UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

"Estudo do efeito *in vitro* de extratos do rizoma de *Dorstenia asaroides* Hook. sobre fatores cariogênicos de *Streptococcus mutans*"

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado: Carlos Eduardo Mendes D'Angelis

Orientador: Prof. Dr. Augusto César Cropanese Spadaro

Ribeirão Preto
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

D'Angelis, Carlos Eduardo Mendes
Estudo do efeito *in vitro* de extratos do rizoma de *Dorstenia asaroides* Hook. sobre fatores cariogênicos de *Streptococcus mutans*. Ribeirão Preto, 2011.

76 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências

Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:

Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Spadaro, Augusto César Cropanese

1. S*treptococcus mutans*. 2. *Dorstenia asaroides*. 3. Atividade anticariogênica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carlos Eduardo Mendes D'Angelis

Estudo do efeito *in vitro* de extratos do rizoma de *Dorstenia asaroides* Hook. sobre fatores cariogênicos de *Streptococcus mutans*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Augusto César Cropanese Spadaro

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Ao meu pai
À minha mãe
Às minhas irmãs
Por todos os motivos
Por todos os sentimentos
Onde quer que eu esteja
Vocês estão em mim.

AGRADECIMENTOS

O agradecimento é uma forma de louvor a Deus pelas bênçãos e graças concedidas. Assim, eu quero e posso fazer mais que um agradecimento, eu faço um compromisso de retribuição a Deus e a todos que de alguma forma incentivaram o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por permitir que eu encontrasse em minha trajetória pessoas com notável competência acadêmica e científica. Todos os valores e virtudes que aprecio em cada uma delas contribuem para minha formação, indicando o norte em minha breve caminhada.

Agradeço ao Prof. Dr. Augusto César Cropanese Spadaro pela orientação, apoio e estímulo ao longo desse trabalho. Tenho enorme admiração pelo exemplo profissional e intelectual que o senhor é para todos ao seu redor. Agradeço também pela compreensão e paciência, forças de sabedoria e discernimento, capazes de nos transformar positivamente. Sou muito grato pela confiança depositada em mim e principalmente, por ter colaborado para o meu crescimento como pessoa e cientista.

Neste sentimento de profundo reconhecimento agradeço aos Diretores das Faculdades Integradas Pitágoras de Montes Claros (FIPMOC) por todas as concessões, auxílio e incentivos necessários para eu chegar até aqui. Isso me fortalece em Deus e me impulsiona para superação constante no exercício da docência. Peço a Deus que os abençoem e que converta todo meu agradecimento em graças naquilo que mais lhes sejam necessário.

Agradeço à pesquisadora Ana Cristina Morseli Polizello por professar vida e ciência a todos ao seu redor. Obrigado pela colaboração, por ter enriquecido nossas discussões e especialmente pelos auxílios científicos tão rotineiros para você que vive a ciência com divindade e altruísmo.

Aos professores que colaboraram para realização desta pesquisa, permitindo a utilização de equipamentos de seus laboratórios, realização de experimentos e contribuições científicas. Para o Prof. Dr. Jairo K. Bastos, Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, Profa. Dra. Carolina Patrícia Aires e suas equipes os meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. João Paulo B. Sousa, Prof. Dr. Pierre Alexandre dos Santos e Prof. Dr. Milton Groppo Júnior agradeço por terem compreendido meus anseios científicos, tornando possível importantes caracterizações apresentadas neste estudo.

Aos alunos de iniciação científica, Lucas Alonso e Ingrid Pontes de Souza, por experimentar material e métodos, revelando e discutindo resultados, tudo isso com alegria e responsabilidade manifestas também pelos laços de amizade.

Agradeço pelo acolhimento religioso e afeto gratuito da Sra. Nadir Mazzucato e Sr. Alcides Silva Pereira. Sou eternamente grato pelos aconselhamentos e constantes manifestações de carinho.

Agradeço ao amigo de vida e ciência, André Pitondo, por manifestar-se como mentor e por mostrar-me os preceitos norteadores da ciência. Fui acolhido, compreendido e advertido por uma amizade sincera que nasceu no berço do conhecimento e nele se fortalece.

Aos amigos e professores das FIPMOC, agradeço por terem compreendido minhas necessidades e ausências. Vocês não mediram esforços e seus auxílios me encorajaram durante toda essa trajetória. Obrigado Gera, Dorothy, Bob e Karina. Obrigado por tudo e para todo o sempre.

Agradeço às secretárias da Pós-Gradução, Eleni e Rosana, pela responsabilidade com que nos acolhem e auxiliam. É confortante saber que posso contar com seus sorrisos, especialmente nos dias de maior aflição. Pelo profissionalismo e carinho que cultivaram em nossos pequenos diálogos, muito obrigado. Ana Lúcia, querida, devo-lhe os mesmos agradecimentos.

Obrigado pai, por acreditar no potencial do Carapiá e por ter nos despertado para este caminho. Sua disponibilidade e mediação nos estimularam durante todo esse tempo. Suas experiências e conhecimento a cerca deste produto nos auxiliaram e nos guiaram até aqui.

Não é somente pelo conhecimento que devo agradecimentos. Sem estes seria impossível progredir, mas existe uma base mais profunda que nos sustenta e ergue para o saber, e essa base é a família que nada tem a ver com pesquisa. Por estes e por outros motivos, agradeço a todos os Meus. Agradeço aos meus pais (Carlos Lúcio e Neida), às minhas irmãs (Lud, Marla e Neluce) e aos meus sobrinhos (Gui, Bruno, João Marcelo, Nanda e Jokinha) pelo amor que nos une e fortalece.

À medida que eu envelhecer ainda haverá mais o que agradecer... E por isso, obrigado por tudo, pelo que hoje reconheço e agradeço e pelo que amanhã minha sensatez permitirá perceber, tornando-me ainda mais grato pelos benefícios recebidos.

“Ainda que possuísse o dom das profecias
e conhecesse todos os mistérios,
que soubesse todas as ciências,
ainda que eu alcançasse tal grau de fé,
que me tornasse capaz de remover montanhas,
se eu não tivesse o amor, nada seria”

Carta de Paulo aos Coríntios

RESUMO

D'ANGELIS, C. E. M. **Estudo do efeito *in vitro* de extratos do rizoma de *Dorstenia asaroides* Hook. sobre fatores cariogênicos de *Streptococcus mutans***. 2011. 76f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Dorstenia asaroides Hook. é um erva perene, conhecida como *"carapiá",* utilizada na medicina popular contra uma variedade de enfermidades. Este estudo teve como objetivo obter e caracterizar o perfil fitoquímico de frações orgânicas (hexânica, acetato e clorofórmica) do extrato de rizomas de *D. asaroides,* bem como avaliar o efeito *in vitro* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (multiplicação, potencial acidogênico e biofilme) e analisar a citotoxicidade destas frações. Os extratos estudados foram obtidos a partir do extrato bruto (rizomas tratados com etanol). A fração hexânica (**FrH**) revelou a presença de ácidos graxos e/ou seus ésteres metílicos ou etílicos, além de um esteróide, campesterol e triterpenos. A fração acetato (**FrA**) é composta principalmente de furanocumarina e um triterpeno, já a fração clorofórmica (**FrC**) é composta pelas furanocumarinas: isopsoraleno e/ou psoraleno e bergapteno. As frações que apresentaram maior valor de inibição do potencial acidogênico foram **FrH** e **FrA**, ambas com 100% de inibição na concentração de 12,5mg/mL. A concentração inibitório mínima (CIM) para **FrH** e **FrC** foi igual a 80µg/mL, e 50µg/mL para **FrA**. Nos estudos de biofilme, verificou-se que a partir de 3h de incubação *S. mutans* foi capaz de aderir a superfícies de vidro e aço inoxidável, formando biofilme em 9h de incubação com populações médias de 3,41 Log de UFC/cm^2 nas lâminas de vidro e de 4,84 Log de UFC/cm^2 nas lâminas de aço inoxidável. Os melhores resultados de controle de biofilme foram obtidos com a fração **FrA**, a qual apresentou diferenças significativas em relação ao controle. As frações hexânica e acetato não se mostraram citotóxicas em concentrações inferiores a 6,25µg/mL. Já para a fração clorofórmica, não houve citotoxicidade em concentrações menores que 25µg/mL. Os resultados obtidos com as frações **FrH**, **FrA** e **FrC** do extrato de rizomas de *D. asaroides* mostram-se promissores, uma vez que apresentaram potencial anticariogênico sobre *S. mutans*.

Palavras-chave: S*treptococcus mutans*. 2. *Dorstenia asaroides*. 3. Atividade anticariogênica

ABSTRACT

D'ANGELIS, C. E. M. **Anti-cariogenic properties of *Dorstenia asaroides* extracts on *Streptococcus mutans***. 2011. 76f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Dorstenia asaroides Hook. (*Moraceae*), a plant occurring endemically in Africa and Central and South America, is used in medicinal plant therapy. In this study, we analyzed the chemical compounds from the hexane fraction (**HFr**), chloroform fraction (**CFr**) and ethyl acetate fraction (**EFr**). These fractions were obtained from crude extracts of the rhizomes of *D. asaroides*. The antimicrobial activity against *S. mutans*, the acid inhibition properties, the effect on *S. mutans* biofilm formed on a glass surface and cytotoxicity were also evaluated. Phytochemical analysis of these organic fractions from the extract of *D. asaroides* rhizomes revealed the presence of substances with known antimicrobial activity, such as campesterol, triterpenes and coumarins. Both the MIC and MBC values for the **HFr** are 80µg/mL, and for the **EFr** and **CFr** are 50µg/mL. Among the fractions tested, the fractions with the highest value of inhibition of the acidogenic potential were **HFr** and **EFr**, with 100.3% and 105.3% inhibition, respectively, at a concentration of 12.5mg/mL. The treatment of biofilms was statistically significant for all three fractions at the highest concentrations tested compared with the control (biofilm at 12 hours). The results for **EFr** were particularly pronounced, showing significant differences at all concentrations. The **HFr** and **EFr** were not cytotoxic at concentrations below 6.25µg/mL. **CFr** was not cytotoxic at concentrations less than 25µg/mL. Thus, the fractions have shown a substantial anticariogenic activity against *S. mutans* and further studies are needed to fully elucidate properties of these fractions.

Keywords: S*treptococcus mutans*. 2. *Dorstenia asaroides*. 3. Anticariogenic activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma representativo do protocolo de obtenção das frações orgânicas (hexânica, acetato e clorofórmica), a partir do extrato bruto dos rizomas de *D. asaroides* Hook. 16

Figura 2. Representação esquemática do método utilizado para a enumeração de *S. mutans* em lâminas de vidro e de aço Inoxidável. . 21

Figura 3. Linhagem de células de fibroblastos de camundongo – L929 em monocamada com aumento de 40x em microscópio invertido (Vidal, 2007)..... 23

Figura 4. Perfil cromatográfico da fração **FrH** obtido em cromatógrafo CG/MS, utilizando coluna capilar DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). 29

Figura 5. Perfil cromatográfico da fração **FrA** obtido em cromatógrafo CG/MS, utilizando coluna capilar DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). 30

Figura 6. Perfil cromatográfico da fração **FrC** obtido em cromatógrafo CG/MS, utilizando coluna capilar DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). 31

Figura 7. Fotografia da microplaca de cultura de *S. mutans* e legenda da figura. As fileiras de A – C da microplaca constituem culturas bacterianas inoculadas com diluições da fração hexânica (**FrH**) do extrato dos rizomas de *D. asaroides* Hook. A fileira D é constituída de controle da cultura de *S. mutans*. A fileira E é constituída de cultura de *S. mutans* incubada com diluições seriadas de digluconato de clorexidina (**CHX**), (controle positivo). A fileira F é constituída de controle de esterilidade do caldo de cultura BHI acrescido de 1% de glucose..... 34

Figura 8. Fotografia da microplaca de cultura de *S. mutans* e legenda da figura. As fileiras de A – C da microplaca constituem culturas bacterianas inoculadas com diluições da fração acetato de etila (**FrA**) do extrato dos rizomas de *D. asaroides* Hook. A fileira D é constituída de controle da cultura de *S. mutans.* A fileira E é constituída de cultura de *S. mutans* incubada com diluições seriadas de digluconato de clorexidina (**CHX**), (controle positivo). A fileira F é constituída de controle de esterilidade do caldo de cultura BHI acrescido de 1% de glucose. 35

Figura 9. Fotografia da microplaca de cultura de *S. mutans* e legenda da figura. As fileiras de A – C da microplaca constituem culturas bacterianas inoculadas com diluições da fração clorofórmica (**FrC**) do extrato dos rizomas de *D. asaroides* Hook. A fileira D é constituída de controle da cultura de *S. mutans.* A fileira E é constituída de cultura de *S. mutans* incubada com diluições seriadas digluconato de clorexidina (**CHX**), (controle positivo). A fileira F é constituída de controle de esterilidade do caldo de cultura BHI acrescido de 1% de glucose. 36

Figura 10. Representação gráfica da queda do pH do meio de suspensão bacteriana (*S. mutans*) tratadas com diferentes concentrações da fração **FrH** do extrato de rizomas de *D. asaroides* Hook. A diminuição do pH ocorre em resposta à produção de ácidos resultante do consumo e metabolização do substrato. 39

Figura 11. Inibição do potencial acidogênico da fração **FrH** paras as concentrações avaliadas. **CP**: controle positivo - digluconato de clorexidina na concentração igual a 0,06% (v/v). 39

Figura 12. Representação gráfica da queda do pH do meio de suspensão bacteriana (*S. mutans*) tratadas com diferentes concentrações da fração **FrA** do extrato de rizomas de *D. asaroides* Hook. A diminuição do pH ocorre em resposta à produção de ácidos resultante do consumo e metabolização do substrato. 40

Figura 13. Inibição do potencial acidogênico da fração **FrA** paras as concentrações avaliadas. **CP**: controle positivo - digluconato de clorexidina na concentração igual a 0,06% (v/v). 40

Figura 14. Representação gráfica da queda do pH do meio de suspensão bacteriana (*S. mutans*) tratadas com diferentes concentrações da fração **FrC** do extrato dos rizomas de *D. asaroides* Hook. A diminuição do pH ocorre em resposta à produção de ácidos resultante do consumo e metabolização do substrato. 41

Figura 15. Inibição do potencial acidogênico da fração **FrC** paras as concentrações avaliadas. **CP**: controle positivo - digluconato de clorexidina na concentração igual a 0,06% (v/v). 41

Figura 16. Formação de biofilme por *S. mutans,* em lâminas de vidro, inoculados em caldo BHI acrescido de 1% (p/v) de glucose, incubados a 37ºC sob agitação e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em ágar BHI acrescido de 1% (p/v) de glucose. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos (n=3) e os respectivos desvios padrões 43

Figura 17. Formação de biofilme por *S. mutans,* em lâminas de aço inoxidável, inoculados em caldo BHI acrescido de 1% (p/v) de glucose, incubados a 37ºC sob agitação e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em ágar BHI acrescido de 1% (p/v) de glucose. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos (n=3) e os respectivos desvios padrões. 43

Figura 18. Populações de *S. mutans* aderidas às lâminas de vidro determinada pelo método de semeadura em placa após tratamento do biofilme com diferentes concentrações da fração **FrH** obtida do extrato de rizomas de *D. asaroides* Hook. **B12:** Biofilme de *S. mutans* formado após 12 horas de incubação em caldo BHI acrescido de 1% (p/v) de glucose. * Diferença estatística em relação ao controle - **B12** ($p<0,05$). 47

Figura 19. Populações de *S. mutans* aderidas às lâminas de vidro determinada pelo método de semeadura em placa após tratamento do biofilme com diferentes concentrações da fração **FrA** obtida do extrato de rizomas de *D. asaroides* Hook. **B12:** Biofilme de *S. mutans* formado após 12 horas de incubação em caldo BHI acrescido de 1% (p/v) de glucose. * Diferença estatística em relação ao controle - **B12** (p<0,05). 47

Figura 20. Populações de *S. mutans* aderidas às lâminas de vidro determinada pelo método de semeadura em placa após tratamento do biofilme com diferentes concentrações da fração **FrC** obtida do extrato de rizomas de *D. asaroides* Hook. **B12:** Biofilme de *S. mutans* formado após 12 horas de incubação em caldo BHI acrescido de 1% (p/v) de glucose. * Diferença estatística em relação ao controle - **B12** (p<0,05). 48

Figura 21. Teste de MTT. (A) Citotoxicidade da fração hexânica. (B) Citotoxicidade da fração clorofórmica. (C) Citotoxicidade da fração acetato. 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Solução de Dulbecco MEM (DMEM) 24

Tabela 2. Solução de PBS 25

Tabela 3. Esquema da microplaca de cultivo dos fibroblastos L929 utilizada para cada fração. 26

Tabela 4. Discriminação do tempo de retenção e substâncias identificadas por CG-MS obtidas nas frações **FrH**, **FrA** e **FrC** do extrato de rizomas de *D. asaroides* Hook. 28

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de tabelas vi

1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Cárie 1
1.2. *Streptococcus mutans* e fatores cariogênicos 2
1.2.1. Biofilme dental: caracterização e formação 3
1.2.2. Interações moleculares na aderência de *Streptococcus mutans* 5
1.2.3. Glucosiltransferases e proteínas ligantes de glucanas 5
1.2.4. Metabolização de carboidratos por *Streptococcus mutans* 6
1.2.5. Caráter acidúrico de *Streptococcus mutans* 8
1.3. Desmineralização do esmalte dental 8
1.4. Cárie, prevenção e controle 9
1.4.1. Os produtos naturais na prevenção da cárie dental 10

2. OBJETIVOS 13
2.1. Objetivo geral 13
2.2. Objetivos específicos 13

3. MATERIAL E MÉTODOS 14
3.1. Origem e conservação das cepas 14
3.2. Obtenção dos rizomas 14
3.2.1. Obtenção de extratos 14
3.2.1.1. Extrato bruto 14
3.2.1.2. Fração hexânica 14
3.2.1.3. Fração acetato 15
3.2.1.4. Fração clorofórmica 15
3.3. Análise fitoquímica 16
3.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das frações orgânicas dos extratos do rizoma de *D. asaroides* Hook. sobre a multiplicação de *S. mutans in vitro* 17

3.5. Avaliação do efeito das frações dos extratos do rizoma de *D. asaroides* Hook. sobre o potencial acidogênico de *S. mutans in vitro* 18

3.6. Avaliação da formação de biofilmes por culturas puras de *S. mutans* 19

3.7. Controle do biofilme de *S. mutans* 22

3.8. Avaliação da citotoxicidade das frações hexânica, clorofórmica e acetato de *D. asaroides* Hook. através do método de redução do tetrazolium (MTT) 22

3.8.1 Cultura de células e condições de cultivo dos fibroblastos L929..... 22

3.8.2. Avaliação da citotoxicidade (MTT) 25

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 27

4.1 Análise fitoquímica 27

4.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das frações dos extratos do rizoma de *D. asaroides* Hook. sobre a multiplicação de *S. mutans in vitro* 32

4.3. Avaliação do efeito das frações orgânicas do extratos do rizoma de *D. asaroides* Hook. sobre o potencial acidogênico de *S. mutans in vitro*..... 38

4.4. Avaliação da formação de biofilmes por culturas puras de *S. mutans* 42

4.5. Controle do biofilme formado por *S. mutans* 45

4.6. Avaliação da citotoxicidade das frações hexânica, clorofórmica e acetato de *D. asaroides* Hook. através do método de redução do tetrazolium (MTT) 49

5. CONCLUSÕES 51

REFERÊNCIAS..... 52

APËNDICE..... 62

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cárie

A cárie dental é uma doença infecciosa, multifatorial, com elevada prevalência em humanos e relacionada com os hábitos alimentares, principalmente o consumo de açúcar, presença de bactérias cariogênicas e higiene oral (BOWEN, 2002).

A literatura tem mostrado que bactérias do gênero *Streptococcus* são predominantes no biofilme dental supragengival, constituindo os colonizadores primários dos dentes recentemente limpos. Dentre as diversas espécies de estreptococos orais que se desenvolvem em diferentes regiões da cavidade bucal, a espécie *Streptococcus mutans* está consistentemente associada ao biofilme dental cariogênico sendo frequentemente isolado das lesões (HAMADA e SLADE, 1980; LOESCHE, 1986; YOO et al., 2007; PEREIRA et al., 2010; GUAN et al., 2011).

A manifestação clínica da lesão é caracterizada por uma erosão ou desmineralização do tecido dentário provocada por ácidos, principalmente o ácido lático, produzido através da fermentação de carboidratos por micro-organismos presentes no biofilme bacteriano que se forma na superfície dos dentes (MARSH, 1999).

Segundo Keyes (1962), o desenvolvimento da cárie depende da interação de três fatores: O hospedeiro (anatomia dos dentes), a microbiota constituinte do biofilme dental e a dieta alimentar. Entretanto, em 1988 Newbrun enfatizou que o processo de desmineralização é lento e progressivo e, portanto, sugeriu a inclusão de um quarto fator, o tempo. Os quatro fatores juntos são denominados fatores essenciais à formação da lesão da cárie, ou fatores primários. Há, ainda, os fatores secundários relacionados com as características da saliva (WEYNE, 1992), como o fluxo salivar e seus constituintes (KRASSE 1988).

Estudos realizados tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento têm enfatizado o surgimento precoce de cárie dental na população infantil em idade pré-escolar e o aumento da prevalência de cárie com o aumento da idade. Os estudos também sugerem que *S. mutans* compromete a dentição primária (BOWEN, 2002). Bowen (2002) alerta que a elevada prevalência da cárie é um problema de saúde pública que tem sido ignorado e enfatiza a necessidade de

novas pesquisas que possam atentar para esta freqüente doença que continua afetando pessoas em todo mundo.

Considerando o presente perfil da população brasileira quanto à saúde bucal percebemos a necessidade de medidas de tratamento e, principalmente, de prevenção da cárie, com o desenvolvimento de novas e contínuas pesquisas nesta área, em busca de novos fármacos com boa ação terapêutica e com efeitos colaterais pouco significativos.

1.2. *Streptococcus mutans* e fatores cariogênicos

Streptococcus mutans são cocos gram-positivos alfa-hemolíticos (causam lise parcial das hemácias) e anaeróbios facultativos. A elevada prevalência na cavidade oral está relacionada com o elevado consumo de açúcar combinado com a diminuição do pH (OLIVEIRA et al., 2004).

Streptococcus são predominantes no biofilme dental supragengival e constitui os colonizadores primários dos dentes recentemente limpos. A espécie *S. mutans* está consistentemente associada ao biofilme dental cariogênico e tem sido apontada como agente causal primário ou iniciador da cárie dental em seres humanos (HAMADA e SLADE, 1980, LOESCHE, 1986; HAMADA et al., 1984; RAMBERG et al., 2003; OGAWA et al., 2011).

A lesão cariosa iniciada por *S. mutans* depende da associação de vários fatores de virulência que incluem: (i) aderência inicial à superfície dos dentes por meio de glicoproteínas de adesão, (ii) capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares insolúveis, por meio de enzimas glucosiltransferases (GTFs), o que promove o acúmulo e permanência do micro-organismo nas superfícies dos dentes, (iii) alta capacidade para catabolizar carboidratos e produzir ácidos que desmineralizam o esmalte dental e, (iv) habilidade para multiplicar e dar continuidade à metabolização de carboidratos em baixo pH (BURNE, 1998; KURAMITSU, 1993, BANAS, 2004, EGUCHI et al., 2011).

Os fatores de virulência cariogênicos podem estar relacionados com características genéticas das cepas de *S. mutans*. Determinantes genéticos podem interferir na habilidade de sobrevivência e persistência destas bactérias na cavidade bucal influenciando em sua capacidade de resposta às alterações das condições ambientais locais como, redução na disponibilidade de nutrientes e redução do pH

devido à exposição dos ácidos orgânicos (DOBRINDT e HACKER, 2001; NASCIMENTO et al., 2004).

Klein et al. (2004) realizaram estudos empregando métodos fenotípicos/genotípicos para investigar as fontes de infecção de *S. mutans* e concluíram que a mãe foi a principal fonte de infecção, transmitindo para as crianças tanto *S. mutans* quanto *S. sobrinus* (e a saliva foi o principal veículo de transmissão). Neste mesmo estudo foram detectados genótipos que não foram encontrados nas mães e em outros membros da família indicando a existência de outras fontes de contaminação para estes micro-organismos. Outros aspectos também podem ser relacionados à variabilidade na transmissão como, susceptibilidade de cada criança, incluindo o período definido como janela imunológica, presença de hiperplasia do esmalte, consumo de sacarose, ação de fatores não específicos da saliva e sistema imune da mucosa bucal (LI et al., 2004).

1.2.1. Biofilme dental: caracterização e formação

A placa dental é exemplo comum de biofilme bacteriano e está relacionado à cárie dentária e a doenças periodontais (CHÁVEZ DE PAZ et al., 2011). O biofilme dental é constituído por micro-organismos aderidos à superfície dos dentes e a tecidos gengivais em diferentes sítios da cavidade bucal. Na adesão inicial, ocorrem interações moleculares entre adesinas e receptores que é fortalecida pela produção de polissacarídeos extracelulares. É uma estrutura altamente organizada e metabolicamente complexa, caracterizada como uma película incolor e não mineralizada, composta por diversas espécies bacterianas, sustentadas por uma matriz de produtos salivares, polissacarídeos, células descamadas, leucócitos e restos alimentares (MARSH e BRADSHAW, 1997).

Estudos de caracterização química e microbiológica do biofilme dental revelaram que aproximadamente 20% de sua massa seca é composta por carboidratos (BOWEN et al., 1977; CURY et al., 1992). As células microbianas podem constituir 60 a 70% da massa do biofilme, com contagem entre 10^5 a 10^{11} micro-organismos por grama (RAMBERG et al., 2003).

A primeira etapa de formação do biofilme envolve o processo de adesão e/ou adsorção de espécies bacterianas da cavidade oral à película salivar ou película adquirida que reveste a superfície dos dentes (YAO et al., 2003). Neste processo

ocorrem interações específicas de proteínas, especialmente glicoproteínas salivares, que funcionam como receptores para proteínas presentes na parede celular bacteriana, as adesinas. Esta primeira etapa é reversível. A etapa seguinte está relacionada ao acúmulo de *S. mutans* através da sua multiplicação e produção de glucanas extracelulares, envolvendo ainda, diferentes processos de interação, coaderência e coagregação com outros micro-organismos bucais (GIBBONS; NYGAARD, 1968, GONÇALVES; PEREIRA, 2003).

O biofilme proporciona melhores condições de sobrevivência da colônia bacteriana em ambientes instáveis, por proporcionar uma série de vantagens, tais como, melhorar a comunicação entre as células por estabelecer continuidade entre elas, facilitar as reações bioquímicas, melhorar a proliferação e acesso a recursos que não poderiam ser utilizados por células isoladas, além da defesa coletiva contra fatores antagônicos (LEITÃO, et al., 2001). Apesar disso, o biofilme dental produz benefícios ao seu hospedeiro, uma vez que contribui para a defesa da cavidade bucal reduzindo o risco de infecções por micro-organismos patogênicos, através da competição mais efetiva por nutrientes e sítios aos quais as bactérias possam aderir e, também, pela criação de condições não favoráveis para o crescimento de espécies invasoras. Os micro-organismos presentes no biofilme dental constituem uma comunidade relativamente estável com inúmeras espécies que variam de um sítio para outro e coexistem através de interações metabólicas altamente relacionadas (SMITH; PIPPIN, 1998).

No biofilme dental existe, portanto, um equilíbrio dinâmico e a lesão de cárie ocorre quando o equilíbrio do processo físico-químico de remineralização é quebrado, alterando a composição e as atividades metabólicas desta complexa comunidade (BURNE, 1998).

A fermentação de carboidratos por bactérias que colonizam o biofilme dental causa flutuações no pH do meio, causando a desmineralização do esmalte dental (PANDIT et al., 2011). Deste modo, o biofilme dental é considerado a primeira evidência clínica da cárie, pois esta doença resulta da interação entre as bactérias fermentadoras de carboidratos que colonizam a superfície dos dentes com os constituintes da dieta alimentar, sobretudo a sacarose (VACCA-SMITH et al., 2000).

A presença primária de *S. mutans* em biofilmes dentais é um fator de virulência importante para sua persistência e cariogenicidade, sendo este campo de estudo promissor para o tratamento e prevenção da cárie.

1.2.2. Interações moleculares na aderência de *Streptococcus mutans*

A aderência do patógeno à célula do hospedeiro é considerada uma etapa inicial crítica (YOUNSON; KELLY, 2004). A aderência inicial de *S. mutans* à superfície dos dentes é mediada por uma adesina expressa na superfície da bactéria. Há na literatura diversos nomes para molécula de adesão, como antígeno estreptocócico (AS I/II), antígeno B, P1 ou Pac. AS I/II é codificada por uma família de genes que codificam proteínas de superfície em estreptococos orais. Sua propriedade de facilitar o processo de adesão foi comprovada em estudos que empregaram cepas mutantes de *S. mutans* deficientes para esta adesina. Nestes estudos foi empregada hidroxiapatita coberta com saliva como estrutura que mimetiza a superfície dos dentes, simulando a adesão *in vitro* por estes micro-organismos. Os resultados obtidos apresentaram adesão diminuída por estes mutantes, comprovando a importância de AS I/II na etapa inicial de aderência (YOUNSON; KELLY, 2004).

Outra proteína de superfície envolvida na formação do biofilme por *S. mutans* é a proteína ligante de glucanas (Plg) que desempenha papel importante na adesão e patogênese pelo micro-organismo. *Streptococcus mutans* produzem no mínimo quatro proteínas ligantes de glucana (LpgA, LpgB, LpgC, LpgD) sendo LpgC a mais importante por contribuir diretamente para a cariogenicidade de *S. mutans* (BISWAS, DRAKE e BISWAS, 2007).

1.2.3. Glucosiltransferases e proteínas ligantes de glucanas

As glucanas constituem a maior parte dos polissacarídeos extracelulares sintetizados por *S. mutans*. São geralmente produzidas a partir da sacarose pela ação de pelo menos três enzimas glucosiltransferases (GTFs). 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 α-(1-6) e α-(1-4) formando os polissacarídeos denominados glucanas. Devido à especificidade das GTFs para a sacarose estas não catalisam a polimerização de glucose livre ou glucose proveniente de outros dissacarídeos (ZERO, 2004). Estas glucanas conferem ao *S. mutans* a capacidade de aderir às superfícies lisas dos dentes e

formar a matriz do biofilme dental, onde outros micro-organismos também poderão se acumular (LOESCHE, 1986; BISWAS, DRAKE, BISWAS, 2007).

Os diferentes tipos de GTFs produzem glucanas distintas quanto à solubilidade (glucanas solúveis ou insolúveis). A GTF-S sintetiza glucana solúveis enquanto as enzimas GTF-I e GTF-SI sintetizam glucanas insolúveis. Estas últimas são componentes importantes no biofilme já que facilitam a adesão celular e o acúmulo de biofilmes estáveis, mediado por proteínas ligantes de glucanas (BISWAS, DRAKE, BISWAS, 2007). Deste modo, a produção destas glucanas modifica as propriedades físico-químicas do biofilme dental, com menor concentração de cálcio, fósforo e fluoreto (CURY, 1992) e aumenta a porosidade da matriz do esmalte dental favorecendo a formação de cárie (ZERO, 2004).

A matriz polissacarídica do biofilme dental, formada pela ação destas glucanas, confere proteção para cepas de *S. mutans* frente a bruscas variações de pH do meio, atuando como uma barreira protetora e reserva de nutrientes para períodos em que a disponibilidade de substratos é insuficiente (GIBBONS e NYGAARD, 1968). Entretanto várias condições de estresse podem modular a expressão das GTFs interferindo na síntese de glucanas (BISWAS, DRAKE, BISWAS, 2007).

1.2.4. Metabolização de carboidratos por *Streptococcus mutans*

Os micro-organismos intimamente relacionados com a cárie foram estudados e tiveram a produção de ácido e a capacidade de metabolização de substratos em meio ácido atribuídos como fatores cariogênicos (LOESCHE, 1986).

Bactérias presentes na cavidade oral devem sintetizar enzimas para a catabolização dos carboidratos da dieta alimentar como maltose, frutose, lactose, alcoóis de açúcar como sorbitol e manitol e, sobretudo a sacarose para conseqüente obtenção de energia a partir destes substratos (ZERO, 2004).

Segundo Loesche (1993) *S. mutans* direciona a maior parte da sacarose para geração de ATP e ácido lático através da via glicolítica bacteriana. O transporte da glucose para o citoplasma bacteriano, de modo a ser utilizada como substrato para estas reações, requer a presença de proteínas transportadoras de membrana específicas. *S. mutans* possui dois sistemas transportadores de glucose: o sistema de co-transporte de prótons ligado a permease e o sistema enzimático

fosfotransferase (HAMILTON, St. MARTIN, 1982). O sistema fosfotransferase tem alta afinidade pela glucose (constante de saturação, Ks, igual a 5,0 μmol/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 por glucose (Ks = 100,0 μmol/L), funcionando apenas quando a concentração desse substrato é alta e o pH do meio está baixo (ELLWOOD et al., 1979).

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. Para garantir o equilíbrio óxido-redutor da célula, este NADH em excesso precisa ser oxidado à NAD^+, garantindo a continuidade do processo glicolítico (CARLSSON, HAMILTON, 1994).

Em condições de aerobiose, *S. mutans* utiliza a enzima piruvato desidrogenase para converter piruvato em Acetil CoA (CARLSSON et al., 1985). Quando em anaerobiose, particularmente em condição de excesso de substrato, o piruvato é reduzido L-ácido lático, através da lactato desidrogenase. Preservando o processo óxido-redutor da célula com a oxidação de NADH a NAD^+ (IWANI e YAMADA, 1999). Nestas mesmas condições, se a disponibilidade de glucose for baixa, é acionada a via formato-liase a qual leva à formação de etanol, formato e acetato que apresenta dois ramos: (1) o ramo que leva a formação de etanol e formato, e (2) o ramo que leva a formação de acetato e formato. O ramo de formação de etanol envolve dois passos, onde duas moléculas de NADH são oxidadas a NAD^+. Em *S. mutans*, onde o Acetil CoA é convertido em acetaldeído, e então em etanol, a catalisação dessas 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 Acetil CoA é primariamente convertido em acetil fosfato, com a concomitante conversão da 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).

Condições ambientais, como pH, temperatura e tensão de O_2 podem interferir na produção de ácidos por *S. mutans*. Em meio de cultura neutro (pH 7,0) enriquecido com sacarose, *S. mutans* produz uma quantidade maior de acetato e

formato, já em pH 5,5 produzem quantidades maiores de lactato, e menores de acetato e formato (IWAMI, 1988).

Os resíduos ácidos, obtidos pela via metabólica anaeróbica de formação de carboidratos, provocam redução dos valores de pH, abaixo do pH crítico (5,5), e difundem-se através do fluido do biofilme até a superfície do esmalte dental, provocando sua dissolução por alterar a composição de cálcio, fosfato e fluoretos, num processo denominado desmineralização (LEMOS et al., 2005).

1.2.5. Caráter acidúrico de *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans possui um sistema de transdução de sinal que garante a sua sobrevivência no biofilme dental. O componente regulador deste 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., 2004). Estas condições foram estudadas por Hamilton e Svensater (1998). Estes autores demonstraram que, quando se expõe uma cepa de *S. mutans,* comumente mantida a pH 7,5, ao pH 5,5 ocorre alteração na sua produção protéica, originando 36 proteínas ácido-reguladoras. Esse fato permitiu aumentar o potencial acidúrico do micro-oganismo, elevando assim, a sua resistência aos ácidos presentes no meio.

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 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, REYNOLDS, 1996).

De modo geral, o caráter acidúrico de *S. mutans* deve-se a estes mecanismos que o protege do acúmulo de intermediários da via glicolítica no citoplasma (HAMILTON, 1994).

1.3. Desmineralização do esmalte dental

A cárie dental deve ser considerada como um processo dinâmico e dependente das condições da interface biofilme dental – esmalte – dentina, em que a concentração de íons hidrogênio e íons de compostos inorgânicos presentes no

biofilme estabelecem condições de supersaturação ou subsaturação que favorecem, respectivamente, a remineralização ou desmineralização do esmalte dental (CURY, 1992). Quando o processo de desmineralização se sobrepõe a remineralização, por longo período, tem-se como resultado a perda gradual de minerais do dente, originando a formação de uma cavidade reversível (AOBA, 2004).

Os contínuos processos de desmineralização e remineralização aos quais os dentes são expostos no ambiente oral podem sofrer interferência pelas constantes mudanças na composição do biofilme (GAO et al., 2001). Não somente a composição do biofilme dental, mas também a dieta, a concentração de íons fluoreto na saliva e no esmalte dental e a viscosidade da secreção salivar, podem influenciar na magnitude das flutuações de pH, e conseqüentemente selecionar uma microbiota resistente a esta variação. Deste modo, esta microbiota será capaz de reagir ao estresse nutricional, interferindo também no equilíbrio do processo cíclico de desmineralização e remineralização, ocasionado uma lesão cariosa (FEJERSKOV, 1997).

Leitão (2005) ressalta que a dieta humana é constituída freqüentemente por altas proporções de carboidratos fermentáveis, logo, os métodos para prevenção e controle da cárie estão direcionados, direta ou indiretamente, à modificação da atividade do biofilme dental para estados compatíveis com a saúde. Assim, o estabelecimento de medidas que se interponham a qualquer uma das propriedades bacterianas previamente discutidas pode resultar na prevenção da cárie.

1.4. Cárie, prevenção e controle

A prevenção e o controle na formação do biofilme bacteriano são as medidas mais importantes para se manter a saúde oral (VALDEVITE, 2007).

Axelsson (1976) demonstrou em seus estudos que a escovação e o uso de fio dental para remoção mecânica do biofilme é um meio seguro e eficaz, quando realizados regularmente. Entretanto, estudos têm mostrado a dificuldade de reduzir *S. mutans* de fissuras e das superfícies proximais dos dentes apenas com o uso destes mecanismos. Neste contexto, encontram-se os agentes químicos como coadjuvantes da higienização bucal necessários para o controle eficaz do biofilme. Os mecanismos de ação destes agentes são diversos, podendo interferir na adesão bacteriana à superfície do dente, prevenir a proliferação microbiana, remover o

biofilme pré-existente, ou ainda, alterar a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis que é um mecanismo particularmente importante na aderência bacteriana (RIBEIRO, BUSSADORI, 2000).

Segundo Almeida (2001), dentre os agentes antimicrobianos usados atualmente no controle da cárie o mais eficaz é a clorexidina, uma bisbiguanida catiônica. A clorexidina é um composto químico sintético com molécula simétrica, consistindo de dois anéis 4-clorofenil e dois grupos biguanida conectados por uma cadeia de hexametileno central (1,1'-hexametilenobis[5'(*p*-clorofenil) biguanida]). Este composto pode apresentar-se na forma de diversos sais, como o gluconato, digluconato, acetato e hidrocloridrato, sendo o digluconato mais indicado, por ter maior solubilidade em água e em pH fisiológico, dissociando-se para liberar o componente catiônico. A apresentação na forma de colutório é aceita pelo Food and Drug Administration (FDA - USA) para redução da inflamação gengival, sendo o enxaguatório antimicrobiano mais estudado. No entanto, apresenta efeitos adversos como manchamento dos dentes e língua, acúmulo de cálculo dentário, alteração do paladar e descamação da mucosa oral (TORRES et al., 2000).

Apesar dos novos antibióticos desenvolvidos pelas indústrias farmacêuticas e químicas, nos últimos anos, cada vez mais tem sido observado um aumento da resistência das bactérias às drogas usadas para fins terapêuticos. Este fato tem levado pesquisadores de diversas áreas a buscar alternativas em produtos naturais empregados na medicina popular de diversas regiões do mundo (WU-YUAN et al., 1990; OOSHIMA et al., 2000; LEITÃO et al., 2004; LEITÃO et al., 2005).

1.4.1. Os produtos naturais na prevenção da cárie dental

Os produtos naturais representam uma excelente fonte de novos fármacos (HARVEY, 2000), sendo que cerca de 60 a 80% de novos antibióticos e de novas drogas antitumorais aprovadas pelo FDA e entidades similares de outros países, são produtos naturais ou seus derivados. Neste contexto, encontra-se a diversidade química dos derivados de produtos naturais que podem ser cada vez mais relevantes para o futuro da descoberta de novas drogas (HARVEY, 2000).

As plantas medicinais representam recursos terapêuticos importantes. Os fitoterápicos exibem ampla abrangência de utilização incluindo, sobretudo a saúde bucal. Os princípios ativos de plantas, utilizadas em enxaguatórios bucais, têm sido

avaliados quanto a eficácia contra gengivite, e os resultados sugerem que podem auxiliar como adjuvante no tratamento e profilaxia das doenças periodontais (CORDEIRO et al., 2006).

Os principais grupos de compostos com atividade biológica, extraídos de plantas incluem terpenóides e óleos essenciais, alcalóides, lectinas e polipeptídios, bem como, substâncias fenólicas e polifenóis, que são os fenóis simples, ácidos fenólicos, as quinonas, flavonóides, taninos e cumarinas (VALDEVITE, 2007).

Produtos farmacêuticos a base de extrato vegetal são promissores visto as vantagens oferecidas, como ausência de efeitos colaterais e baixo custo de produção, fatores estes de fundamental importância para o seu uso e aplicação. Entre as propriedades farmacológicas citadas tem-se a antimicrobiana, anti-inflamatória e citostáticas, entre outras (WU-YUAN et al., 1990; OOSHIMA et al., 2000; ITO et al., 2003).

As possibilidades de aplicação de produtos naturais são citadas tanto na indústria quanto na odontologia, apresentando atividade frente a várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Alguns produtos já foram reportados como novos candidatos a substâncias anticariogênicas por inibir o crescimento de *S. mutans* ou pela inibição de glucosiltransferases. Porém, pela elevada prevalência da cárie é evidente que estes agentes não são suficientemente efetivos, indicando a necessidade do desenvolvimento de novos agentes preventivos para cárie dental (VALDEVITE, 2007).

Os produtos naturais fazem parte de um campo de investigação com infinito potencial, sendo especialmente, importante em países com grande biodiversidade, como Brasil (CORDEIRO et al., 2006).

Neste contexto encontra-se o gênero *Dorstenia* pertencente a família Moraceae e conhecido popularmente como caapiá ou carapiá. Apesar da escassez de dados sobre o gênero *Dorstenia* sabe-se que todas as espécies são dotadas de propriedades medicinais como atividade analgésica e/ou antiinflamatória, atividade antileishmania, atividade antioxidante, atividade citotóxica, atividade giardicida, efeitos antihipertensivos e diminuição nos níveis de colesterol e insulina (BALESTRIN et al., 2008).

Espécies de *Dorstenia* apresentam rizomas com odor adocicado sugestivo de figo e indicativo da presença de furanocumarinas (BAUER, NOLL, 1986). Estudos

fitoquímicos relativos ao gênero *Dorstenia* identificaram cumarinas prenil e geranil substituídas, chalconas, flavonas e flavanonas (ABEGAZ et al., 2004),

A espécie *D. asaroides* Hook. foi minimamente investigada, não havendo relatos de estudos fitoquímicos e/ou de atividade biológica para essa espécie.

Sendo assim, a proposta deste estudo, foi realizar a caracterização de compostos químicos, atividade antimicrobiana e potencial anticariogênico das frações do extrato do rizoma de *Dorstenia asaroides* Hook. sobre *S. mutans* ATCC 25175.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar o efeito *in vitro* das frações orgânicas de extratos de rizomas de *Dorstenia asaroides* Hook. sobre fatores cariogênicos de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

2.2. Objetivos específicos

- Obter frações orgânicas dos extratos de rizomas de *D. asaroides* Hook. para caracterização fitoquímica e realização de testes *in vitro* relacionados aos principais fatores cariogênicos de *S. mutans* ATCC 25175.

- Estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) das frações estudadas sobre o crescimento de *S. mutans* ATCC 25175.

- Avaliar o efeito *in vitro* das frações sobre o consumo de carboidratos e produção de ácidos orgânicos por *S. mutans* ATCC 25175.

- Induzir e caracterizar a formação de biofilme por *S. mutans* ATCC 25175 em lâminas de aço inoxidável e vidro.

- Testar as frações sobre a remoção do biofilme de *S. mutans* ATCC 25175.

- Avaliar a citotoxicidade das frações orgânicas dos extratos de rizomas de *D. asaroides* Hook.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem e conservação das cepas

A cepa de *S. mutans* ATCC 25175 foi adquirida através do Instituto André Tosello (Campinas, SP). Estas cepas foram mantidas em caldo BHI (Infusão Cérebro Coração enriquecido com glucose 1,0% (p/v) – Oxoid) acrescido de glicerol 20,0% (p/v), a -70 ºC até sua utilização.

3.2. Obtenção dos rizomas

As amostras de *D. asaroides* Hook. (carapiá) foram obtidas em seu habitat na zona rural de Rio Pardo de Minas/MG no período de janeiro a julho de 2009. Para identificação botânica da espécie vegetal, utilizou-se uma amostra com todas as partes da planta, a qual foi enviada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FFCLRP) para identificação Botânica pelo Prof. Milton Groppo Júnior e encontra-se registrada sob o número SPFR 12262.

3.2.1. Obtenção de extratos

3.2.1.1. Extrato bruto

Os rizomas de *D. asaroides* Hook., secos e triturados em micromoinho de facas foram submetidos a maceração como método de extração. Misturou-se 1.000 g para 4 L de etanol, realizando periódicas agitações durante 5 dias. Após este período o sobrenadante foi removido e rotaevaporado. O mesmo procedimento foi realizado durante 4 vezes e as amostras obtidas em cada ciclo foram concentradas e secas em estufa de ar circulante a 40 ºC.

3.2.1.2. Fração hexânica

Para obtenção da fração hexânica, 66g do resíduo do extrato bruto foram homogeneizados em 50 mL de hexano. Em seguida esta amostra foi aquecida em

banho maria a 37 ºC por 2 minutos e solubilizado em ultra-som por 15 minutos. Após a decantação da amostra, o sobrenadante foi coletado e o sedimento remanescente foi utilizado em mais duas extrações com hexano, reproduzindo este mesmo procedimento. Os sobrenadantes foram reunidos e rotaevaporados, obtendo-se a fração hexânica (**FrH**).

3.2.1.3. Fração acetato

Ao sedimento remanescente do item 3.2.1.2 foi adicionado de 50 mL de acetato de etila e solubilizado em ultra-som durante 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante, obtido por decantação, foi coletado e o procedimento de extração com acetato foi reproduzido em mais dois ciclos, utilizando o sedimento remanescente. Os sobrenadantes foram reunidos e rotaevaporados, obtendo-se a fração acetato (**FrA**).

O sedimento remanescente adquirido com esta fase foi reservado para obtenção da fração clorofórmica.

3.2.1.4. Fração clorofórmica

Para obtenção da fração clorofórmica (**FrC**), o sedimento remanescente, adquirido na extração com acetato, foi homogeneizado com clorofórmio (50 mL), realizando-se os mesmos procedimentos descritos no item 3.2.1.3 (Figura 1).

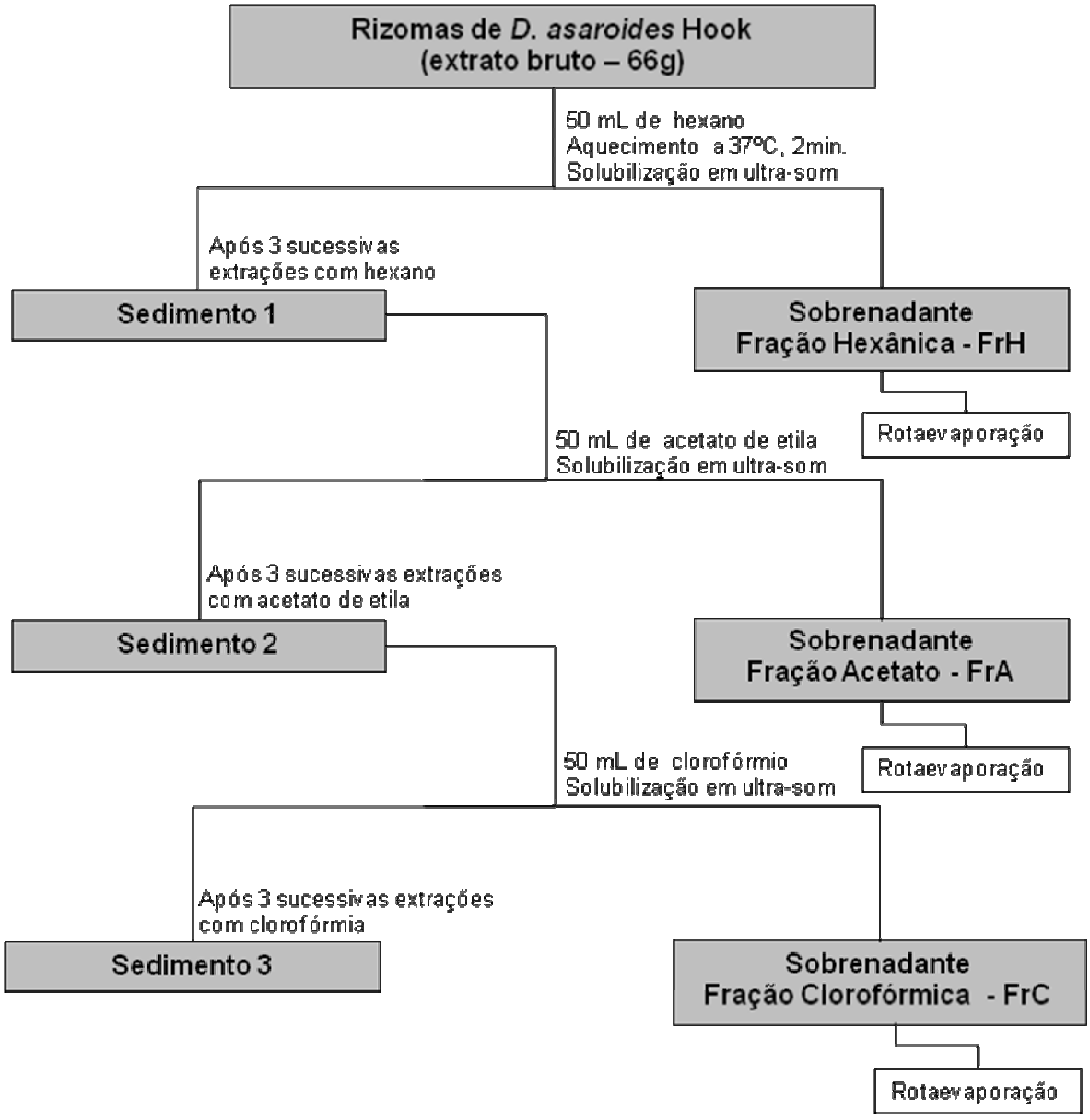


Figura 1 – Fluxograma representativo do protocolo de obtenção das frações orgânicas (hexânica, acetato e clorofórmica), a partir do extrato bruto dos rizomas de *D. asaroides* Hook.

3.3. Análise fitoquímica

As frações **FrH**, **FrA** e **FrC** foram analisadas em cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas da Shimadzu, modelo QP-2010. As análises foram realizadas utilizando-se uma coluna capilar DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), com o cromatógrafo operando nas seguintes condições: injetor (240 ºC), split 1:60, velocidade linear do gás de arraste a 36,7 cm/s, temperatura do forno iniciando a 70

ºC (3 minutos), 10 ºC por minuto até 250 ºC (10 minutos), 10 ºC por minuto até 280 ºC (25 minutos), tempo total de análise 59 minutos. Para o espectrômetro, as condições foram: temperatura da fonte de íons 250 ºC, temperatura da interface 280 ºC, sendo realizada varredura de íons no intervalo de massas 40 a 500 uma. A análise fitoquímica foi realizada no Laboratório de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP pela equipe do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes do Departamento de Física e Química.

3.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das frações orgânicas dos extratos do rizoma de *D. asaroides* Hook. sobre a multiplicação de *S. mutans in vitro*

O ensaio para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das frações dos extratos do rizoma de *D. asaroides* sobre a multiplicação de *S. mutans* foi realizado em microplacas de cultivo com 96 poços em virtude de sua sensibilidade, simplicidade de execução e rapidez devido ao maior número de amostras e concentrações que podem ser testadas em um único ensaio (ELOFF, 1998).

Soluções estoque das frações **FrH**, **FrA** e **FrC** solubilizadas em DMSO:água (1:1 v/v) foram utilizadas na preparação das diluições do teste.

Microplacas de 96 poços foram utilizadas para o ensaio, onde foram realizadas diluições seriadas das frações **FrH**, **FrA** e **FrC** em caldo BHI na faixa de concentração de 10 a 120 µg/mL. O controle positivo consistiu de uma seqüência de cavidades com diluições seriadas de digluconato de clorexidina (Sigma) na faixa de concentração de 0,5 a 120 µg/mL. Para excluir o efeito inibitório de DMSO presente nas frações, realizou-se diluições de DMSO nas mesmas proporções encontradas nas frações do extrato. Todas as cavidades contendo diluições seriadas dos extratos ou digluconato de clorexidina foram inoculadas com 10^4 UFC de *S. mutans* e incubadas a 37 ºC por 24 horas, em câmara úmida. O volume final em cada cavidade foi de 200 µL. Controles de crescimento da cultura foram preparados apenas com o meio de cultura BHI e o inóculo de *S. mutans* células de 10^4 UFC/poço.

Após o período de incubação, adicionou-se a cada cavidade 50 µL de uma solução aquosa do sal azul de tetrazólio (NBT) 0,14% (p/v) para se obter uma

concentração final de NBT igual a 0,04%. Após um breve período de incubação a 37 ºC, o crescimento de *S. mutans* foi indicado pela coloração azul do derivado de formazano produzido pela metabolização bacteriana do sal de tetrazólio (ELOFF, 1998).

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) de cada extrato foi determinada semeando-se uma alíquota de 200 μL da suspensão de cada poço em ágar BHI acrescido de 1% de glicose (p/v). A cultura foi incubada sob capnofilia a 37 ºC por 24 a 48 horas. A CBM foi estabelecida como a menor concentração do extrato que impossibilitou o crescimento bacteriano sobre o ágar (99,9% de morte celular).

3.5. Avaliação do efeito das frações dos extratos do rizoma de *D. asaroides* Hook. sobre o potencial acidogênico de *S. mutans in vitro*

Os ensaios de potencial acidogênico foram realizados segundo metodologia padronizada (LEITÃO, 2001).

Soluções estoque das frações **FrH**, **FrA** e **FrC** foram solubilizadas em DMSO:água (1:1 v/v) e utilizadas nos ensaios de potencial acidogênico.

Alíquotas de 5,0 mg de *S. mutans* armazenadas em solução de glicerol 20,0% (p/v), a –70 ºC, foram descongeladas em banho-maria a 37 ºC, por 5 minutos. Em seguida, foram centrifugadas (centrífuga Eppendorf, modelo 5810R) a 15.000 x g por 2 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células de cada alíquota foram ressuspensas cuidadosamente com o auxílio de pipeta automática em solução Tampão FC pH 6,9 (NaCl 0.865 g/L, KCl 0,625 g/L, $MgCl_2.6H_2O$ 0,125 g/L, $CaCl_2.2H_2O$ 0,072 g/L, KH_2PO_4 0,326 g/L, $K2HPO_4$ 0,803 g/L) (NAKAMOTO, 1979 modificado), contendo glucose 10,0 mmol/L como substrato. A cada suspensão bacteriana foi adicionado determinado volume (2.5 a 50 μL) das frações **FrH**, **FrA**, e **FrC** do extrato de rizomas de *D. asaroides* Hook. para se obter concentrações de teste que variaram de 0,625 mg/mL a 12,5 mg/mL. Em seguida, estas suspensões de células foram homogeneizadas, incubadas em banho-maria a 37 ºC e a elas foi introduzido um eletrodo de bulbo fino (modelo 8103, Ross (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 30 minutos. A metabolização

de glucose pelos estreptococos com conseqüente produção de compostos ácidos foi monitorada pela queda do pH do meio de suspensão, em função do tempo de incubação. O controle negativo consistiu de uma suspensão de células bacterianas tratada com Tampão FC contendo apenas o substrato (glucose 10,0 mmol/L). O controle positivo, onde a síntese de ácidos orgânicos é completamente inibida, consistiu de uma suspensão de células bacterianas tratadas com Tampão FC contendo glucose 10,0 mmol/L e digluconato de clorexidina com concentração final igual a 0,06% (v/v). O controle dos solventes foi feito por uma suspensão de células bacterianas tratadas solução Tampão FC contendo glucose 10,0 mmol/L como substrato e 10 µL a 200 µL do solvente utilizado (DMSO).

Os valores de área integrada sob a curva (AI) obtidos com as curvas de pH *versus* tempo (calculados pelo programa GraphPad Prism (versão 4.0) foram utilizados como parâmetro para a determinação da porcentagem de inibição produzida pelas amostras sobre o potencial acidogênico bacteriano. O valor de AI do controle negativo foi subtraído dos valores de AI referentes à curva do controle positivo e às curvas de pH obtidas com as amostras tratadas pelas amostras. O novo valor obtido para o controle positivo foi considerado como equivalente a 100% de inibição do potencial Os ensaios de potencial acidogênico foram realizados segundo metodologia padronizada (LEITÃO, 2001).

3.6. Avaliação da formação de biofilmes por culturas puras de *S. mutans*

O método para avaliação da formação de biofilme foi padronizado com culturas puras de *S. mutans.* Para avaliação da capacidade de formação de biofilme em lâminas de vidro e de aço inoxidável por *S. mutans* foi utilizada a metodologia descrita por Marsh et al. (2003), com modificações. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

As lâminas de vidro e de aço inoxidável (com dimensão de 7,5 x 2,5 x 0,2 cm) foram imersas em solução aquosa de dodecil sulfato de sódio a 1% e mantidas em ebulição por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram enxagüadas em isopropanol por 5 minutos para a remoção de resíduos de detergente, enxagüadas em água destilada e esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 121 ºC.

As lâminas pré-tratadas foram imersas em caldo BHI acrescido de 1% de glucose (p/v) e neste caldo foram adicionadas aproximadamente 10^5 UFC/mL de *S.*

mutans previamente reativado em caldo BHI acrescido de 1% de glucose e incubado a 37 ºC. Foi feita a enumeração de *S. mutans* aderido à superfície abiótica (15 cm^2), de acordo com a técnica descrita por Chae e Schraft (2000). Para isso, as lâminas de vidro foram amostradas em 3, 6, 9, 12 e 24 horas após a inoculação. As bactérias aderidas à superfície das lâminas de vidro foram removidas por fricção manual (100 vezes) com o auxílio de um *swab* esterilizado. A amostra assim obtida foi inoculada em um tubo de ensaio contendo 10 mL de solução salina fosfatada tamponada pH 7,0 (PBS), constituída por cloreto de sódio (0,8%), cloreto de potássio (0,020%), fosfato de sódio dibásico (0,115%), fosfato de potássio monobásico (0,020%). O tubo foi agitado vigorosamente para que as bactérias ficassem suspensas na solução tamponante. Em seguida, foram realizadas diluições decimais seriadas em PBS e o número de células foi determinado através de semeadura, em triplicata, de 0,01 mL de cada diluição em superfície de ágar BHI acrescido de 1% de glucose (Figura 2).

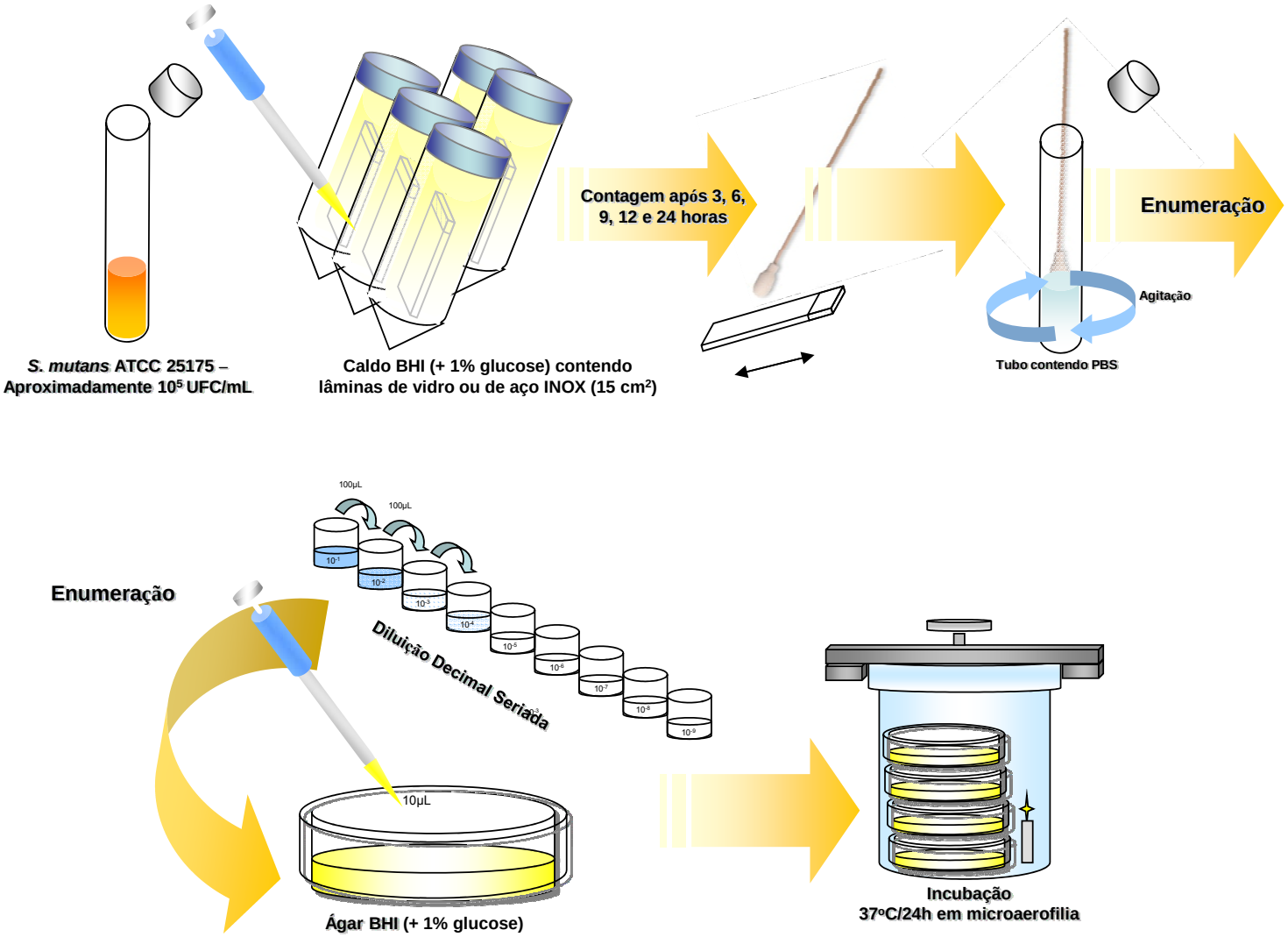


Figura 2: Representação esquemática do método utilizado para a enumeração de *S. mutans* em lâminas de vidro e de aço Inoxidável.

3.7. Controle do biofilme de *S. mutans*

Para avaliação da atividade das frações **FrH**, **FrA** e **FrC** frente às células de *S. mutans* fixadas à superfície de vidro, foi utilizada a metodologia descrita por (Marsh et al., 2003) com modificações.

Para tanto, foram obtidos biofilmes de *S. mutans* segundo descrito no item 3.6, após 12 horas de incubação.

A partir das soluções estoque das frações **FrH**, **FrA** e **FrC**, preparou-se concentrações que variaram de 1,25 a 12,5 mg/mL solubilizadas e em PBS e utilizadas nos testes de controle da formação de biofilmes.

Lâminas de vidro, contendo biofilme, foram colocadas em placas de Petri esterilizadas contendo 10 mL de cada fração nas concentrações citadas anteriormente e submetidas a agitação durante 3 minutos. Após o tratamento, as lâminas foram enxagüadas em 30 mL de PBS e, em seguida, realizou-se a determinação do número de UFC/cm^2 de S. *mutans* aderidas à superfície de vidro, de acordo com a técnica descrita anteriormente no item 3.6 (Figura 2).

3.8. Avaliação da citotoxicidade das frações hexânica, clorofórmica e acetato de *D. asaroides* Hook. através do método de redução do tetrazolium (MTT)

3.8.1 Cultura de células e condições de cultivo dos fibroblastos L929

A segurança de extratos vegetais deve ser investigada através de testes toxicológicos *in vitro* para assegurar o desenvolvimento de novos fármacos (AJAIYEOBA, et al., 2006).

Neste estudo, a citotoxicidade das frações orgânicas de *D. asaroides* foi avaliada através do método de redução do tetrazolium (MTT), utilizando-se fibroblastos da linhagem L929 (Figura 3), de tecido conectivo de camundongo, cedidas pelo Professor Dr. Auro Nomizo do laboratório de Imunologia do departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

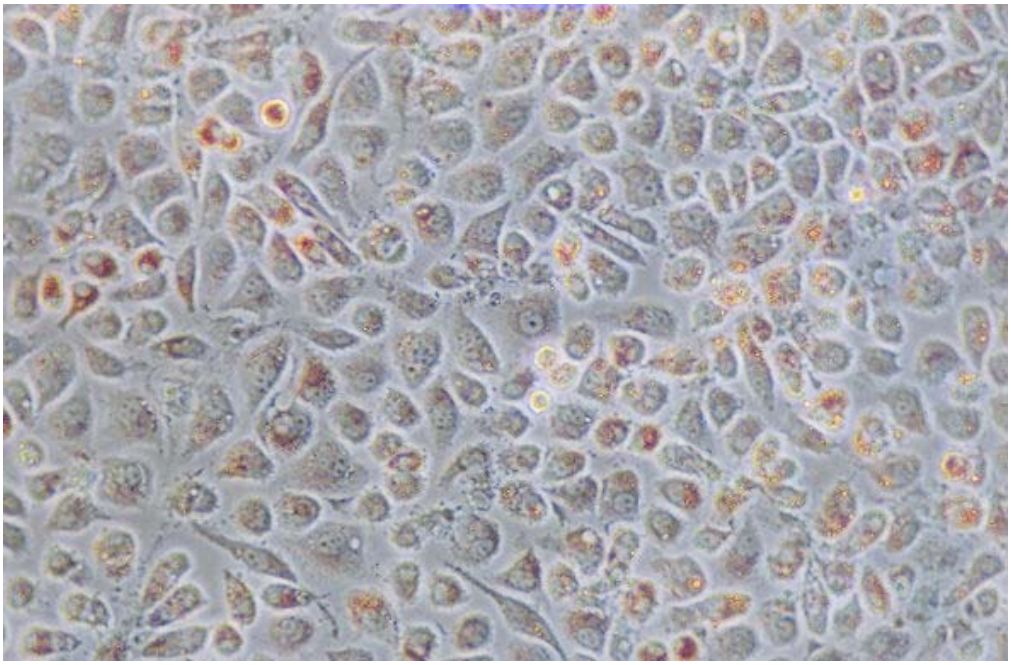


Figura 3. Linhagem de células de fibroblastos de camundongo – L929 em monocamada com aumento de 40x em microscópio invertido (Fotografia cedida por Katiana Accioly Lins Vidal).

As células foram mantidas sob congelamento em nitrogênio líquido, em uma solução de soro bovino fetal e DMSO a 10%. Antes de sua utilização as células L929 foram rapidamente descongeladas em banho maria a 37 ºC. Estas células foram cultivadas em 10 mL do meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM – GIBCO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, Campinas) e solução antibiótica-antimicótica (Sigma, EUA). A composição final do meio de cultura está descrita na tabela 1. Para obtenção do sedimento celular, a cultura foi centrifugada por 5 minutos a 200 x g a 4 ºC e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspendidas em DMEM e transferidas para garrafas de cultura. A suspensão celular obtida neste processo foi mantida em incubadora (Forma Scientific, Series II) com controle de temperatura e pressão em ambiente úmido a 37 ºC, em fluxo de 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico (ALBERTS et al., 1989).

Após atingirem o estado de confluência realizou-se o repique, removendo-se o meio de cultura e lavando as células em PBS. Para desprender as células aderidas nas paredes das garrafas de cultura as mesmas foram incubadas por 3 minutos a 37 ºC em solução de Tripsina/EDTA 0,05% (Sigma, EUA). Esta tripsinização promove a dispersão da monocamada celular pela clivagem das proteínas da matriz celular. A quantidade ideal de células para iniciar os testes foi obtida após 5 ou 6 repiques realizados após as células atingirem de 70 a 80% de confluência, mantendo assim nutrientes suficientes no meio e espaço para aderência.

Tabela 1. Solução de Dulbecco MEM (DMEM)

Sais Inorgânicos	**mg/L**	L-Treonina	95
$CaCl_2$ anidro	200	L-Triptofano	16
$Fe(NO_3)_3.9H_2O$	0,1	L-Tirosina	104
KCl	400	L-Valina	94
$MgSO_4$ anidro	97,67	**Vitaminas**	**mg/L**
NaCl	6400	Cloreto de colina	4
$NaH_2PO_4.H_2O$	125	Pantotenato de cálcio D	4
$NaHCO_3$	2200	Ácido fólico	4
Aminoácidos	**mg/L**	i-Inositol	7,2
L-Arginina.HCl	84	Nicotinamida	4
L-Cistina.2HCl	63	Piridoxina HCl	4
L-Glutamina	584	Riboflavina	0,4
Glicina	30	Tiamina HCl	4
L-Histidina.HCl.H_2O	42	**Outros Componentes**	**mg/L**
L-Isoleucina	105	D-Glicose	4500
L-Leucina	105	Piruvato de sódio	110
L-Lisina HCl	146	Vermelho de fenol	15
L-Metionina	30	Soro bovino fetal	10%
L-Fenilanina	66	Sulfato de estreptomicina	100 µg/mL
L-Serina	42	Penicilina G potássica	100 UI/mL

3.8.2. Avaliação da citotoxicidade (MTT)

As suspensões celulares de L929 em DMEM foram dispostas em microplacas de 96 poços e incubadas a 37 ºC, em atmosfera a 5% de CO_2, por 24 horas. Padronizou-se concentração igual a $1x10^5$ células por poço. Após a incubação, as células de cada poço foram lavados com 200 μL de solução PBS, cuja composição está descrita na tabela 2.

Tabela 2. Solução de PBS

Substância	Concentração
Cloreto de sódio	8 g/L
Cloreto de Potássio	0,2 g/L
Fosfato de Potássio Monobásico	1,15 g/L
	pH = 7,4

Em seguida, depositou-se 100 µL das frações orgânicas (**FrH**, **FrA** e **Frc**) na faixa de concentração de 0,003125 a 0,20 mg/mL. Esta etapa foi realizada lenta e cuidadosamente para evitar danos às células subjacentes.

Após a aplicação das frações foram acrescentados 200 μL de DMEM em cada cavidade e incubadas a 37 ºC em atmosfera com 5% de CO_2 por um período de 24 horas. Decorrido este período, desprezou-se o conteúdo de todos os poços e as células aderidas lavadas com PBS. Adicionou-se em cada poço 180 µL de DMEM sem vermelho de fenol (LGC Biotecnologia) e 20 µL de MTT (Sigma, EUA) 0,5% em PBS e incubadas novamente durante 3 horas, a 37 ^oC, em atmosfera a 5% de CO_2. Posteriormente, foram acrescentados em cada poço 50 µL de HCl 0,04 mol/L em isopropanol para solubilização do sal de formazano derivado da redução do MTT pelas células viáveis. Após 24 horas, foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro Cary 50 da Varian, em comprimento de onda igual a 545 nm.

Como controle positivo utilizou-se uma seqüência de poços com células contendo apenas o meio de cultura DMEM. As células tratadas com SDS 20% consistiram no controle negativo. O DMSO/água na proporção 1:1 foi utilizado para a formação de uma microemulsão, para que as amostras solubilizassem com maior

facilidade, por isso também tiveram sua citotoxicidade avaliada. A leitura do branco foi realizada em poços contendo apenas o meio de cultura. A Tabela 3 demonstra o esquema da montagem da microplaca de cultivo.

Tabela 3. Esquema da microplaca de cultivo dos fibroblastos L929 utilizada para cada fração.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CONTROLE CULTURA	CONTROLE CALDO	DMSO	Fração 0,2mg/mL	Fração 0,1mg/mL	Fração 0,05mg/mL	Fração 0,025mg/mL	Fração 0,0125mg/mL	Fração 0,00625mg/mL	Fração 0,003125mg/mL	SDS	BRANCO
B	CONTROLE CULTURA	CONTROLE CALDO	DMSO	Fração 0,2mg/mL	Fração 0,1mg/mL	Fração 0,05mg/mL	Fração 0,025mg/mL	Fração 0,025mg/mL	Fração 0,00625mg/mL	Fração 0,003125mg/mL	SDS	PEG + TWEEN 80
C	CONTROLE CULTURA	CONTROLE CALDO	DMSO	Fração 0,2mg/mL	Fração 0,1mg/mL	Fração 0,05mg/mL	Fração 0,025mg/mL	Fração 0,025mg/mL	Fração 0,00625mg/mL	Fração 0,003125mg/mL	SDS	PEG + TWEEN 80
D	CONTROLE CULTURA	CONTROLE CALDO	DMSO	Fração 0,2mg/mL	Fração 0,1mg/mL	Fração 0,05mg/mL	Fração 0,025mg/mL	Fração 0,025mg/mL	Fração 0,00625mg/mL	Fração 0,003125mg/mL	SDS	PEG + TWEEN 80
E	CONTROLE CULTURA	CONTROLE CALDO	DMSO	Fração 0,2mg/mL	Fração 0,1mg/mL	Fração 0,05mg/mL	Fração 0,025mg/mL	Fração 0,025mg/mL	Fração 0,00625mg/mL	Fração 0,003125mg/mL	SDS	PEG + TWEEN 80
F	CONTROLE CULTURA	CONTROLE CALDO	DMSO	Fração 0,2mg/mL	Fração 0,1mg/mL	Fração 0,05mg/mL	Fração 0,025mg/mL	Fração 0,025mg/mL	Fração 0,00625mg/mL	Fração 0,003125mg/mL	SDS	PEG + TWEEN 80
G	CONTROLE CULTURA	CONTROLE CALDO	DMSO	Fração 0,2mg/mL	Fração 0,1mg/mL	Fração 0,05mg/mL	Fração 0,025mg/mL	Fração 0,025mg/mL	Fração 0,00625mg/mL	Fração 0,003125mg/mL	SDS	PEG + TWEEN 80
H	CONTROLE CULTURA	CONTROLE CALDO	DMSO	Fração 0,2mg/mL	Fração 0,1mg/mL	Fração 0,05mg/mL	Fração 0,025mg/mL	Fração 0,025mg/mL	Fração 0,00625mg/mL	Fração 0,003125mg/mL	SDS	PEG + TWEEN 80

Neste teste, tanto a proliferação como a citotoxicidade celulares podem ser avaliadas através de um sistema de oxi-redução mitocondrial. O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium) é clivado pela desidrogenase mitocondrial das células, o que leva à formação do sal de formazano. Esta conversão ocorre apenas em células vivas e a quantidade de formazano produzida é proporcional ao número de células “funcionais” presentes. Este é um método muito útil na determinação da sobrevivência celular e correto funcionamento mitocondrial (DENIZOT, LANG, 1986).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise fitoquímica

O genêro *Dorstenia* é utilizado na medicina popular em formulações tradicionais locais, como febrífugo, emenagogo, antiofídico, tônico, analgésico, antiinflamatório, diurético, sudorífero, estimulante digestivo, entre outras enfermidades como infecções, doenças de pele, diarréia e reumatismo (PENA, 1946; LIFCHITZ, 1981; CRUZ, 1982; CACERES et al., 2001; CARDOSO et al., 2002; ABEGAZ et al., 2004; CELEGHINI et al., 2007).

O interesse de diversos pesquisadores é direcionado para a composição química das espécies brasileiras de *Dorstenia*, caracterizadas pela presença de furanocumarinas (CARDOSO et al., 2002) conferindo aos rizomas o típico odor adocicado (BAUER, NOLL, 1986). Estas plantas são conhecidas por sua capacidade de sintetizar psoraleno, bergaptana, isobergapteno, pimpinelina e isopimpinelina (CARDOSO et al., 2002).

Estudos fitoquímicos, de várias espécies de *Dorstenia,* apontam sua utilização para o tratamento de afecções cutâneas devido as propriedades das furanocumarinas, em conjunto com irradiação UV, no tratamento clínico de psoríase e vitiligo (CELEGHINI et al., 2007).

No presente estudo, as frações **FrH**, **FrA FrC** do extrato de rizomas de *D. asaroides* Hook. foram analisadas por cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

A fração **FrH,** como era esperado, revelou a presença de grande número de ácidos graxos e ou seus ésteres metílios ou etílicos, além de um esteróide, o campesterol, e triterpenos. A fração **FrA** é composta principalmente de furanocumarina e um triterpeno, já a **FrC** é composta quase que exclusivamente pelas furanocumarinas: isopsoraleno e/ou psoraleno e bergapteno (Tabela 4 e Figuras 4, 5 e 6).

Considerando a amostra como um todo, alguns picos não foram identificados devido à complexidade das frações. Levando em conta a espectrometria de massas foi possível identificar alguns componentes, principalmente com relação aos derivados de furanocumarinas. Todavia, para elucidação estrutural completa destes compostos, há a necessidade da realização de processos de purificação, bem como a utilização de técnicas espectroscópicas avançadas como RMN de ^{1}H e ^{13}C.

Quanto à presença de psoraleno e ou isopsoraleno (furanocumarinas) nas frações analisadas é necessário uma análise mais detalhada, pois os espectros de massas obtidos em nosso estudo revelam uma semelhança maior com os espectros do isopsoraleno presentes na biblioteca do que com o espectro do psoraleno.

Tabela 4. Discriminação do tempo de retenção e substâncias identificadas por CG-MS obtidas nas frações **FrH**, **FrA** e **FrC** do extrato de rizomas de *D. asaroides* Hook.

Fração	Tempo de retenção (min.)	Substância correspondente
FrH	16,38	Aldeído palmítico
	16,45	Miristato de metila
	16,45	Caproato de metila
	17,89	Isopsoraleno ou Psoraleno
	18,60	Palmitato de metila
	18,99	Ácido palmítico
	19,28	Palmitato de etila
	19,6	Eicosanoato de metila
	20,16	Bergapteno
	20,32	Oleato de metila
	20,37	Octadec-14-enoato de metila
	20,56	Estearato de metila
	20,68	9,12-octadienoato de metila
	20,73	Ácido oléico
	20,89	Linoleato de etila
	20,89	Linoleato de metila
	20,94	Oleato de etila
	20,99	Oleato de etila
	21,17	Estearato de etila
	29,32	Ácido linoléico
	38,66	ND
	43,54	Campesterol
	48,08	β-amirina
	48,08	Acetato de β-amirina
	49,5	Acetato de taraxerol
	50,07	α-amirina
	50,07	Acetato de α-amirina
	50,28	Acetato de taraxasterol
FrA	17,87	Isopsoraleno ou psoraleno
	18,6	Palmitato de metila
	19,27	Palmitato de etila
	20,14	Bergapteno
	20,26	Linoleato de metila
	20,32	Oleato de metila
	20,88	Linoletao de etila
	20,94	Oleato de etila
	38,68	ND
	53,75	β-amirina
	53,75	Acetato de β-amirina
	54,85	Acetato de taraxasterol
FrC	17,90	Isopsoraleno ou psoraleno
	20,15	Bergapteno

ND: Substância não determinada

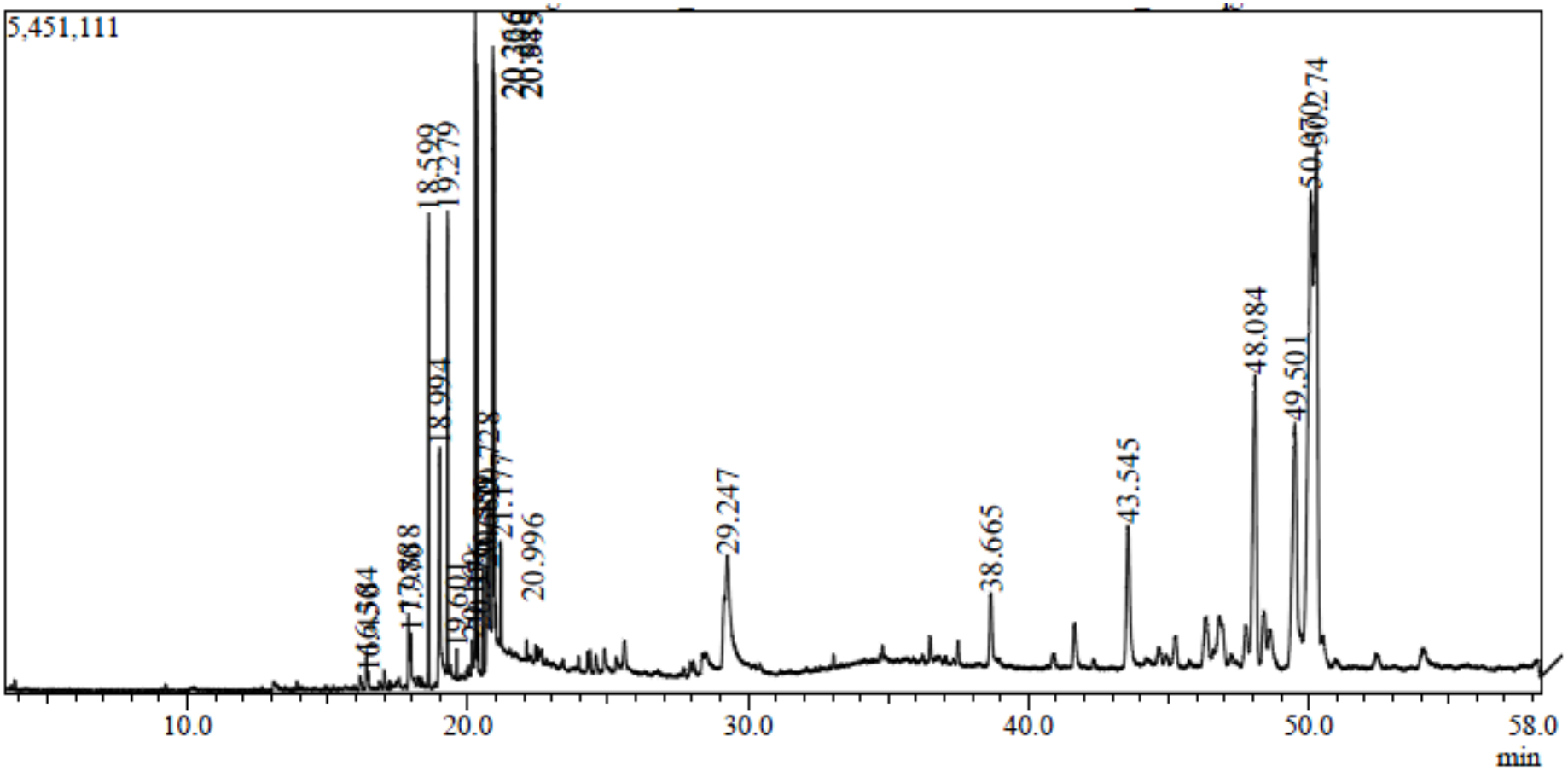


Figura 4. Perfil cromatográfico da fração **FrH** obtido em cromatógrafo CG/MS, utilizando coluna capilar DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

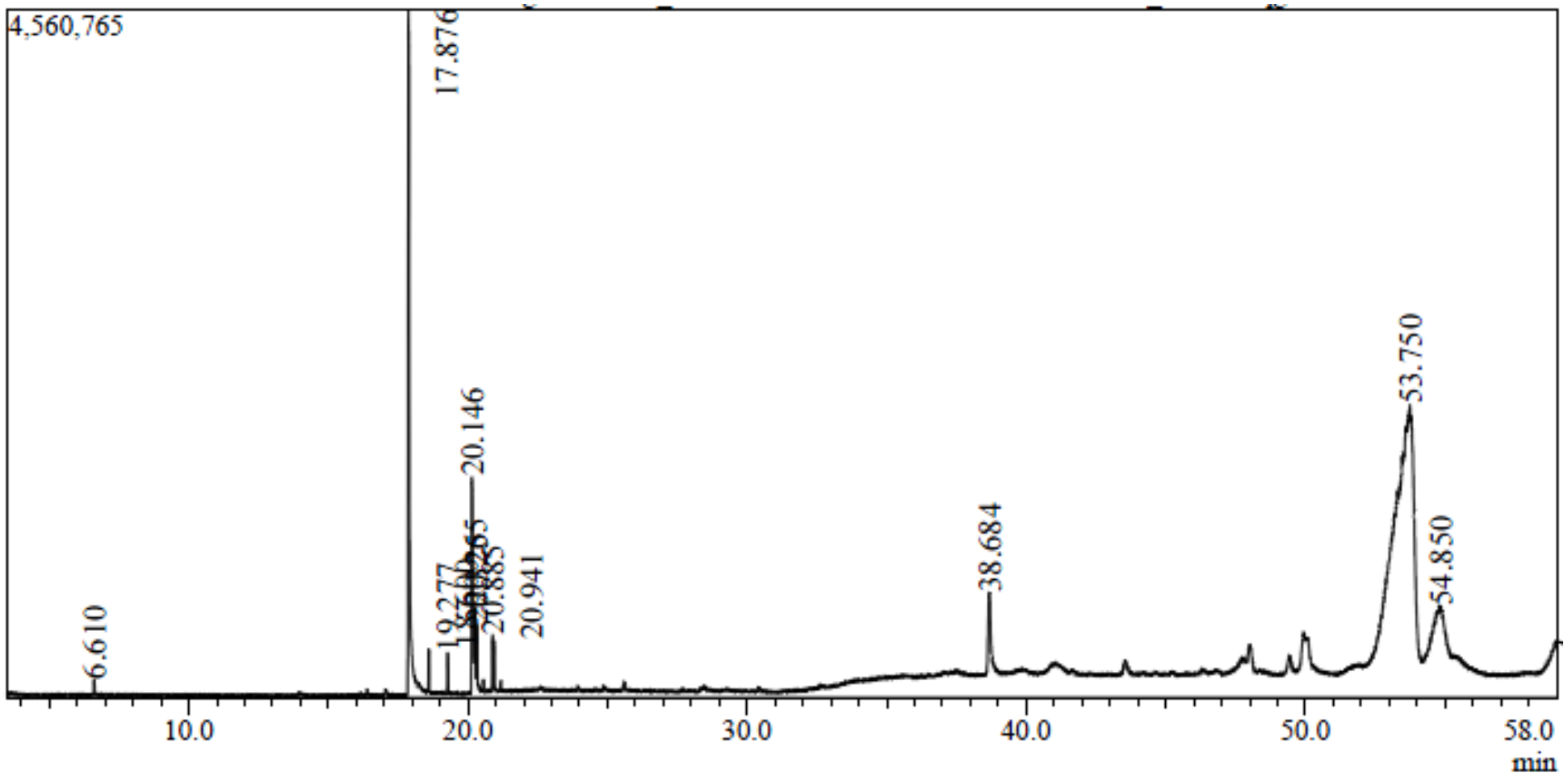


Figura 5. Perfil cromatográfico da fração **FrA** obtido em cromatógrafo CG/MS, utilizando coluna capilar DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

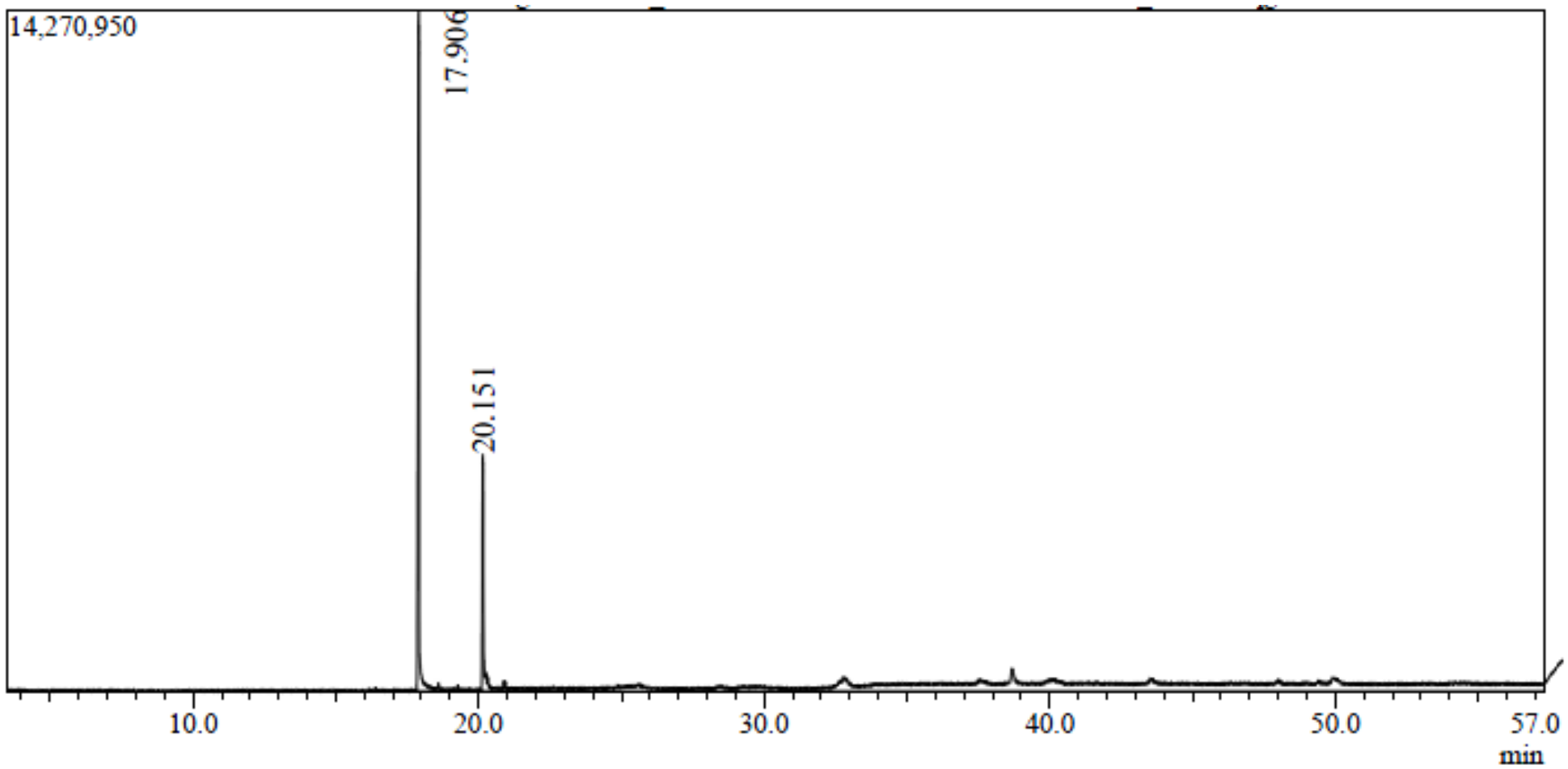


Figura 6. Perfil cromatográfico da fração **FrC** obtido em cromatógrafo CG/MS, utilizando coluna capilar DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

Cardoso et al. (2002) analisaram a composição química da furanocoumarinas na infusão e decocção várias espécies de "Carapiá" (*D. vitifolia*, *D. tubicina*, *D. asaroides*), empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação quantitativa de psoraleno, bergapteno, pimpinelina e isopimpinelina. O conteúdo da furanocoumarina revelou uma diferença insignificante entre a infusão e decocção. Psoraleno e bergaptana foram identificados em *D. tubicina* e *D. asaroides*, enquanto *D. vitifolia* apresentou somente isopimpinelina.

4.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das frações dos extratos do rizoma de *D. asaroides* Hook. sobre a multiplicação de *S. mutans in vitro*

Estudos envolvendo atividade antimicrobiana de produtos obtidos de plantas são promissores, permitindo isolamento de compostos químicos de espécies vegetais brasileiras e de outras partes do mundo, despertando o interesse da indústria farmacêutica para aqueles compostos com potente atividade antimicrobiana (YUNES, CALIXTO, 2001). Tais estudos são motivados pelo potencial antimicrobiano apresentados por extratos de plantas, óleos essenciais ou compostos isolados, como alcalóides, flavonóides, lactonas sesquiterpênicas, diterpenos, triterpenos ou naftoquinonas, entre outros (RÍOS, RECIO, 2005).

Os ensaios que buscam avaliar propriedades antimicrobianas de extratos de plantas medicinais e naturais com potencial de aplicação em odontologia envolvem avaliação da capacidade do material de inibir o crescimento de patógenos orais típicos, tais como *Streptococcus* sp. (PALOMBO, 2011).

A determinação *in vitro* da resistência ou sensibilidade de uma bactéria a uma ou várias substâncias antimicrobianas recebe a denominação de antibiograma, que pode ser utilizada ainda para a obtenção do espectro de ação de uma nova substância ou para sua dosagem biológica por meio da determinação da concentração mínima inibitória. Em qualquer uma destas situações é necessária a utilização de técnicas padronizadas e de bactérias cujo grau de sensibilidade seja estável e bem conhecido. O antibiograma pode ser realizado essencialmente por meio de duas metodologias: diluições seriadas em tubos ou placas, ou por difusão em meio sólido, através do método Kirby-Bauer. A sensibilidade de bactérias a agentes antimicrobianos é determinada, no teste de disco difusão em ágar através

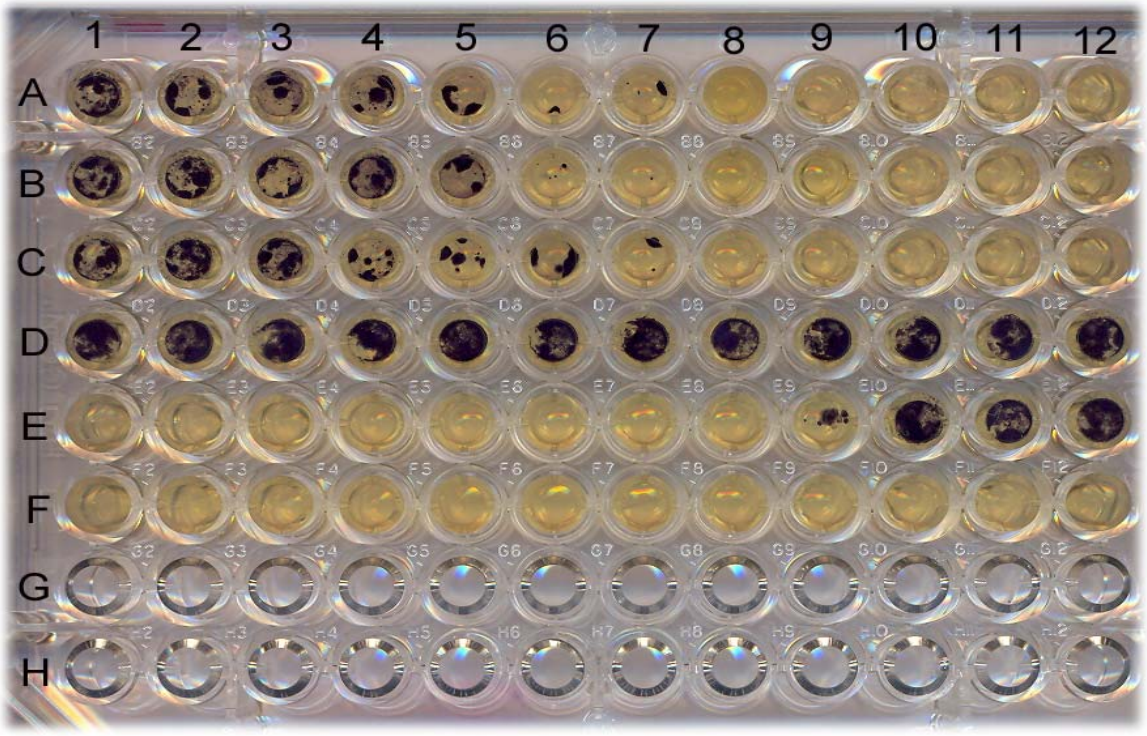
da formação de um halo de inibição de crescimento ao redor do disco contendo o agente em questão (TRABULSI e TOLEDO, 1989; PELCZAR *et al*., 1997).

Anteriormente aos ensaios de CIM, avaliou-se a atividade antimicrobiana empregando-se o teste de disco difusão em ágar, porém não foram observados halos de inibição (dados não apresentados).

É importante ressaltar que no método de disco-difusão o tamanho dos halos de inibição está relacionado com as características físico-químicas do agente antimicrobiano presente na fração, como solubilidade, carga e massa molar. Estes fatores podem interferir na difusibilidade da fração no meio, podendo gerar resultados falso-negativos, pois a difusão da fração no meio inoculado é fundamental na triagem de atividade biológica. Certas substâncias podem apresentar halos inexpressivos por difundirem muito pouco (GREENWOOD, 1989).

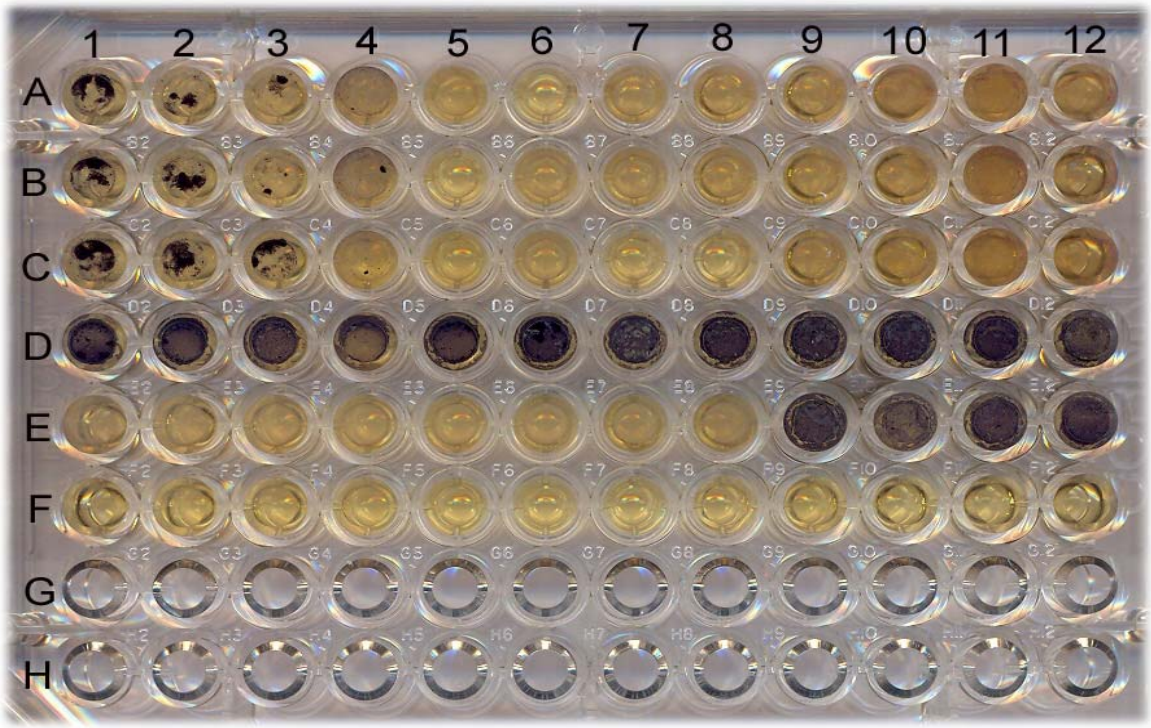
Deste modo, buscamos determinar a CIM de cada uma das frações do extrato dos rizomas de *D. asaroides* Hook. Para isso, os ensaios de sensibilidade de microdiluição em caldo foram feitos seguindo as recomendações da NCCLS (2003), por se tratar de um método de referência para testes de suscetibilidade aos antimicrobianos. Os testes foram realizados em caldo BHI acrescido de 1% de glucose contido em microplacas de 96 poços. As frações foram depositadas nos poços, seguindo a técnica de diluição em série. Foi realizado controle do caldo BHI, do micro-organismo e do DMSO. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A leitura foi realizada através da mudança de cor da solução reveladora (NBT), considerando o resultado positivo a ausência de coloração e negativo na presença de coloração azulada.

As figuras 7, 8 e 9 apresentam fotografias digitais da placa de microcultivo para a determinação da CIM das frações **FrH**, **FrA** e **FrC**. A identificação do conteúdo de cada placa apresentada nas figuras pode ser feita através de sua própria legenda.



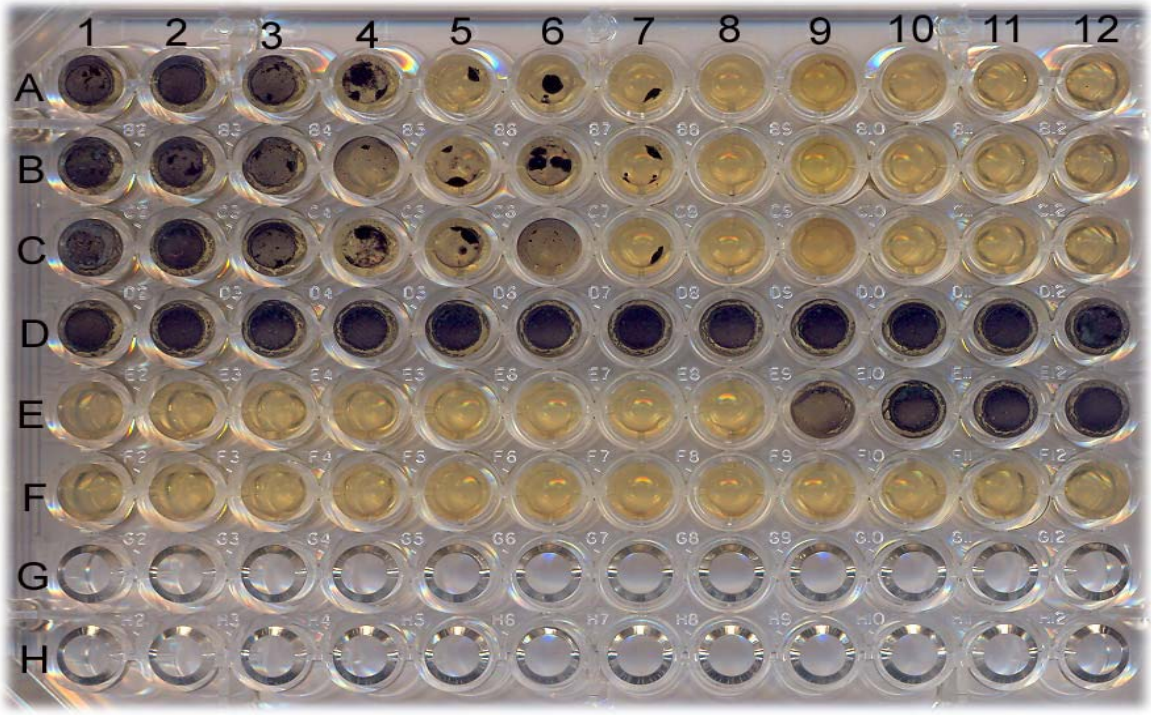
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**FrH** 10 µg/mL	**FrH** 20 µg/mL	**FrH** 30 µg/mL	**FrH** 40 µg/mL	**FrH** 50 µg/mL	**FrH** 60 µg/mL	**FrH** 70 µg/mL	**FrH** 80 µg/mL	**FrH** 90 µg/mL	**FrH** 100 µg/mL	**FrH** 110 µg/mL	**FrH** 120 µg/mL
B	**FrH** 10 µg/mL	**FrH** 20 µg/mL	**FrH** 30 µg/mL	**FrH** 40 µg/mL	**FrH** 50 µg/mL	**FrH** 60 µg/mL	**FrH** 70 µg/mL	**FrH** 80 µg/mL	**FrH** 90 µg/mL	**FrH** 100 µg/mL	**FrH** 110 µg/mL	**FrH** 120 µg/mL
C	**FrH** 10 µg/mL	**FrH** 20 µg/mL	**FrH** 30 µg/mL	**FrH** 40 µg/mL	**FrH** 50 µg/mL	**FrH** 60 µg/mL	**FrH** 70 µg/mL	**FrH** 80 µg/mL	**FrH** 90 µg/mL	**FrH** 100 µg/mL	**FrH** 110 µg/mL	**FrH** 120 µg/mL
D	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**
E	**CONTROLE Clorexidina** 120 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 60 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 30 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 15 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 7,5 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 3,75 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 1,87 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 0,93 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 0,46 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 0,23 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 0,11 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 0,05 µg/mL
F	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**
G												
H												

Figura 7. Fotografia da microplaca de cultura de *S. mutans* e legenda da figura. As fileiras de A – C da microplaca constituem culturas bacterianas inoculadas com diluições da fração hexânica (**FrH**) do extrato dos rizomas de *D. asaroides* Hook. A fileira D é constituída de controle da cultura de *S. mutans*. A fileira E é constituída de cultura de *S. mutans* incubada com diluições seriadas de digluconato de clorexidina (**CHX**), (controle positivo). A fileira F é constituída de controle de esterilidade do caldo de cultura BHI acrescido de 1% de glucose.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**FrA** 10 µg/mL	**FrA** 20 µg/mL	**FrA** 30 µg/mL	**FrA** 40 µg/mL	**FrA** 50 µg/mL	**FrA** 60 µg/mL	**FrA** 70 µg/mL	**FrA** 80 µg/mL	**FrA** 90 µg/mL	**FrA** 100 µg/mL	**FrA** 110 µg/mL	**FrA** 120 µg/mL
B	**FrA** 10 µg/mL	**FrA** 20 µg/mL	**FrA** 30 µg/mL	**FrA** 40 µg/mL	**FrA** 50 µg/mL	**FrA** 60 µg/mL	**FrA** 70 µg/mL	**FrA** 80 µg/mL	**FrA** 90 µg/mL	**FrA** 100 µg/mL	**FrA** 110 µg/mL	**FrA** 120 µg/mL
C	**FrA** 10 µg/mL	**FrA** 20 µg/mL	**FrA** 30 µg/mL	**FrA** 40 µg/mL	**FrA** 50 µg/mL	**FrA** 60 µg/mL	**FrA** 70 µg/mL	**FrA** 80 µg/mL	**FrA** 90 µg/mL	**FrA** 100 µg/mL	**FrA** 110 µg/mL	**FrA** 120 µg/mL
D	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**
E	**CONTROLE Clorexidina** 120 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 60 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 30 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 15 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 7,5 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 3,75 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 1,87 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 0,93 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 0,46 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 0,23 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 0,11 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 0,05 µg/mL
F	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**
G												
H												

Figura 8. Fotografia da microplaca de cultura de *S. mutans* e legenda da figura. As fileiras de A – C da microplaca constituem culturas bacterianas inoculadas com diluições da fração acetato de etila (**FrA**) do extrato dos rizomas de *D. asaroides* Hook. A fileira D é constituída de controle da cultura de *S. mutans.* A fileira E é constituída de cultura de *S. mutans* incubada com diluições seriadas de digluconato de clorexidina (**CHX**), (controle positivo). A fileira F é constituída de controle de esterilidade do caldo de cultura BHI acrescido de 1% de glucose.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**FrC** 10 µg/mL	**FrC** 20 µg/mL	**FrC** 30 µg/mL	**FrC** 40 µg/mL	**FrC** 50 µg/mL	**FrC** 60 µg/mL	**FrC** 70 µg/mL	**FrC** 80 µg/mL	**FrC** 90 µg/mL	**FrC** 100 µg/mL	**FrC** 110 µg/mL	**FrC** 120 µg/mL
B	**FrC** 10 µg/mL	**FrC** 20 µg/mL	**FrC** 30 µg/mL	**FrC** 40 µg/mL	**FrC** 50 µg/mL	**FrC** 60 µg/mL	**FrC** 70 µg/mL	**FrC** 80 µg/mL	**FrC** 90 µg/mL	**FrC** 100 µg/mL	**FrC** 110 µg/mL	**FrC** 120 µg/mL
C	**FrC** 10 µg/mL	**FrC** 20 µg/mL	**FrC** 30 µg/mL	**FrC** 40 µg/mL	**FrC** 50 µg/mL	**FrC** 60 µg/mL	**FrC** 70 µg/mL	**FrC** 80 µg/mL	**FrC** 90 µg/mL	**FrC** 100 µg/mL	**FrC** 110 µg/mL	**FrC** 120 µg/mL
D	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**	**CONTROLE CULTURA**
E	**CONTROLE Clorexidina** 120 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 60 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 30 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 15 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 7,5 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 3,75 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 1,87 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 0,93 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 0,46 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 0,23 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 0,11 µg/mL	**CONTROLE Clorexidina** 0,05 µg/mL
F	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**	**CONTROLE CALDO**
G												
H												

Figura 9. Fotografia da microplaca de cultura de *S. mutans* e legenda da figura. As fileiras de A – C da microplaca constituem culturas bacterianas inoculadas com diluições da fração clorofórmica (**FrC**) do extrato dos rizomas de *D. asaroides* Hook. A fileira D é constituída de controle da cultura de *S. mutans.* A fileira E é constituída de cultura de *S. mutans* incubada com diluições seriadas de digluconato de clorexidina (**CHX**), (controle positivo). A fileira F é constituída de controle de esterilidade do caldo de cultura BHI acrescido de 1% de glucose.

Os resultados dos ensaios de CIM demonstram a eficácia das frações **FrH**, **FrA** e **FrC** do extrato dos rizomas de *D. asaroides* Hook. sobre *S. mutans.* A CIM para **FrH** e **FrC** foi igual a 80 µg/mL, sendo a inibição mais expressiva relativa a **FrA** com valor de CIM igual a 50 µg/mL.

O controle positivo representado por digluconato de clorexidina apresentou CIM igual 0,93 µg/mL em todos os ensaios realizados.

A clorexidina é considerada como agente antimicrobiano de amplo espectro, ativo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SOUZA-FILHO et al., 2008). Entretanto, existe uma falta de consenso e controvérsia a respeito do papel da clorexidina na prevenção da cárie dentária entre odontólogos pesquisadores e clínicos. A falta de resultados conclusivos e de resultados clínicos favoráveis torna a clorexidina não recomendável para a prevenção da cárie, sendo atualmente o modo de tratamento disponível apenas nos E.U.A. (AUTIO-GOLD, 2008).

Os resultados obtidos com as frações **FrH**, **FrA** e **FrC** do extrato dos rizomas de *D. asaroides* Hook. mostram-se promissores, já que apresentaram potencial antimicrobiano sobre *S. mutans*, além disso, destacam-se como uma alternativa em potencial para indicações terapêuticas por plantas medicinais como método alternativo e de baixo custo na clínica odontológica.

Neste contexto, destaca-se o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que tem como um de seus objetivos inserir com segurança, eficácia e qualidade; plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à Fitoterapia no SUS. O Ministério da Saúde, por meio do Departamento de Ciência e Tecnologia (Decit) apoiou 79 projetos de pesquisa entre os anos de 2003 e 2008, priorizando a biodiversidade brasileira, onde estão contempladas plantas medicinais e fitoterápicos. Entre os projetos de pesquisa, na área de Plantas Medicinais e Fitoterápicos perpassam diversas temáticas no campo da saúde, incluindo saúde bucal (Ministério da Saúde, 2010).

Numerosos estudos *in vitro* investigaram a atividade de substâncias naturais de plantas contra bactérias orais, entretanto não há estudos antimicrobianos específicos para *D. asaroides* Hook.

Numerosas variações nos procedimentos de análise de atividade antimicrobiana são observadas na literatura, já que se pode variar a espécie microbiana envolvida, concentração do inóculo, meio de cultura, espécie vegetal, forma de obtenção de extratos e composição química das amostras empregadas.

Por essa razão, os resultados de CIM variam consideravelmente, mesmo para espécies vegetais muito próximas, tornando difícil a comparação dos valores de CIM obtidos em cada estudo.

4.3. Avaliação do efeito das frações orgânicas do extratos do rizoma de *D. asaroides* Hook. sobre o potencial acidogênico de *S. mutans in vitro*

S. mutans é o principal e mais virulento dos micro-organismos cariogênicos, devido a suas características acidogênicas e acidúricas (STAMFORD et al., 2005). Neste sentido, o consumo periódico de carboidratos induz o biofilme dental a ciclos repetitivos de desmineralização do esmalte dental devido aos ácidos produzidos a partir da glicólise bacteriana (BURNE, MARQUIS, 2000).

Deste modo, investigou-se o efeito inibitório das frações **FrH**, **FrA** e **FrC** do extrato dos rizomas de *D. asaroides* Hook. sobre a produção de ácidos por *S. mutans*.

A figura 10 apresenta as curvas pH *versus* tempo de diferentes concentrações da fração **FrH**, representando a queda do pH do meio de suspensão de *S. mutans* ao longo do período de incubação (30 minutos). A partir da figura 10, observa-se uma inibição crescente sobre o potencial acidogênico bacteriano com o aumento da concentração da **FrH**. O percentual inibitório da fração **FrH** nas concentrações com 1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL 6,25 mg/mL e 12,5 mg/mL foi de 22,26%, 55,07%, 87,5% e 100,3% respectivamente (Figura 11).

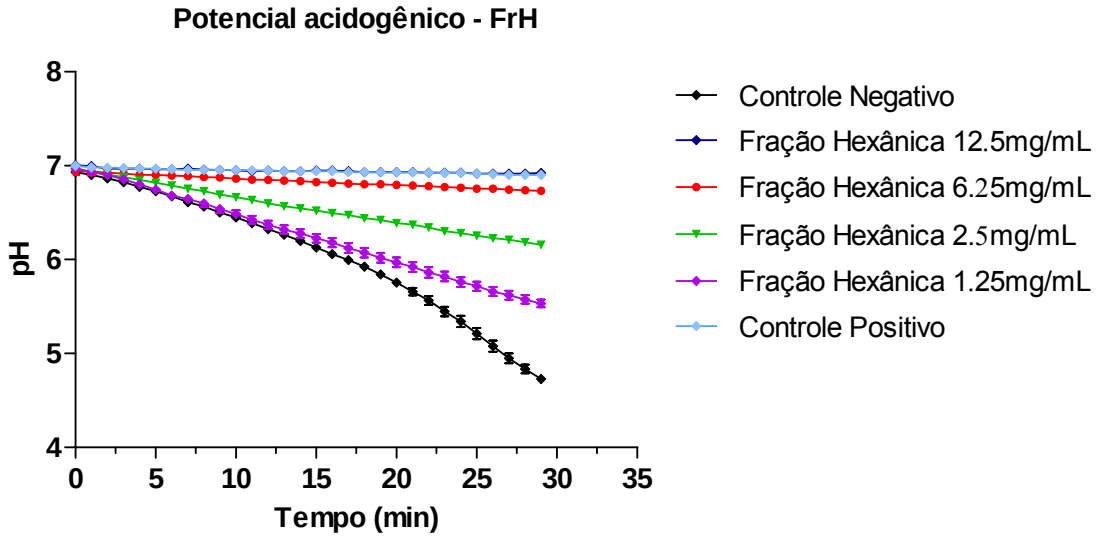


Figura 10. Representação gráfica da queda do pH do meio de suspensão bacteriana (*S. mutans*) tratadas com diferentes concentrações da fração **FrH** do extrato de rizomas de *D. asaroides* Hook. A diminuição do pH ocorre em resposta à produção de ácidos resultante do consumo e metabolização do substrato.

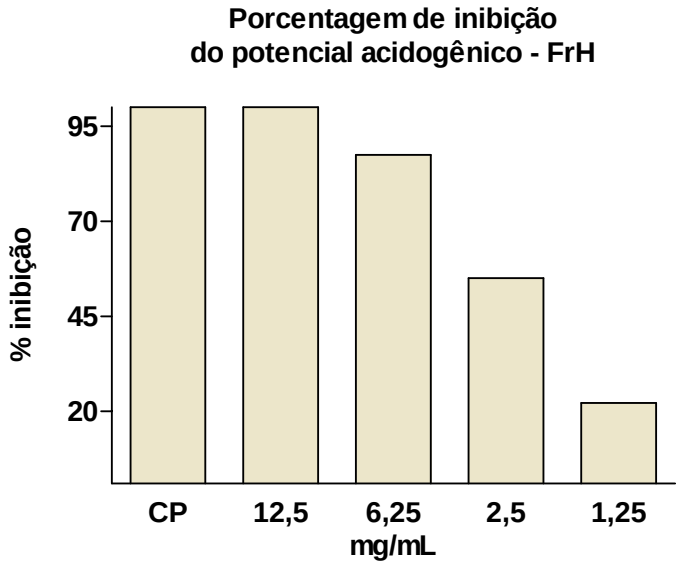


Figura 11. Inibição do potencial acidogênico da fração **FrH** paras as concentrações avaliadas. **CP**: controle positivo - digluconato de clorexidina na concentração igual a 0,06% (v/v).

A figura 12 apresenta as curvas pH *versus* tempo de diferentes concentrações da fração **FrA** do extrato dos rizomas de *D. asaroides* Hook. Inibição do potencial acidogênico com 0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL, 1,875 mg/mL, 2,5 mg/mL, 6,25 mg/mL e 12,5 mg/mL da fração acetato foi de 38,46%, 39,61%, 58,46%, 90%, 97,69% e 105,3% respectivamente (Figura 13).

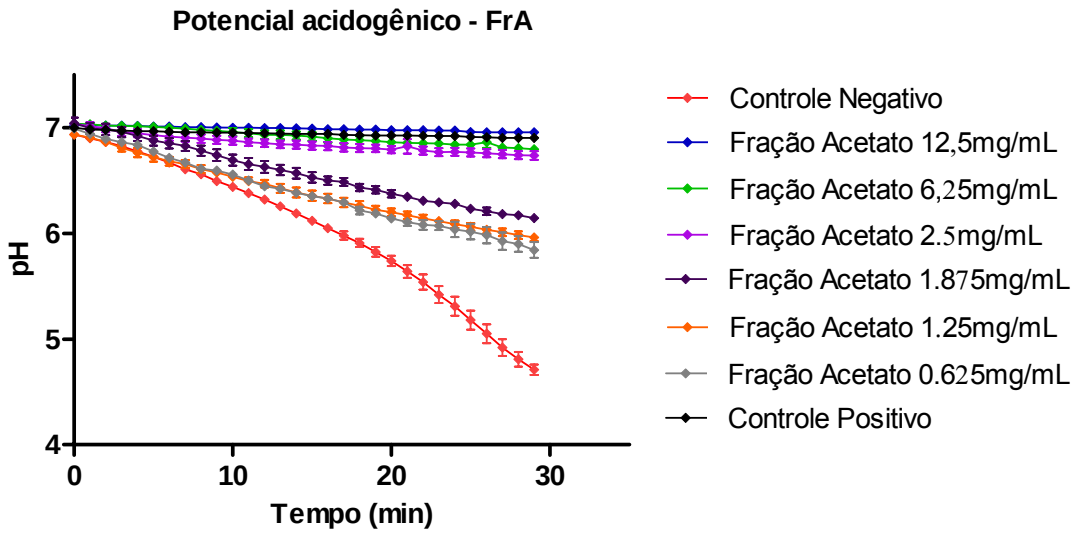


Figura 12. Representação gráfica da queda do pH do meio de suspensão bacteriana (*S. mutans*) tratadas com diferentes concentrações da fração **FrA** do extrato de rizomas de *D. asaroides* Hook. A diminuição do pH ocorre em resposta à produção de ácidos resultante do consumo e metabolização do substrato.

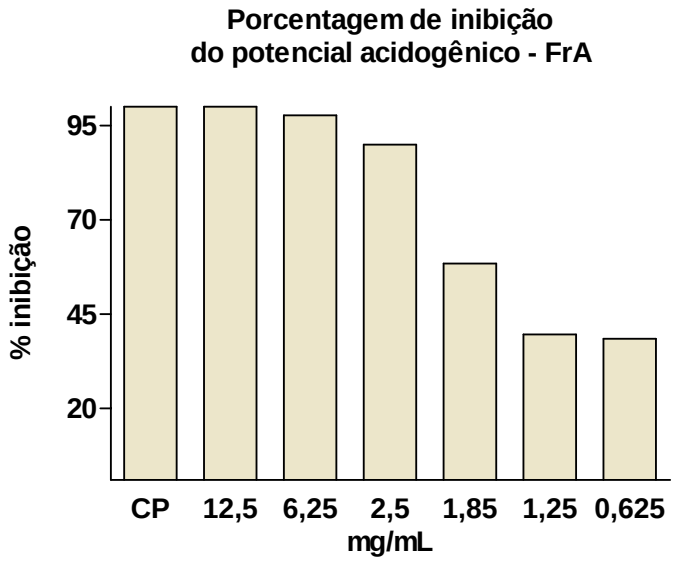


Figura 13. Inibição do potencial acidogênico da fração **FrA** paras as concentrações avaliadas. **CP**: controle positivo - digluconato de clorexidina na concentração igual a 0,06% (v/v).

A figura 14 apresenta as curvas pH *versus* tempo de diferentes concentrações da fração **FrC** do extrato dos rizomas de *D. asaroides* Hook. O percentual inibitório da fração **FrC** nas concentrações 0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL, 6,25 mg/mL e 12,5 mg/mL foi de 6,53%, 76,53%, 91,15%, 90,76% e 93,07% respectivamente (Figura 15).

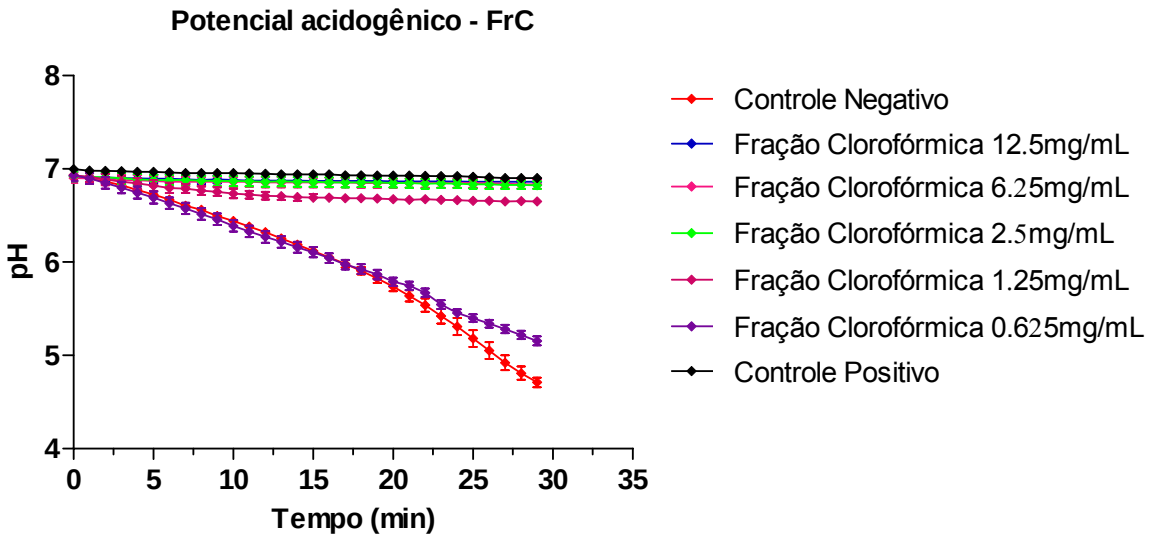


Figura 14. Representação gráfica da queda do pH do meio de suspensão bacteriana (*S. mutans*) tratadas com diferentes concentrações da fração **FrC** do extrato dos rizomas de *D. asaroides* Hook. A diminuição do pH ocorre em resposta à produção de ácidos resultante do consumo e metabolização do substrato.

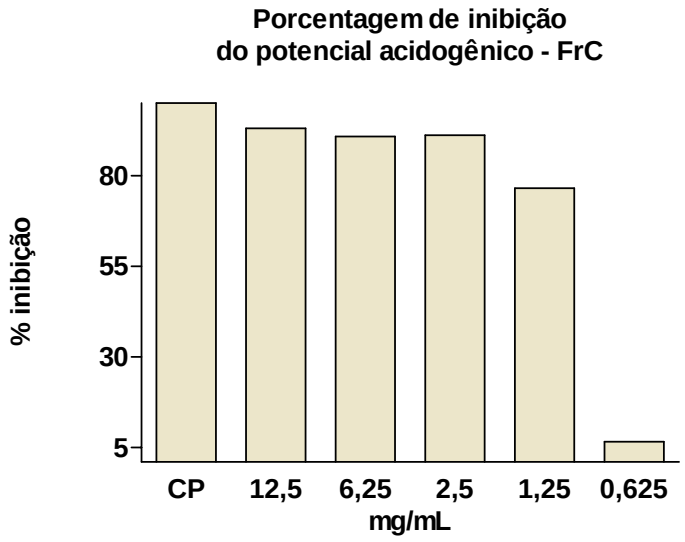


Figura 15. Inibição do potencial acidogênico da fração **FrC** paras as concentrações avaliadas. **CP**: controle positivo - digluconato de clorexidina na concentração igual a 0,06% (v/v).

Dentre as frações do extrato de *D. asaroides* Hook. testadas, as que apresentaram maior valor de inibição do potencial acidogênico foram as **FrH** e **FrA**, com 100,3 e 105,3% de inibição na concentração 12,5 mg/mL, respectivamente.

A produção de ácidos orgânicos por *S. mutans* é um fator cariogênico fundamental para o processo de desmineralização do esmalte dos dentes (BANAS, 2004; GUAN et al., 2011). Desta forma, a atividade antimicrobiana e a inibição de produção de ácidos observados em nossos resultados evidenciam o potencial anticariogênico das frações **FrH**, **FrA** e **FrC**, com aplicação promissora na prevenção e controle da cárie dental.

4.4. Avaliação da formação de biofilmes por culturas puras de *S. mutans*

Alguns micro-organismos são capazes de promover de adesão formando aglomerados bacterianos. Esta capacidade de adesão promove a formação de camadas múltiplas de bactérias denominadas biofilme, podendo apresentar associação ou não com outros micro-organismos e estar aderido a diferentes tipos de superfície, como plástico, vidro, metal entre outros materiais (DONLAN, 2002).

A placa dentária é um exemplo de biofilme bacteriano que se desenvolve sobre a superfície dos dentes, restaurações, próteses e implantes. As bactérias que o compõem produzem ácidos orgânicos, como ácido láctico, por metabolizar carboidratos, afetando o equilíbrio desmineralização/mineralização e conseqüente formação da cárie dentária (PALOMBO, 2011).

Neste estudo, buscou-se avaliar a formação de biofilme por culturas puras de *S. mutans* em lâminas de vidro e aço inoxidável, utilizando-se caldo BHI acrescido de 1% (p/v) de glucose. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Os resultados obtidos mostram que a partir de 3 horas de incubação *S. mutans* foi capaz de aderir a superfícies de vidro e aço inoxidável, aumentando suas populações ao longo do tempo de incubação. Com 9 horas de incubação enumerou-se população media de 3,41 Log de UFC/cm^2 nas lâminas de vidro e de 4,84 Log de UFC/cm^2 nas lâminas de aço inoxidável (Figuras 16 e 17).

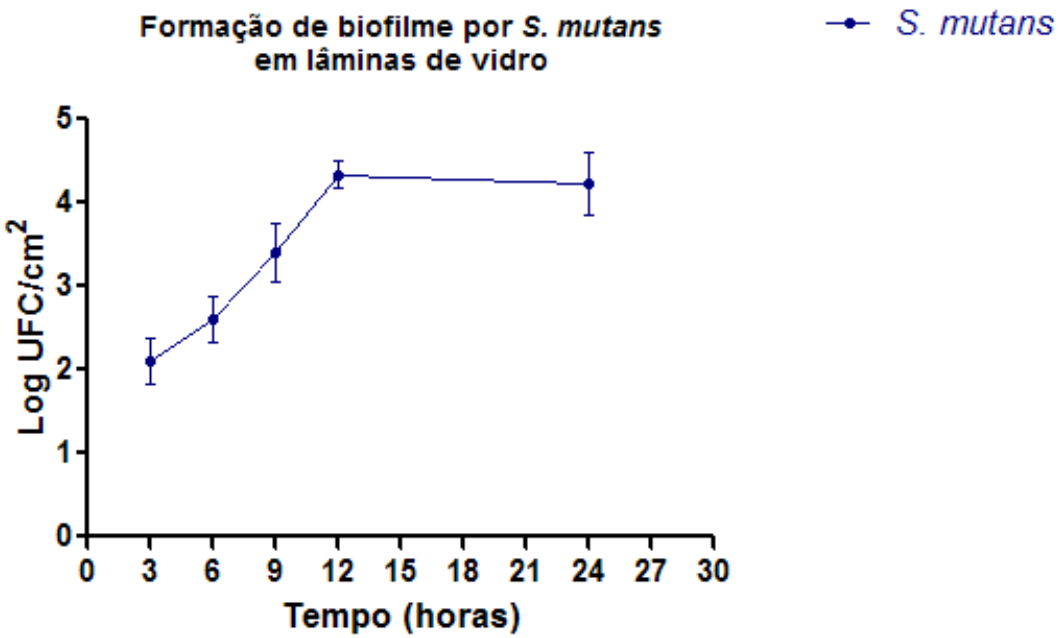


Figura 16. Formação de biofilme por *S. mutans,* em lâminas de vidro, inoculados em caldo BHI acrescido de 1% (p/v) de glucose, incubados a 37 ºC sob agitação e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em ágar BHI acrescido de 1% (p/v) de glucose. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos (n=3) e os respectivos desvios padrões.

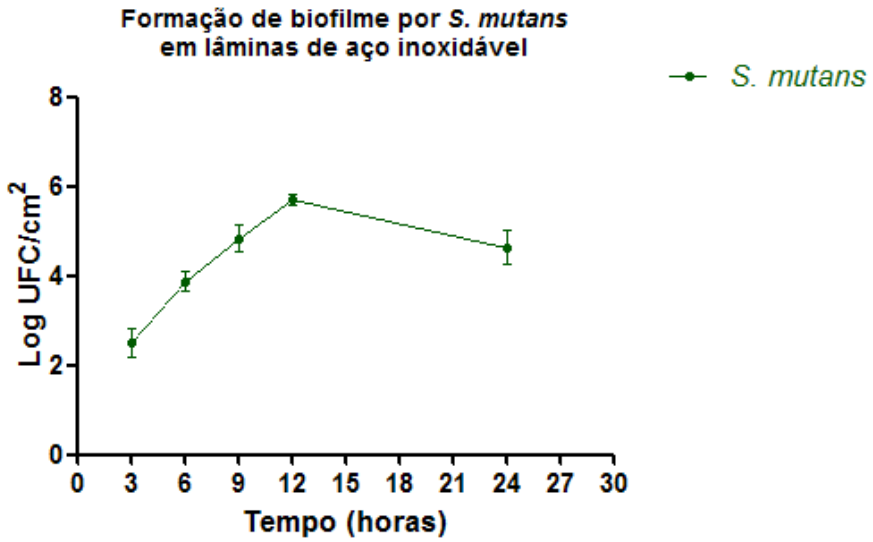


Figura 17. Formação de biofilme por *S. mutans,* em lâminas de aço inoxidável, inoculados em caldo BHI acrescido de 1% (p/v) de glucose, incubados a 37 ºC sob agitação e enumerados em diferentes intervalos de tempo por semeadura em ágar BHI acrescido de 1% (p/v) de glucose. Estão apresentadas as médias dos resultados obtidos (n=3) e os respectivos desvios padrões.

O número de células viáveis aderidas às superfícies de vidro e aço inoxidável foi ligeiramente menor com 24 horas de incubação quando comparado com os resultados de 12 horas. As populações médias obtidas em 24 horas foram de 4,24 Log de UFC/cm^2 em lâminas de vidro e de 4,64 Log UFC/cm^2 em aço inoxidável, contra 4,34 Log de UFC/cm^2 e 5,7 Log de UFC/cm^2, respectivamente, com 12 horas de incubação.

Após o processo inicial de aderência a bactéria irá se multiplicar e sobreviver somente se as condições físicas e químicas do meio forem propícias, podendo ser mais vantajoso para o micro-organismo a sua morte do que permanecer aderida em uma superfície se as condições se tornam desfavoráveis (NOOBS et al., 2009).

Características do meio, como o pH, disponibilidade de nutrientes, força iônica, e temperatura podem afetar o desempenho do micro-organismo na formação do biofilme. Diversos estudos têm demonstrado um efeito sazonal na fixação de bactérias e formação de biofilme em diferentes sistemas aquosos. Fletcher (1988) citado por Donlan (2002) descobriu que um aumento na concentração de vários cátions (sódio, cálcio. lantânio, ferro férrico) afetou a adesão de *Pseudomonas fluorescens* em superfícies de vidro, presumivelmente, afetando as forças de repulsão entre células bacterianas e a superfície de vidro. Além disso, um aumento na concentração de nutrientes correlaciona-se com um aumento no número de células aderidas (DONLAN, 2002).

Após a análise dos resultados representados nas figuras 16 e 17, buscou-se verificar as diferenças entre a formação de biofilme em superfícies de vidro e aço inoxidável. Deste modo, para a análise estatística, utilizou-se o teste t de Student não pareado, considerando na análise comparativa P significante < 0,05. O teste t demonstrou que os dois grupos são diferentes entre si. A análise das populações médias de UFC/cm^2 foram maiores nas lâminas de aço inoxidável que o relativo a lâmina de vidro.

O objetivo deste experimento foi de padronizar a formação de biofilme por *S. mutans*, a fim de estudar medidas de controle como a remoção ou inibição do micro-organismo, empregando as frações **FrH**, **FrA** e **FrC**. Deste modo, os protocolos de controle de biofilme foram padronizados com 12 horas de incubação, no qual o número de células de *S. mutans* aderidas por cm^2 é maior ou igual a 10^3 UFC aderidas por cm^2 (3,0 log de UFC por cm^2).

A superfície sólida pode apresentar várias características importantes no processo de aderência. Characklis et al. (1990) observaram que a extensão da colonização microbiana parece aumentar à medida que aumenta a rugosidade da superfície. Isso ocorre porque as forças de cisalhamento são diminuídas e a área de superfície é maior em superfícies mais ásperas.

Vários métodos têm sido utilizados para avaliar a formação de biofilme por *S. mutans*. Entre os protocolos de demonstração do biofilme encontram-se a turbidimetria, contagem de UFC, cintilografia e microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.), variando-se também os tempos de incubação, corpos de prova (BARBIERI et al., 2005), exibindo padrões de aderência diferentes dos obtidos neste trabalho.

Barbieri et al., (2007) investigaram a capacidade de aderência *in vitro* de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* em superfície dentária. Estes autores demonstraram o biofilme através de análises M.E.V. e determinação de UFC/cm^2.

Yanti et al., (2008) determinaram o efeito anti-biofilme de macelignana, isoladas de noz-moscada, na remoção de biofilme de *S. mutans*, *S. sanguis* e *Actinomyces viscosus* em placas de microtitulação. A atividade anti-biofilme de macelignana foi determinada por porcentagem de absorvância do biofilme remanescente após o tratamento com a substância.

Deng et al., (2009) avaliaram a influência de *S. mutans* na formação de biofilme por *Enterococcus faecalis* utilizando discos de hidroxiapatita como corpo de prova. O biofilme formado foi expresso por contagem de UFC nos discos. Outros autores também utilizaram discos de hidroxiapatita em seus estudos (XIAO, KOO, 2009; SHEN et al., 2010), porém analisaram o biofilme através de microscopia confocal de varredura a laser.

4.5. Controle do biofilme formado por *S. mutans*

Vários métodos têm sido utilizados para avaliar a atividade de produtos naturais na redução ou eliminação do biofilme oral. Em contraste com os métodos utilizados para investigar propriedades antimicrobianas (que envolvem a morte de bactérias de ensaio), estes métodos são utilizados para avaliar a capacidade dos produtos de evitar a adsorção ou adesão das bactérias às superfícies (fase inicial do desenvolvimento do biofilme) ou para impedir a síntese da camada de

polissacarídeos insolúveis pela atividade de glucosiltransferase das bactérias colonizadoras (na segunda e irreversível fase do desenvolvimento de biofilme) (PALOMBO, 2011).

A remoção do biofilme dental é uma medida importante para a prevenção e controle da cárie e da doença periodontal. Agentes antimicrobianos, em forma de enxaguatórios bucais, apresentam grandes vantagens no controle da placa bacteriana, pois superam as limitações dos métodos mecânicos de higiene, diminuindo o número de micro-organismos patogênicos na cavidade oral (MARINHO e ARAÚJO, 2007).

Uma abordagem para controlar a formação de biofilme oral é eliminar ou reduzir a massa de biofilme utilizando agente anti-biofilme. Há na literatura vários estudos que avaliaram atividade antibacteriana ou anticariogênica produtos naturais contra patógenos orais, mas não especificamente voltados para remover a placa bacteriana (YANTI et al., 2008).

Após a avaliação da formação de biofilme por *S. mutans,* buscou-se avaliar a capacidade das frações do extrato de rizomas de *D. asaroides* Hook. de eliminar ou reduzir o biofilme formado em lâminas de vidro. Foram utilizadas as frações **FrH**, **FrA** e **FrC** nas seguintes concentrações 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,75 mg/mL, 2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL e os experimentos realizados em triplicata.

Os resultados obtidos com estes experimentos estão apresentados nas figuras 18, 19 e 20 e mostram que o tratamento do biofilme com as frações **FrH**, **FrA** e **FrC** foram estatisticamente significantes em relação ao controle (biofilme 12 horas) nas maiores concentrações testadas, com destaque para a fração **FrA**, a qual apresentou resultados significantes para todas as concentrações. O controle positivo contendo digluconato de clorexidina na concentração de 1,2 mg/mL foi capaz de eliminar todo o biofilme presente na lâmina de vidro.

O tratamento estatístico dos dados foi realizado por análise de variância ANOVA de uma via, seguida pelo teste Dunnett para verificar diferenças entre o biofilme formado com 12 horas (controle) e os tratamentos realizados com diferentes concentrações das frações **FrH**, **FrA** e **FrC**.

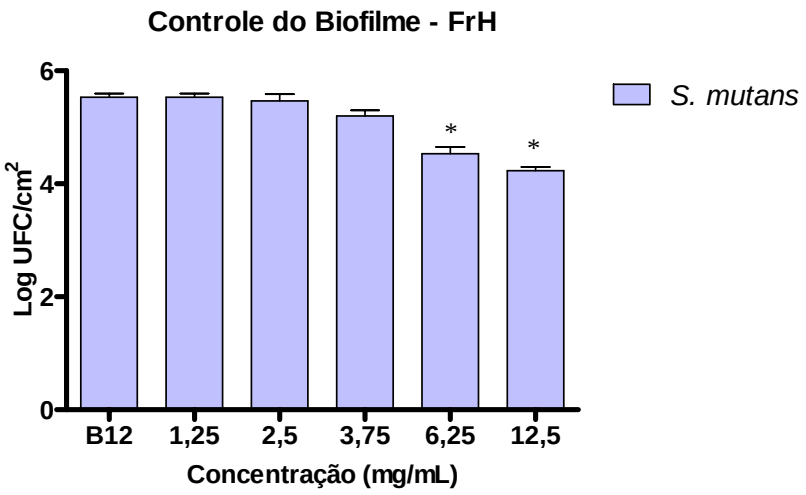


Figura 18. Populações de *S. mutans* aderidas às lâminas de vidro determinada pelo método de semeadura em placa após tratamento do biofilme com diferentes concentrações da fração **FrH** obtida do extrato de rizomas de *D. asaroides* Hook. **B12:** Biofilme de *S. mutans* formado após 12 horas de incubação em caldo BHI acrescido de 1% (p/v) de glucose. * Diferença estatística em relação ao controle - **B12** ($p<0,05$).

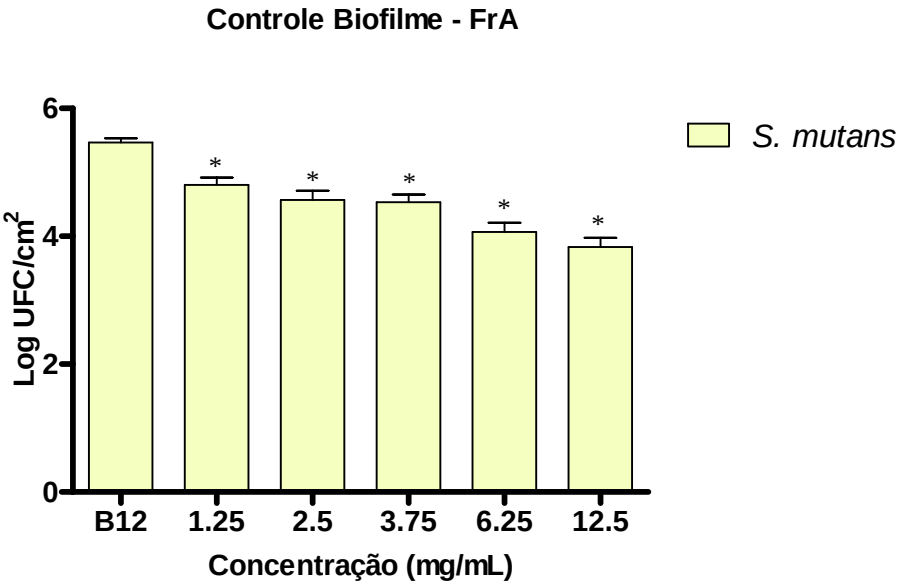


Figura 19. Populações de *S. mutans* aderidas às lâminas de vidro determinada pelo método de semeadura em placa após tratamento do biofilme com diferentes concentrações da fração **FrA** obtida do extrato de rizomas de *D. asaroides* Hook. **B12:** Biofilme de *S. mutans* formado após 12 horas de incubação em caldo BHI acrescido de 1% (p/v) de glucose. * Diferença estatística em relação ao controle - **B12** ($p<0,05$).

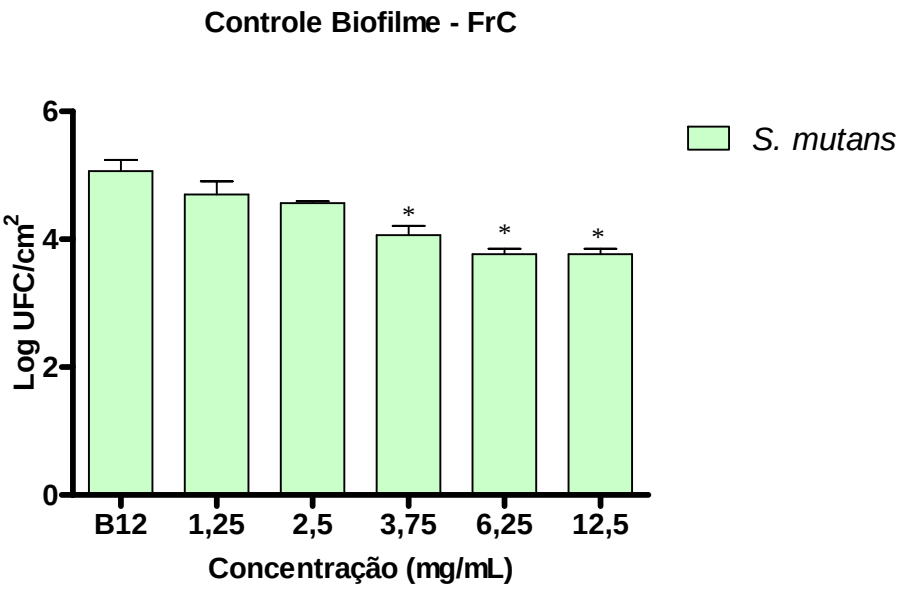


Figura 20. Populações de *S. mutans* aderidas às lâminas de vidro determinada pelo método de semeadura em placa após tratamento do biofilme com diferentes concentrações da fração **FrC** obtida do extrato de rizomas de *D. asaroides* Hook. **B12:** Biofilme de *S. mutans* formado após 12 horas de incubação em caldo BHI acrescido de 1% (p/v) de glucose. * Diferença estatística em relação ao controle - **B12** ($p<0,05$).

Vários estudos de controle de biofilme *in vitro* foram realizados empregando agentes antimicrobianos sintéticos, como o digluconato de clorexidina e triclosan (Wilson, 1996; Wilson et al., 1998; Marsh, Bradshaw, 1993). Tais agentes, considerados eficazes na remoção de placa dentária, podem resultar em alteração da cavidade oral e também o desenvolvimento de bactérias tolerantes quanto utilizados em dosagem excessiva (YANTI et al., 2008). Conseqüentemente, inúmeras substâncias químicas continuam sendo testadas, com o objetivo de inibir a formação do biofilme dental, crescimento bacteriano e adesão de micro-organismos à superfície dentária (PEREIRA et al., 2006). Entre as substâncias que merecem destaque, encontram-se os produtos de origem vegetal devido a sua potente atividade antimicrobiana contra bactérias cariogênicas, seletividade sobre estas bactérias e capacidade de inibir a síntese de glucanos pela inibição da glucosiltransferase (ALVES et al., 2008).

Plantas do gênero *Mikania* (Asteraceae) são comumente utilizadas no Brasil por causa de suas numerosas propriedades farmacológicas. Os resultados obtidos com extratos e frações de *Mikania laevigata* e *M. glomerata* mostraram inibição do crescimento de *S. mutans* (MIC = 12,5 -100 µg/mL) e de adesão de células a superfície de vidro. A fração hexânica do extrato apresentou os melhores resultados

indicando que os componentes ativos possuem características apolares (YATSUDA et al., 2005).

Yanti et al., (2008) determinaram o efeito anti-biofilme de macelignana após tratamento do biofilme de *S. mutans*, *S. sanguis* e *Actinomyces viscosus* com várias concentrações da substância (0,2, 2 e 10 mg/mL) e tempos de exposição (5, 10 e 30 minutos). Os biofilmes formados com 24 horas de crescimento tiveram redução de 30% para as células de *S. mutans*, 30% para *A. viscosus* e 38% para *S. sanguis* após o tratamento com 10 mg/mL por 5 minutos. O aumento do tempo de tratamento para 30 minutos resultou em uma redução de mais de 50% de cada um dos biofilmes.

Observa-se em nossos resultados que as frações organicas (**FrH**, **FrA**, **FrC**) do extrato de rizomas de *D. asaroides* têm mostrado considerável atividade anticariogênica. É notável seus efeitos sobre alguns fatores de virulência de *S. mutans*, incluindo a produção de ácidos e formação de biofilme. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar precisamente as propriedades das frações e seus mecanismos de ação anticariogênica, a fim de que possam ser utilizadas de acordo com a sua actividade proposta.

4.6. Avaliação da citotoxicidade das frações hexânica, clorofórmica e acetato de *D. asaroides* Hook. através do método de redução do tetrazolium (MTT)

Como mencionado anteriormente, O MTT é um indicador de atividade metabólica utilizado em ensaios de viabilidade celular. Quando convertido em produto formazano por desidrogenases citosólica e mitocondrial de células viáveis a quantidade de cor produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Na figura 21, é possível observar que a **FrH** apresentou interferência na proliferação celular, observando-se uma diminuição na viabilidade dos fibroblastos a partir de concentrações acima de 0,00625 mg/mL, já a **FrC**, em concentrações maiores que 0,025 mg/mL, houve completa interferência sobre a proliferação celular. A **FrA**, assim como a **FrH** diminuíram a viabilidade celular com 0,00625 mg/mL. Estudos preliminares demonstraram que o solvente DMSO apresentou interferência na viabilidade celular, tendo efeito anti-proliferativo na cultura de fibroblastos. Dessa forma, o efeito citotóxico observado nas concentrações mais altas das frações, pode estar relacionado com as concentrações de DMSO utilizadas, na faixa 0,5 a 25% (v/v).

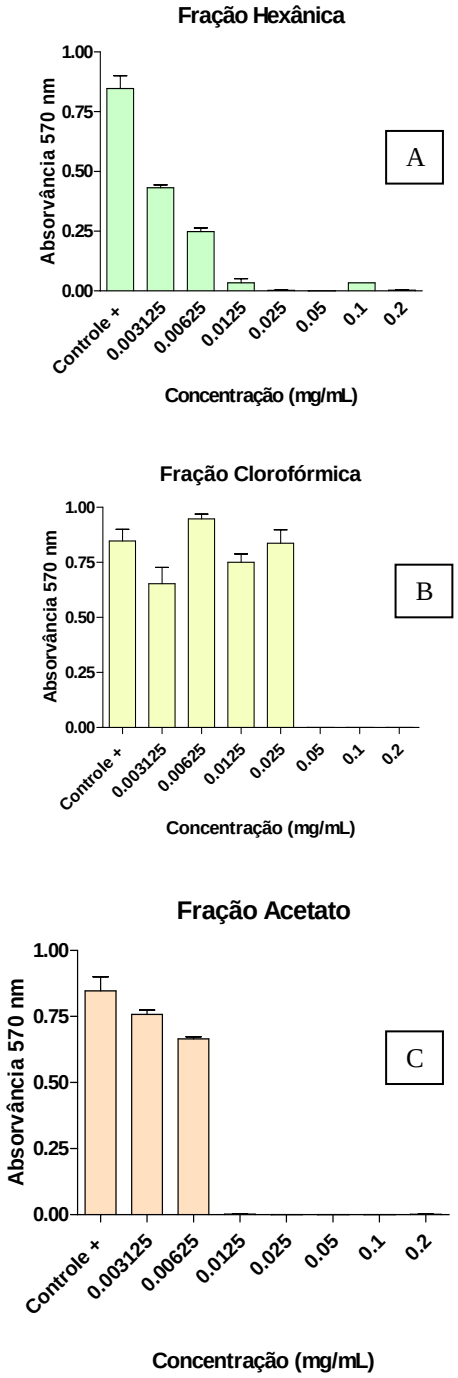


Figura 21. Teste de MTT. (A) Citotoxicidade da fração hexânica. (B) Citotoxicidade da fração clorofórmica. (C) Citotoxicidade da fração acetato.

5. CONCLUSÕES

- O perfil fitoquímico da fração **FrH** revelou grande quantidade de ácidos graxos e/ou seus ésteres metílios ou etílicos, além de um esteróide, o campesterol, e triterpenos. A fração **FrA** é composta principalmente de furanocumarina e um triterpeno, já a **FrC** é composta quase que exclusivamente pelas furanocumarinas: isopsoraleno e/ou psoraleno e bergapteno.

- As frações hexânica, acetato e clorofórmica inibiram o potencial acidogênico da *S. mutans* em perfil dose – dependente na faixa de concentração de 0,625 mg/mL a 12,5 mg/mL.

- Dentre as frações do extrato testadas, aquelas que apresentaram maior valor de inibição do potencial acidogênico foram as frações **FrH** e **FrA** com 100,3 e 105,3% de inibição na concentração 12,5 mg/mL, respectivamente.

- A CIM para **FrH** e **FrC** foi igual a 80 µg/mL, sendo a inibição mais expressiva relativa a **FrA** com valor de CIM igual a 50 µg/mL.

- Nos estudos de biofilme, verificou-se que a partir de 3 horas de incubação *S. mutans* foi capaz de aderir a superfícies de vidro e aço inoxidável, aumentando suas populações ao longo do tempo de incubação. Com 9 horas de incubação enumerou-se populações médias de 3,41 Log de UFC/cm^2 nas lâminas de vidro e de 4,84 Log de UFC/cm^2 nas lâminas de aço inoxidável.

- Os melhores resultados de controle de biofilme foram obtidos com a fração **FrA**, a qual apresentou diferenças significativas em relação ao controle.

- As frações hexânica e acetato não se mostraram citotóxicas em concentrações inferiores a 6,25 µg/mL. Já para a fração clorofórmica, não houve citotoxicidade em concentrações menores que 25 µg/mL.

REFERÊNCIAS

ABEGAZ, B. M.; NGADJUIB, B. T.; FOLEFOCB,G. N.; FOTSOB, S.; AMBASSAB, P.; BEZABIHA, M.; DONGOB, E.; RISEC, F.; PETERSENC, D. Prenylated flavonoids, monoterpenoid furanocoumarins and other constituents from the twigs of *Dorstenia elliptica* (*Moraceae*), **Phytochem**., v. 65, p. 221–226, 2004.

AJAIYEOBA, E. O.; ABIODUM, O. O.; FALADE, M. O.; OGBOLE, N. O.; ASHIDI, J. S.; HAPPI, C. T.; AKINBOYE, D. O. In vitro cytotoxicity studies of 20 plants used in Nigerian antimalarial ethnomedicine. **Phytomedicine**, v. 13, p. 295-298, 2006.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Molecular biology of the cell. New York: Plenum Press, p.123-156, 1989.

ALMEIDA, B. S. Uso de clorexedina associada com a escovação no controle da placa dentária de escolares. **Rev. Gau. Odontol.**, v. 49, p. 133-138, 2001.

ALVES, P. M.; PEREIRA, J. V.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, M. S. V.; QUEIROZ,L. M. G. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. (alecrim) sobre microrganismos cariogênicos. **Arq. Odontol.**, v, 44, p. 53-58, 2008.

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

AUTIO-GOLD, J. The role of chlorhexidine in caries prevention. **Oper. Dent.,** v. 33, p. 710-716, 2008.

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.

BALESTRIN, L.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; DALL'STELLA, D. S. G.; MIGUEL, M. D. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, p. 230-235, 2008.

BANAS, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Front. Biosci.**, v.1, p.1267-1277, 2004.

BARBIERI, D. S. V.; VICENTE, V. A.; FRAIZ, F. C.; LAVORANTI, O. J.; SVIDZINSKI, T. I. E.; PINHEIRO, R. L. Analysis of the *in vitro* adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans.* **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, p. 624-631, 2007.

BARBIERI, D. S. V. **Análise da aderência in vitro de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na superfície dentária.** 2005. 92 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

BAUER, L.; NOLL, I. B. Furanocumarinas de *Dorstenia brasiliensis* Lam. **Cad. Farm.**, v. 2, p. 163-71, 1986.

BISWAS, I.; DRAKE, L.; BISWAS, S. Regulation of gbpC expression in *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.**, v. 10, p. 6521-6531, 2007.

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

BOWEN, W. H.; VELEZ, H.; AGUILA, M.; VELASQUEZ, 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.***,* v. 56, p. 32-39, 1977.

BURNE, R. A.; MARQUIS, R. E. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 193, p. 1-6, 2000.

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

CACERES, A.; RASTELLI, L.; DE SIMONE, F.; DE MARTINO, G.; SATURNINO, C.; SATURNINO, P.; AQUINO, R. Furanocoumarins from the aerial parts of *Dorstenia contrajerva*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 376-381, 2001.

CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; BARISON, A.; HONDA, N. K. Simultaneous determination of furanocoumarins in infusions and decoction from “Carapiá” (*Dorstenia* species) by High-Performance Liquid Chromatography. **J. Agric. Food Chem**., v. 50, p. 1465-1469, 2002.

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

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

CELEGHINI, R. M. S.; YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M. Otimização das condições de extração hidroalcoólica das furanocumarinas de *Dorstenia brasiliensis* Lam. por maceração com ultra-som e análise quantitativa por CLAE/UV e fluorescência. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 9, p. 61-66, 2007.

CHAE, M. S.; SCHRAFT, H. Cell viability of *Listeria monocytogenes* in biofilms. **Food Microbiology.**, v. 18, p. 103-112, 2001.

CHARAEKLIS, W. G.; MCFETERS, G.A.; MARSHALL, K.C. **Physiological ecology in biofilm systems**. In: Charaeklis WG. Marshall KC, editors. Biofilms. New York: John Wiley & Sons; 1990. p. 341-94, Cordeiro CHG, Sacramento LVS, Corrêa MA,

CHÁVEZ DE PAZ, L. E.; RESIN, A.; HOWARD, K. A.; SUTHERLAND, D. S.; WEJSE, P. L. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on *Streptococcus mutans* biofilms. **Appl env microbiol.**, v. 77, p. 3892–3895, 2011.

CORDEIRO, C. H. G.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORRÊA, M. A.; PIZZOLITO, A. C.; BAUAB, T. M. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Rev. Bras. Cien. Farm.**, v. 42, p. 395-404, 2006.

CRUZ, C. L. Dicionário de plantas úteis do Brasil. 2ª ed. São Paulo: Civilização Brasileira, 1982. p. 173-4.

CURY, J. A. Uso do flúor. In: BARATIERI, L.N. et al. Dentística – procedimentos preventivos e restauradores. 2ed. Rio de Janeiro: Quintessence, p.42-67, 1992.

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

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods.** v. 22; p. 271-277, 1986.

DENG, D. M.; HOOGENKAMP, M. A.; EXTERKATE, R. A. M.; JIANG, L. M.; VAN DER SLUIS, L. W. M.; TEN CATE, J. M.; CRIELAARD, W. Influence of *Streptococcus mutans* on *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **J. Endodont.**, v. 35, p. 1249-1252, 2009.

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

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg. Infect. Dis.,** v. 8, p. 881-890, 2002

EGUCHI, Y.; KUBO, N.; MATSUNAGA, H.; IGARASHI, M.; UTSUMI, R. Development of an antivirulence drug against *Streptococcus mutans*: repression of biofilm formation, acid tolerance, and competence by a histidine kinase inhibitor, Walkmycin C. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, p. 1475-1484, 2011.

ELLWOOD, 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* Ingbritt grown in continuous culture. **Infect. Immun.**, v.23, p.224-231, 1979.

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

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

FLETCHER, M. **The applications of interference reflection microscopy to the study of bacterial adhesion lo solid surfaces.** In: Houghton DR, Smith RN, Eggins HOW, editors, Biodeterioration 7. London: Elsevier Applied Science; p. 31-35. 1988.

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

GIBBONS, R. J.; NYGAARD, M. Synthesis of insoluble dextrand its significance in formation of gelatinous deposits by plaque forming streptococci. **Arch. Oral Biol.**, v. 13, p. 1249-1262, 1968.

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.

GREENWOOD, D.; Antimicrobial Chemotherapy, 2nd ed., Oxford University: Oxford, 1989.

GUAN, X.; ZHOU, Y.; LIANG, X.; XIAO, J.; HE, L.; LI, J. Effects of compounds found in *Nidus Vespae* on the growth and cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*, **Microbiol. Res.**, v. 16, 2011. No Prelo. doi:10.1016/j.micres.2011.03.002

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

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

HAMILTON, C. G. Metabolic activity of oral bacteria In: Thyrtrup A.: Fejurskov, O (eds). Text of clinical cariology 2ed. Copenhagem: Nunksgaard, p. 74-88, 1994.

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

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

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

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

ITO, K.; NAKAMURA, Y.; TOKUNAGA, T.; IIJIMA, D.; FUKUSHIMA, K. Anticariogenic properties of a water-soluble extract from cacao. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 67, p. 2576 – 2573, 2003.

IWAMI, Y. Influence of enviromenton glycolysis in streptococci. **Kitasato Arch. Exp. Med.**, v. 61, p. 1-20, 1988.

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.**, v. 14, p. 220-224, 1999.

KEYES, P. H. Recent advances in dental research; bacteriology. **Int. Dent. J.**, v. 12, p. 443-464, 1962.

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

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

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

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. 130p. 2005. FCFRP-USP – Tese de Doutorado.

LEITÃO, D. P. S. Estudo do efeito de enxaguatórios bucais sobre a produção de ácidos orgânicos por *Streptococcus mutans*, isolado do biofilme dental. 2001. 121p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

LEITÃO, D. P. S.; SILVA-FILHO, A. A.; POLIZELLO, A. C. M.; BASTOS, J. K.; SPADARO, A .C.C. Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. ***Biological & Pharmaceutical Bulletin.***, *v.* 27, p. 1834-1839, 2004.

LEMOS, J.A.; ABRANCHES, J.; BURNE, R.A. Responses of cariogenic streptococci to enviromenmental stresses. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v. 7, 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.**, v. 150, p. 1353-1366, 2004.

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.**, v. 97, p. 1311-1318, 2004.

LIFCHITZ, A. **Plantas medicinales**. 5ª ed. Buenos Aires: Kier, p.92, 1981.

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

LOESCHE, W. J. Cárie dental – uma infecção tratável. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 349p. 1993.

MARINHO, B. V. S.; ARAÚJO, A. C. S. Use mouthwash in gingivitis and dental biofilm. **Int. J. Dent.**, v. 6, p. 124-131, 2007.

MARSH, E. J.; LUO, H; WANG, H. A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities. **FEMS Microbiol. Let.,** v. 228, p. 203-210, 2003.

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

MARSH, P. D. Microbiological aspects of dental plaque and dental caries. **Dent. Clin. North. Am.**, v. 43, p. 599-614, 1999.

MARSH, P. D. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. **J. Dent. Res.**, v. 71, p. 1431-1438, 1992.

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

MARSH, P. D.; BRADSHAW, D.J. Microbiological effects of new agents in dentifrices for plaque control. **Int. Dent. J.**, v. 43, p. 399–406, 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Prova a política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Diário Oficial da União, Brasília, mai. 2006c. Disponível em: *http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portariafito.pdf* Acesso em 18 jan. 2010.

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

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 6ed. Wayne, PA: Technical Report M07-A6, 2003.

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

NOBBS, A. H.; LAMONT, R. J.; JENKINSON, H. F. *Streptococcus* adherence and colonization. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 73, p. 407-450, 2009.

OGAWA, A.; FURUKAWA, S.; FUJITA, S.; MITOBE, J.; KAWARAI, T.; NARISAWA, N.; SEKIZUKA, T.; KURODA, M.; OCHIAI, K.; OGIHARA, H.; KOSONO, S.; YONEDA, S.; WATANABE, H.; MORINAGA, Y.; UEMATSU, H.; SENPUKU, H. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by *Streptococcus salivarius* FruA. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 77, p. 1572–1580, 2011.

OLIVEIRA, V. R., RESENDE, M. D. V., NASCIMENTO, C. E. S., DRUMOND, M. A., SANTOS, C. A. F. Variabilidade genética de procedências e progênies de umbuzeiro via metodologia de modelos lineares mistos (REML/BLUP). **Rev. Bras. Frutic.**, v. 26, p. 53-56, 2004.

OLIVEIRA, D. P. **Corantes como importante classe de contaminantes ambientais – um estudo de caso:** USP, 2005. 120 páginas. Tese (doutorado). Programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2005.

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.**, v. 45, p. 639-643, 2000.

PALOMBO, E. A. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. **Evid. Based Complement. Altern. Med.,** July 13, 2011**.** No Prelo: doi:10.1093/ecam/nep067

PANDIT, S.; KIM, J.; JUNG, K.; CHANG, K.; JEON, J. Effect of sodium fluoride on the virulence factors and composition of *Streptococcus mutans* biofilms. **Arch. Oral. Biol.**, v. 56, p. 643-649, 2011.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1997.

PENA, M. **Dicionário brasileiro de plantas medicinais**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Kosmos, 1946. p. 151-2.

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

PEREIRA, J. V.; VIEIRA PEREIRA, M. S.; SAMPAIO, F. C.; CORREIA SAMPAIO, M. C.; ALVES, P. M.; FERREIRA DE ARAÚJO, C. R.; HIGINO, J. S. Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. **Braz J. Pharmacogn.**, v. 16, p. 88-93, 2006.

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

RIBEIRO, S. K.; BUSSADORI, S. K. Comparação entre o gel de clorexidine e o verniz de flúor na contagem salivar de *Streptococcus mutans*. **Rev. Paul. Odontol.**, v. 22. p. 48-52, 2000.

RÍOS, J. L.; RECIO,M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacol**, v. 100, p. 80–84, 2005.

SHEN, Y.; STOJICIC, S.; QIAN, W.; OLSEN, I.; HAAPASALO, M. The synergistic antimicrobial effect by mechanical agitation and two chlorhexidine preparations on biolfim bacteria. **J. Endod.**, v. 36, n. 1, p. 100-104, 2010.

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

SOUZA-FILHO, F. J.; SOARES, A. J.; VIANNA, M. E.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; GOMES, B. P. F. A. Antimicrobial effect and ph of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other material. **Braz. Dent. J.**, v. 19, p. 28-33, 2008.

STAMFORD, T. C. M.; PEREIRA, D. M. S.; ALCÂNTARA, L. C.; COUTO, G. B. L. Microbiological and biochemical parameters and their relationship with carie in healthy teenagers. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, v. 5, p. 71-76, 2005.

TORRES, C. R. G.; KUBO, C. H.; ANIDO, A. A.; RODRIGUES, J. R. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na odontologia. **Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos**, v.3, p. 43-52, 2000.

TRABULSI, L. R.; DE TOLEDO, M. R. F. **Microbiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1989.

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

VALDEVITE, L. M. 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. 2007. FCFRP-USP – Dissestação de Mestrado.

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

WILSON, M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. **J. Med. Microbiol.**, v. 44, p. 79–87, 1996.

WILSON, M.; PATEL, H.; NOAR, J. H. Effect of chlorhexidine on multi-species biofilms. **Curr. Microbiol.**, v. 36, p. 13–18, 1998.

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

XIAO, J.; KOO, H. Structural organization and dynamics of exopolysaccharide matrix and microcolonies formation by *Streptococcus mutans* in biofilms. **J. Appl. Microbiol.**, v. 108, p. 2103-2113, 2009.

YANTI; YAYA, R.; KYU-HOI, K.; JAE-KWAN, H. *In Vitro* Anti-biofilm Activity of Macelignan isolated from *Myristica fragrans* Houtt. against Oral Primary Colonizer Bactéria, **Phytother. Res.**, v. 22, p. 308–312, 2008.

YATSUDA, R.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; MURATA, R. M.; REHDER, V. L.; MELO, L. V.; KOO, H. Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. **J. Ethnopharmacol.**, v. 28, p. 183-189, 2005.

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.**, v. 278, p. 5300–5308, 2003.

YOO, S. Y.; PARK, S. J.; JEONG, D. K.; KIM, K. W.; LIM, S. H.; LEE, S. H.; CHOE, S. J.; CHANG Y. H.; PARK, I.; KOOK, J. K. Isolation and characterization of the Mutans Streptococci from the dental plaques in Koreans. **J. Microbiol.** v. 45, p. 246-255, 2007.

YOUNSON, J.; KELLY, C. The rational design of an anti-caries peptide against *Streptococcus mutans*. **Mol. Div.**, v. 8, p. 121-126, 2004.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p. 17-75, 2001.

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

APËNDICE

Anti-cariogenic properties of *Dorstenia asaroides* extracts on *Streptococcus mutans*

C. E. M. D'Angelis[a,c], M. L. Freire[a], J. P. B. Sousa[a], L. Alonso[a], A. C. M. Polizello[a], M. Groppo Júnior[b]; J. K. Bastos[a]; A. C. C. Spadaro[a*]

[a] Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

[b] Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

[c] Faculdades Integradas Pitágoras de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil

[*] Corresponding author: Tel: +55 16 3602 4215; Fax: +55 16 3633 1936; E-mail address: cespada@usp.br

Keywords: Antimicrobial, Biofilm, *Streptococcus mutans*, *Dorstenia asaroides*

ABSTRACT

Dorstenia asaroides Hook (Moraceae), a plant occurring endemically in Africa and Central and South America, is used in medicinal plant therapy. In this study, we analyzed the chemical compounds from the hexane fraction (**HFr**), chloroform fraction (**CFr**) and ethyl acetate fraction (**EFr**). These fractions were obtained from crude extracts of the rhizomes of *D. asaroides*. The antimicrobial activity against *S. mutans*, the acid inhibition properties and the effect on *S. mutans* biofilm formed on a glass surface were also evaluated. Phytochemical analysis of these organic fractions from the extract of *D. asaroides* rhizomes revealed the presence of substances with known antimicrobial activity, such as campesterol, triterpenes and coumarins. Both the MIC and MBC values for the **HFr** are 80µg/ml and for the **EFr** and **CFr** are 50µg/ml. Among the fractions tested, the fractions with the highest value of inhibition of the acidogenic potential were **HFr** and **EFr**, with 100.3% and 105.3% inhibition, respectively, at a concentration of 12.5mg/ml. The treatment of biofilms was statistically significant for all three fractions at the highest concentrations tested compared with the control (biofilm at 12 hours). The results for the **EFr** were particularly pronounced, showing significant differences at all concentrations. Thus, the fractions have shown a substantial anticariogenic activity against *S. mutans* and further studies are needed to fully elucidate properties of these fractions.

1. Introduction

Despite all efforts towards its control and prevention, dental caries still remain a global health problem affecting all ages [1]. *Streptococcus mutans* is the most important cariogenic agent, associated with the etiology and pathogenesis of human dental caries [2] and lives almost exclusively in densely populated biofilms that form on the tooth surface [3]. Virulence factors such as its ability to produce acid by sugar fermentation and biofilm formation are involved in the pathogenesis of dental caries [4,5]. Therefore, to prevent the formation and development of dental caries, strategies that control the cariogenicity of *S. mutans* by suppressing the acid-producing bacterial metabolism with metabolic inhibitors, reducing the *S. mutans* population in the oral cavity or eliminating biofilms should be explored.

Natural products derived from medicinal plants have been used as folk-medicines for thousands of years and have proven to be an abundant source of biologically active compounds, many of which have been the basis for developing novel therapeutic agents. They have been the focus of much recent research as potential agents in the prevention of oral disease, particularly plaque-related diseases, such as dental caries [6].

Dorstenia is a herbaceous genus (Moraceae) that contains many plants used for medicinal plant therapies in many countries in Africa and Central and South America due to the presence of furanocoumarins, which exhibit a broad range of biological activities [7,8]. This genus is also recognized as a rich source of prenylated and geranylated flavonoids and coumarins [9]. Furanocoumarins possess a variety of biological activities including antimicrobial, antifungal, anti-inflammatory and antioxidative [10]. Pharmacological data on the genus *Dorstenia* are scarce, but all species of the genus are known as “Carapiá” for their putative medicinal qualities [11]. *Dorstenia asaroides* Hook. has been only minimally investigated and, to the best of our knowledge, no previous phytochemical or biological activity studies have been reported on this taxon.

The aim of the present study was to analyze the chemical compounds in hexane, chloroform and ethyl acetate fractions from the extract of *Dorstenia asaroides* Hook. rhizomes and to investigate their effect on acid production (acidogenic potential), growth and biofilm formation in *S. mutans*.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial strain

Streptococcus mutans ATCC 25175 was used in this study. The culture was stored at -70°C in Brain Heart Infusion Broth (Oxoid) containing 20% (w/v) glycerol.

2.2. Plant material

Dorstenia asaroides rhizomes were collected in the Rio Pardo de Minas region of the Minas Gerais state, Brazil, in July, 2009. Professor Milton Groppo Júnior authenticated the plant material, and a voucher specimen (SPFR 12262) was deposited in the herbarium of the School of Sciences, Philosophy and Education of Ribeirão Preto of the University of São Paulo-USP, Ribeirão Preto, Brazil. Rhizomes were dried under air circulation (40°C), ground in a knife mill, contained in hermetically sealed glass flasks stored at 8°C until they were used.

2.3. Preparation of the extract and chemical characterization

The dried and powdered rhizomes of *D. asaroides* (1000g) were macerated for 72 hours with 90% aqueous ethanol at room temperature and percolated. The procedure was repeated four times, and the combined hydroalcoholic extract was filtered and concentrated under reduced pressure at 50°C to produce a crude extract. Next, 70g of this extract were dissolved into 1l of 90% aqueous methanol and sequentially fractioned with 400ml of hexane, chloroform and ethyl acetate. The hexane, chloroform, and ethyl acetate fractions were characterized using gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) analyses. For this, a Shimadzu GC/MS – QP2010 was used, equipped with an automatic sampler AOC – 20Si at split mode (1:60). The data acquired were evaluated using the Shimadzu system and spectrometric electronic library Wiley 7.0. All analyses were performed on a fused-silica capillary column (DB-5, 30mx0.25mm, coating thickness 0.25µm) with hydrogen as the carrier gas at 1.30ml/min; mass spectrums were recorded in the scan mode at 70eV (40–500*m/z*). The injector temperature was 250ºC, and the oven temperature was programmed to 70–250ºC at 3ºC/minute. The three crude fractions

were characterized by comparing the fragmentation profiles with those reported in the literature and by comparing the obtained mass spectra of the peaks with those either reported in the literature or available in the Wiley 7.0 data system library. Phytochemical analysis was conducted at the Laboratório de Química Orgânica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP by a group of researchers from the laboratory of Prof. Dr. Norberto Lopes Peporine.

2.4. Antimicrobial activity assay

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of fractions from *D. asaroides* on *S. mutans* were determined according to the microdilution procedure detailed by the Clinical and Laboratory Standards Institute Guidelines [12]. Briefly, a series of dilutions of the **HFr**, **EFr** and **CFr** were prepared, and 20µl volumes were pipette into 96-well microtitre plates. BHI broth (1% glucose – w/v) without an antibacterial agent was used as the negative control and BHI broth (1% glucose – w/v) with chlorhexidine digluconate 0.06% as the positive control. After the addition of 180µl of bacterial cell suspension (1×10^4 CFU) into each well, the plate was vibrated at a low force for 1 minute. The final concentrations ranged from 10 to 120µg/ml. Bacteria were then incubated at 37°C in an aerobic atmosphere for 24 hours. The growth of bacteria in each well was established with a rapid method for determining the minimum inhibitory concentration using nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma) [13] for the early detection of bacterial growth. After determining the MIC, the bacteria from wells that exhibited no growth were subcultured on to BHI Agar (1% glucose – w/v) and incubated at 37°C for 24 hours under microaerophylic conditions. The minimum bactericidal concentration (MBC) was defined as the lowest concentration at which no microorganism growth was detected on the agar. All assays were performed in triplicate.

2.5. *In vitro* effect on acid production by *S. mutans*

Growth conditions for *S. mutans* and the acidogenic activity assay were assayed according to the model described by Leitão et al. [14]. Only a few modifications were implanted. Briefly, *S. mutans* ATCC 25175 was grown in Trypticase Soy Broth (Oxoid) supplemented with 1% glucose (w/v) at 37°C and

harvested in the exponential growth phase by centrifugation at 6000*g* for 10 minutes at 4°C. Bacterial cells were washed twice with sterile phosphate buffer saline solution (PBS), pH 7.4, containing Na_2HPO_4 1.15g/l (w/v), NaCl 8.0g/l (w/v) and KCl 0.2g/l (w/v). Washed cells were then resuspended in a PBS containing 20% (w/v) glycerol to obtain a bacterial suspension of approximately 5.0mg wet weight cells/ml, which was divided into 1 ml aliquots (*ca.* 5.0mg wet weight cells) in sterile polyethylene tubes and stored at -70°C. For the acidogenic activity assay, aliquots of 1ml of *S. mutans* suspensions were defrosted at 37°C in a water-bath and centrifuged (15300*g* for 2 minutes, 25°C) to remove the glycerol solution. Cell pellets were resuspended in 6.0mmol/l phosphate buffer, pH 6.9, containing 0.865g/l (w/v) NaCl, 0.625g/l (w/v) KCl, 0.125g/l (w/v) $MgCl_2{\cdot}6H_2O$, 0.072g/l (w/v) $CaCl_2{\cdot}2H_2O$, 0.326g/l (w/v) KH_2PO_4, and 0.803g/l (w/v) K_2HPO_4 supplemented with 10.0mmol/l glucose as a bacterial substrate and fractions of *D. asaroides* (**HFr**, **EFr**, and **CFr**) with final concentrations ranging from 0.625 to 12.5mg/ml). The fractions were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO)–H_2O (1:1, v/v) immediately before the assays were preformed. A thin-bulb analytical electrode (model 8103, Orion) was placed in the cell suspension, which was warmed to 37°C, and the glycolitic production of acid was monitored over a 30 minutes time period by measured pH decay with a pH meter (model 710 A, Orion). The negative control (no inhibition) consisted of *S. mutans* aliquots resuspended in the same buffer solution supplemented with 10.0mmol/l glucose. The positive control (no acid production) consisted of *S. mutans* aliquots resuspended in the same buffer solution supplemented with 10.0mmol/l glucose and chlorhexidine digluconate 0.06%. Appropriate solvent controls were also performed.

The pH curves (pH *versus* time) were built from a plot of the average values of triplicate assays and their integrated area values were used to estimate the percent inhibition of acidogenic activity by extracts at each concentration tested, given that no acid production was observed in the positive control (*i.e.*, absence of pH decay) and the negative control pH curve represented no inhibition of the acid production.

2.6. Preparation of glass slides coupons

Before use, 15cm^2 glass slides (7.5 by 2.0 by 0.2cm) were manually washed with neutral Extran solution (Merck, Darmstadt, Germany), boiled in 1% sodium lauryl sulfate (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) for 5 minutes, rinsed with 100% isopropanol,

washed with distilled water for 5 minutes, and sterilized for 15 minutes at 121ºC [15,16].

2.7. Evaluation of biofilm formation by *S mutans*

Biofilms were allowed to form on sterile glass slides that were clamped vertically to a sterile steel rack by immersing them, in a beaker containing BHI broth (1% glucose - w/v) and an aliquot of an overnight culture of *S. mutans* (1%, v/v) and then incubating at 37ºC for up to 24 hours with slow constant agitation. Glass slides were removed at 3 hours intervals and rinsed with 20ml of PBS to remove non adherent cells. The remaining adhered cells were removed by manually scrubbing the upper surface of the glass with a sterile cotton swab ca.100 times. To estimate *S mutans* adhesion, each swab was transferred to tubes containing 10ml of PBS and 100µl serial decimal dilutions were plated on BHI agar (1% glucose - w/v) and incubated at 37ºC under microaerophilic conditions for 24 hours [15, 16]. All assays were performed in triplicate.

2.8. Exposure of *S. mutans* biofilm to fractions of *D. asaroides*

S. mutans biofilms were cultivated on glass slides immersed in BHI broth (1% glucose - w/v) and incubated at 37ºC for up to 12 hours with slow constant agitation. To assess the effect of fractions of the *D. asaroides* extract fractions on the established *S. mutans* biofilms, glass slides containing biofilm were removed at 12 hours, placed in sterile Petrie dishes, and immersed in aqueous dilutions of the **HFr**, **EFr**, and **CFr** ranging from 1.25 to 12.5mg/ml. The Petrie dishes were vibrated at a low force for 3 minutes. Excess fluid was removed from the glass slides by washing with 20ml of PBS. The *S. mutans* population that still adhered to the glass slides was evaluated according to methodology previously described [15,16]. Results were compared with those from controls where *S. mutans* adhesion was measured on glass slides not treated with the fractions. As a control, glass slides also were removed at 12 hours and rinsed with 20ml of PBS to remove nonadherent cells. Adherent cells were then removed with a sterile cotton swab and transferred to a tube containing 10ml of PBS. Aliquots (100µl) of each serial decimal dilution of the tube contents were plated on BHI agar (1% glucose) and incubated at 37ºC

under microaerophilic conditions for 24 hours to estimate the population of adherent *S. mutans* as previously described [15. 16]. All assays were performed in triplicate.

3. Results

3.1. Chemical characterization

In the **HFr**, fatty acids, esters, campesterol, and triterpenes were detected. The **EFr** was mainly composed of furanocoumarins and triterpenes. In the **CFr**, furanocoumarins were mainly detected, specifically, isopsoralen, psoralen, and bergapten.

3.2. Antimicrobial activity

All of the fractions could effectively inhibit and kill *S. mutans*. Both the MIC and MBC values for the **HFr** are 80µg/ml and for the **EFr** and **CFr** are 50µg/ml. The positive control, chlorhexidine digluconate, had a MIC value equal to 0.93µg/ml in all tests.

3.3. *In vitro* effect of fractions on *S. mutans* acid production

The glycolytic production of acids by *S. mutans* ATCC 25175 in the presence of the **HFr**, **EFr**, and **CFr** (concentrations ranging from 0.625 to 12.5mg/ml) was evaluated over a 30 minutes incubation. The inhibitory effects of the fractions on acid production by *S. mutans* were examined as a function of their concentrations. All of the fractions reduced the rate of acid production by *S. mutans*, and the extend of inhibition was dose-dependent. A significant reduction of bacterial acid production was found at concentrations greater than 2.5mg/ml for all fractions analyzed as illustrated in Figure 1. **HFr** suppressed bacterial acid production by 22.26%, 55.07%, 87.5% and 100.3% at concentrations of 1.25 mg/ml, 2.5mg/ml, 6.26mg/ml and 12.5mg/ml, respectively, while **EFr** suppressed bacterial acid production by 38.46%, 49.61%, 58.46%, 90%, 97.69% and 105.3% at concentrations of 0.625mg/ml, 1.25mg/ml, 1.875mg/ml, 2.5mg/ml, 6.25mg/ml and 12.5mg/ml, respectively. **CFr** suppressed acid production by 6.53%, 76.53%, 91.15%, 90.76% and 93.07% at

concentrations of 0.625mg/ml, 1.25mg/ml, 2.5mg/ml, 6.25mg/ml and 12.5mg/ml, respectively.

Among the fractions of *D. asaroides* extract tested, the fractions with the greatest acidogenic inhibition potential were **HFr** and **EFr** with 100.3 and 105.3% inhibition, respectively, at a concentration of 12.5mg/ml.

3.4. Evaluation of *S. mutans* biofilm formation

Figure 2 shows biofilm formation in pure cultures of *S. mutans* growing in BHI broth for up to 24 hours. The biofilm formation by *S. mutans* is a phase dependent process. The early phase is marked by initial adherence of the bacteria. During the first 3 hours of incubation, biofilm formation of pure culture of *S. mutans* was observed on glass slides. The number of adherent cells on the glass slides increased for up to 24 hours, reaching a value of approximately 4.24 log UFC/cm^2.

3.5. Exposure of *S. mutans* biofilm to fractions of *D. asaroides*

After the evaluation of *S. mutans* biofilm formation, we assessed the ability of the fractions from the extract of *D. asaroides* rhizomes to eliminate or reduce the biofilm formed on the glass slides at 12 hours. **HFr**, **EFr**, and **CFr** were used at the following concentrations: 12.5mg/ml, 6.25mg/ml, 3.75mg/ml, 2.5mg/ml and 1.25mg/ml.

The results obtained from these experiments are presented in Figure 3 and show that the treatment of biofilms with these fractions was statistically significant compared with the control (biofilm 12 hours) at the highest concentrations tested. The effect was most pronounced for the **EFr**, which showed significant differences at all concentrations.

The statistical treatment of data was performed using a one-way ANOVA followed by Dunnett's test to verify differences between the biofilm formed after 12 hours (control) and treatments performed with different concentrations of the **HFr**, **EFr**, and **CFr**.

4. Discussion

Research specialists have recently investigated many natural products, especially in the genus *Dorstenia*, for biological and pharmacological effects [7,8,9,10]. In our studies, fractions of *D. asaroides* extracts have shown an anticariogenic potential that could be used as an alternative to avoid the side effects of antiseptics such as chlorhexidine.

There is controversy among researchers and clinicians concerning the role of chlorhexidine in the prevention of dental caries. Consequently, many natural products are still being tested for properties such as the inhibition of bacterial growth, biofilm formation and the adherence of microorganisms to the tooth surface [4,6,14].

Phytochemical analysis of **HFr**, **EFr**, and **CFr** from the extract of *D. asaroides* rhizomes revealed the presence of substances with known antimicrobial activity, such as campesterol, triterpenes and coumarins. The apparent antimicrobial potential of these fractions was determined by minimum inhibitory concentration testing. In these studies, the **HFr**, **EFr**, and **CFr** are promising because they showed notable antimicrobial activity against *S. mutans* and present an interesting medicinal plant-based alternative for therapeutic indications in a dental clinic. In this context, Brazil has a national program that promotes the use of medicinal plants and herbs. The objective of this project is to combine safety, efficacy and quality, medicinal plants, herbal medicines and services related to phytotherapy in the Unified Health System [17].

The acid production and acid tolerance of the bacterium also serve as virulence factors because both the acid end products formed during the metabolism of dietary carbohydrates and the ability of bacteria to withstand acidification in dental biofilms are essential for the development of dental caries [18, 19]. Thus, we also examined the inhibitory effect of the **HFr**, **EFr**, and **CFr** on the production of acids by *S. mutans*. Our results showed inhibition values of considerable significance, especially for **HFr** and **EFr**, revealing that these fractions may inhibit the dissolution of tooth mineral by acid.

Biofilm formation by *S. mutans* is considered its principal virulence factoring causing dental caries [20]. The first step in plaque formation is the adherence of *S. mutans* bacteria to tooth surfaces [21]. Thus, we characterized biofilm formation by examining *S. mutans* adherence to a glass surface, which represents the hard and

smooth surface of the teeth. In this system, the population of bacteria was determined in units of UFC/cm^2. These experimental model has been validated in several studies [15,16]. The biofilm formation by *S. mutans* is a phase dependent process [20]. In this study, the time-dependent assay reveals that *S. mutans* was able to adhere to glass surfaces within a 3 hours incubation period and futher increased its population following incubation time. After 12 hours of incubation, the biofilm bacterial count was equal to 4.34 log UFC/cm^2. This experiment was important for the characterization and quantification of biofilm formation by *S. mutans*.

One approach to controlling the formation of oral biofilm is to eliminate or reduce the biofilm mass using an anti-biofilm agent [22]. Thus, we evaluated the effect of the **HFr**, **EFr**, and **CFr** in the removal of biofilms and found that treatment of biofilms with these fractions were statistically significant compared with the control (biofilm at 12 hours) at the highest concentrations tested. **EFr** was particularly effective and showed significant differences at all concentrations.

Therefore, our studies suggest that the fractions (**HFr**, **EFr**, and **CFr**) from the extract of *D. asaroides* rhizomes have anticariogenic potential due to their impacts on some key virulence factors of *S. mutans*, including growth, acid production and biofilm formation. Further studies are needed to fully elucidate the properties of these fractions and the mechanisms underlying the anticariogenic activity in order for it to be used prevent dental caries.

Acknowledgements

The authors thank Pierre Alexandre dos Santos and Marley Garcia Silva for their help in this work.

References

[1] R. Karthikeyan, B.T. Amaechi, H.R. Rawls, V.A. Lee, Antimicrobial activity of nanoemulsion on cariogenic *Streptococcus mutans*. Arch. Oral Bio., 56 (2011) 437-445.

[2] C.S. Toi, P. Cleaton-Jones, The effect of traditional African food mixtures on growth, pH and extracellular polysaccharide production by mutans streptococci *in vitro*, Anaerobe, 12 (2006) 99-105.

[3] W.J. Loeschel, L.H. Straffon, Longitudinal investigation of the role of *Streptococcus mutans* in human fissure decay, Infect. Immun., 26 (1979) 498-507.

[4] C. Badet, F. Quero, The in vitro effect of manuka honeys on growth and adherence of oral bacteria, Anaerobe, 17 (2011) 19-22.

[5] M. Huang, L. Meng, M. Fan, P. Hu, Z. Bian, Effect of biofilm formation on virulence factor secretion via the general secretory pathway in *Streptococcus mutans*. Arch. Oral Biol. 53 (2008) 1179-1185.

[6] J. Xiao, Y. Zuo, Y. Liu, J. Li, Y. Hoa, X. Zhou, Effects of *Nidus vespae* extract and chemical fractions on glucosyltransferases, adherence and biofilm formation of *Streptococcus mutans*, Arch. Oral Biol., 52 (2007) 869-875.

[7] B.M. Abegaz, B.T. Ngadjuib, G.N. Folefocb, S. Fotsob, P. Ambassab, M. Bezabiha, E. Dongob, F. Risec, D. Petersenc, Prenylated flavonoids, monoterpenoid furanocoumarins and other constituents from the twigs of *Dorstenia elliptica* (*Moraceae*), Phytochem. 65 (2004) 221–226.

[8] C.A.L. Cardoso, W. Vilegas, A. Barison, N.K. Honda, Simultaneous determination of furanocoumarins in infusions and decoctions from “carapiá” (*Dorstenia* species) by High-Performance Liquid Chromatography, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 1465-1469.

[9] B.M. Abegaz, B.T. Ngadjui, E. Dongob, M.T. Bezabih, Chemistry of the genus *Dorstenia*, Curr. Org. Chem. 4 (2000) 1079–1090.

[10] R. Heinke, K. Franke, A. Porzel, L.A. Wessjohann, N.A.A. Ali, J. Schmidt, Furanocoumarins from *Dorstenia foetida*, Phytochem. 72 (2011) 929-934.

[11] L. Balestrin, J.F.G. Dias, O.G. Miguel, D.S.G. Dall'Stella, M.D. Miguel, Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (*Moraceae*) com abordagem em atividade antioxidante, Braz. J. Pharm. 18 (2008) 230-235.

[12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement. M100-S16. Wayne, PA: CLSI; 2006.

[13] T. Urban, C. Jarstrand, Rapid determination of the susceptibility of bacteria to antibiotics with sensititre plates and nitroblue tetrazolium, J. Antimicrob. Chemother., 8 (1981) 363-369.

[14] D.P.S. Leitão, A.A.S. Filhom, A.C.M. Polizello, J.K. Bastos, A.C.C. Spadaro, Comparative evaluation of in-vitro effects of brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*, Biol. Pharm. Bull. 27 (2004) 1834-1839.

[15] E.J. Marsh, H. Luo, H. Wang, A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities. *FEMS Microbiol. Lett.* 228 (2003) 203-210.

[16] C.C. Minei, B.C. Gomes, R.P. Ratti, C.E.M. D'Angelis, E.C.P. De Martinis, Influence of peroxyacetic acid and nisin and coculture with *Enterococcus faecium* on *Listeria monocytogenes* biofilm formation, J. Food Prot., 71 (2008) 634-638.

[17] MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Prova a política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Diário Oficial da União, Brasília, mai. 2006c. Available in: *http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portariafito.pdf* Acessed in July 20th 2010.

[18] S. Pandit, J. Kim, K. Jung, K. Chang, J. Jeon, Effect of sodium fluoride on the virulence factors and composition of *Streptococcus mutans* biofilms, Arch. Oral Biol., 56 (2011) 643-964.

[19] R.A. Burne, R.E. Marquis, Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. FEMS Microbiol. Lett. 193 (2000) 1-6.

[20] A.U. Khan, B. Islam, S.N. Khan, M. Akram, A proteomic approach for exploring biofilm in *Streptococcus mutans*, Bioinformation, 5 (2011) 440-445.

[21] X. Guan, Y. Zhou, X. Liang, J. Xiao, L. He, J. Li, Effects of compounds found in *Nidus Vespae* on the growth and cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*, Microbiol. Res., 16 (2011) *In Press* doi:10.1016/j.micres.2011.03.002

[22] Y.R. Yanti, K. Kyu-Hoi, H. Jae-Kwan, *In vitro* anti-biofilm activity of macelignan isolated from *Myristica Fragrans* houtt against oral primary colonizer bacteria, Phytother. Res., 22 (2008) 308-312.

FIGURES

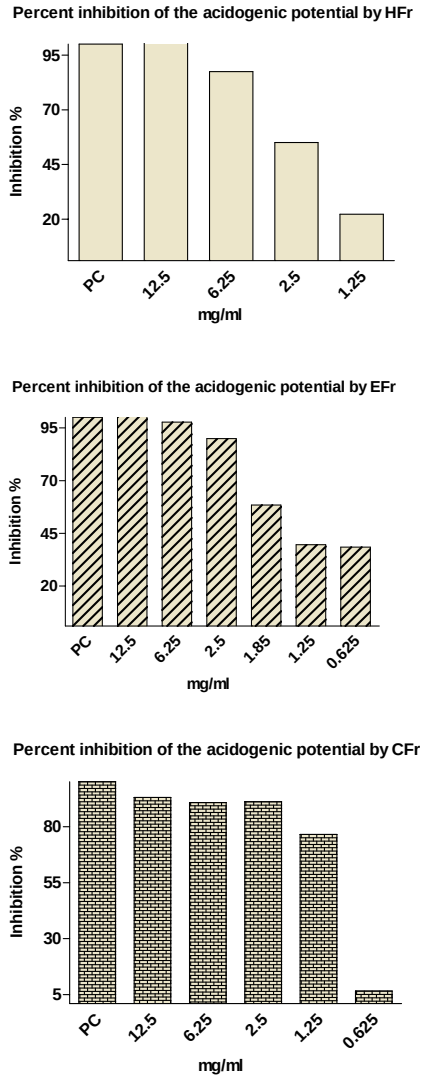


Figure 1. Percent inhibition by the fractions (**HFr**, **EFr**, and **CFr**) on *S. mutans* acid production. **PC**: positive control – chlorhexidine digluconate 0,06% (v/v).

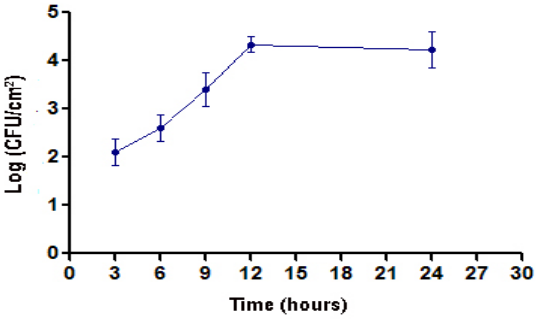


Figure 2. Biofilm formation on glass slides immersed in a pure culture of *S. mutans* (—•—) in BHI broth at 37°C.

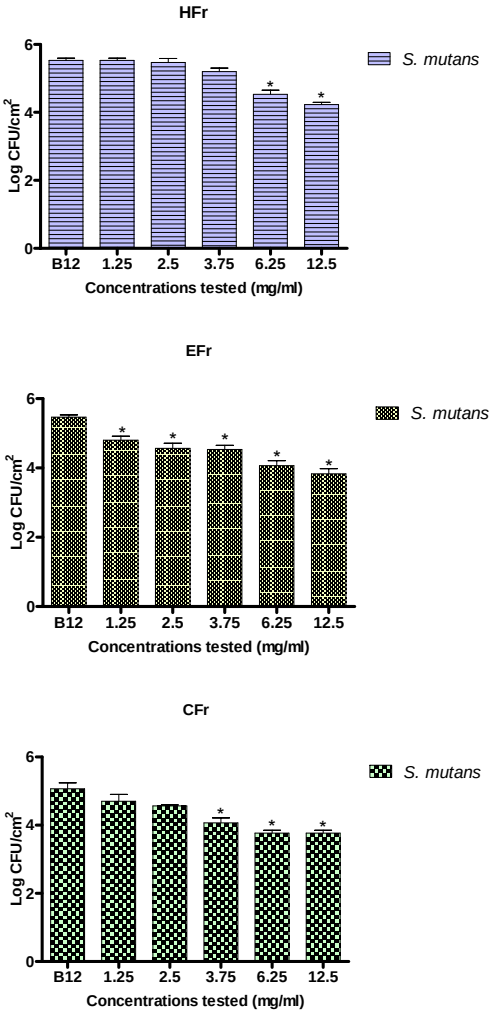


Figure 3. Populations of *S. mutans* adhered to glass slides after treatment with different concentrations of **HFr**, **EFr**, and **CFr**. **B12**: *S. mutans* biofilms formed after 12 hours of incubation in BHI broth. *Significant differences compared to control - **B12** ($p < 0.05$).