.

FESSENDEN, R.J. Organic chemistry. Boston: Willard Grant Pres, 1982.

FUJIWARA, T.; TAMESADA, M.; BIAN, Z.; KAWABATA, S.; KIMURA, S.; HAMADA, S. Deletion and reintroduction of glucosyltransferase genes of *Streptococcus mutans* and role of their gene products in sucrose dependent cellular adherence. **Microb Pathol**, v. 20, p. 225-233, 1996.

GABRIELSON, J.; HART, M., JARELÖV, A.; KÜHN, I., McKENZIE, D., MÖLLBY, R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *J Microbiol Meth*, v. 50, p. 63 - 73, 2002.

GAO, X.J.; FAN, Y.; KENT, R.L. Jr.; Van HOUTE, J.; MARGOLIS, H.C. Association of caries activity with the composition of dental plaque fluid. *J. Dent Res.*, v. 80, p.1834-1839, 2001.

GERMAINE, G.R.; CHLUDZINSKI, A.M.; SCHACHTELE, C.F. *Streptococcus mutans* dextransucrase: requirement for primer dextran. *J Bacteriol*, Washington, v. 120, n. 1, p. 287-294, 1974.

GIBBONS, R.J. Role of extracellular bacterial polysaccharides in the caries process. *J Dent Res.*, Chicago. v. 47 n. 6, p. 926-927, 1968.

GIBBONS, R. J.; NYGAARD, M. Synthesis of insoluble dextran and its significance in formation of gelatinous deposits by plaque forming streptococci. *Archives of Oral Biology*, v. 13, n. 10, p. 1249-1262, Oct.1968.

GILBERT, B.; MORS, W. B.; BAKER, P. M.; TOMASSINI, T. C. B.; GOULART, E. G.; HOLANDA, J. C.; COSTA, J. A. R.; LOPES, J. N.G.; SANTOS-FILHO, D.; SARTI, S. J.; TURCO, A. M.; VICHNEWSKI, W.; LOPES, J. L. C.; THAMES, A. W.; PELLEGRINO, J.; KATZ, N. A atividade anti-helmíntica de óleos essenciais e

de seus componentes químicos. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 44(supl.), p. 423-428, 1972..

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 353-358, jul./set., 2005

GONÇALVES, N.C.L.A.V.; PEREIRA, A.C. Cárie dental: uma doença multifatorial In: PEREIRA, A.C. **Odontologia em saúde coletiva: planejando ações e promovendo saúde**. Porto Alegre: Artmed, p. 193-206, 2003.

GOTTIEB, O. R. Ethnopharmacology versus chemosystematics in the search of biologically active principles in plants. **J.Ethnopharm**, v. 6, p. 227-230, 1982.

GRAMOZA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Volatile Constituents of *Copaifera langsdorffii* from the Brazilian Northeast. **J.Essesnt Oil Res**. v. 17, p. 130-132, 2005.

GRAVENMADE, E.J.; JENKINS, G.N. Isolation, purification and some properties of a potential cariostatic factor in cocoa that lowers enamel solubility. **Caries Res**, Basel, v. 20, n. 5, p. 433-436, 1986.

HAMADA, S.; KOGA, T.; OOSHIMA, T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **Journal of Dental Research**, v. 63, p. 407-411, 1984.

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev**, Amsterdam, v. 44, n. 2, p.331-384, 1980.

HAMILTON, C. J.; Metabolic activity of oral bacteria In: Thystrup, A.; Fejerskov, O (eds). Text of clinical cariology 2ed. Copenhagen: Nunksgaard, p. 74-88, 1994.

HAMILTON, I.R.; St. MARTIN, E.J. Evidence for the involvement of proton motive force in the transport of glucose by a *Streptococcus mutans* strain DR 0001 defective in glucose – phosphoenolpyruvate phosphotransferase activity. **Infect Immun**, Oxford, v. 36, p. 567-575, 1982.

HAMILTON, I. R., SVENSÄTER, G. Acid-regulated proteins induced by *Streptococcus mutans* and other oral bacteria during acid shock. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 13, p. 292-300, 1998.

HANADA, S.; KURAMITSU, H.K. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* gtfC gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucan. **Infect Immun**, Oxford, v. 56, p. 1999-2005, 1988.

HANADA, S.; KURAMITSU, H. K. Isolation and a characterization of the *Streptococcus mutans* gtfC gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. **Infect Immun**, Oxford, v. 57, p. 2079-2085, 1989.

HARPER, D. S.; LOESCHE, W. J. Growth and acid tolerance of human dental plaque bacteria. **Arch Oral Biol**. v. 10, p. 843-848, 1984.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplores natural products. **Drugs Discov Today**, Oxford, v. 5, p. 294-300, 2000.

HAYACIBARA, M. F.; KOO, H.; VACCA-SMITH, A. M.; KOPEC, L. K.; SCOTT-ANNE, K.; CURY, J. A.; BOWEN, W. H. The influence of mutanase and dextranase on the production and structure of glucans synthesized by streptococcal glucosyltransferases. **Carbohydrate Research**. v. 339, p. 2127-2137, 2004.

van der HOEVEN, J. S.; CAMP, P. J. M. The use of lectins in monitoring degradation of oligosaccharide chains in mucin by oral streptococci. **Caries Research**, v. 28, p. 257-261, 1994.

HOJO, S.; HUGUCHI, M.; ARAYA, S. Glucan inhibition of difusión in plaque. **J Dent Res**, Chigaco, v. 55, n. 1, p. 169-173, 1976.

HOTZ, P.; GUGGENHEIM, B.; SCHMID, R. Carbohydrates in pooled dental plaque. **Caries Res**, Basel, v. 6, p. 103-121, 1972.

VAN HOUTE, J.; LOPMAN, J.; KENT, R. The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces. **Journal of Dental Research**, v.75, n. 4, p. 1008-1014, 1996.

IWAMI, Y. Acid production by streptococci growing at low pH chemostat under anaerobic conditions. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 7, p. 304-308, 1992.

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

JOHNSON, M.C.; BOZZOLA, J.J.; SHECHMEISTER, I.L. Morphological study of *Streptococcus mutans* and two extracellular polysaccharide mutants. **J Bacteriol**, Washington, v. 118, n. 1, p. 304-11, 1974.

JORDAN, H.V.; KEYS, P.H. In vitro methods for the study of plaque formation and carious lesions. **Arch Oral Biol**, New York, v. 11, n. 8, p. 793-802, 1966.

JUNIOR, A. V. Técnica de spray para aplicações tópicas de soluções fluoretadas. **Revista Gaúcha de Odontologia**. Porto Alegre, v. 49, n. 3, p. 157-164, Jul – Ago – Set, 2001.

KAPLAN, M. C.; FIGUEIREDO, M. R.; GOTTIEB, O. R. Variation in cyanogenesis in plants with seasons and insect pressure. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 11, p. 367-370, 1983.

KEYES, P.H. Recent advances in dental research. Bacteriology. **Int Dent J**, London, v. 12, n. 4, p. 443-464, 1962.

KLEIN, M.I.; FLORIO, F.M.; PEREIRA, A.C.; HOFLING, J.F.; GONÇALVES, R.B. Longitudinal study of transmission, diversity and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrius* genotypes in Brazilian nursery children. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 4620-4626, 2004.

KOLENBRANDER, P. E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 11, p. 3247-3252, 1993.

KÖHLER, B.; BIRKHED, D.; OLSSON, S. Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. **Caries Research**, v. 29, n. 5, p. 402-406, 1995.

KRASSE, B. Exame salivar. In: **Risco de cáries. Guia prático para controle e assessoramento**. 2 ed. São Paulo: Quintessence, 1988, p. 41-44.

KURAMITSU, H. K. Virulence factor of mutans streptococci: role of molecular genetics. **Crit Rev Oral Biol Med** v. 4, p. 159-176, 1993.

LACEY, L. A.; SCHRECK, C. E.; MCGOVERN, T. P. Native and experimental repellent against black flies in the Amazon basin of Brazil. **Mos News**. v.41, p. 376-379, 1981.

LEITÃO, D. P. S, POLIZELLO, A. C. M, ITO, I.Y, SPADARO, A. C. C. Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cranberry juice. **J Med Food** 8 (1), 2005.

LEITÃO, D.P.S, SILVA FILHO, A.A., POLIZELLO, A.C.M., BASTOS, J.K, SPADARO,A.C.C. Comparative Evolution of *in vitro* effects of brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Biol.Pharm. Bull.** v. 27, p. 834-1839, 2004.

LEITÃO, D. P. S.; SILVA-FILHO, A. A .; POLIZELLO, A . C . M.; BASTOS, J. K.; SPADARO, A .C. C. *In vitro* effect of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on the acidogenic potencial of *Streptococcus mutans*. In: CONGRESS OF PHARMACEUTICAL SCIENCES – CIFARP 2003, 4th, Ribeirão Preto, SP, 2003. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences)** v. 39, supl. 2,p. 210, 2003.

LEITÃO, D.P.S. Estudo comparativo do efeito *in vitro* de extrato de própolis verde e extratos de *Baccharis dracunculifolia* sobre fatores de virulência de *Streptococcus mutans*, relacionados à cárie dental. 119p. 2005. FCFRP – USP – Tese de doutorado.

LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F.; KITAJIMA, E. W.; ISHIDA, M. L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 9, p.1-41, 2001.

LEITE, M.F. Estudo do efeito *in vitro* de extratos de *Tamarindus indica* L. sobre fatores d virulência de *Streptococcus mutans*, relacionados à cárie dental. 94p. FCFRP-USP – Dissertação de Mestrado, 2005.

LEMOS, J. A.; ABRANCHES, J.; BURNE, R. A. Responses of cariogenic streptococci to enviromental stress. **Curr Issues Mol Biol**, Norwich, v.7, n.1, p. 95-107, 2005.

LEN, A.C.L.; HARTY, D.W.S.; JACQUES, N.A. Proteome analysis of *Streptococcus mutans* metabolic phenotype during acid tolerance. **Microbiol**, Washington, v. 150, p. 1353-1366, 2004.

LINDQUIST, B.; EMILSON, C. G. Distribution and prevalence of mutans streptococci in human dentition. **J. Dent. Res.**, v.69, p.1160-1166, 1990.

LI, Y.; BURNE, R. A. Regulation of the gtfBC and ftf genes of *Streptococcus mutans* in biofilms in response to pH and carbohydrate. *Microbiol* v. 147, p. 2841-2848, 2001.

LI, Y.; CAUFIELD, P. W. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. *J Dent Res*, v.74, p.681-685, 1995.

LI, J.; HELMERHORST, E. J.; LEONE, C. W.; TROXLER, R. F.; YASKELL, T.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S.; OPPENHEIM, F. G. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol*, Baltimore, v. 97, p. 1311-1318, 2004.

LI, Y.; LAU, P.C.Y.; TANG, Y.; SVENSATER, G.; ELLEN, R.P.; CVITKOVITCH, D.G. Novel two-component regulatory system involved biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *Jornal of bacteriology*. p. 6333-6342, nov.2002.

LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* v. 50, p. 353-380, 1986.

LOESCHE, W. J. Metabolismo dos carboidratos pelos microorganismos da placa. In.: Cárie dentária: um,a infecção tratável. Rio de Janeiro: Cultura médica, cap.9, 1993.

MCNEILL K, HAMILTON I. R. Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 11, p. 25-30, 2003.

MacPHERSON, L. M.; DAWES C. Distribution of sucrose around the mouth and its clearance after a sucrose moutherense or consumption of three different foods. **Caries Research**, v. 28, p. 150-155, 1994.

MANJI, F.; FERJERSKOV, O.; NAGELKERKE, N. J. D.; BAEUM, V. A random effects model for some epidemiological features of dental caries. **Community Dental Oral Epidemiol**, v. 19, p. 324-328, 1991.

MARSH, P. D.; Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv Dent Res**, Washington, v. 8, p. 263-271, 1994.

MARSH, P. D. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. **Dent Clin North Am** v. 43, 1999.

MARSH, P. D.; BRADSHAW, D. J. Physiological approaches to the control of oral biofilms. **Advances in Dental Research**, v. 11, p. 176-185, 1997.

MATTOS-GRANER, R. O.; ZELANTE, F.; LINE, R. C.; MAYER, M. P. Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5 year old Brazilian children. **Caries Res**, v. 32, p. 319-323, 1998.

MONTI, H.; TILIACOS, N.; FAURE, R. Two diterpenoids from copaíba oil. **Phytochemistry** v. 42, n. 6, p. 1653-1656, 1996.

MORETI, A. B. S. Estudo clínico e microbiológico in vitro do efeito da tintura de *Sanguinária canadensis* associada a goma de mascar sobre o biofilme bacteriano. 126p. Dissertação de mestrado. FOB – USP – Dissertação de mestrado, 2004.

MUKASA, H. TSUMORI, H.; SHIMAMURA, A. Isolation and characterization of an extracellular glucosyltransferase synthesizing insoluble glucan from *Streptococcus mutans* serotype c. **Infect Immun**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 790-796, 1985.

NASCIMENTO, M. M.; LEMOS, J. A.; ABRANCHES, J.; GONÇALVES, R. B.; BURNE, R. A. Adaptive acid tolerance response of *Streptococcus sobrius*. **J Bacteriol**, v. 186, p. 6383-6390, 2004.

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically: approved standart. 6ed. Wayne, PA: Techicol Report M07-A, 2003.

NEWBRUN, E. Conceitos atuais da etiologia da cárie. In: **Cariologia**. 2ed. São Paulo. Livraria e editora Santos Ltda. 1988. p. 17-49.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat Prod**, New York, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NOGUEIRA, R. D.; ALVES, A. C.; NAPIMOGA, M. H.; SMITH, D. J.; MATTOS-GRANER, R. O. Characterization of salivary immunoglobulin A response in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. **Infection and immunity**, v. set, p. 5675-5684, 2005.

O'KENNEDY, R.; THORNES, R. D. Coumarins: biology, applications and mode of action. New York: John Wiley, 1997.

OOSHIMA, T.; OSAKA, Y.; SAZAKI, H.; OSAWA, K.; YASUDA, H.; MATSUMURA, M.; SOBUE, S.; MATSUMOTO, M. Caries inhibitory effect of cacao bean husk extract in in vitro and animal experiments. **Arch Oral Biol**, New York, v.45, p.639-643, 2000.

ORTH, D.S. Handbook of cosmetic microbiology. Marcel Dekker, Inc., v.12, cap. 8, 591p, 1993.

PECHARKI, D.; PETERSEN, F. C.; ASSEV, S.; SCHEIE, A. A. Involvement of antigen I/II surface proteins in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius* biofilm formation. **Oral Microbiol Immunol**, v. Dec, p. 966-671, 2005

PHAN, T.N.; BUCKNER, T.; SHENG, J.; BALDECK, J.D.; MARQUIS, R.E. Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid alkali production by oral Streptococci in suspensions and biofilms. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, p. 31-38, 2004.

PIOVANO, S.; MARCANTONI, M.; DONO, R.; BELLAGAMBA, H. Effect of a chlorhexidine varnish on Streptococcus mutans in saliva. **Acta Odontol Latinoam**. v. 18(1) p. 7-13, 2005.

RAMBERG, P.; SEKINO, S.; UZEL, N. G.; SOCRANSKY, S.; LINDHE, J. Bacterial colonization during de novo plaque formation. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 30, p. 990-995, 2003.

RIBEIRO, S. K.; BUSSADORI, S. K. Comparação entre o gel de clorexedine e o verniz de flúor na contagem salivar de *Streptococcus mutans*. Revista Paulista de Odontologia, Ano XXII, n. 04, p. 48-52, Julho/Agosto, 2000.

RICKARD, A. H.; GILBERT, P.; HIGH, N.; KOLENBRANDER, P. E.; HANDLEY, P. S. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. Review. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 2, february, 2003.

RIGAMONTTE-AZEVEDO, O.C.; WADI, P.G.S.; WADI, L.H.O.; VEIGA Jr, V.F.; PINTO, A. C.; REGIANI, A.M. Variabilidade química e física do óleo-resina de *Copaifera* spp. No sudoeste da amazônia brasileira. **Revista bras oil fibras** v. 8, n. 2/3, p. 851-861, 2004.

ROLLA, G.; BASTAD, K. L. Chlorhexidine: a new remedy in tooth care? *Nor Tannlaegeforen Tid.* v. 80(4) p. 248-55, 1970.

SARAMANAYAKE, L. P. Microbiology of dental caries. In: *Essential microbiology for dentistry*. New York: Churchill Livingstone, 1996. p. 275-281.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SCHACHETELE, C.; MAYO, J. A. Phosphoenolpyruvate-dependent glucose transport in oral streptococci, **J Dent Res**, Chicago, v. 52, p. 1209-1215, 1973.

SIMIONATO, M.R. Antissépticos de uso em odontologia. In: *Apostila da Universidade de São Paulo instituto de ciências biomédicas departamento de microbiologia*. BMM 560 – microbiologia oral noturno, 2005.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V.L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. **Am J Enol Vitic** v. 28, p. 49-55, 1977.

SMITH, V. H.; PIPPIN, D. J. Implications of resource-ratio theory for oral microbial ecology. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v. 106, p. 605-615, 1998.

SOET, J. J. et al. Acidogenesis by oral streptococci at different pH values. **Caries Res.**, v. 23, p. 14-17, 1989.

STERN, J. L.; HAGERMAN, A. E.; STEINBERG, P. D.; MASON, P. K. Phlorotannin-protein interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v. 22, p. 1887-1899, 1996.

STURR, M. G.; MARQUIS, R. E. Comparative acid tolerance and inhibitor sensitive of isolated ATPase of oral lactic acid bacteria. **Enviromental microbiology**, v. 58, p. 2287-2291, 1992.

TAKAHASHI-ABBE, S.; ABBE, K.; TAKAHASHI, N.; TAMAZAWA, Y.; YAMADA, T. Inhibitory effect os sorbitol on sugar metabolism of *Streptococcus mutans* in vitro and on acid production in dental plaque in vivo. **Oral Microbiol Immun**, Philadelphia, v. 16, p. 94-99, 2001.

TAKAHASHI-ABBE, S.; ABBE, K.; TAKAHASHI, N. Biochemical and functional properties of pyruvate formate-lyase (PFL) – activating system in *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiol Immun**, Philadelphia, v. 18, p. 293-297, 2003.

TAHAHASHI, N.; ABBE, K.; TAKAHASHI-ABBE, S.; YAMADA, T. Oxygen sensitivity of sugar metabolism and interconversion of pyruvate formato-lyase in intact cells of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. **Infect Immun**, Oxford, v. 55, n. 3, p. 652-656, 1987.

TAKAHASHI,N.; YAMADA,T. Catabolic pathway for aerobic degradation of lactate by *Actinomyces naeslundii*. **Oral Microbiol Immun**, Philadeplphia, v. 11, p. 193-198, 1996.

TANZER, J.M. Studies on the fate of the glucosyl moiety of sucrose metabolized by *Streptococcus mutans*. **J Dent Res**, Chicago, v. 5, n. 2, p. 415-23, 1972.

TANZER, J.M.; FREEDMAN, M.L.; FITZGERALD, R.J.; LARSON, R.H. Diminished virulence of glucan synthesis-defective mutants of *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 197-203, 1974.

TENGERDY, R.P.; NAGY, J.G; MARTIN, B. Quantitative measurement of bacterial growth by the reduction of tetrazolium salts. **Appl Microbiol**, Baltimore, v.15, p.954-955, 1967.

TENOVUO, J. Antimicrobial function of human saliva - how important is it for oral health? **Acta Odontologic Scandinavian**, v. 56, p. 250-256, 1998.

TEREZAN, M. L. F.; MOREINOS, M.; RIBEIRO, I. C.; MACHADO, W. A. S. Estudo comparativo da citotoxicidade da clorexedina na mucosa bucal humana (Hibitane e Plack Out). **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 29, n. 5, p. 42-48, Setembro/Outubro, 1992.

TERRAS, F. R. G.; SCHOOFS, H. M. E.; THEVISSSEN, H. M. E.; BROEKAERT, W. F. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1311-1319, 1993.

TOMITA, Y.; WATANABE, T.; TAKEUCHI, T.; NAMBU, A.; SHINOZAKI, N, IKEMI, T.; FUKUSHIMA, K. Effects of surfactants on glucosyltransferases production and in vitro sucrose-dependent colonization by *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol**, v.43, n.9, p.735-740, 1998.

TORSSEL, B. G. Natural product chemistry. A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism. New York: John Willey, 401p, 1989.

TWETMAN, S. Anticrobials in furutes caries control? – A Review wthi special reference to chorhexidine treatment. **Caries Res**, v. .38, p. 223-229, 2004.

TWETMAN, S.; PETERSON, L. G.; PAKHOMO, V. G. N. Caries incidence in relation to salivary mutans streptococci and floride varnish applications in preschool children from low and optimal fluoride areas. **Caries Research**, v. 30, n. 5, p. 347-353, 1996.

VACCA-SMITH, A.M.; Ng-EVANS, L.; WUNDER, D.; BOWEN, W.H. Studies concerning the glucosyltransferase of *Streptococcus sanguinis*. **Caries Res Basel**, v. 34, p. 295-302, 2000.

VACCA-SMITH, A. M.; VENKITARAMAN, A. R.; SCHILLING, K. M; BOWEN, W. H. Characterization of glucosyltransferases of human saliva adsorbed onto hydroxyapatite surface. **Caries Res**, Basel, v. 30, p.354-360, 1996.

VADEBONCOEUR, C.; PELLETIER, M. The phosphoenolpyruvate sugar phosphotransferase system for oral Streptococci and its role in the control of sugar metabolism. **FEMS Microbiol Rev.** Amsterdam, v.19, p.187-207, 1997.

VEIGA-Jr, V. F; PINTO, A. O gênero Copaifera. **Quím. Nova**, v. 25, n. 2, São Paulo, Abr./May, 2002.

WEYNE, S. Cariologia In: BARATIERI, L. N. et al. Dentística – procedimentos preventivos e restauradores. 2ed. Rio de Janeiro: Quintessence, 1992, p. 1-42.

WOOD, D.; BOWEN, W. H. Effects of antibodies to glucosyltransferase on soluble and insolubilized enzymes. **Oral Dis**. London, v. 6, p. 286-296, 2000.

WU-YUAN, C. D.; GREEN, L., BIRCH, W. X. In vitro screening of Chinese medicinal toothpastes: their effects on growth and plaque formation of mutans streptococci. **Caries Res**, v. 24, n. 3, p. 198-202, 1990.

YAMASHITA, Y.; BOWEN, W. H.; BURNE, R. A.; KURAMITSU, H. K. Role of the *Streptococcus mutans* gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. **Infect Immun**, Oxford, v. 61, p. 3811-3817, 1993.

YANAGIDA, A.; KANDA, T.; TANBE, M.; MATSUDAIRA, F.; CORDEIRO, J. G. O. Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic of mutans Streptococci. **J. Agric Food Chem**, Columbus, v. 48, p. 5666-5671, 2000.

YAO, Y.; BERG, E. A.; COSTELLO, C. E.; TROXLER, R. F.; OPPENHEIM, F. G. Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 278, p. 5300-5308, 2003.

ZHANG, Y.; LEWIS, K. Fabatins: new antimicrobial plant peptides. **FEMS Microbiological Letters**, v. 149, p. 59-64, 1997.

ZERO, D. T. Sugars - The arch criminal? **Caries Res**, Basel, v. 38, p. 277-285, 2004.

ZERO, D. T.; FU, J.; ANNE, K. M.; CASSATA, S.; McCORMACK, S. M.; GWINNER, L. M. Na improved intra oral enamel demineralization test model for the study of dental caries. **J Dent Res**, v. 71 (spec), p. 871-878, 1992.

Anexos

ANEXOS

ANEXO A

ANEXO B

A Associação Ambientalista Projeto Copalíba é uma organização não governamental, sem fins lucrativos, fundada em Socorro no ano de 1999 com o objetivo de contribuir para a conservação e a recuperação do meio ambiente local.

Nossa Missão é
Promover a preservação, recuperação e conscientização ambientais, contribuindo assim para a convivência harmônica entre seres humanos e natureza.

Acreditamos que

- Todos os seres vivos têm direito à vida;
- O desenvolvimento sustentável é uma necessidade premente;
- Todo cidadão tem o direito de viver em um ambiente saudável e equilibrado;
- A participação e o envolvimento da sociedade nas atividades em prol do meio ambiente são essenciais;
- É fundamental a plena transparência na utilização dos recursos.

**projeto
copalíba**
NOME E VOCAÇÃO POR NATUREZA

Rua General Glicério, 233 - Socorro - SP
www.projetcopaliba.org.br
e-mail: atendimento@projetcopaliba.org.br

**projeto
copalíba**
NOME E VOCAÇÃO POR NATUREZA

Nossos Objetivos

O município de Socorro está situado numa região hidromineral muito rica. Historicamente, as matas nativas aqui existentes

foram degradadas ou mesmo suprimidas pelas atividades agropastoris, restando hoje apenas pequenos fragmentos da mata original. As matas nativas, especialmente as ciliares, são essenciais para o equilíbrio ecológico do ecossistema, destacando-se a função de conservação da quantidade e qualidade da água dos rios e nascentes, de proteção do solo e como fonte de alimentos e proteção à fauna silvestre. A despeito da importância para a conservação da vida, as matas e, especialmente, os mananciais ainda sofrem várias formas de impactos ambientais, entre elas o assoreamento, devido à grave erosão em solos adjacentes, à degradação da mata ciliar e à poluição. O controle desses impactos ambientais requer abordagens diversificadas, como manejo racional do solo, recuperação da flora nativa e especialmente trabalhar a educação ambiental da população local.

Pensando no conhecimento como uma das principais formas de diminuir a degradação ambiental e motivar a ação em prol da natureza, colocamos como uma de nossas prioridades para os próximos anos a ampliação do trabalho de conscientização da sociedade de Socorro para a preservação e recuperação ambientais. Além da conscientização, acreditamos que é essencial para a conservação da vida, a recuperação das áreas degradadas e a preservação da biodiversidade. Nesse sentido, objetivamos ampliar o trabalho de recuperação de áreas degradadas, o qual desenvolvemos há 4 anos no município, e ampliar a produção de mudas de árvores de espécies

Áreas de Atuação e Principais Atividades

Desde sua fundação o Projeto Copaliba atua em três áreas principais:

Conservação da Flora Nativa: visando à preservação da biodiversidade e da diversidade genética da flora local, o Projeto Copaliba vem desde 2001 produzindo mudas de espécies de árvores nativas da região de Socorro (Mata Atlântica), as quais abastecem os trabalhos de recuperação de áreas degradadas da própria organização e iniciativas de terceiros. Foram produzidas em 2 anos, 12.000 mudas de 40 espécies de árvores nativas. Objetivamos, com a implantação do Viveiro Florestal Copaliba, produzir em 3 anos 100.000 mudas de 150 espécies de árvores nativas.

Recuperação de Áreas Degradadas: as atividades de recuperação de áreas degradadas foram as primeiras ações em prol do meio ambiente realizadas pelo Projeto Copaliba, as quais mantêm-se como símbolo e essência da organização até os dias de hoje. Essas atividades fazem parte do Programa VerDe Novo, que tem por objetivo recuperar áreas degradadas, especialmente as ciliares, por meio de plantio de árvores nativas. Do primeiro plantio, em outubro de 1999, até o fim do primeiro semestre de 2003 foram plantadas 8.414 mudas de árvores. Temos como meta plantar, através dos diversos projetos e atividades do Programa VerDe Novo, 40.000 mudas nos próximos 3 anos.

Educação Ambiental: graças ao Programa Copaliba na Escola, que objetiva trabalhar a educação ambiental de alunos de instituições de ensino, foram atingidas, nos anos de 2001 e 2002,

3.475 alunos das escolas de Socorro por meio de diversos projetos e atividades. Pretendemos ampliar o trabalho de educação ambiental, quantitativa e qualitativamente, dando oportunidades para os alunos conhecerem e refletirem sobre o meio ambiente e a atuação de cada cidadão na sua conservação. Buscaremos por meio do Projeto Escola do Campo levar a cultura de preservação à zona rural do município de Socorro, além de realizarmos trabalhos mais sistematizados nas escolas da zona urbana. Outra forma de conscientizar a sociedade tem

sido pela participação social em atividades de plantio de árvores, as quais fazem parte do Programa VerDe Novo. Até o fim do primeiro semestre de 2003 os plantios tiveram a participação total de 977 pessoas, com

média de 28 pessoas por plantio. Nossa meta é aumentar a participação para 65 pessoas por plantio nos próximos 3 anos.

**projeto
copaliba**

NOME E VOCAÇÃO POR NATUREZA

Data de Fundação: 7 de setembro de 1999
Web site: www.projetcopaliba.org.br
e-mail: atendimento@projetcopaliba.org.br
Sede: Rua General Glicério, 233 - Socorro - SP