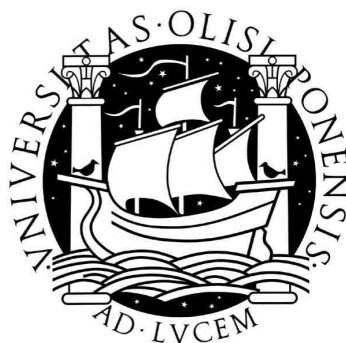


UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



EFEITO INIBITÓRIO DE EXTRACTOS DE PLANTAS  
NO CRESCIMENTO E FACTORES DE VIRULÊNCIA  
DE *STREPTOCOCCUS SOBRINUS* E *STREPTOCOCCUS*  
*MUTANS*

Neusa Lindorosa Loureiro Figueiredo

MESTRADO EM BIOQUÍMICA  
(Bioquímica)

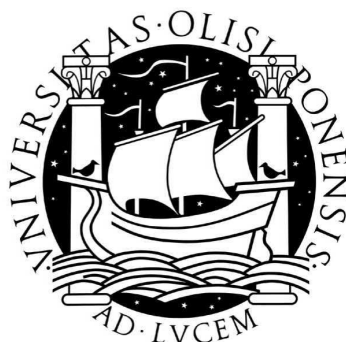
2009



UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



EFEITO INIBITÓRIO DE EXTRACTOS DE PLANTAS  
NO CRESCIMENTO E FACTORES DE VIRULÊNCIA  
DE *STREPTOCOCCUS SOBRINUS* E *STREPTOCOCCUS*  
*MUTANS*

Neusa Lindorosa Loureiro Figueiredo

MESTRADO EM BIOQUÍMICA  
(Bioquímica)

Dissertação orientada pela Professora Doutora Ana Rosa Leal Lino

2009



*“Na prosperidade, um prazer. Na adversidade, um estímulo e, na dor, um consolo.  
Na alegria, uma amável companhia...E, em todos os momentos, um outro Eu.”*  
*(John Lyly)*

§

*Toda a minha existência foi criada minuciosamente por Aquele que em Espírito  
acompanha todos os meus passos, endireitando as minhas pisaduras para que o  
meu caminho vá ao encontro do Seu. Agradeço, primeiramente e principalmente,  
ao meu Deus criador, eterno Pai e fiel Amigo. Este trabalho é por Ele e para Ele.*

## AGRADECIMENTOS

*“A longa caminhada faz-se mais ligeira, alegre, a passo largo... Tudo à volta é mais radioso, quando um amigo vai a nosso lado.”*

*(Autor desconhecido)*

Quero deixar aqui um especial agradecimento à minha família, aos meus pais e a minha irmã, pelo apoio incondicional nesta trajectória. Principalmente aos meus pais, pela confiança depositada em mim.

§

Queria conseguir passar para as palavras o meu sincero e especial agradecimento à Professora Doutora Ana Rosa Lino que pela sua orientação, apoio, paciência, disponibilidade, dedicação, participação activa e, acima de tudo, amizade, tornou possível a realização deste trabalho. Durante este período de trabalho, todo o seu empenho na orientação, não só neste trabalho, mas também ao nível profissional deixou-me extremamente surpreendida e eternamente agradecida. Ao fim deste período, revejo todo o curso desta experiência passada na sua companhia e vejo que não poderia ter estado em melhores mãos.

§

Também quero agradecer à Professora Doutora Maria Luísa Serralheiro pela sua participação activa neste trabalho, sem ela não seria possível a realização de grande parte do mesmo.

§

Um agradecimento muito especial à Doutora Ana Mourato, pelos conhecimentos transmitidos, pelo constante apoio, força, paciência e carinho. Apesar de não estar envolvida directamente neste trabalho acabou por ser uma segunda orientadora.

§

Agradeço à Doutora Professora Margarida Meireles pela sua fabulosa alegria que nos contagiou a todos dando-nos mais ânimo para trabalhar.

Um muito especial agradecimento às minhas colegas de trabalho, Joana, Catarina e Diana. Partilhar o ambiente de trabalho com elas foi a melhor surpresa deste período, porque desta convivência nasceu uma bela amizade. À Joana, que pela sua doçura inata esteve sempre pronta para ajudar, ouvir e mimar, agradeço por me abraçar durante este período como uma grande amiga. À Catarina, a alegria em pessoa, sempre com uma palavra para animar e o espírito para ajudar em qualquer situação, agradeço a sincera amizade. À Diana, que pela sua forte determinação transmitiu grande força e convicção a todos nós, agradeço a amizade.

§

Um agradecimento especial ao Pedro Falé pela preciosa ajuda, disponibilidade e paciência. O seu envolvimento activo neste trabalho teve uma contribuição positiva para a realização do mesmo. E, acima de tudo, agradeço a amizade.

§

Um agradecimento ao Paulo Madeira pelo seu envolvimento neste trabalho, dando um contributo muito importante através da identificação dos compostos por espectroscopia de massa.

§

Agradeço a todos os colegas e Investigadores do 4º andar que, de alguma forma, também apoiaram-me, através das ajudas com os equipamentos, das conversas e até de um simples bom dia. Em particular, quero deixar um especial agradecimento à Doutora Marta Silva. Igualmente, também agradeço a todos que passaram pelo laboratório neste período, especialmente à Catarina Antunes e à Doutora Paula Nicolau.

§

Um agradecimento muito especial à Graça, Rebeca, Mateus e João que, pelo amor que nos une, sempre apoiaram-me espiritualmente pelas orações e orientação. Igualmente a todos os membros da UBF, a minha grande família.

§

Agradeço a minha grande e especial amiga Stella, pela verdadeira amizade durante todos estes anos.



## RESUMO

A cárie dentária é uma doença que resulta da interacção de três factores: bactéria, dieta e susceptibilidade dos dentes, que, em conjunto, promovem a desmineralização de tecidos dentários. Apesar da complexidade e diversidade da flora oral, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* são os principais patogénicos envolvidos no desenvolvimento desta doença em humanos. Por isso, os métodos de controlo desta doença têm subjacente o controlo da viabilidade e dos factores de virulência destas duas espécies, nomeadamente presença do enzima glucosiltransferase, capacidade de formar biofilmes e a capacidade acidogénica.

Com o objectivo de investigar o potencial anti-cárie de extractos aquoso e metanólico de *Plectranthus barbatus* e *Plectranthus ecklonii*, assim como de ácido rosmarínico, investigou-se o efeito destes extractos/composto no crescimento, viabilidade e factores de virulência de *S. mutans* e *S. sobrinus*. O efeito inibitório no crescimento e viabilidade destas espécies foi avaliado através da determinação de concentração mínima inibitória (MIC) e concentração mínima bactericida (MBC), respectivamente. Os valores de MIC variaram de 0,2 a 8,4 mg/mL e os valores de MBC variaram de 0,6 a 12,5 mg/mL, com os valores mais baixos para o extracto metanólico e os mais alto para o ácido. O efeito dos extractos e do ácido rosmarínico nos factores de virulência foi avaliado ao nível do efeito inibitório na actividade de GTF, na formação e viabilidade de biofilme e na capacidade acidogénica destas espécies. O efeito inibitório na actividade de GTF de *S. mutans* foi calculado através do valor de IC<sub>50</sub>, sendo que estes valores variaram de 1,6 a 3,9 mg/mL. O efeito inibitório na formação de biofilme apresentou valores de IC<sub>50</sub> entre 0,12 – 2,7 mg/mL e no biofilme formado apresentou valores de IC<sub>50</sub> de remoção de biofilme entre 0,6 e 9,0 mg/mL. O efeito inibitório na capacidade acidogénica destas duas espécies também foi analisando.



## ABSTRACT

Dental caries is a disease that results from the interaction of three factors: bacteria, diet and susceptibility teeth. Together, these three factors promote demineralization of tooth tissues. Despite the complexity and diversity of oral flora, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* are main pathogens involved in the development of this disease in humans. Therefore, methods to control this disease have underlying control of the viability and virulence factors of these two species, namely the presence of the enzyme glucosyltransferase, ability to form biofilms and the acidogenic potential.

In order to investigate the potential anti-caries of aqueous and methanolic extracts of *Plectranthus barbatus* and *Plectranthus ecklonii*, as well as rosmarinic acid, we investigated the effect of these extracts / compound on growth, viability and virulence factors of *S. mutans* and *S. sobrinus*. The inhibitory effect on growth and viability of these species was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), respectively. MIC values ranged from 0.2 to 8.4 mg / ml and MBC values ranged from 0.6 to 12.5 mg / ml, with the lowest values for the methanol extract and the highest for the acid. The effect of the extracts and rosmarinic acid in virulence factors was assessed through the inhibitory effect on GTF activity, the formation and viability of the biofilm and the acidogenic potential. The inhibitory effect on GTF activity of *S. mutans* was calculated through the IC<sub>50</sub> value, which ranged from 1.6 to 3.9 mg / ml. The inhibitory effect on biofilm formation presented IC<sub>50</sub> values between 0.12 to 2.7 mg / ml and the biofilm formed presented values of IC<sub>50</sub> of removing biofilm from 0.6 to 9.0 mg / ml. The inhibitory effect on the acidogenic potential was also verified.



## PALAVRAS-CHAVE

*Plectranthus barbatus*

*Plectranthus ecklonii*

*Streptococci mutans* Oral

Atividade antibacteriana

Biofilme dentário

## KEYWORDS

*Plectranthus barbatus*

*Plectranthus ecklonii*

Oral *mutans Streptococci*

Antibacterial activity

Dental biofilm



## ABREVIATURAS

---

$\mu\text{g}$	Taxa específica de crescimento
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	Meio de cultura ( <i>Brain Heart Infusion</i> )
BHI-S	Meio de cultura suplementado
BSA	Albumina do soro bovino ( <i>Bovine Serum Albumine</i> )
C	Átomo de carbono
CFU	Unidade formadora de colónias ( <i>Colony- Forming Units</i> )
CECT	Colecção Espanhola de Cultivos Tipo
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance ( <i>High Perfomance Liquid Chromatography</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DOC	Desoxicolato de sódio
OD	Densidade óptica ( <i>Optical Density</i> )
GBP	Proteínas de ligação aos glucanos ( <i>Glucan- Binding Proteins</i> )
GTF	Glucosiltransferase
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50% ( <i>half maximal inhibitory concentration</i> )
M	Molar
MBC	Concentração mínima bactericida ( <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> )
MHz	Megahertz
MIC	Concentração mínima inibitória ( <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> )
MS	<i>Mutans streptococci</i>
N	Azoto
N <sub>2</sub>	Azoto gasoso
NaOH	Hidróxido de sódio

---

---

O <sub>2</sub>	Oxigénio
PMSF	Floureto fenil-metil-sulfunilo ( <i>phenylmethyisulphonyl fluoride</i> )
Td	Tempo de duplicação
TCA	Ácido tricloroacético
UV	Ultravioleta

---

# INDÍCE

CAPITULO I	1
I.1. INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
I.1.1. CÁRIE DENTÁRIA	3
I.1.1.1. Natureza da Doença	3
I.1.1.2. Desenvolvimento da Doença	4
I.1.2. PLACA DENTÁRIA	6
I.1.2.1. Definição de Placa Dentária	6
I.1.2.2. Formação de Placa Dentária	7
I.1.2.3. Função de Placa Dentária	9
I.1.3. MICROBIOLOGIA DA FLORA ORAL	12
I.1.3.1. Composição Bacteriana da Flora Oral	12
I.1.3.2. Streptococci mutans	13
I.1.3.3. Factores de Virulência de <i>S. mutans</i> e <i>S. sobrinus</i>	15
I.1.3.3.1. Adesão Inicial à Superfície dos Dentes	16
I.1.3.3.2. Glucosiltransferase	17
I.1.3.3.3. Potencial Acidogénico e Acidúrico	19
I.1.4. PREVENÇÃO DE CÁRIE DENTÁRIA	21
I.1.4.1. Mecanismos e Compostos	21
I.1.4.2. Produtos Naturais como Agentes de Prevenção	23
I.1.5. GÉNERO <i>PLECTRANTHUS</i>	25
I.1.5.1. Aspectos Gerais	25
I.1.5.2. Uso Etnobotânico	25
I.1.5.3. Química dos <i>Plectranthus</i>	26
I.1.5.4. <i>Plectranthus barbatus</i>	27
I.1.5.5. <i>Plectranthus ecklonii</i>	29
I.1.5.6. Ácido Rosmarínico	30

<b>I.2. OBJECTIVOS</b>	33
<b>I.2.1. OBJECTIVOS ESPECÍFICOS</b>	33
<b>CAPÍTULO II: Análise do Material Biológico e Vegetal</b>	35
II.1. INTRODUÇÃO	37
II.2. MATERIAL E MÉTODOS	37
II.2.1. Material Microbiológico	37
II.2.1.1. Meio de Cultura	37
II.2.1.2. Curvas de Crescimento de <i>S. mutans</i> e <i>S. sobrinus</i>	39
II.2.1.2.1. Crescimento Microbiano	39
II.2.1.2.2. Curva de Crescimento Microbiano	41
II.2.1.2.3. Procedimento Experimental	42
II.2.2. Material Vegetal	43
II.2.2.1. Preparação de Extractos	43
II.2.2.1.1. Extracto Aquoso	43
II.2.2.1.2. Extracto Metanólico	43
II.2.2.2. Análise dos Extractos	44
II.2.2.2.1. Determinação de Fenóis Totais	44
II.2.2.2.2. Análise por HPLC e Espectroscopia de Massa	46
II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
II.3.1. Condição de Crescimento	47
II.3.1.1. Curva de Crescimento	47
II.3.1.2. Variação de pH	49
II.3.2. Análise de Extracto	50
II.3.2.1. Teor em Fenóis Totais	50
II.3.2.2. Análise de pH dos Extractos	51
II.3.2.3. Análise da Composição dos Extractos	52
II.4. CONCLUSÕES	56

<b>CAPÍTULO III: Actividade Antibacteriana dos Extractos</b>	57
III.1. INTRODUÇÃO	59
III.2. MATERIAL E MÉTODO	60
III.2.1. Efeito na Viabilidade de Células em Suspensão (MIC e MBC)	60
III.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
III.3.1. Actividade Antibacteriana	62
III.3.1.1. Efeito no Crescimento de Células em Suspensão – MIC	64
III.3.1.2. Efeito na Viabilidade de Células em Suspensão – MBC	66
III.3.2. Discussão da Actividade Antibacteriana dos Extractos	67
III.4. CONCLUSÃO	69
<b>CAPÍTULO IV: Efeito dos Extractos nos factores de virulência de <i>S. mutans</i> e <i>S. sobrinus</i>.</b>	71
IV.1. INTRODUÇÃO	73
IV.2. MATERIAS E MÉTODOS	74
IV.2.1. Susceptibilidade de GTF-extracelular aos Extractos	74
IV.2.1.1. Preparação do Homogenato de GTF-extracelular	74
IV.2.1.2. Doseamento de GTF-extracelular	75
IV.2.1.3. Actividade de GTF-extracelular	76
IV.2.1.3.1. Síntese de Glucanos Insolúveis	76
IV.2.1.3.2. Quantificação da Actividade de GTF-extracelular	77
IV.2.1.4. Efeito dos Extractos na Actividade de GTF-extracelular	78
IV.2.2. Efeito dos Extractos no Biofilme	79
IV.2.2.1. Efeito dos Extractos na Formação do Biofilme	79
IV.2.2.2. Efeito dos Extractos no Biofilme Formado	80
IV.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
IV.3.1. Susceptibilidade de GTF aos Extractos	81
IV.3.1.1. Preparação de GTF e Síntese de Glucanos Insolúveis	81
IV.3.1.2. Efeito Inibitório dos Extractos na Actividade de GTF	82
IV.3.2. Efeito Inibitório dos Extractos no Biofilme	85
IV.3.2.1. Efeito Inibitório dos Extractos na Formação de Biofilme	86

IV.3.2.2. Efeito Inibitório dos Extractos no Biofilme Formado	89
IV.3.2.3. Discussão do Efeito Inibitório dos Extractos no Biofilme	92
IV.3.3. Interferência dos Extractos na Capacidade Acidogénica	93
IV.4. CONCLUSÃO	97
<b>CAPÍTULO V</b>	99
V.1. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECIVAS FUTURAS	99
V.1.1. CONCLUSÕES GERAIS	101
V.1.2. PERSPECTIVAS FUTURAS	102
V.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
<b>ANEXOS</b>	113
ANEXO I	115
ANEXO II	116
ANEXO III	117
ANEXO IV	118
ANEXO V	119
ANEXO VI	120

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

- Figura 1 Carácter multifactorial da cárie dentária: os quatro factores primários envolvidos no desenvolvimento da mesma (Lima, 2007). 4
- Figura 2 Diagrama de formação do biofilme dentário: (a) colonização primária; (b) formação de micro-cólonias; (c) co-adesão das diferentes espécies e (d) divisão celular das espécies envolvidas do biofilme e subsequente criação de um biofilme misto com características próprias (Rickard *et al.*, 2003). 7
- Figura 3 Representação esquemática da relação entre o estado benéfico - patogénico da placa dentária. Aumento do número do microrganismo patogénico devido ao aumento das pressões ecológicas (Marsh, 2006) 10
- Figura 4 Hipótese da ecologia da placa dentária que dá origem a cárie dentária. A cárie resulta das alterações na ecologia da placa dentária devido a produção de ácidos a partir da fermentação dos açúcares provenientes da dieta, o que selecciona as espécies acidogénicas e acidúricas, como *streptococci mutans* e lactobacilos (Marsh, 2006). 11
- Figura 5 Imagem de *S. mutans* e *S. sobrinus* ([1] [2]). 13
- Figura 6 Morfologia dos *Streptococcus*: (a) individuais; (b) associados em pares e (c) associados em cadeia (Adaptado de [3]). 13
- Figura 7 Factores de virulência de *S. mutans*. (1) Adesão inicial; (2) síntese de glucanos e (3) potencial acidogénico (adaptado de Mitchell, 2003). Os mesmos factores são observados em *S. sobrinus*. 15
-

---

Figura 8	Adesão de <i>S. mutans</i> à superfície do dente e a outras bactérias independente de sacarose, durante a formação da placa dentária (adaptado de Mitchell, 2003).	16
Figura 9	Mecanismo de adesão dependente de sacarose (adaptado de Mitchell, 2003).	17
Figura 10	Potencial acidogénico de <i>S. mutans</i> e consequente desmineralização dos dentes. O mesmo processo é verificado em <i>S. sobrinus</i> (adaptado de Mitchell, 2003).	20
Figura 11	<i>Plectranthus barbatus</i> ([4]).	28
Figura 12	<i>Plectranthus ecklonii</i> ([5]).	29
Figura 13	Estrutura molecular de ácido rosmarínico (Makino <i>et al.</i> , 2000).	30
Figura 14	Câmara de Neubauer (Castillo, 2004).	40
Figura 15	Curva de crescimento microbiano em sistema fechado ([6]).	41
Figura 16	Representação gráfica das curvas de crescimento de <i>S. sobrinus</i> e <i>S. mutans</i> , por densidade óptica, em meio BHI, a 37°C e em condições de anaerobiose.	47
Figura 17	Representação gráfica da variação do pH ao longo do período de crescimento de <i>S. sobrinus</i> e <i>S. mutans</i> em meio BHI a 37°C.	49
Figura 18	Percentagem de fenóis nos extractos aquosos e metanólicos de <i>P. barbatus</i> e <i>P. ecklonii</i> .	51

---

---

Figura 19	Cromatograma de HPLC de extractos metanólicos de <i>P. barbatus</i> . * Pico correspondente à saída de DMSO.	53
Figura 20	Composto com o tempo de retenção de 14,13 minutos no extracto metanólico de <i>P. barbatus</i> : espectro de massa e estrutura química.	53
Figura 21	Cromatograma de HPLC de extractos metanólicos de <i>P. ecklonii</i> . * Pico correspondente à saída de DMSO.	54
Figura 22	Determinação de MIC e MBC pelo método de micro-diluições ([7]).	60
Figura 23	Actividade antibacteriana: A e B - extracto aquoso de <i>P. ecklonii</i> e <i>P. barbatus</i> e ácido rosmarínico sobre <i>S. sobrinus</i> e <i>S. mutans</i> , respectivamente; A' e B' – extracto metanólico de <i>P. ecklonii</i> e <i>P. barbatus</i> sobre <i>S. sobrinus</i> e <i>S. mutans</i> , respectivamente.	63
Figura 24	Actividade enzimática de GTF extracelular, produção de glucanos insolúveis a partir de sacarose.	82
Figura 25	Gráfico de percentagem de glucanos formados pelo GTF de <i>S. mutans</i> na presença de concentrações crescente de extracto aquoso de <i>P. barbatus</i> e <i>P. ecklonii</i> e de ácido rosmarínico.	83
Figura 26	Efeito inibitório de extractos aquosos de <i>P. barbatus</i> e <i>P. ecklonii</i> e do ácido rosmarínico na formação de biofilme por <i>S. mutans</i> (B) e do extracto metanólico das plantas na formação de biofilme pelo <i>S. sobrinus</i> (A') e <i>S. mutans</i> (B').	86

---

- 
- Figura 27 Percentagem de biofilme removido pelos extractos aquosos das plantas: biofilme de *S. sobrinus* (A) e de *S. mutans* (B); e pelos extractos metanólicos das plantas: biofilme de *S. sobrinus* (A') e de *S. mutans* (B'). 89
- Figura 28 Variação do pH do biofilme resuspendido de *S. mutans* e *S. sobrinus* sob efeito do extracto aquoso de *P. ecklonii* e *P. barbatus* e do ácido rosmarínico. B -, variação de pH de biofilme de *S. mutans* formado na presença do extracto /composto; B\*- variação de pH de biofilme de *S. mutans* existente, que posteriormente foi sujeito aos extractos; A – variação do pH do biofilme de *S. sobrinus* existente, que posteriormente foi sujeito aos extractos. 94
- Figura 29 Variação do pH do biofilme resuspendido de *S. mutans* e *S. sobrinus* sob efeito do extracto metanólico de *P. ecklonii* e *P. barbatus*. B e B\*- variação de pH do biofilme de *S. mutans*, formado na presença dos extractos e existente que posteriormente foi sujeito aos extractos, respectivamente; A e A\* – variação de pH do biofilme de *S. sobrinus*, formado na presença dos extractos e existente, que posteriormente foi sujeito aos extractos. 95

## ÍNDICE DE TABELAS

---

Tabela 1	Composição do meio BHI.	38
Tabela 2	Tempo de desarejamento.	38
Tabela 3	Parâmetros cinéticos da curva de crescimento de <i>S. sobrinus</i> e <i>S. mutans</i> , em meio BHI a 37°C.	48
Tabela 4	Concentração de fenóis nos extractos aquosos e metanólicos de <i>P. barbatus</i> e <i>P. ecklonii</i> .	51
Tabela 5	Valores de pH dos extractos aquosos e metanólicos de <i>P. barbatus</i> e <i>P. ecklonii</i> .	52
Tabela 6	Valores de MIC de extractos aquoso e metanólico de <i>P. barbatus</i> e <i>P. ecklonii</i> e de ácido rosmarínico sobre culturas de <i>S. mutans</i> e <i>S. sobrinus</i> .	64
Tabela 7	Valores de MBC de extractos aquoso e metanólico de <i>P. barbatus</i> e <i>P. ecklonii</i> e de ácido rosmarínico contra culturas de <i>S. mutans</i> e <i>S. sobrinus</i> .	66
Tabela 8	Efeito inibitório de extractos aquosos de <i>P. barbatus</i> e <i>P. ecklonii</i> e ácido rosmarínico na síntese de glucanos insolúveis por GTF extracelular de <i>S. mutans</i> e <i>S. sobrinus</i> . * Resultados obtidos por Aguiar, 2008.	84

---

Tabela 9	Inibição de formação de biofilme por <i>S. mutans</i> e <i>S. sobrinus</i> pelos extractos aquosos e metanólicos de <i>P. ecklonii</i> e <i>P. barbatus</i> e pelo ácido rosmarínico. * Valores obtidos por Sara Aguiar, 2008.	87
Tabela 10	Valores de IC <sub>50</sub> de remoção de biofilme formado por <i>S. mutans</i> e <i>S. sobrinus</i> pelos extractos aquosos e metanólicos de <i>P. ecklonii</i> e <i>P. barbatus</i> .	90
Tabela 11	Efeito do extracto aquoso e metanólico de <i>P. barbatus</i> e <i>P. ecklonii</i> na viabilidade de um biofilme de 48 horas formado por células de <i>S. sobrinus</i> e <i>S. mutans</i> . Apenas são apresentadas as culturas submetidas a concentração máxima testada.	91





# **CAPÍTULO I**

---

## **I.1. Introdução Geral e Revisão Bibliográfica**

## **I.2. Objectivo**



## **I.1.1. CÁRIE DENTÁRIA**

### **I.1.1.1. Natureza da Doença**

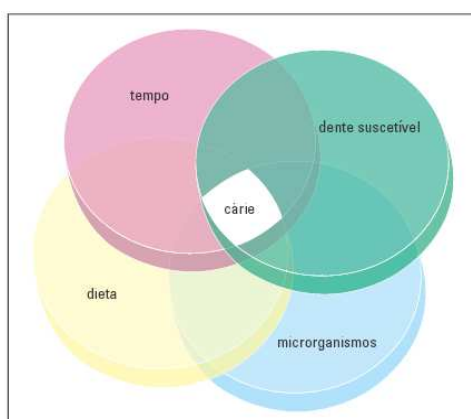
A cárie dentária é a doença oral mais comum e a maior causa de danificação dos dentes e subsequente perda dos mesmos (Addy *et al.*, 1992). Esta doença que é de incidência mundial, resulta de um processo patológico onde ocorre uma interacção entre as bactérias que colonizam ou infectam a superfície dos dentes com os constituintes da dieta, normalmente a sacarose. Este processo patológico dá origem a uma placa dentária que possui capacidades cariogénicas, por isso o aparecimento da placa dentária é a primeira evidência clínica desta doença. Trata-se de uma doença infecciosa dependente do aparecimento de determinados microrganismos na flora oral – bactérias cariogénicas. Estas bactérias estão envolvidas no processo de lesão cariogénica, pois, para além de serem capazes de formar um biofilme dentário, possuem a capacidade de produzir ácidos a partir da fermentação dos açúcares provenientes da dieta (Bowen, 2002). Estes ácidos, em especial o ácido láctico, desencadeia o processo de desmineralização dos dentes, o que leva à destruição dos tecidos dentários, tais como o esmalte, a dentina e o cimento.

De entre as várias bactérias presentes na flora oral, as espécies de *streptococci mutans* (MS, do inglês, *mutans streptococci*) participam no desenvolvimento inicial e na subsequente manutenção da lesão cariogénica (Loesche, 1989), o que faz destas os principais agentes patogénicos envolvidos nesta doença. A grande relevância destas espécies na etiologia da cárie dentária está estritamente relacionada com os seus factores de virulência, nomeadamente os que estão directamente envolvidos na capacidade de formação do biofilme e produção de ácidos (Bowen, 2002).

A natureza e elevada incidência desta doença oral fazem recair sobre ela uma série de investigações com vista a reduzir a sua incidência e prevalência.

### I.1.1.2. Desenvolvimento da Doença

O processo de formação da cárie dentária é caracterizado por uma fase inicial de desmineralização do tecido dentário mais externo, causada pelos ácidos produzidos através da fermentação dos açúcares provenientes da dieta, pelos microrganismos presentes no biofilme dentário (Marsh, 1999). Por sua vez, o desenvolvimento da mesma depende directamente de vários factores ditos primários, por isso esta doença apresenta um carácter multifactorial. Os factores primários são factores essenciais à formação da lesão cariogénica, tais como o hospedeiro (anatomia dos dentes), a flora microbiana presente no biofilme e a dieta alimentar, sugeridos no modelo proposto por Keyes em 1962 (*in* Lima, 2007). No entanto, em 1983 Newbrum sugeriu que a este modelo deve ser acrescentado o factor tempo, uma vez que o processo do desenvolvimento da doença não é instantâneo (*in* Lima, 2007). Como tal, estes quatro factores estão incluídos no modelo de formação e subsequente desenvolvimento da cárie dentária (Figura 1).



**Figura 1:** Carácter multifactorial da cárie dentária: os quatro factores primários envolvidos na formação e desenvolvimento da mesma (Lima, 2007).

Segundo este modelo, a lesão cariogénica inicia-se com a formação de uma placa dentária, pelas bactérias cariogénicas. Estas bactérias formam um biofilme complexo, onde se acumulam ácidos provenientes do metabolismo de hidratos de carbono da dieta. A produção destes ácidos promove a excessiva desmineralização do esmalte dentário, o que causa um desequilíbrio no ciclo de desmineralização/remineralização, que ao longo do tempo, poderá culminar no aparecimento de lesões cariogénicas (Lima, 2007).

Contudo, o desenvolvimento da cárie dentária também depende de factores secundários. Estes factores estão relacionados com as características da saliva, nomeadamente a velocidade do seu fluxo e os seus componentes (Weyne, 1992). O fluxo da saliva pode influenciar a concentração bacteriana presente, na medida em que um maior fluxo conduz a uma menor concentração de bactérias na cavidade oral (Valdevite, 2007). Além disso, a composição da saliva confere-lhe a capacidade de protecção, nomeadamente funciona como tampão, participa na formação de uma película que recobre o esmalte dentário e possui enzimas que fazem a digestão do amido e da sacarose (Valdevite, 2007).

Porém, o possível aparecimento da cárie dentária está estritamente relacionado com a placa dentária, logo depende dos agentes agressivos e de vários fenómenos associados ao crescimento do biofilme, tais como a alteração da composição da espécie predominante e/ou dos nutrientes. Por isso, o controlo da formação e desenvolvimento da placa dentária é o mecanismo mais eficaz na prevenção da progressão desta doença.

## **I.1.2. PLACA DENTÁRIA**

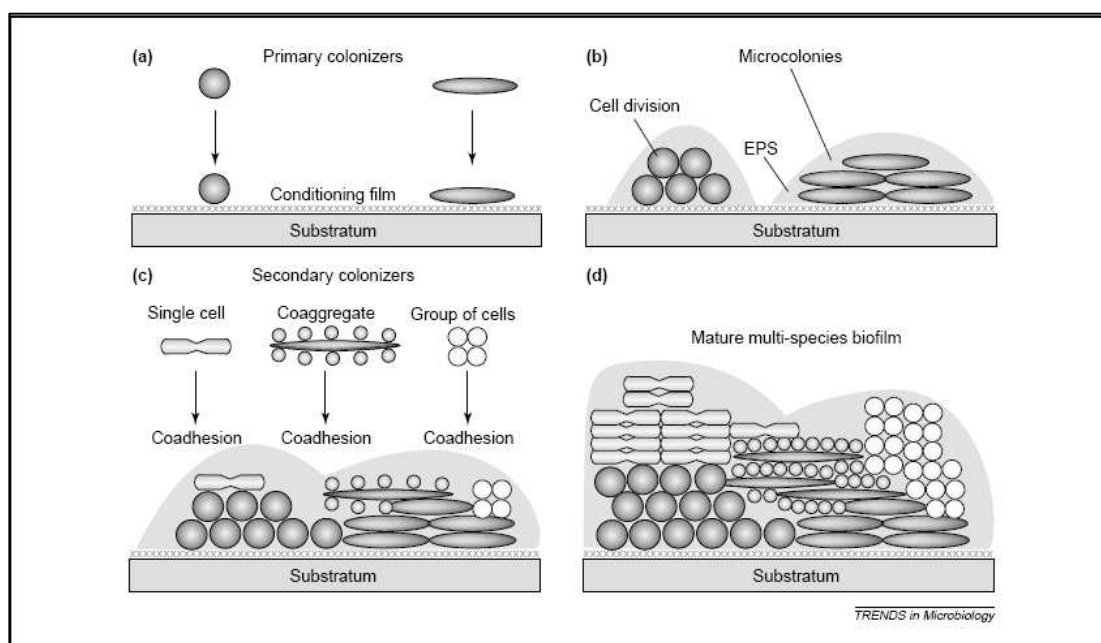
### **I.1.2.1. Definição de Placa Dentária**

A placa dentária é um complexo e típico biofilme bacteriano formado pela acumulação de bactérias da flora oral, firmemente ligadas umas às outras, sobre a superfície dos dentes. Esta placa está envolvida na etiologia da cárie dentária (Sbordone e Bortolaia, 2003) e de outras doenças orais, tais como, a gengivite crónica (Addy *et al.*, 1992), a periodontite e a periimplantite (Sbordone & Bortolaia, 2003).

Um biofilme pode ser definido como uma comunidade biológica com elevado grau de organização, onde a flora microbiana forma comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais. Estas comunidades biológicas encontram-se imobilizadas numa superfície e embebidos numa matriz orgânica produzida por elas próprias (Sunthalingam & Cvitkovitch, 2005). Dentro desta associação complexa, os microrganismos apresentam propriedades diferentes das que apresentam na fase planctónica (livre), nomeadamente propriedades fisiológicas, menor susceptibilidade ao agente antimicrobiano, interação com o tecido hospedeiro e resposta imunológica (Sbordone & Bortolaia, 2003). Portanto a formação do biofilme requer capacidades de auto-organização e resistência a perturbações ambientais, sendo que cada membro desta comunidade deve ser mais eficiente na associação do que isoladamente e deve responder às alterações do meio como uma unidade.

### I.1.2.2. Formação de Placa Dentária

A formação da placa dentária ocorre em função de uma sequência de eventos que definem três estados distintos: formação da película adquirida, colonização da superfície do dente e maturação do biofilme (Burne, 1997). A formação da película adquirida dá-se através da adsorção à superfície dentária de proteína e glicoproteínas presentes na saliva e algumas moléculas excretadas pelas bactérias, formando um filme no esmalte dentário. Uma vez formada a película adquirida, pode ocorrer a colonização da superfície dos dentes pelas bactérias da flora oral que depois desenvolvem um biofilme complexo e subsequente maturação do mesmo (Figura 2).



**Figura 2:** Diagrama de formação do biofilme dentário: (a) colonização primária; (b) formação de micro-colônias; (c) co-adesão das diferentes espécies e (d) divisão celular das espécies envolvidas do biofilme e subsequente criação de um biofilme misto com características próprias (Rickard *et al.*, 2003).

A colonização dá-se em três fases: (1) adesão reversível; (2) adesão irreversível e (3) co-adesão. Adesão reversível de bactérias orais à superfície sólida do dente dá-se através de interações fisiológicas entre a superfície da célula bacteriana e a película adquirida, criando uma área de fraca taxa de atracção (Marsh, 2004). Após a adesão reversível ocorrer a transição desta à adesão irreversível, através da interacção entre moléculas específicas presentes na superfície das células bacterianas (adesinas) e receptores complementares na película adquirida (Lamont & Jenkinson, 2002). As bactérias da flora oral normalmente possuem mais do que um tipo de adesinas nas suas membranas celulares e, por isso, podem estar envolvidas em múltiplas interacções tanto com receptores do próprio meio como com receptores de outras bactérias (co-adesão) (Marsh, 2004). A co-adesão envolve receptores de adesina com elevado grau de especificidade inter-espécies (inter-bactérias) e leva a um aumento na diversidade do biofilme e formação de estruturas de morfologia invulgar (Kolenbrander *et al.*, 2000). Esta etapa é crucial para o funcionamento do biofilme dentário, pois a co-adesão facilita a organização funcional da placa dentária, uma vez que as bactérias se envolvem numa série de interacções bioquímicas antagónicas e sinérgicas. Destas interacções resulta uma maior eficiência metabólica ao nível da cadeia alimentar e, até mesmo, ao nível da sobrevivência (Marsh, 2004).

Depois da colonização dos dentes, dá-se a multiplicação de microrganismos por divisão celular, o que resulta num confluyente crescimento e, eventual, aparecimento de um biofilme constituído por uma cultura mista que, espacialmente e funcionalmente, está organizado numa estrutura tridimensional. A produção de polímeros resulta na formação de uma matriz extracelular complexa constituída por glucanos insolúveis e solúveis, fructanos e heteropolímeros. Esta matriz é comum nos biofilmes e tem um papel fundamental na integridade estrutural do biofilme e, além disso, esta matriz pode ser biologicamente activa na medida em que retém nutrientes, água e enzimas fundamentais (Allison, 2003).

Uma vez estabelecido o biofilme dentário, a microflora residente mantém-se relativamente estável ao longo do tempo, garantindo a sobrevivência das colónias em ambientes instáveis.

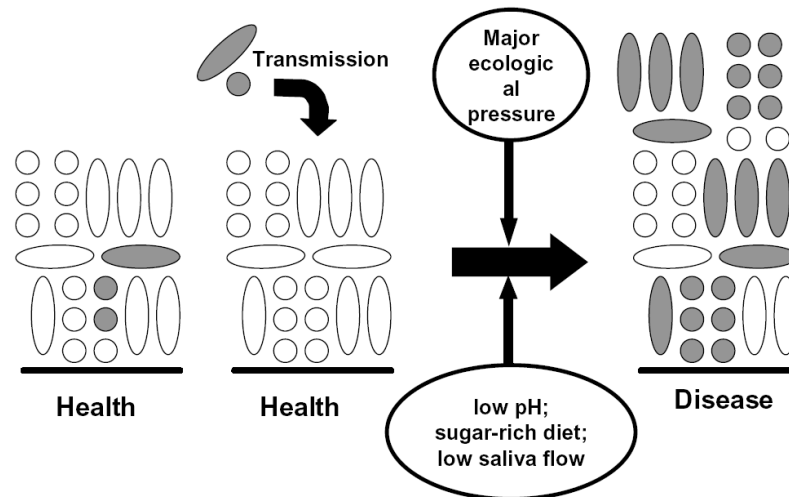
### **I.1.2.3. Funções de Placa Dentária**

Enquanto um típico biofilme, a placa dentária possui como principal função a protecção das células bacterianas. Para além disso, deve garantir a manutenção das células imobilizadas, garantir a estrutura tridimensional e serve de barreira contra a penetração de agentes agressivos. A elevada estabilidade que o biofilme proporciona está directamente ligada a diversas vantagens proporcionadas pelo mesmo, nomeadamente a melhor comunicação entre as células, melhor proliferação das células, maior capacidade metabólica, acesso a recursos que não podem ser utilizados por células individuais e melhor defesa contra agentes antagónicos (Leite, *et al.*, 2001).

Enquanto sistema inserido na cavidade oral, a placa dentária poderá ter duas funções antagónicas, ser benéfica ou patogénica. O carácter benéfico da placa dentária é normalmente desconhecido, uma vez que ela é associada de imediato às situações patológicas. Mas ao contrário do que se pensa, a colonização microbiana dos dentes que dá origem a uma placa bacteriana pode ser benéfica, na medida em que contribui para a defesa da cavidade bucal contra os organismos patogénicos, através da competição. No entanto, o carácter patogénico manifesta-se quando ocorrem perturbações na homeostase microbiana devido a alterações num parâmetro considerado crítico no que diz respeito a manutenção da estabilidade ecológica.

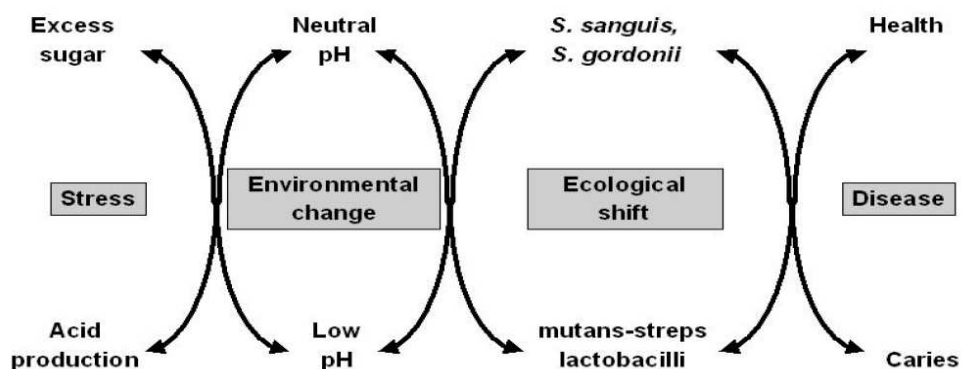
A homeostase da cavidade oral é regulada por alguns parâmetros, tais como a integridade das defesas do hospedeiro (por exemplo o fluxo da saliva) e a composição da dieta (Marsh, 2006). Portanto, o aparecimento de lesões ocorre quando há perturbações destes parâmetros devido a pressões ecológicas, o que provoca um desequilíbrio dos processos físico-químicos orais, que por sua vez,

está associado a modificações da composição e actividades metabólicas da comunidade que define o biofilme (Burne, 1998) (Figura 3).



**Figura 3:** Representação esquemática da relação entre o estado benéfico - patogénico da placa dentária. Aumento de número do microrganismo patogénico devido ao aumento das pressões ecológicas (Marsh, 2006).

No caso da cárie dentária o desequilíbrio físico-químico ocorre devido a pressões ecológica que incluem uma dieta rica em açúcares, condições de baixo pH e baixo fluxo da saliva (Marsh, 2006). Estas pressões levam a um aumento da proporção de bactérias cariogénicas (acidogénicas e acidúricas), especialmente *streptococci mutans* e lactobacilos que estão envolvidos na desmineralização do esmalte. Estas bactérias são capazes de metabolizar rapidamente os açúcares provenientes da dieta através da fermentação, causando, assim, flutuações no pH, o que culmina na desmineralização dos dentes (Marsh, 2006) (Figura 4).



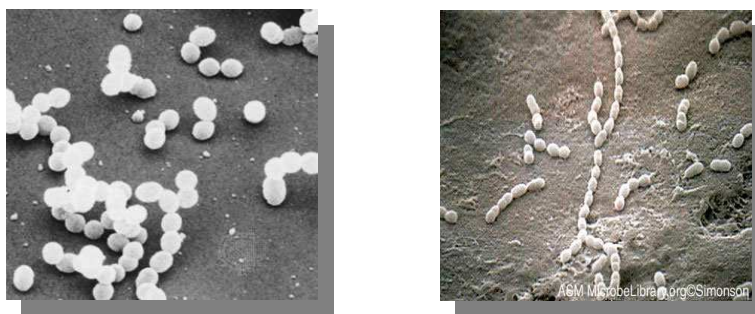
**Figura 4:** Hipótese da ecologia da placa dentária que dá origem a cárie dentária. A cárie resulta das alterações na ecologia da placa dentária devido a produção de ácidos a partir da fermentação dos açúcares provenientes da dieta, o que selecciona as espécies acidogénicas e acidúricas, como *streptococci mutans* e lactobacilos (Marsh, 2006).

### I.1.3. MICROBIOLOGIA DA FLORA ORAL

#### I.1.3.1. Composição Bacteriana da Flora Oral

A microflora oral é um ecossistema complexo, onde existem diversas espécies que ao colonizarem a superfície dos dentes formam as placas dentárias. A favorável condição ambiental da cavidade oral, nomeadamente a temperatura (34°-36°C), elevada humidade, pH neutro e disponibilidade de nutrientes, faz dela um alvo propício para o crescimento de diversas comunidades bióticas, tais como comunidades constituídas por bactérias, protozoários, fungos (leveduras) e alguns vírus. No entanto, evidências científicas revelam que nestas comunidades prevalecem as bactérias anaeróbicas ou anaeróbicas facultativas, dentre as quais estão as pertencentes aos géneros *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Micrococcus*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* e *Leptotriquia* (Moreira *et al.*, 2003). Muitas destas bactérias estão associadas à formação da placa dentária com capacidade patogénica ou não.

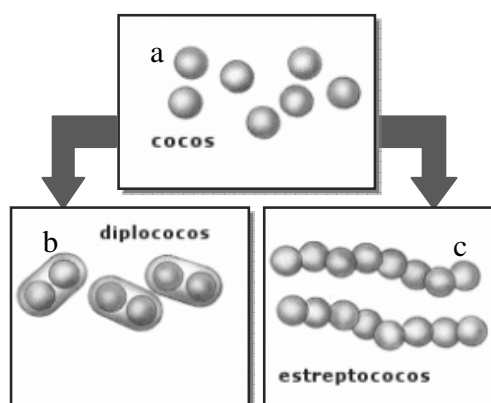
Como já foi referido anteriormente, é a composição bacteriana das placas dentárias que define o seu carácter patogénico, e consequentemente o desenvolvimento de doenças orais. No caso da cárie dentária, esta composição bacteriana da placa dentária é marcada pela presença de bactérias cariogénicas, principalmente duas espécies de *streptococci mutans*, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) e *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) (Figura 5), são geralmente apontados como agentes etiológicos primários desta doença nos humanos (Loesche, 1986).



**Figura 5:** Imagem de *S. mutans* e *S. sobrinus* ([1] e [2]).

### I.1.3.2. *Streptococci mutans*

O grupo *streptococci mutans* alberga bactérias pertencentes ao grande género *Streptococcus*. De acordo com o *Manual of Systematic Bacteriology* de *Bergey*, os *Streptococcus* são bactérias Gram positivas, de catalase negativa, anaeróbicas facultativas, esféricas ou ovóides com menos de 2  $\mu\text{m}$  (*in* Ferreira & Sousa, 2000). Em grupo, os *Streptococcus* associam-se em pares ou cadeias formando “rosários” (Aguiar, 2008), (Figura 6).



**Figura 6:** Morfologia dos *Streptococcus*: (a) individuais; (b) associados em pares e (c) associados em cadeia (Adaptado de [3]).

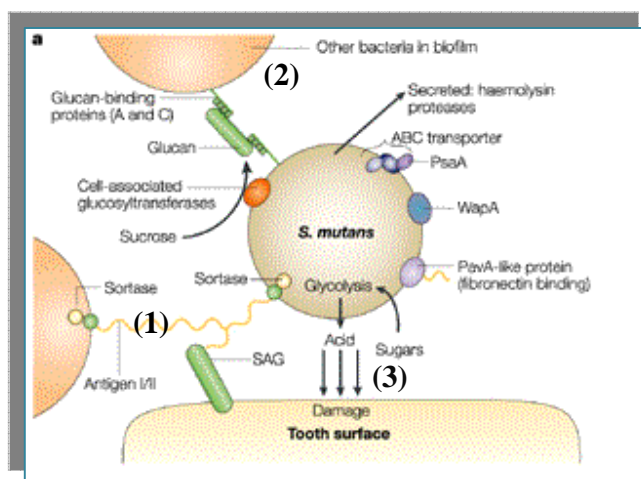
As espécies pertencentes ao género *Streptococcus* estão geralmente associadas à formação da placa dentária, porque a maiorias dos colonizadores primários pertencem a este género. Também são consideradas potenciais causadoras de cárie dentária, uma vez que muitas destas espécies são capazes de fermentar os açúcares provenientes da dieta e produzir ácido como produto final (Banas, 2004). Porém, de entre as 18 espécies orais do género *Streptococcus* já identificadas (Mouton e Robert, 1995), *S. mutans* e *S. sobrinus*, ocupam um papel central na etiologia da cárie dentária humana (Loesche, 1986). A atribuição deste papel remonta a várias pesquisas realizadas ao nível da cárie dentária, sendo que numa destas pesquisas, em 1924, Clarke isolou uma bactéria a partir de uma lesão cariogénica, que ele designou por *Streptococcus mutans*, devido à sua aparência com um *mutant* e a forma de cocos (*in* Banas, 2004). Subsequentemente, houve diversas investigações com o objectivo de confirmar a associação desta bactéria com as lesões cariogénicas (Banas, 2004), o que culminou na hipótese de que *S. mutans* é responsável primário do aparecimento da cárie dentária (Loesche, 1989). Os avanços na taxonomia permitiram isolar diversas espécies semelhantes a *S. mutans*, que colectivamente formaram o grupo dos *streptococci mutans* (Coykendall, 1989).

O elevado potencial cariogénico associado a *S. mutans* e *S. sobrinus* advém de alguns factores de virulências próprios destas duas espécies, nomeadamente potencial acidogénico, adesão inicial à superfície do dente e capacidade para sintetizar glucanos insolúveis e solúveis em água devido à existência do enzima glucosiltransferase.

### I.1.3.3. Factores de Virulência de *S. mutans* e *S. sobrinus*

A virulência de uma bactéria engloba todas as propriedades da mesma que promovem a sua entrada, colonização e crescimento no organismo do hospedeiro.

O elevado potencial cariogénico associado a *S. mutans* e *S. sobrinus* advém de alguns factores de virulência próprios das mesmas, nomeadamente (1) adesão inicial à superfície dos dentes, (2) capacidade para sintetizar glucanos insolúveis e solúveis em água devido à existência dos enzimas glucosiltransferases (GTFs) e (3) potencial acidogénico e acidúrico (Figura 7) (Loesche, 1989 e Wiater, *et al.*, 1999). Estes factores de virulência conferem a estas espécies a capacidade de adesão e acumulação na superfície dos dentes, definindo assim um biofilme com propriedades cariogénica.

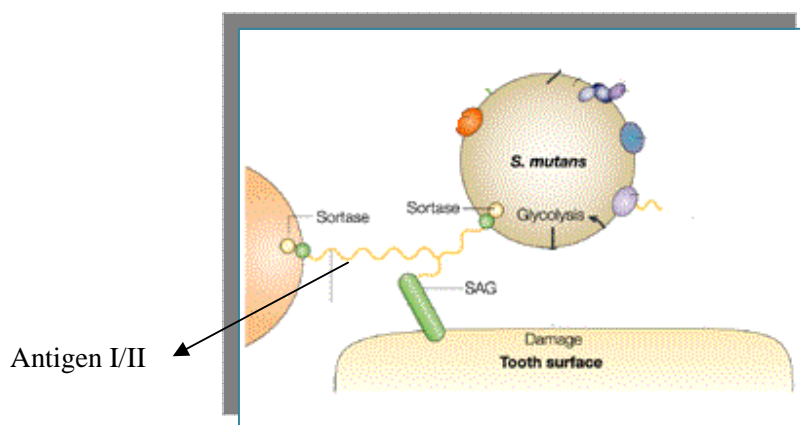


**Figura 7:** Factores de virulência de *S. mutans*. (1) Adesão inicial; (2) síntese de glucanos e (3) potencial acidogénico (adaptado de Mitchell, 2003). Os mesmos factores são observados em *S. sobrinus*.

### I.1.3.3.1. Adesão Inicial à Superfície dos Dentes

A adesão de *S. mutans* e *S. sobrinus* que origina a placa dentária pode ser independentemente ou dependente da sacarose. A adesão independente da sacarose dá-se a partir da adesão da bactéria aos componentes da saliva presentes na película adquirida no esmalte dos dentes. É este tipo de adesão que, normalmente, inicia o processo de colonização, enquanto a adesão dependente da sacarose é responsável pela acumulação das comunidades bacterianas na superfície do dente. Portanto a capacidade de adesão inicial está associada a uma via independente da sacarose.

A adesão independente da sacarose em *S. mutans* poderá estar relacionada com o antígeno I/II, uma proteína de superfície (Figura 8) (Banas, 2004). Esta proteína, que também é encontrada na maioria das espécies do grupo *streptococci mutans* orais, liga-se a aglutinina salivar, componente da película adquirida, e a outras placas bacterianas (Petersen, et al., 2002). Em seguida, com a disponibilidade de sacarose, a célula bacteriana activa os enzimas glucosiltransferases, que sintetizam glucanos extracelulares a partir da sacarose, o que inicia a adesão dependente de sacarose, contribuindo para o desenvolvimento de um biofilme patogénico estritamente relacionado com a cárie dentária.

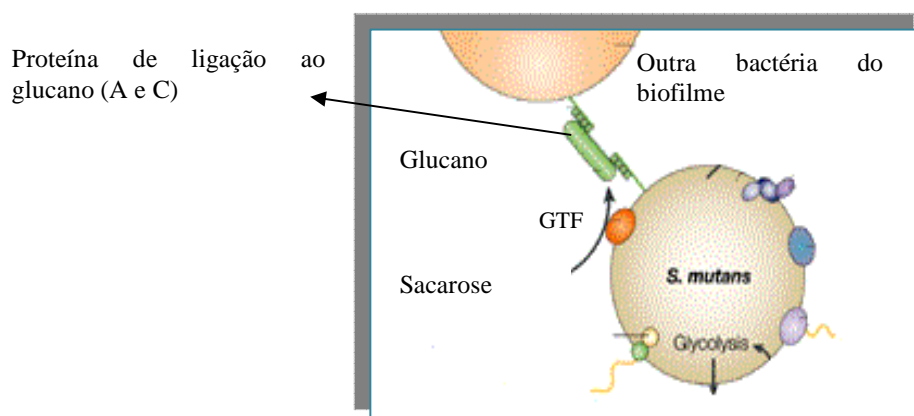


**Figura 8:** Adesão de *S. mutans* à superfície do dente e a outras bactérias independente de sacarose, durante a formação da placa dentária (adaptado de Mitchell, 2003).

### I.1.3.3.2. Glucosiltransferases

A actividade de glucosiltransferase (GTF; EC 2.4.1.5) na síntese de glucanos é o principal mecanismo interveniente na adesão dependente de sacarose (Figura 9), o que faz dela um dos principais factores de virulência associado a capacidade patogénica de *S. mutans* e *S. sobrinus* (Koo, et al., 2002).

As GTFs são enzimas que hidrolisam, com grande especificidade, moléculas de sacarose, dando origem a moléculas de glucose e de frutose (Monchois, *et al.*, 1999). As unidades de glucose resultantes são, posteriormente, unidas através de ligações glicosídicas  $\alpha(1-6)$  e  $\alpha(1-3)$ , formando polissacarídeos denominados por glucanos, que podem ser solúveis em água ou insolúveis em água (Wiater, *et al.*, 1999). Os glucanos solúveis em água apresentam, predominantemente, ligações  $\alpha(1-6)$ , enquanto os glucanos insolúveis são composto, predominantemente, por ligações  $\alpha(1-3)$  (Wiater, *et al.*, 1999). Ambos os glucanos promovem a aderência entre as células bacterianas e entre as células bacterianas e a superfícies dos dentes, durante a formação da placa dentária. Porém, os glucanos solúveis promovem a agregação bacteriana, enquanto os glucanos insolúveis são apontados como os principais responsáveis pela adesão à superfícies (Wiater *et al.*, 1999).



**Figura 9:** Mecanismo de adesão dependente de sacarose (adaptado de Mitchell, 2003).

As espécies bacterianas *S. mutans* e *S. sobrinus* produzem três diferentes tipos de GTFs, que podem surgir na forma extracelular, associados à membrana celular e intracelular (Huang *et al.*, 2006 & Tamesada, 2004). Todos os GTFs, colectivamente, são responsáveis pela síntese tanto de glucanos insolúveis como de glucanos solúveis em água, no entanto, cada um tem propriedades distintas, que variam consoante a molécula “*primer*” requerida, proporção de ligações  $\alpha(1-6)$  e  $\alpha(1-3)$ , o grau de ramificações introduzidas no glucano e o comprimento total da cadeia de glucano produzido. Consoante estas propriedades, estas enzimas são classificadas em três grupos: GTF-S, responsável pela síntese de glucanos solúveis em água; GTF-I, responsável pela síntese de glucanos insolúveis em água, e GTF-SI, responsável pela síntese de ambos os glucanos (Huang *et al.*, 2006 & Tamesada, 2004). Portanto, a capacidade de síntese destas enzimas determina a quantidade de glucanos insolúveis e solúveis sintetizados pelas bactérias. Estruturalmente, estas enzimas são membros da superfamília das  $\alpha$ -amilases e contêm um motivo  $\alpha/\beta$ -barril (Banas & Vickerman, 2003). O seu domínio catalítico de 1000 aminoácidos contém aminoácidos conservados que são necessários para a hidrólise da sacarose.

Uma vez formados, os polímeros de glucanos promovem a adesão das bactérias à película adquirida formada à superfície dos dentes e a outras bactérias, através de ligações por pontes de hidrogénio. Estas ligações são promovidas pelos próprios GTFs e por proteínas de ligação aos glucanos (GBPs, do inglês, *glucan-binding proteins*) (Banas & Vickerman, 2003). Algumas destas GBPs são na realidade proteínas de superfície, que actuam como receptores de glucanos, enquanto outras são proteínas excretadas, que se associam à célula quando os glucanos revestem a célula bacteriana (Banas & Vickerman, 2003). Estas proteínas também existem em espécies da placa dentária que não pertencentes a género *Streptococcus*, o que promove a sua colonização.

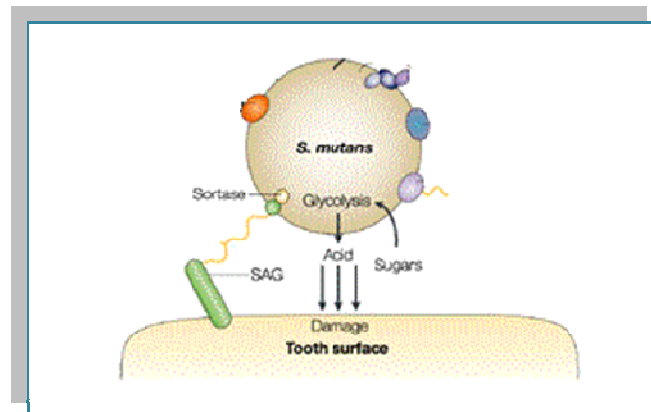
Os polímeros de glucanos definem, assim, a formação da matriz extracelular que, por sua vez, promove a formação do biofilme dentário que

constitui a placa dentária e todas as suas capacidades patogênicas envolvidas no desenvolvimento da cárie dentária.

#### **I.1.3.3.3. Potencial Acidogénico e Acidúrico**

A produção de ácidos e subsequente sobrevivência em meio ácido é um dos factores de virulência atribuídos a microrganismos implicados na etiologia da cárie dentária.

Tanto *S. mutans* como *S. sobrinus* utilizam os açúcares provenientes da dieta, tais como a sacarose e a glucose, como substrato para obtenção de energia necessária para a manutenção de processos vitais à célula, através da fermentação dos mesmos. Por isso, ambas as espécies possuem uma via glicolítica completa a partir da qual produzem ATP e, como produtos finais, ácidos orgânicos, tais como o ácido láctico, ácido acético e etanol, que são posteriormente excretados para o exterior da célula bacteriana (Loesche, 1993). A produção destes ácidos orgânicos provoca alterações no biofilme, nomeadamente o abaixamento do pH (pH <5,5). Além disso, estes ácidos, ao difundirem através do fluido do biofilme até à superfície do esmalte, provocam a desmineralização do mesmo, como consequência da alteração da composição em minerais tais como o cálcio, fosfatos e fluoretos (Lemos *et al.*, 2005) (Figura 10). Estas alterações no pH e na superfície do dente promovem a proliferação de espécies acidogénicas e tolerantes a meios ácidos (Banas, 2004), o que agrava ainda mais a desmineralização da superfície dos dentes.



**Figura 10:** Potencial acidogénico de *S. mutans* e consequente desmineralização dos dentes. O mesmo processo é verificado em *S. sobrinus* (adaptado de Mitchell, 2003).

Adicionalmente ao potencial acidogénico associado a *S. mutans* e *S. sobrinus*, estas possuem a capacidade de tolerância aos ácidos – acidúria. Esta capacidade advém do facto destas espécies conseguirem manter a via glicolítica mesmo á valores de pH inibidores do crescimento (abaixo de pH 4,4) (Banas, 2004). Evidências científicas demonstram que esta capacidade de tolerar meios ácidos está relacionada com a síntese de glucanos insolúveis e formação de biofilme, uma vez que as células, dentro do biofilme, conseguem tolerar melhor as alterações do pH do que as células planctónicas (McNeill, *et al.*, 2003). Adicionalmente, sabe-se que o carácter acidúrico de *S. mutans* é mediado por uma bomba de prótons  $F_1F_0$ -ATP e também por adaptações na expressão de genes e proteínas (Banas, 2004).

Portanto, o potencial acidogénico e, a adicional acidúria associado a *S. mutans* e *S. sobrinus* confere-lhes o carácter patogénico envolvido no desenvolvimento da cárie dentária.

## **I.1.4. PREVENÇÃO DA CÁRIE DENTÁRIA**

### **I.1.4. 1. Mecanismos e Compostos**

Tendo em conta que o desenvolvimento da cárie dentária é determinado tanto pela dieta como pela composição bacteriana que define a placa dentária, a sua prevenção só poderá fazer-se mediante o controlo destas duas determinantes. Porém, a dieta humana é, normalmente, constituída por elevada quantidade de hidratos de carbono fermentáveis, portanto a prevenção da cárie dentária só poderá ser feita através do controlo da placa dentária. Partindo do princípio que o potencial patogénico da placa dentária é derivado do potencial cariogénico das bactérias que a compõem, o estabelecimento de medidas que se interponham em qualquer propriedade fisiológica destas bactérias pode resultar na prevenção da cárie dentária.

Durante muitos anos, o método mecânico para remover a placa dentária, através de escovagem dos dentes, foi considerado como o método mais seguro e mais eficaz na prevenção da cárie dentária (Addy, *et al.*, 1992). Porém, esta técnica tem-se revelado ineficaz, porque, para além do facto de que o indivíduo não possuir capacidades inerentes para limpar eficientemente a superfície do dente, existem certas superfícies dentárias que são particularmente difíceis de limpar, tais como fissuras e áreas próximas dos dentes (Rugg-Gunn & MacGregor 1978 in Addy, *et al.*, 1992). Por isso, o método mecânico por si só não é eficaz no controlo da placa dentária.

Reconhecendo as limitações do método mecânico, tem-se implementado, cada vez mais, os agentes químicos como coadjuvantes na higiene oral, nomeadamente no controlo da placa dentária. A utilização destes compostos tem como objectivo promover alterações na comunidade microbiológica da placa. Estas alterações estão ligadas à interferência destes compostos com a adesão das bactérias à superfície dos dentes, prevenindo a formação de biofilmes e

removendo os biofilmes pré-existentes, e na viabilidade bacteriana, promovendo a morte bacteriana e subsequente prevenção de futuros biofilmes (Sbordone & Bortolaia, 2003). Diversas investigações têm sido desenvolvidas com vista a encontrar compostos com actividade anti-adesiva, antimicrobiana e com capacidade para remover a placa dentária. Entre estes compostos os mais comuns e mais eficazes são os antibióticos, enzimas, anticépticos, compostos amónio quaternários, bisbiguadinas (cloro-hexedina), compostos fenólicos sintéticos (timol e triclosan), iões metálicos (zinco e cobre), agentes oxidantes, etc (Eley, 1999). Entre os compostos apresentados, a cloro-hexedina, uma bisbiguadina dicatiónica é o melhor inibidor da placa dentária. A cloro-hexedina é um composto com características antimicrobianas, que tem actividade sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo aeróbias e anaeróbias, e fungos, tais como leveduras. A sua acção antibacteriana é derivada do aumento da permeabilidade da membrana celular seguido de coagulação das macromoléculas citoplasmáticas (Eley, 1999). No entanto este composto apresenta algumas contra-indicações, tais como, o aparecimento de manchas nos dentes e possível mau estar associado a náuseas, vómitos, diarreias, hiper-salivação, dessensibilização das papilas gustativas e consequente perda de paladar (Valdevite, 2007).

Os compostos químicos são mais eficazes no controlo da placa dentária e subsequente prevenção da cárie dentária, mas podem ter associados efeitos secundários. Por isso, cada vez mais, há uma maior procura de produtos naturais capazes de combater e prevenir a cárie dentária.

### **I.1.4. 2. Produtos Naturais como Agentes de Prevenção**

O uso de produtos provenientes de plantas no combate aos microrganismos patogénicos tem sido uma mais-valia ao nível da microbiologia clínica. Esta vantagem advém do facto de se tratar de produtos naturais, o que faz toda a diferença aquando da escolha por parte do público, que tem vindo a manifestar uma certa preocupação com a excessiva prescrição de produtos químicos.

O grande potencial das plantas como agentes antimicrobianos está directamente relacionado com a sua composição química. Ao nível da composição química, um dos grupos de maior interesse são as substâncias aromáticas, das quais, os principais são compostos fenólicos ou os seus derivados e metabolitos secundários. Estas substâncias têm revelado grande capacidade ao nível da defesa da planta, nomeadamente na sua defesa contra os microrganismos, insectos e herbívoros. Alguns destes compostos são responsáveis pela pigmentação (exemplo: taninos e quinonas), odores (exemplo dos terpenóides) e sabor (flavonóides). Estes compostos podem ser divididas em várias categorias: compostos fenólicos, terpenóides e óleos essenciais, alcalóides, lectinas, polipéptidos e poliactilenos (Cowan, 1999). Os mecanismos de acção destes compostos passam-se pela interacção com a membrana, causando a disrupção da mesma, inactivação e/ou inibição de enzimas, interacção com o *DNA*, etc.

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários provenientes da via metabólica do ácido xiquímico e/ou acetato que, não sendo azotados, têm anel ou anéis aromático. Estes compostos apresentam diversas funções, nomeadamente, actuam como radicais livres, inibidores de crescimento, protectores das plantas ao *stress* ambiental, mecanismo de defesa a pragas e doenças (Evaristo & Leitão, 2001) e ainda como agente antimicrobiano, como por exemplo o catecol e o pirogalol (Cowan, 1999). O local e o número de grupos hidroxilos num grupo fenólico têm sido apontados como sendo os responsáveis pelo maior ou menor grau de toxicidade destes compostos, evidenciando que um aumento de

hidroxilação resulta num aumento da toxicidade. Adicionalmente, alguns autores apontam que maiores níveis de oxidação dos fenóis resultam numa maior capacidade inibitória.

Os terpenóide são metabolitos secundários que fazem parte do grupo de óleos essenciais, que possui como estrutura base um isopreno ( $C_{10}H_{16}$ ) e, consoante o número de átomos de carbono, podem ocorrer sob a forma de diterpenóides, triterpenóides e tetraterpenóides ( $C_{20}$ ,  $C_{30}$  e  $C_{40}$ ). Estes compostos têm demonstrado actividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiprotozoária (Cowan, 1999). O mecanismo de acção destes compostos nos microrganismos ainda não é bem conhecido, mas pensa-se que poderá estar envolvido com a ruptura da membrana por compostos lipofílicos. Um estudo realizado por Koo *et al* (2005), aponta *tt*- farnesol, um terpenóide, como um dos compostos mais activo sobre *S. mutans* e segundo Bard *et al* (1988), a sua acção antibacteriana é ao nível de disrupção da membrana, reduzindo a viabilidade celular.

Portanto, as plantas, pelas suas propriedades químicas, apresentam um grande potencial antimicrobiológico. Esta propriedade tem suscitado um grande interesse ao nível da investigação de compostos activos na prevenção da cárie dentária, com vista a desenvolver estratégias mais naturais no controlo da placa dentária. Nesta área de investigação já existem diversos estudos que comprovam bons resultados na aplicação de plantas no combate à placa dentária através da interferência com a viabilidade bacteriana e até mesmo com os factores de virulência de *streptococci mutans*. Também já foi observado potencial anticariogénico nos compostos bioactivos naturais *in vitro* e *in vivo* (Koo *et al.*, 2002 e Duarte *et al.*, 2006). Um bom exemplo de um produto natural com actividade anticariogénica é o própolis, que apresenta capacidade inibidora sobre a actividade de GTFs e o crescimento de *S. mutans* (Koo, *et al.*, 2002).

## **I.1.5. GÉNERO *PLECTRANTHUS***

### **I.1.5.1. Aspectos Gerais**

O género *Plectranthus* é um grande género pertencente à família das *Lamiaceae*, que apresenta um total de, aproximadamente, 300 espécies, amplamente distribuídas pela África tropical, Ásia e Austrália (Lukhoba, *et al.*, 2006). Muitas espécies deste género têm sido alvo de diversas investigações devido ao grande interesse económico, ornamental e medicinal que incide sobre estas e também devido à grande diversidade de possíveis usos etnobotânicos. Em particular, todo o interesse em torno destas plantas está ligado à sua peculiar composição química.

Morfologicamente são, na maioria, espécies sub-arbustivas ou herbáceas, com caules e folhas normalmente suculentos ou semi-suculentos. No entanto, o critério morfológico que permite discriminar as plantas pertencentes a este género ainda não está completamente estabelecido, devido à elevada semelhança com plantas de outros géneros, nomeadamente, *Solenostemon* e *Englerastrum* (Lukhoba, *et al.*, 2006).

### **I.1.5.2. Uso Etnobotânico**

As espécies do género *Plectranthus* apresentam um vasto leque de aplicações, sendo que na sua maioria são com fins terapêuticos, como consequência das suas propriedades medicinais. De entre todas as espécies, *Plectranthus amboinicus* e *Plectranthus barbatus* (*P. barbatus*) são as mais utilizadas para tratamento de um maior número de doenças e cobrem cerca de 68% do uso tradicional de plantas deste género (Lukhoba *et al.*, 2006). Lukhoba *et al* (2006) efectuaram uma revisão das utilizações mais comuns de 62 espécies deste género, dentro da qual enumeram as aplicações medicinais, ornamentais e alimentares.

As aplicações medicinais envolvem o tratamento de diversas doenças, desde desordens digestivas, problemas respiratórios, infecções e até situações patológicas associadas à pele (Lukhoba *et al.*, 2006).

Um das características destas plantas que suscita um grande interesse económico é a capacidade de várias espécies crescerem como ornamentais. Esta potencialidade destas plantas tem vindo a ganhar poder devido, em grande parte, às suas características vistosas comprovadas pelas suas flores e folhagem extremamente atractivas. Mas também, a este uso, está subjacente a elevada capacidade de resistência a doenças e de sobrevivência a condições de carência de água destas plantas. Tudo isto tem contribuído para uma maior disseminação destas espécies.

### **I.1.5.3. Química dos *Plectranthus***

Apesar deste género abarcar várias plantas de interesse económico e medicinal, a sua química ainda não está totalmente estabelecida. No entanto, sabe-se que na sua composição química, estas plantas apresentam como maiores constituintes os diterpenóides, óleos essenciais e compostos fenólicos (Abdel-Mogib, *et al.*, 2002).

Por isso, a maioria dos estudos fitoquímicos sobre estas espécies tem-se focalizado no isolamento e na identificação de diterpenóides. De entre os diferentes tipos de diterpenóides, o grupo de diterpenóides de estrutura abietânica é aquele que se apresenta em maior abundância neste género e, por isso, é o grupo mais estudado. Como tal, já foram identificados muitos compostos pertencentes a este grupo, como por exemplo o coleon F e C, coleonol C, carioical e plectrina identificados em *P. barbatus*, coleon M, N, O, P, Q e R identificados em *Plectranthus caninus*, etc (Abdel-Mogib, *et al.*, 2002). Alguns destes compostos apresentam actividade antimicrobiana, e esta vertente poderá explicar alguns usos com fins medicinais, especialmente no tratamento de algumas infecções e

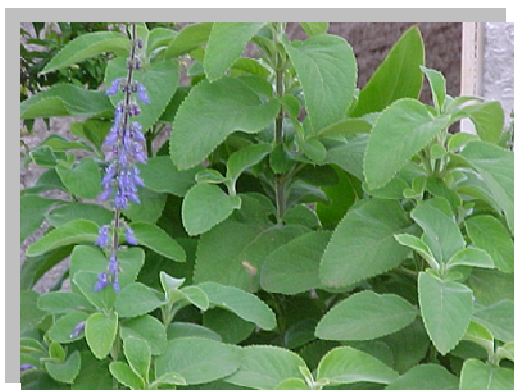
inflamações. Em particular, as propriedades antimicrobianas foram encontradas em alguns diterpenóides abietânicos, como por exemplo o 7-epigrandiodone D e grandiedone D isolados de *Plectranthus grandidentatus* (Teixeira *et al.*, 1997) e 11-Hidroxi-12-oxo-7,9 (11), 13-abietatriene, isolados a partir de *Plectranthus elegans*, inibiram a germinação de esporos do fungo *Cladosporium cucumerinum* e o crescimento de bactérias Gram-positivas, em particular *Bacillus subtilis* (Dellar *et al.*, 1996; Gibbons, 2004).

#### **I.1.5.4. *Plectranthus barbatus***

De entre a grande variedade de espécies pertencente ao género *Plectranthus*, o *P. barbatus* é uma das espécies mais estudada. Esta espécie, nativa de África encontra-se distribuída pela África, Ásia e América do Sul. No Brasil esta planta é conhecida por “falso bolbo”, “malva santa” ou “bolbo nacional” e é uma das plantas mais citadas de entre a panóplia de plantas medicinais (Albuquerque *et al.*, 2007).

Esta espécie é uma erva aromática ou sub-arbusto perene de ramos sub-lenhosos. As folhas são pecíoladas, elípticas e pilosas e com bordo denteado. As flores são de coloração azulada e crescem em forma de espigas. São estas características morfológicas que permitem a distinção de *P. barbatus* (Figura 11) das outras espécies do mesmo género, especialmente de *Plectranthus amboinicus* (hortelã-de-folha-grande).

O grande interesse científico associado a esta planta advém do elevado uso popular do chá das suas folhas no tratamento de diversas doenças, desde problemas digestivos até desordens no sistema nervoso (Albuquerque, *et al.*, 2007). Este interesse permitiu a realização de diversos estudos com o objectivo de definir as propriedades terapêuticas desta planta. Entre estas propriedades, encontra-se a capacidade antioxidante (Albuquerque, *et al.*, 2007), anti-inflamatória, antimicrobiana e antifúngica (Lukhoba *et al.*, 2006).



**Figura 11:** *Plectranthus barbatus* ([4]).

As suas propriedades terapêuticas estão directamente ligadas à presença de diterpenóides na sua composição química. A partir de estudos realizados, já foi possível identificar alguns destes compostos, tais como a plectrina (Kubo *et al.*, 1984 in Abdel-Mogib *et al.*, 2002), plectratona J, *coleon* F e E, plectrinona B, (16R)-plectrinona (Abdel-Mogib *et al.*, 2002), ciclobutatusina, barbatusina, 7 $\beta$ -acetil-12-desacetoxiciclobutatusina (Albuquerque, *et al.*, 2007), *forskolin* (Lukhoba *et al.*, 2006) e derivados fenólicos como o *nepetoidins* A e B (in Falé *et al.*, 2008). Na literatura, a barbatusina, presente nos extractos polares, e o *forskolin*, presente nos extractos orgânicos, são referenciados como os dois compostos mais abundantes nesta planta (Lukhoba *et al.*, 2006; Albuquerque, *et al.*, 2007). Porém, os estudos realizados, por Falé *et al.*, 2008, em extracto aquoso das folhas desta planta obtida no herbário da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, revelaram uma composição constituída por ácido rosmarínico, como composto maioritário, *scutellarein 4- metylether-7-o-glucoronide* e (16S)-*coleon* E.

A comparação destes estudos revela que, os extractos orgânicos apresentam maior teor em diterpenóides do que os extractos aquosos, no entanto estes últimos apresentam maior teor em compostos fenólicos.

#### **I.1.5.5. *Plectranthus ecklonii***

*Plectranthus ecklonii* (*P. ecklonii*) é uma planta endêmica de África, que normalmente é encontrada em florestas subtropicais húmidas, florestas temperadas de África e nas margens de florestas. Esta planta é um arbusto macio, erecto de crescimento rápido que poderá atingir 3 metros. As folhas, de ovais a elípticas, são dispostas em pares opostos ao longo do caule, sendo que no nó apresenta tufo de pêlos de cor púrpura. A sua inflorescência é de cor entre o roxo e azul, terminal e num formato panicular (espiga) com 370 mm de comprimento (Figura 12).



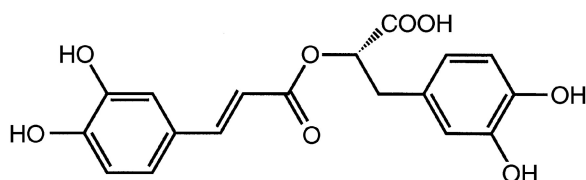
**Figura 12:** *Plectranthus ecklonii* ([5]).

Apesar de haver vários estudos ao nível das plantas pertencentes ao género *Plectranthus*, as informações acerca de *P. ecklonii* ainda são muito escassas. Na bibliografia não se encontram muitos estudos relacionados com a composição química desta planta. No entanto, os poucos que existem revelam que esta planta, como a maioria das plantas pertencentes ao género *Plectranthus*, tem como maiores constituintes fitoquímicos os diterpenóides. Destes, já foram identificados o parviflorona F, ecklonoquinona A e B (Abdel-Mogib, et al., 2002). Um estudo realizado por Hawas *et al.*, 2008, em extracto hidro-metanólico de folhas de *P.*

*ecklonii*, indica que este contém na sua composição vitexina, isovitexina, apeginina 7-O- $\beta$ -glucosídica, apeginina 4',6-dimethoxy-7-O- $\beta$ -glucosídica, luteolina 7-O- $\beta$ -glucosídico, apeginina, luteolina e ácido caféico. No estudo realizado por Falé *et al.*, 2008, em extracto aquoso de folhas de *P. ecklonii* colhido no jardim da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, indica que o composto maioritário presente neste extracto é o ácido rosmarínico.

#### I.1.5.6. Ácido Rosmarínico

O ácido rosmarínico (Figura 13) é um éster de ácido caféico e de ácido 3,4-dihidroxifeniláctico, que normalmente é encontrado na subfamília Nepetoideae das Lamiaceae. Este composto tem um elevado número de actividades biológicas, tal como a sua actividade antiviral, antibacteriana, anti-inflamatório e antioxidante (Petersen, & Simmonds, 2003). A sua actividade antioxidante é tão relevante, maior do que a da vitamina E, que pode ajudar a prevenir os danos causados nas células pelos radicais livres e, conseqüentemente, reduzir o risco de cancro e aterosclerose. Esta elevada actividade antioxidante poder fazer deste composto, um bom inibidor de cárie dentária, uma vez que o poder antioxidante é um dos factores associados ao possível tratamento desta doença (Liskmann, *et al.*, 2007). Além destas actividades biológicas, o ácido rosmarínico também inibe várias enzimas, tais como a fosfolipase A<sub>2</sub> (Tricli *et al.*, 2005), interfere na expressão genética (Lee *et al.*, 2007) e na via de sinalização relacionada com a prevenção do cancro (Petersen, & Simmonds, 2003).



**Figura 13:** Estrutura molecular de ácido rosmarínico (Makino *et al.*, 2000).

A presença de ácido rosmarínico nos extractos de *P. barbatus* e *P. ecklonii* confere-lhes grandes benefícios medicinais, o que faz deles, um bom alvo de investigação como possíveis inibidores da placa bacteriana.



## I.2. OBJECTIVOS

A cárie dentária é um dos grandes problemas de saúde ao nível mundial, por isso existem muitos esforços com vista a encontrar formas eficazes no combate a esta doença. A capacidade de modelar as actividades fisiológicas da comunidade que compõe a placa dentária é uma das estratégias mais promissoras no combate à cárie dentária. A realização deste trabalho teve como principal objectivo investigar o efeito de extractos aquosos e metanólicos de *P. barbatus* e *P. ecklonii*, bem como de seu constituinte maioritário – ácido rosmarínico – no crescimento e factores de virulência de *S. mutans* e *S. sobrinus*. De forma a atingir este objectivo, foram traçados alguns objectivos específicos.

### I.2.1. Objectivos Específicos

- 1) Investigar o efeito antibacteriano dos extractos de *P. barbatus* e *P. ecklonii* e do ácido rosmarínico sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*.
- 2) Determinar os valores de concentração mínima inibitória e de concentração mínima bactericida, para os extractos em estudo.
- 3) Investigar o efeito sobre a actividade de GTF- extracelular isolada a partir de culturas de *S. mutans* e *S. sobrinus*.
- 4) Estabelecer os valores de IC<sub>50</sub> para inibição da actividade de GTF- extracelular.
- 5) Testar o efeito dos extractos em estudo, assim como do composto, na formação do biofilme *in vitro* pelas culturas de *S. mutans* e *S. sobrinus*.
- 6) Estabelecer os valores de IC<sub>50</sub> para a inibição da formação do biofilme.

- 7) Avaliar a capacidade de remoção de biofilme formado *in vitro*, pelas culturas de *S. mutans* e *S. sobrinus*, e determinar o respectivo IC<sub>50</sub>.
- 8) Avaliar o efeito dos extractos em estudo, bem como do ácido rosmarínico, no potencial acidogénico das duas espécies em estudo.

# **CAPÍTULO II**

---

## **Análise de Material Biológico e Vegetal**



## II.1. INTRODUÇÃO

O presente estudo envolve a utilização tanto de material biológico como de material vegetal. Portanto, é necessário fazer uma análise prévia de ambos, de forma a se conhecer o possível comportamento que estes poderão assumir consoante o decorrer da investigação. No caso do material biológico, esta análise passará pela investigação do comportamento do mesmo no meio de cultura, nomeadamente as condições de crescimento, de forma a definir condições experimentais padrão. Relativamente ao material vegetal, a análise deverá centrar-se na investigação da composição e/ou propriedades do mesmo, uma vez que este vai ser utilizado sob a forma de extracto.

## II.2. MATERIAL E MÉTODOS

### II.2.1. Material Microbiológico

Na presente investigação, utilizou-se como material biológico células de *S. sobrinus*, estirpe 4010 CECT, e de *S. mutans*, estirpe 479 CETC (*Coleccion Española* de Cultivos Tipo, lote 21-10-1998) crescidas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) (*Fluka*) e meio BHI suplementado (BHI-S) e em atmosfera anaeróbica. As estirpes utilizadas neste estudo foram oferecidas pelo projecto Project POCTI/CTM/56029.

#### II.2.1.1. Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado neste estudo foi o meio BHI. Este meio é o meio de cultura que frequentemente é utilizado para o crescimento de microrganismos, tendo na sua composição diversos componentes (Tabela 1) que suportam o bom crescimento destes organismos.

**Tabela 1:** Composição do meio BHI

Composição (g/L)	
Infusão de cérebro de borrego	12,5
Infusão de coração de boi	5
Peptona	10
Cloreto de Sódio	5
D (+) – Glucose	2
Dihidrogenofosfato de Sódio	2,5

Para preparar os meios de cultura líquido, dissolveu-se o meio BHI em água destilada (37g/mL) e distribuiu-se em frascos de anaerobiose de diferentes volumes (*Belco Glass inc.*), dependendo do volume requerido pela experiência a realizar. As condições de anaerobiose foram asseguradas pelo desarejamento com azoto gasoso (N<sub>2</sub>), em intervalos de tempo definidos (Tabela 2).

**Tabela 2:** Tempo de desarejamento.

Volume (mL)	Tempo (minutos)
10	10
100	20
1000	60

Para evitar contaminações com oxigênio (O<sub>2</sub>), os frascos foram selados com rolhas de borracha (*Belco Glass inc.*) e encapsulados com cápsulas metálicas antes de serem esterilizados (autoclave *Uniclave 88*) a 110°C durante 20 minutos. Os frascos de 1000 mL (frascos *Schott*) foram desarejados após a esterilização, em ambiente estéril, por filtração (filtros Acro 50 da *Pall Gelman Corporation* com poros de 0,2µm).

Para os ensaios que envolviam a formação do biofilme, *in vitro*, preparou-se meio BHI-S. Este meio é constituído pelo meio BHI com adição de 0,05% de *L*-cisteína, 0,5% de extracto de levedura e 1% de sacarose.

Neste trabalho também utilizou-se meio de cultura sólido – meio BHI sólido. Para preparar meio BHI sólido, adicionou-se ao meio BHI líquido agar bacteriológico tipo E (*Biokar Diagnostics*) (15g/L). O meio foi posteriormente esterilizado e distribuído em caixas de *petri* esterilizadas (*Sterilin*) (aproximadamente 10 mL).

### **II.2.1.2. Curvas de Crescimento de *S. mutans* e *S. sobrinus***

#### **II.2.1.2.1. Crescimento Microbiano**

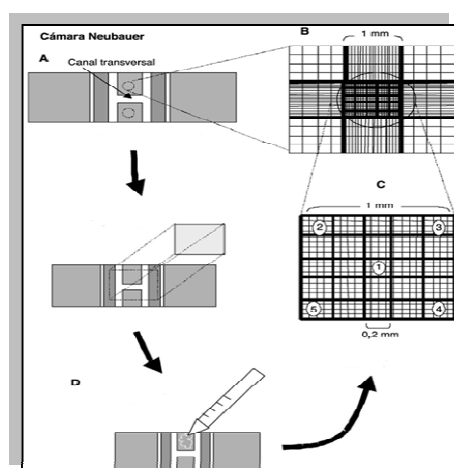
O crescimento microbiano está associado ao crescimento de uma população de células de um dado microrganismo. Este crescimento da população celular é, por sua vez, consequência do aumento do número de células devido à multiplicação celular. A multiplicação celular, que normalmente se dá por fissão binária ou gemulação, é um processo caracterizado pela geração de duas células a partir da divisão de uma, ao fim de um determinado tempo. A partir da divisão celular ocorre a duplicação do número de células, da quantidade da biomassa presente e dos componentes celulares mensuráveis (tais como os ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, etc.).

O curso do crescimento microbiano é seguido através de avaliação da evolução da concentração de células, ao longo do tempo. A avaliação quantitativa do crescimento microbiano pode ser feito através de vários métodos, entre eles está a determinação do peso seco, biomassa em suspensão, quantificação de um componente celular (enzimas componentes químicos, etc.) ou da taxa de processos metabólicos (por exemplo: fermentação ou respiração), e contagem de células. Porém, no caso de microrganismos unicelulares esta avaliação é, normalmente,

feita através da determinação da concentração celular pelo método de determinação de biomassa em suspensão ou de contagem do número de células (Stanier, *et al.*, 1971).

Para determinar a biomassa em suspensão recorre-se à análise espectrofotométrica por leitura de densidade óptica (OD, de inglês *optical density*) da cultura. Este método consiste na determinação da quantidade de luz que é transmitida através da cultura líquida. Quando um feixe de luz atravessa a suspensão, a redução da quantidade de luz transmitida possibilita a medição da densidade celular, uma vez que a densidade óptica registada é inversamente proporcional à biomassa celular em suspensão. Sendo assim, pode-se concluir que quanto maior for o número de células, menor será a quantidade de luz transmitida. Por isso, a medição da densidade óptica por espectrofotometria tornou-se o método mais usado e fácil na avaliação quantitativa do crescimento de um microrganismo.

A contagem do número de células de um organismo unicelular, em suspensão, é realizada microscopicamente. Esta contagem de células individuais presentes num pequeno volume é efectuada num hematocitómetro (câmara de Neubauer (Figura 14)).

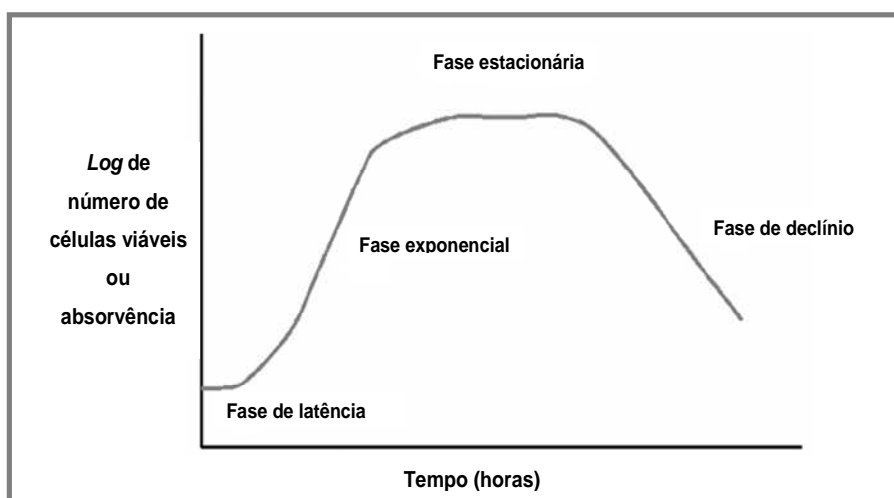


**Figura 14:** Câmara de Neubauer (Castillo, 2004).

O hematocítmetro é uma lâmina de maior espessura que contém, à superfície, uma câmara dividida em vários quadrados de área conhecida. Esta divisão permite que o volume do líquido sobre cada quadrado da câmara seja conhecido. Apesar deste método de contagem ser de rápida execução, tem como desvantagem a incapacidade de distinção entre células viáveis e não viáveis.

### II.2.1.2.2. Curva de Crescimento Microbiano

A avaliação quantitativa do crescimento microbiano é, experimentalmente, representada através de uma curva de crescimento da população microbiana (Figura 15). Esta curva é constituída pelas várias fases de crescimento microbiano: fase de latência, fase exponencial, fase estacionária e fase de declínio.



**Figura 15:** Curva de crescimento microbiano em sistema fechado (adaptado de [6]).

A fase de latência corresponde ao período inicial, após a inoculação num meio de cultura, em que ocorre a adaptação do microrganismo ao meio. Nesta fase há, essencialmente, a produção de enzimas necessários à síntese de compostos essenciais ao crescimento ou à hidrólise de compostos presentes.

A fase exponencial corresponde à fase de crescimento progressivo do microrganismo, ou seja, é o período marcado pela divisão celular com duplicação do número de células, após um determinado intervalo de tempo. É durante esta fase que se verifica uma taxa específica de crescimento máxima, dependendo de factores genéticos do próprio microrganismo, assim como de factores ambientais (pH, temperatura, etc.)

A fase estacionária é a fase em que há um esgotamento de nutrientes essenciais e/ou acumulação de produtos finais que potenciam a interrupção da divisão celular. No entanto, as células podem manter-se viáveis, ao longo de um certo período de tempo, à custa de reservas endógenas que são usadas em processos de manutenção. Portanto esta é a fase em que a população se mantém constante. Como consequência disto, ocorre a perda irreversível da capacidade de divisão celular, ocorrendo, assim, a morte celular. A morte celular, por sua vez, origina um decréscimo da concentração de células viáveis na população microbiana, ao longo do tempo, iniciando, assim, a fase de declínio.

A partir desta curva é possível determinar os parâmetros cinéticos, nomeadamente a taxa específica de crescimento e o tempo de duplicação do microrganismo em questão.

### **II.2.1.2.3. Procedimento Experimental**

Para determinar a curva de crescimento das estirpes de *S. mutans* e *S. sobrinus* utilizadas neste estudo, inoculou-se culturas das mesmas em meio BHI que, posteriormente, foram crescidas numa estufa a 37°C e em condições de anaerobiose. De seguida, efectuou-se leituras de hora a hora da densidade óptica, através da medição da absorvência a 630nm (Espectrofotómetro *Shimadzu UV-160A*), e do pH (*Crison micropH 2001*). Também se determinou o número total de células (Anexo I (Figura I.1)), de hora a hora, através da contagem de células

bacterianas vistas ao microscópio (*Olympus BX50*) usando um hematócrito. Os ensaios foram realizados em triplicado.

## **II.2.2. Material Vegetal**

Neste trabalho utilizou-se como material vegetal espécies *P. barbatus* e *P. ecklonii*. As folhas de *P. barbatus* e *P. ecklonii* foram colhidas no herbário da Faculdade de Ciências e da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, respectivamente. Com estas folhas preparou-se dois extractos: extracto aquoso e extracto metanólico.

### **II.2.2.1. Preparação de Extractos**

#### **II.2.2.1.1. Extracto Aquoso**

De forma a reproduzir-se uma composição química semelhante à encontrada num chá, preparou-se um extracto aquoso das plantas em estudo, segundo o método apresentado em Falé *et al.*, 2008. Às folhas frescas e cortadas das plantas, adicionou-se água destilada (10 mL/ g) em ebulição e deixou-se ferver durante 10 minutos. Após o arrefecimento à temperatura ambiente, filtrou-se, através do método de filtração por vácuo, e liofilizou-se (Liofilizador de *Savant Modulyo*). O extracto aquoso liofilizado foi armazenado a – 20 °C.

#### **II.2.2.1.2. Extracto Metanólico**

Em muitos estudos de investigação de propriedades anti-microbiológicas de plantas, o método de extração é baseado no uso de solventes orgânicos, entre outros o metanol e a acetona (Tsai, *et al.*, 2007). O uso mais frequente de solventes orgânicos está directamente ligado à maior capacidade destes solventes

de extrair compostos orgânicos aromáticos ou saturados, que são os compostos mais activos contra os microrganismos.

A preparação do extracto metanólico foi realizada segundo o método apresentado em Tsai, *et al.*, 2007. Às folhas secas e moídas das plantas, adicionou-se metanol (*Panreac*) (5 mL/g) e deixou-se em agitação contínua durante 3 horas e à temperatura ambiente. Após a extracção, a mistura foi filtrada e o resíduo sofreu novamente o processo de extracção em metanol, durante a noite. A combinação das soluções metanólicas foi filtrada duas vezes, uma a vácuo e outra por gravidade, e evaporado num rotavapor (*Buchi Rotavapor R-200*). O extracto obtido, cujo rendimento foi de 14,1% para *P. ecklonii* e 11,9% para *P. barbatus*, foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) numa concentração de 400 mg/mL e armazenado.

#### **II.2.2.2. Análise dos Extractos**

A aplicação dos extractos de plantas, em qualquer estudo, requer um prévio conhecimento das características do mesmo. Consoante os objectivos do estudo, a análise será mais ou menos detalhada.

Neste trabalho fez-se uma análise ao nível do pH, espectro de absorção, teor em fenóis totais e análise por HPLC.

##### **II.2.2.2.1. Determinação de Fenóis Totais**

Os compostos fenólicos de plantas reúnem-se em diversas categorias: fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), flavonóides, taninos condensados, etc., sendo que, no seu todo representam um grande grupo de metabolitos secundários encontrados nas plantas. Quimicamente são caracterizados por possuir anéis aromáticos hidroxilados, tornando-os

relativamente polares e solúveis em água ou misturas álcool/água (Proença da Cunha, 2005).

Nas plantas, estes compostos desempenham funções fundamentais, tais como a actividade antimicrobiana, protecção contra a radiação ultravioleta (UV) e na atracção de insectos ou outros polinizadores. No entanto, a actividade antioxidante dos compostos fenólicos é a características de maior interesse científico.

A determinação dos compostos fenólicos é feita mediante a quantificação espectrométrica a partir de diversos métodos. Porém, o método de Folin-Ciocalteu é, de entre todos, o mais utilizado. O reagente de Folin-Ciocalteu, na sua composição química, é constituído por uma mistura de dois ácidos, o ácido fosfomolibdico e fosfotúngstico, no qual o molibdénio e o tungsténio se encontram no estado de oxidação 6<sup>+</sup>. Na presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, o estado de oxidação destes ácidos altera-se para um estado entre 5 e 6. Esta alteração é acompanhada de uma mudança de coloração, o que permite determinar a presença de substâncias redutoras, assim como a sua concentração.

A determinação do teor de fenóis totais foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu (Oktay *et al.*, 2003), com o pirogalol como composto fenólico padrão. A um volume de 4,5 mL de água destilada adicionou-se 100 µL de solução de extracto, cuja concentração era conhecida (1mg/mL), e 100 µL de reagente de Folin-Ciocalteu. A solução foi agitada durante 3 minutos e, em seguida, adicionou-se 300 µL de uma solução de carbonato de sódio 2 %. Após um período de incubação de 2 horas com agitação intermitente, mediu-se a absorvência a 760nm. O teor em fenóis foi calculado através da recta de calibração realizada com o pirogalol (Anexo II.2). O ensaio foi realizado em triplicado.

#### II.2.2.2.2. Análise por HPLC e Espectroscopia de Massa

A análise por cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*) foi realizada num sistema de Cromatografia Líquida *Finnigan<sup>TM</sup> Surveyor<sup>®</sup> Plus Modular LC* equipado com uma coluna *Purospher<sup>®</sup> STAR RP-18* de *Merck* e *software Xcalibur*. O extracto foi analisado através da injeção de 25 µL do mesmo e utilizando um gradiente composto por uma solução A (0,3% de ácido fosfórico), solução B (acetonitrilo) e solução C (metanol) e na seguinte proporção: 0 minuto, 90% A, 10% B e 50 minutos 5% A, 80% B, 15% C. A detecção foi feita entre 200 a 600nm por um sistema de detecção de fotodiodos.

Para purificar os compostos maioritários dos extractos metanólicos de *P. barbatus* e *P. ecklonii*, utilizou-se o mesmo sistema de HPLC descrito. Os picos foram recolhidos separadamente, sendo que este processo foi repetido várias vezes. Os picos recolhidos foram submetidos ao processo de identificação através de espectroscopia de massa utilizando um espectrómetro de massa *ApexQe FTICR* de *Bruker Daltonics (Billerica, MA, USA)* equipado com uma fonte *Apollo II Dual ESI/MALDI* e um campo magnético activo (7 T). As amostras foram introduzidas por meio de uma bomba de infusão *KD Scientific (Holliston, MA, USA)* com uma taxa de fluxo de 120 µL/h. De momento, ainda não foi possível identificar-se todos os compostos maioritários.

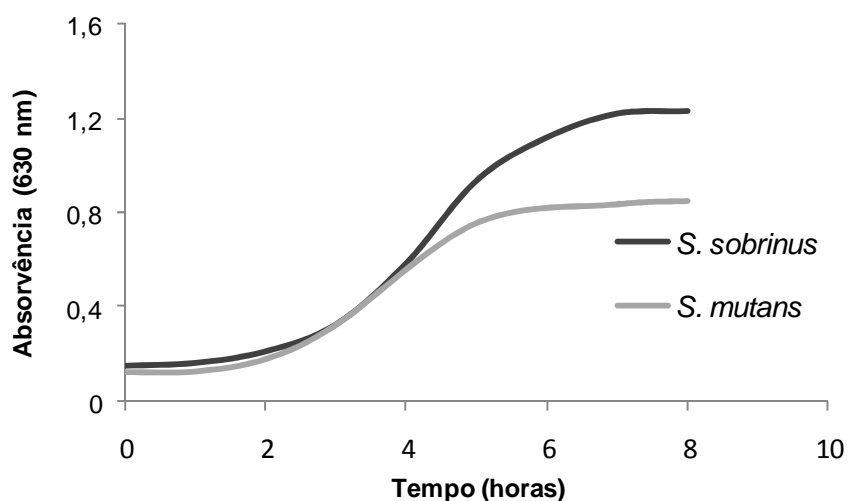
## II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### II.3.1. Condições de Crescimento

A manipulação de microrganismos requer um prévio conhecimento do seu desenvolvimento ao longo do tempo, de forma a se conhecer as condições experimentais padrão. Para atingir este objectivo, seguiu-se o crescimento de culturas de *S. sobrinus* e *S. mutans* em meio BHI, a 37°C e em condições de anaerobiose, ao longo do tempo. Ao fim do tempo determinado, estabeleceu-se a curva de crescimento e analisou-se a variação do pH do meio de cultura.

#### II.3.1.1. Curva de Crescimento

A partir dos valores obtidos por densidade óptica, foi possível definir uma curva de crescimento para cada uma das espécies em estudo (Figura 16).



**Figura16:** Representação gráfica das curvas de crescimento de *S. sobrinus* e *S. mutans*, por densidade óptica, em meio BHI, a 37°C e em condições de anaerobiose.

A análise destas curvas de crescimento, indicaram que as culturas de *S. mutans* e de *S. sobrinus*, mantidas em meio BHI, atingem a fase estacionária ao fim de 5 e 7 horas de incubação, respectivamente. Estes resultados estão relativamente próximos dos obtidos por Martins, *et al.* (2007) para a mesma estirpe de *S. mutans* e por Aguiar (2008) para a mesma estirpe de *S. sobrinus*. Portanto é neste período que ocorrerá o crescimento populacional, correspondendo assim ao período de maior actividade celular.

A partir da fase exponencial das curvas de crescimento definidas, foi possível determinar os parâmetros cinéticos de crescimento, nomeadamente a taxa específica de crescimento ( $\mu_g$ ) e o tempo de duplicação (Td). A taxa específica de crescimento é a taxa de aumento da biomassa/número de células a cada intervalo de tempo, sendo que ela é constante e máxima na fase exponencial. O tempo de duplicação é o intervalo de tempo requerido para que uma nova célula complete o ciclo de crescimento e divisão, dando origem a duas células filhas. Para determinar estes parâmetros, traçou-se uma curva de logaritmo (*log*) da fase exponencial das curvas de crescimento (Anexo I (Figura I.2)).

Os resultados dos parâmetros cinéticos calculados são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Parâmetros cinéticos da curva de crescimento de *S. sobrinus* e *S. mutans*, em meio BHI a 37°C.

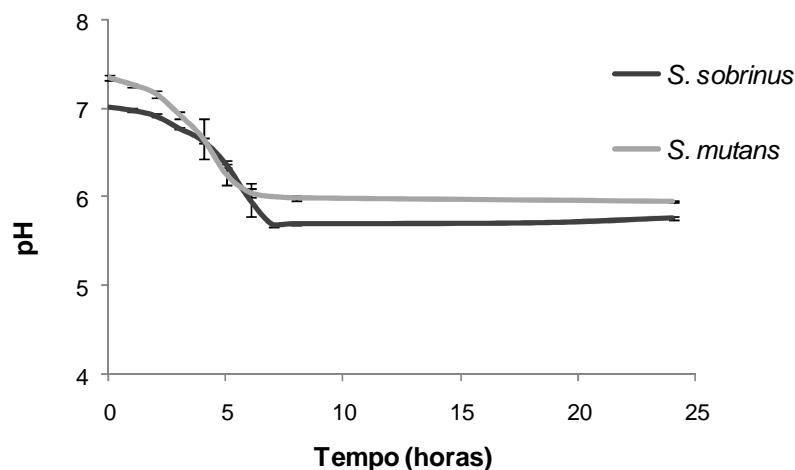
Parâmetros cinéticos	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>
$\mu_g$ (h <sup>-1</sup> )	0,136	0,124
Td (h)	2,210	2,422

A partir destes resultados verificou-se que a taxa específica de crescimento é aproximadamente igual para as duas espécies, sendo que o seu valor é de aproximadamente 0,1 OD/h. Da mesma forma, o tempo de duplicação é também

semelhante para as duas espécies, aproximadamente 2 horas. Estes valores distanciam-se um pouco dos valores obtidos num estudo sobre *S. mutans* realizado por Makaya (2007) e num estudo sobre *S. sobrinus* realizado por Aguiar (2008), onde a taxa específica de crescimento apresentado é ligeiramente superior e o tempo de duplicação é ligeiramente inferior.

### II.3.1.2. Variação de pH

Em paralelo com a determinação da curva de crescimento, seguiu-se as alterações do pH (Figura 17). Esta investigação tinha como base confirmar um dos factores de virulência destas espécies, que se prende com a sua capacidade acidogénica. Este factor de virulência está estritamente ligado à existência de uma via glicolítica nestas bactérias, que lhes confere a capacidade de produzirem ácido láctico e ácido acético a partir da fermentação dos açúcares. A produção destes ácidos é verificada através uma diminuição acentuada do pH do meio (aproximadamente de 7 a 5) (Bana, 2004).



**Figura 17:** Representação gráfica da variação do pH ao longo do período de crescimento de *S. sobrinus* e *S. mutans* em meio BHI a 37°C.

De acordo com o gráfico, verificou-se que para a cultura *S. mutans* ocorreu uma diminuição de pH acentuada na ordem de 1,4 unidades, ao fim de 6 horas, estabilizando-se num pH da ordem de 6. O mesmo resultado foi apresentado pela cultura de *S. sobrinus*, com a única exceção de que este decréscimo deu-se ao fim de 7 horas. Esta diminuição da ordem de 1,4 está de acordo com a diminuição referida por Banas, 2004, (aproximadamente 2) e com a diminuição registada para *S. mutans* por Makaya, 2007, (aproximadamente 1) e para *S. sobrinus* por Aguiar, 2008, (aproximadamente 1,3).

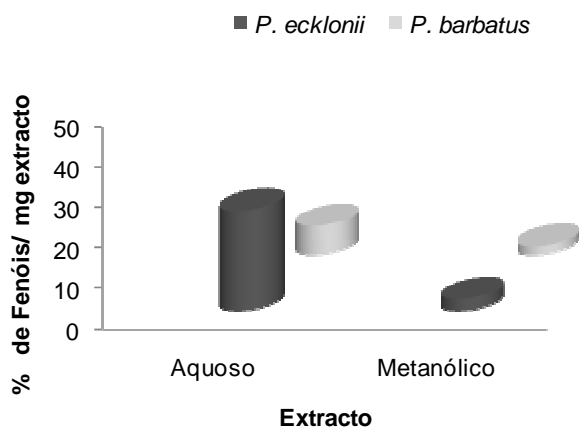
Este decréscimo acentuado de pH corresponde à fase exponencial de crescimento o que é coerente, tendo em conta que esta fase é marcada por um crescimento progressivo das bactérias. Como tal, a estabilização do pH corresponde à fase estacionária de crescimento.

## **II.3.2. Análise de Extractos**

### **II.3.2.1. Teor em Fenóis Totais**

O conhecimento da composição em fenóis totais presente nos extractos é uma informação de grande importância para o prosseguimento deste estudo. Estes compostos, pela sua elevada actividade antioxidante, podem ser um dos factores responsáveis pela actividade antimicrobiana das plantas em estudo. A extrapolação da concentração em fenóis totais presente nos extractos é apresentada na Figura 18 e na Tabela 4.

A partir dos resultados obtidos verificou-se que, *P. ecklonii* apresenta uma concentração mais elevada de compostos fenólicos, resultado comprovado pelos 25% de fenóis presentes em 1mg de extracto aquoso e 3% no extracto metanólico. Isto pode ser explicado pela existência de maior teor de ácido rosmarínico em *P. ecklonii*, aproximadamente 50%, do que em *P. barbatus*, apenas 14% (Falé *et al.*, 2008).



**Figura18:** Percentagem de fenóis nos extractos aquosos e metanólicos de *P. barbatus* e *P. ecklonii*.

**Tabela 4:** Concentração de fenóis nos extractos aquosos e metanólicos de *P. barbatus* e *P. ecklonii*.

Planta	Extracto	Concentração (mg fenóis/ mg extracto)
<i>P. barbatus</i>	Aquoso	0,07 ± 0,00
	Metanólico	0,02 ± 0,00
<i>P. ecklonii</i>	Aquoso	0,25 ± 0,01
	Metanólico	0,03 ± 0,01

A comparação entre os extractos aquosos e metanólicos revela que os extractos aquosos apresentam maior teor em fenóis totais do que os metanólicos.

### II.3.2.2. Análise de pH dos Extractos

A análise de pH foi necessária uma vez que se trata de um parâmetro que pode fornecer informação ao nível do comportamento do extracto em solução. No entanto, esta análise teve como maior interesse perceber se o pH do extracto pode,

de alguma forma, condicionar ou justificar o efeito do mesmo sobre os microrganismos em estudo.

Os resultados obtidos (Tabela 5) revelam que os extractos aquosos têm um pH ligeiramente ácido, na ordem de 6, enquanto o extracto metanólico apresenta o pH básico, na ordem dos 8,5. Esta diferença de pH poderá estar relacionada com a diferente composição dos dois extractos, sendo que os extractos aquosos possuem como composto maioritário o ácido rosmarínico.

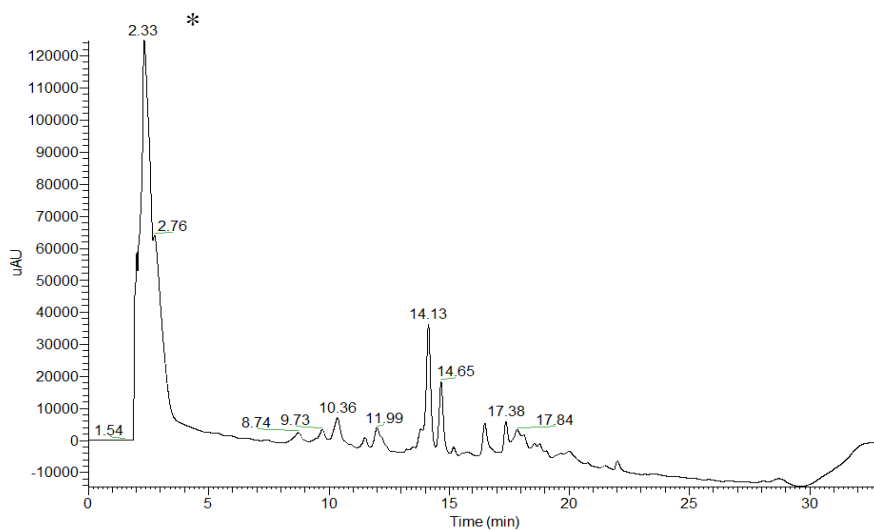
**Tabela 5:** Valores de pH dos extractos aquosos e metanólicos de *P. barbatus* e *P. ecklonii*.

<b>Extracto</b>	<b><i>P. barbatus</i></b>	<b><i>P. ecklonii</i></b>
Aquoso	5,92	6,02
Metanólico	8,42	8,51

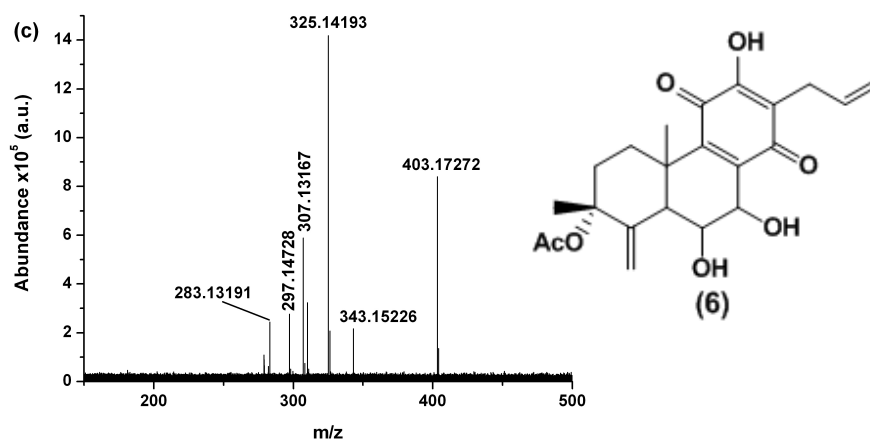
### II.3.2.3. Análise da Composição dos Extractos

De forma a compreender se os extractos utilizados neste estudo apresentam diferente composição química, fez-se uma análise por HPLC dos extractos metanólicos de *P. barbatus* e *P. ecklonii*. Os cromatogramas de HPLC são apresentados na Figura 19 e 21.

O cromatograma de *P. barbatus* (Figura 19) apresentou um pico maioritário com um tempo de retenção a 14,13 minutos seguindo de um pico a 14,65 minutos. O espectro de massa e a estrutura química do composto com o tempo de retenção de 14,13 minutos é apresentado na Figura 20. A estrutura química e o espectro de massa são consistente com um diterpenóide abietano já isolado em *Plectranthus hereroensis* e citado na bibliografia (Abdel-Mogib *et al.*, 2002).

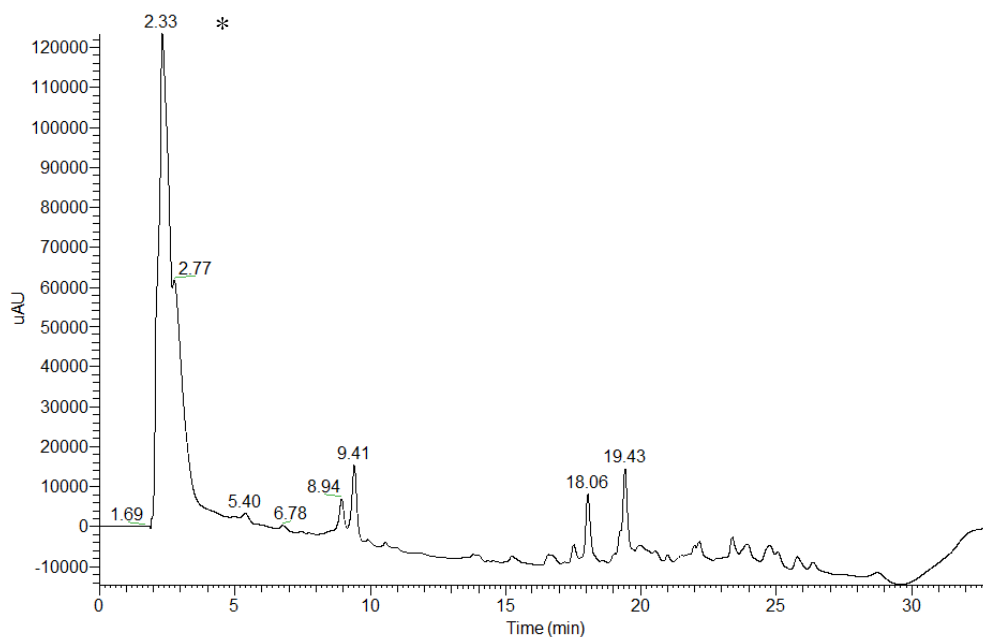


**Figura 19:** Cromatograma de HPLC de extractos metanólicos de *P. barbatus*. \* Pico correspondente à saída de DMSO.



**Figura 20:** Composto com o tempo de retenção de 14,13 minutos no extracto metanólico de *P. barbatus*: espectro de massa e estrutura química.

O cromatograma de *P. ecklonii* (Figura 21) apresenta dois picos maioritários a 9,41 e 19,43 minutos seguidos de um pico a 18,06 minutos. Ainda não foi possível identificar estes compostos, no entanto estão em curso as investigações com vista a concluir este estudo.



**Figura 21:** Cromatograma de HPLC de extractos metanólicos de *P. ecklonii*. \* Pico correspondente à saída de DMSO.

Contudo, estes resultados preliminares revelam que estas duas plantas apresentam diferente composição química, o que, conseqüentemente, pode reflectir-se em diferentes propriedades biológicas. Comparando estes cromatogramas com os obtidos num estudo realizado por Falé *et al.*, 2008, para o extracto aquoso destas duas plantas, verificou-se que existem diferenças nas composições químicas entre ambos os extractos. O cromatograma do extracto aquoso de *P. barbatus* apresentava um pico maioritário a 19,2 minutos seguido de dois picos a 23,4 e 33,0 minutos, que correspondiam ao ácido rosmarínico, scutelareina 4'-metil éter 7-O-glucuronido e (16S)-coleon E, respectivamente,

enquanto o cromatograma de *P. ecklonii* apresentava apenas um pico maioritário a 19,2 minutos, que correspondia ao ácido rosmarínico.

A diferença na composição química também é comprovada pelos espectros de absorção UV-visível dos extractos e do ácido rosmarínico (Anexo III). A partir destes espectros de absorção verificou-se que existem grandes diferenças, ao nível da composição química, entre os extractos aquosos e os extractos metanólicos e entre as duas plantas. Esta diferença é marcada pela existência de apenas um pico de absorção maioritário nos extractos aquosos que corresponde ao pico do ácido rosmarínico, enquanto os extractos metanólicos apresentam vários picos.

A diferença entre os extractos metanólicos e extractos aquosos pode estar ligada à maior capacidade dos solventes orgânicos na extracção de compostos, que neste caso podem ser diterpenóides, uma vez que, através da literatura, verificou-se que ambas as plantas apresentam como constituintes maioritários os diterpenóides. No entanto, devido à sensibilidade do método de identificação dos compostos, ainda não é possível fazer uma análise conclusiva desta diferença registada, nomeadamente a identificação dos compostos maioritários dos extractos metanólicos que ainda está em curso.

## II.4. CONCLUSÕES

Na análise do material biológico, pode-se concluir que não existem diferenças relevantes entre as duas espécies em estudos, ao nível do comportamento no meio de cultura utilizado. Tanto *S. mutans* como *S. sobrinus* apresentam uma curva de crescimento onde a fase estacionária é atingida ao fim de 6 e 7 horas, respectivamente. O período de crescimento exponencial é acompanhado por uma variação do pH do meio, que passa de básico a ácido, comprovando assim o potencial acidogénico das bactérias em estudo.

O material vegetal utilizado neste estudo são extractos aquosos e metanólicos de *P. barbatus* e *P. ecklonii*. A análise destes dois extractos indica que as duas plantas apresentam diferentes composição química e que esta composição varia de extracto para extracto. Em relação a estas diferenças pode-se concluir que *P. ecklonii* possui maior teor em fenóis e que os extractos metanólicos de ambas as plantas apresentam menor teor de fenóis, comparativamente com o extracto aquoso das mesmas. Também se pode concluir que a diferença registada entre o extracto metanólico e aquosos pode estar ligada à existência de maior teor de diterpenóides nos extractos metanólicos.

# **CAPÍTULO III**

---

## **Actividade Antibacteriana dos Extractos**



### III.1. INTRODUÇÃO

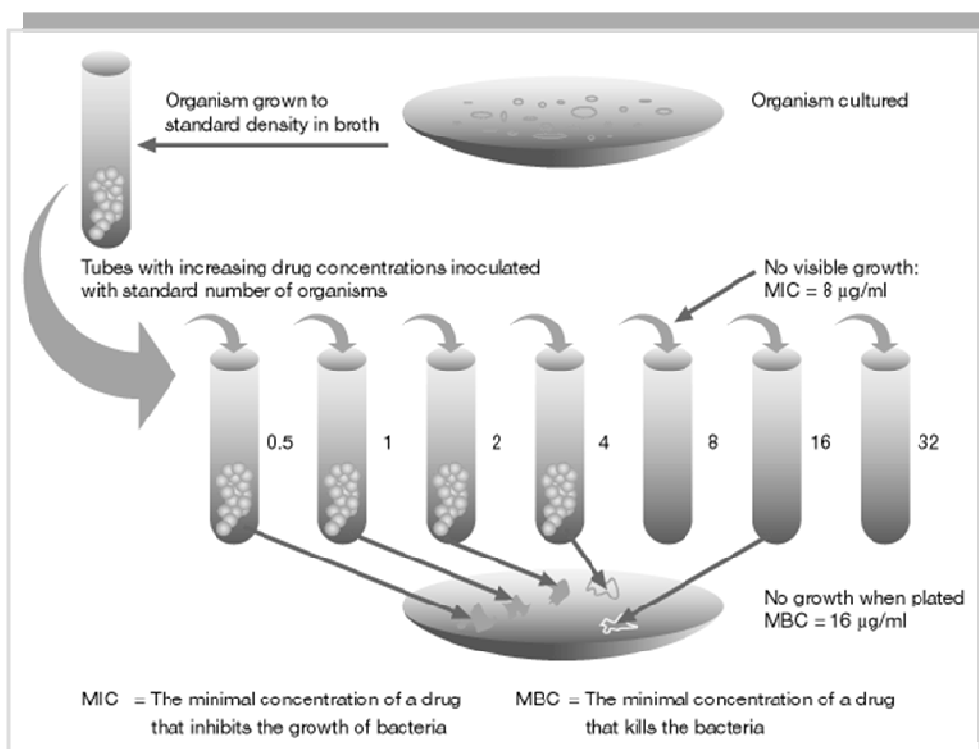
A avaliação da actividade antibacteriana é um ponto de elevada relevância pois, através desta pode-se retirar informação ao nível da susceptibilidade do microrganismo a agentes antibacterianos. O termo susceptibilidade aqui referido está associado ao efeito resultante da interacção directa entre o agente antibacteriano com o microrganismo, sendo que desta interacção pode resultar a inibição de crescimento e/ou a morte do microrganismo. Portanto, esta avaliação tem como finalidade averiguar se o agente em estudo pode ser utilizado na prevenção da proliferação das bactérias. Por isso, a identificação de agentes antibacterianos é uma das áreas de maior interesse nas investigações relacionadas com o desenvolvimento de compostos capazes de prevenir a formação da placa dentária.

A investigação da actividade antibacteriana de um composto/extracto é seguida com base na determinação da capacidade bacteriostática e/ou bactericida, sendo que para atingir esta finalidade, recorre-se à determinação da concentração mínima inibitória (MIC, do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*) e da concentração mínima bactericida (MBC, do inglês *Minimum Bactericidal Concentration*), respectivamente. O MIC é a concentração mínima de um agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um microrganismo, após uma incubação ao fim de 48 horas (Andrews, J. M, 2001). Pode ser apresentado sob forma de MIC<sub>50</sub> ou MIC<sub>90</sub> (indicando que a concentração em questão revela uma inibição da população bacteriana de 50% ou de 90%, respectivamente) em unidades de µg/mL ou mg/mL. O MBC é a concentração mínima do agente antimicrobiano que impede o crescimento de qualquer organismo após o plaqueamento num meio sólido (Andrews, J. M, 2001).

## III.2. MATERIAL E MÉTODOS

### III.2.1. Efeito na Viabilidade de Células em Suspensão (MIC e MBC)

A determinação do MIC e do MBC do extracto aquoso e metanólico de *P. barbatus* e *P. ecklonii* e do ácido rosmarínico contra culturas *S. sobrinus* e de *S. mutans* foi baseada no método de micro-diluição descrito por Koo *et al.*, 2002, (Figura 22).



**Figura 22:** Determinação de MIC e MBC pelo método de micro-diluições ([7]).

Para a determinação do MIC, culturas em suspensão de *S. sobrinus* e de *S. mutans*, após 18 h de crescimento em meio BHI, foram ajustadas a 0,5 OD ( $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colónias (CFU/mL) e depois diluídas 100 vezes (isto é, aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  CFU/mL). Desta diluição, foram retirados 100 µL e

adicionados a poços de uma microplaca (*Greiner bio-one Cellstar*) contendo 100  $\mu\text{L}$  de meio BHI com os extractos aquosos e metanólicos de *P. barbatus* e *P. ecklonii* e ácido rosmarínico, em diferentes concentrações (0-5 mg/mL, 0-1 mg/mL e 0-10 mg/mL, respectivamente). Para minimizar os erros associados a interferência da cor dos próprios extractos, uma série em paralelo da mistura, sem adição do inóculo, foi preparado. Também foi feito um branco de DMSO na mesma proporção e com adição do inóculo. Para cada concentração, as amostras foram preparadas em triplicado.

Após 48 h de incubação em jarras de anaerobiose (*OXOID*) a 37°C em condições anaeróbicas (garantidas por saquetas de anaerobiose da *OXOID*), o crescimento bacteriano foi estimado espectrofotometricamente, a 630nm, utilizando um leitor de microplacas (Leitor de Microplacas *TECA Sunrise*) e microscopicamente pela contagem do número de células num hematócrito.

Para determinar o MBC, uma alíquota (50  $\mu\text{L}$ ) de todos poços com concentrações superior à concentração de MIC foi removida, diluída 10 vezes em meio BHI, e depois plaqueado em meio BHI sólido durante 48 horas a 37°C e em condições de anaerobiose.

Experimentalmente, o MIC é a concentração mínima que restringe o crescimento bacteriano a um valor de absorvência inferior à 0.05. O MBC é a concentração mínima onde não se verifica crescimento bacteriano após o período de incubação (48h).

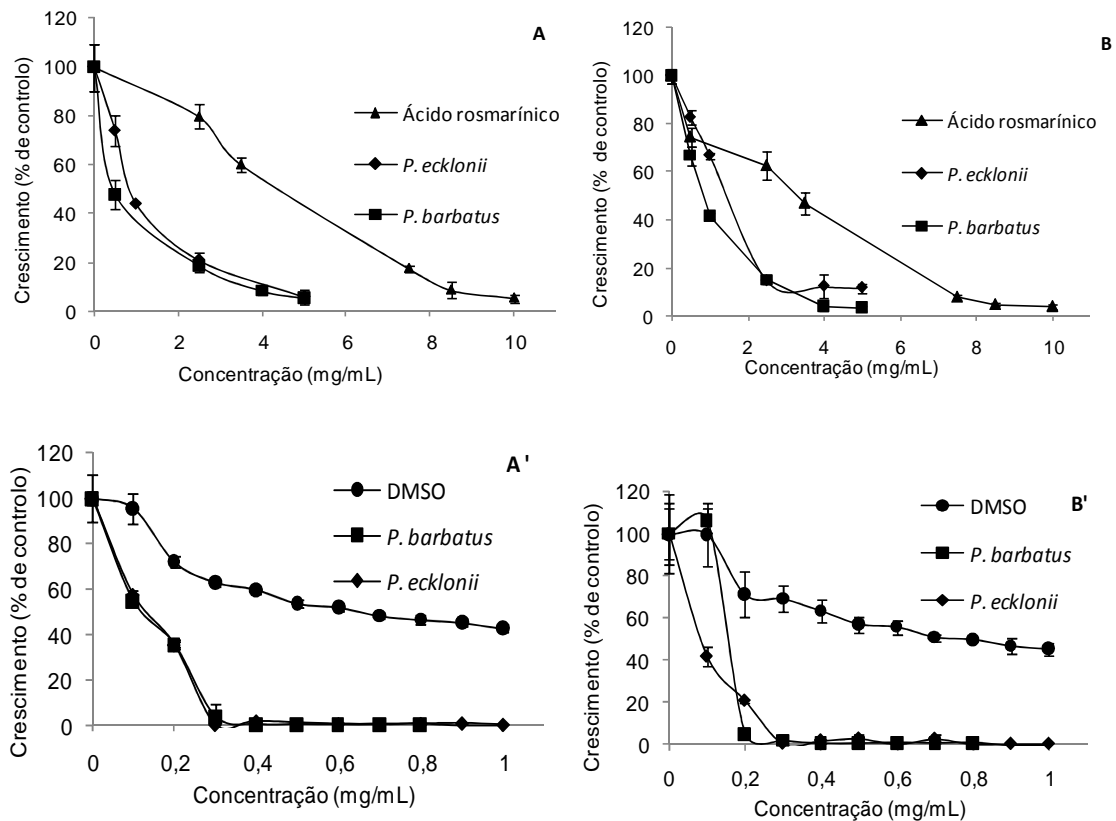
### III.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### III.3.1. Actividade Antibacteriana

A análise da actividade antibacteriana de um agente (composto ou extracto) é um parâmetro de extrema importância que facultar informação ao nível da susceptibilidade de um determinado microrganismo bacteriano ao mesmo. A partir do conhecimento deste parâmetro pode-se avaliar a capacidade bacteriostática e bactericida do agente em estudo, através da determinação de MIC e MBC. Neste estudo, culturas de *S. mutans* e *S. sobrinus* foram inoculadas na presença de várias concentrações de extracto aquoso e metanólico de *P. barbatus* e *P. ecklonii* e de ácido rosmarínico, por um período de 48 horas. Após este período, fez-se uma avaliação do crescimento bacteriano em função do aumento da concentração dos extractos/ácido e determinou-se o valor de MIC e MBC.

A avaliação do crescimento bacteriano das duas espécies em estudo na presença de extractos aquoso e metanólico de *P. barbatus* e *P. ecklonii* e de ácido rosmarínico é apresentado na Figura 23. A inibição do crescimento foi apresentada sob a forma de percentagem de crescimento em função do aumento da concentração dos extractos. Na análise das curvas, verificou-se que todas apresentavam um padrão semelhante, sendo que este padrão é marcado pelo contínuo decréscimo da percentagem de crescimento das bactérias com o aumento da concentração dos extractos e do composto. No entanto, verificou-se grandes diferenças ao nível da ordem das concentrações inibitórias, relativamente aos extractos em estudo. O extracto metanólico apresentou uma inibição de aproximadamente 100% a partir de uma concentração de 0,3 mg/mL, para ambas as plantas e para ambas as espécies, enquanto o extracto aquoso apresentou uma capacidade inibitória de aproximadamente 100% a partir de uma concentração de 5 mg/mL. O maior efeito antibacteriano verificado para o extracto metanólico

poderá estar em parte ligado a presença de DMSO, que apresentou uma certa actividade antibacteriana. Em relação à comparação dos extractos com o ácido rosmarínico, verificou-se que o ácido tem menor capacidade inibidora, pois a inibição de aproximadamente 100% só é atingida para concentrações na ordem dos 10 mg/mL.



**Figura 23:** Actividade antibacteriana: **A e B** - extracto aquoso de *P. ecklonii* e *P. barbatus* e ácido rosmarínico sobre *S. sobrinus* e *S. mutans*, respectivamente; **A' e B'** – extracto metanólico de *P. ecklonii* e *P. barbatus* sobre *S. sobrinus* e *S. mutans*, respectivamente.

### III.3.1.1. Efeito no Crescimento de Células em Suspensão - MIC

A partir dos valores obtidos, foi possível definir o valor de MIC para o extracto aquoso e metanólico de *P. barbatus* e *P. ecklonii* e para o ácido rosmarínico (Tabela 6). Os valores de MIC apresentados para os extractos aquosos são valores de MIC<sub>90</sub> (concentração em que a inibição da população bacteriana é de 90%), uma vez que, devido à grande interferência da cor do próprio extracto, não foi possível definir o valor através da absorvência.

Os valores de MIC dos extractos aquosos relativamente a *S. sobrinus* variaram entre 2,9 a 7,3 mg/mL e a *S. mutans* variaram entre 3,8 a 8,4 mg/mL, sendo que o valor mais baixo foi apresentado pelo extracto de *P. barbatus* e o mais alto pelo ácido rosmarínico. Os valores de MIC dos extractos metanólicos das duas plantas sobre as duas espécies em estudo não variaram, sendo que o valor foi de 0,3 mg/mL, com a excepção do valor de 0,2 mg/mL apresentado por *P. barbatus* sobre *S. mutans*.

**Tabela 6:** Valores de MIC de extractos aquoso e metanólico de *P. barbatus* e *P. ecklonii* e de ácido rosmarínico sobre culturas de *S. mutans* e *S. sobrinus*.

Extracto	Plantas	Composto	MIC (mg/mL)	
			<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>
Aquoso	<i>P. barbatus</i>	-----	3,8 ± 0,00	2,9 ± 0,12
	<i>P. ecklonii</i>	-----	4,7 ± 0,30	5 ± 0,00
	-----	Ácido rosmarínico	8,4 ± 0,40	7,3 ± 0,23
Metanólico	<i>P. barbatus</i>	-----	0,3 ± 0,07	0,2 ± 0,01
	<i>P. ecklonii</i>	-----	0,3 ± 0,00	0,3 ± 0,01

Comparando os extractos aquosos das duas plantas, verificou-se que o extracto de *P. barbatus* tem maior capacidade bacteriostática do que o extracto aquoso de *P. ecklonii*. Esta diferença pode estar associada à diferente composição química das duas plantas, nomeadamente a presença de derivados de *scutellareina* e (16S)-coleon E no extracto aquoso de *P. barbatus* (Falé *et al.*, 2008). Da comparação dos extractos das duas plantas com o ácido rosmarínico pode-se constatar que a capacidade bacteriostática exibida por ambas não é somente devida à presença de ácido rosmarínico – composto maioritário nestas plantas (Falé *et al.*, 2008) -, os valores de MIC para este composto foram relativamente superiores aos valores obtidos para os extractos. Contudo, comparativamente com extractos aquosos de outras plantas medicinais, que são usadas nos produtos dentífricos comerciais, tais como *Rosmarinus officinalis* – alecrim - (MIC 16 mg/ml) (Tsai *et al.*, 2007), *Caesalpinia pyramidalis* – catingueira - (MIC 8 mg/ml) e *Ziziphus joazeiro* – juazeiro - (MIC 16mg/ml) (Alviano *et al.*, 2008), os valores aqui apresentados revelam uma boa capacidade bacteriostática.

A mesma apreciação pode ser feita para os valores dos extractos metanólicos de *P. ecklonii* e *P. barbatus*, quando comparados com o extracto metanólico de *Rosmarinus officinalis* – alecrim - (MIC 4 mg/ml) (Tsai *et al.*, 2007). Da mesma ordem de grandeza são os valores referenciados na literatura, por exemplo para *Polygonum cuspidatum*, planta tradicionalmente usada no controlo de doenças orais, em que o valor de MIC para várias estirpes de *S. mutans* e *S. sobrinus* variaram entre 31,3-250 µg/mL (Song, *et al.*, 2007).

Comparando os valores obtidos para os extractos metanólicos de ambas as plantas com os dos extractos aquosos, verificou-se que os primeiros têm maior capacidade bacteriostática, apesar de apresentarem menor teor em fenóis totais. Isto sugere que a presença de outros compostos, nomeadamente diterpenóides, pode influenciar a actividade antibacteriana dos extractos.

### III.3.1.2. Efeito na Viabilidade de Células em Suspensão - MBC

Com o objectivo de investigar a actividade bactericida, determinou-se o valor de MBC (Tabela7). Em geral, os valores de MBC variaram de 9-10 mg/mL para os extractos aquosos e de 0,6-0,8 mg/mL para os extractos metanólicos. Estes valores revelam que os extractos metanólicos têm maior actividade bactericida do que os extractos aquosos.

**Tabela 7:** Valores de MBC de extractos aquoso e metanólico de *P. barbatus* e *P. ecklonii* e de ácido rosmarínico contra culturas de *S. mutans* e *S. sobrinus*.

Extracto	Plantas	Composto	MBC (mg/mL)	
			<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>
Aquoso	<i>P. barbatus</i>	-----	9,5	9,5
	<i>P. ecklonii</i>	-----	9,0	10,0
	-----	<b>Ácido rosmarínico</b>	12,0	12,5
Metanólico	<i>P. ecklonii</i>	-----	0,6	0,8
	<i>P. barbatus</i>	-----	0,6	0,8

A concentração bactericida para o ácido rosmarínico foi superior aos extractos, 12 mg/mL para *S. sobrinus* e 12,5 mg/mL para *S. mutans*. Esta considerável diferença de valores comprova que a actividade bactericida não é devida, somente, à presença de ácido rosmarínico nestes extractos, sendo que esta actividade poderá estar ligada à acção deste composto e à de outros compostos presentes no extracto, nomeadamente alguns flavonóides (Koo *et al.*, 2002).

### III.3.2. Discussão da Actividade Antibacteriana dos Extractos

As plantas, dependendo da sua composição química, podem ser usadas como bons agentes antimicrobianos. Como tal, podem ser potenciais agentes preventivos da cárie dentária, uma vez que a inibição do crescimento bacteriano ou até a eliminação das bactérias do grupo *streptococci mutans* é uma das estratégias de prevenção desta doença.

No presente trabalho verificou-se que, tanto o extracto aquoso como o extracto metanólico de *P. barbatus* e *P. ecklonii* apresentam capacidade antibacteriana sobre duas espécies de *streptococci mutans*, *S. mutans* e *S. sobrinus*. Esta capacidade pode ser explicada pela composição química destas plantas, nomeadamente a presença de compostos fenólicos e terpenóides do tipo diterpenóides (Abdel-Mogib, *et al.*, 2002 & Falé, 2008). Os compostos fenólicos podem apresentar um certo grau de toxicidade para os microrganismos através da sua capacidade para inibir enzimas e até mesmo inibir o crescimento bacteriano (Koo *et al.*, 2002). Estes efeitos, que resultam da actividade antibacteriana associada a estes compostos, estão directamente ligados ao elevado poder antioxidante dos mesmos. Em particular, o poder antioxidante destes compostos explica parcialmente a actividade antibacteriana dos mesmos sobre as duas espécies em estudo, uma vez que um estudo realizado por Liskmann *at al.* (in Alviano, *et al.*, 2008) revela que à presença de antioxidantes na saliva previne o aparecimento de infecções bacterianas na cavidade oral. Em relação aos terpenóides, a mesma toxicidade é verificada (Cowan, 1999), sendo que o mecanismo de acção poderá estar ligado à disrupção da membrana pelos compostos lipofílicos (Mendoza *et al.* & Cowan, 1999), tais como o farnesol (Koo, *et al.*, 2002). Em particular os diterpenóides, tais como os *coleons* (Wellsow, *et al.*, 2006), *grandidones* (Lukhoba, *et al.*, 2006) e *forskolin* (Krombholz *et al.*, 1992 in Costa, 2006) têm sido reportados como bons agentes antibacterianos.

Nos extractos aquosos, a actividade antibacteriana poderá estar principalmente associada à presença, nestes extractos, de um ácido fenólico em elevada quantidade - ácido rosmarínico. No entanto a diferença de actividade entre as duas plantas indica que poderá existir uma contribuição adicional de outros compostos com actividade antibacteriana, nomeadamente ácido cafeico (Cowan, 1999), um dos compostos identificado no hidro-metanólico de *P. ecklonii* (Hawas *et al.*, 2008), flavonóides (Koo, *et al.*, 2002) e/ou iões metálicos, como o zinco e cobre (Addy, *et al.*, 1992).

Os extractos metanólicos de *P. barbatus* e *P. ecklonii* são reportados na bibliografia como sendo ricos em terpenóides, em particular do tipo diterpenóides, o que facilmente explica a elevada actividade antibacteriana exibida pelos mesmos.

### III.4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que os extractos aquosos e metanólicos de *P. barbatus* e *P. ecklonii* têm uma acção antibacteriana sobre as duas principais espécies cariogénicas em humanos, *S. mutans* e *S. sobrinus*. Esta actividade antibacteriana está associada à capacidade bacteriostática e bactericida de ambas. Porém este poder antibacteriano é mais acentuado no extracto metanólico destas plantas, devido à diferente composição química dos extractos.

Também se pode concluir que o ácido rosmarínico, composto maioritário presente no extracto aquoso destas duas plantas, apresenta actividade antibacteriana e que a presença deste composto nos extractos em estudo pode justificar, em parte, a mesma actividade exibida pelos extractos. No entanto a presença de diterpenóides no extracto metanólico pode ser o responsável pela maior actividade antibacteriana dos mesmos.



# **CAPÍTULO IV**

---

**Efeito dos Extractos nos Factores de Virulência de  
*S. mutans* e *S. sobrinus***



## IV.1. INTRODUÇÃO

Apesar da elevada complexidade da flora oral, *S. sobrinus* e *S. mutans* são duas espécies bacterianas apontadas como sendo os agentes primários da formação da cárie dentária, resultante do potencial cariogénico associado a ambas. Este potencial cariogénico está directamente relacionado com os seus factores de virulência, nomeadamente a presença de enzimas capazes de sintetizar glucanos extracelulares – glucosiltransferases (GTFs) -, o potencial acidogénico, tolerância ao ácido e capacidade de formar biofilmes (Song, *et al.*, 2006).

A síntese de GTFs é um dos factores de virulência de maior importância nestas espécies. Estas enzimas são responsáveis pela síntese de polissacáridos extracelulares – glucanos - a partir de moléculas de sacarose, o que promove a aderência firme e irreversível destas duas estirpes à superfície do dente e a outras bactérias da flora oral, definindo assim um biofilme dentário. Neste ambiente protegido proporcionado pelos glucanos, as duas espécies de *Streptococcus* formam uma comunidade estável e protegida – placa dentária - onde produzem ácidos provenientes de vias metabólicas (Devulapalle, *et al.*, 2004). *S. sobrinus* e *S. mutans* segregam três tipos de GTFs responsáveis pela síntese de glucanos solúveis em água e glucanos insolúveis em água. No entanto, a produção de glucanos insolúveis em água é essencial no desenvolvimento da placa dentária, pois estão associados à adesão à superfície do dente (Loesche, 1986).

A produção de ácido e a tolerância ao ácido são duas das características apontadas como factores de virulência destas espécies, porque um dos produtos resultantes do metabolismo de açúcares da dieta são ácidos. Estes ácidos criam um ambiente de pH baixo o que promove a desmineralização dos dentes, a principal causa da cárie dentária.

Por isso, a prevenção da cárie dentária, passa não só pelo controlo do crescimento bacteriano, mas também pelo controlo dos factores de virulência destas duas espécies, nomeadamente a inibição de GTFs e a inibição da formação do biofilme.

## IV.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### IV.2.1. Susceptibilidade de GTF-extracelular aos Extractos

A investigação da susceptibilidade de GTF aos extractos de *P. barbatus* e *P. ecklonii* foi levada a cabo pela medição de glucanos insolúveis em água sintetizados pelo GTF extracelular.

#### IV.2.1.1. Preparação do Homogenato de GTF-extracelular

A preparação do homogenato de GTF extracelular foi realizada de acordo com o método descrito por Koo *et al.*, 2000.

As culturas de *S. mutans* e *S. sobrinus* foram crescidas em meio BHI (100 mL de suspensão celular em 900 mL de meio) a 37°C durante 18h em condição de anaerobiose. Após este período de incubação, procedeu-se à remoção das células por centrifugação a 10000xg e a 4°C durante 30 minutos, desprezando o *pellet*. Em seguida, ajustou-se o pH do sobrenadante para 6.8 com hidróxido de sódio (NaOH) 2M e depois foi submetido a um processo de precipitação com sulfato de amónio (*Riedel-de Haen*) (50% (p/v) de saturação), durante 1h a 4°C com agitação contínua. Ao fim deste período, deixou-se em repouso durante mais 1h a 4°C. Seguidamente, foi novamente centrifugado a 10000xg, a 4°C e durante 20 minutos. Após a centrifugação, o precipitado foi dissolvido num pequeno volume de tampão fosfato 0,1M (pH 6,0) e submetido a uma diálise por 24h (*Mangas de diálise Sigma*, tamanho do poro 12000 Da) contra tampão fosfato 0,001M (pH 6,0) contendo 0,01% de azida de sódio (*Sigma- Aldrich*) e fluoreto de fenil-metil-sulfunilo (PMSF) (*Sigma*) 1mM a 4°C. Em seguida, o material insolúvel existente foi removido por filtração por gravidade (*filtro Whatman n°1*) e o extracto de GTF foi armazenado a -20°C.

#### IV.2.1.2. Doseamento de GTF-extracelular

O doseamento de GTF extracelular foi realizado com base no método descrito por Lowry *et al.* (1951) e modificado por Bensadoun e Weinstein (1976).

O método de Lowry é um método quantitativo para determinação de proteínas. À solução de proteínas é adicionado um reagente que após reacção com elas forma um complexo de cor azul, sendo que a intensidade da cor é proporcional à concentração de proteínas dissolvidas. Em meio alcalino, os iões de cobre ligam-se à proteína através da ligação destes aos átomos de azoto (N) das cadeias peptídicas, formando um complexo com capacidade de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu (reagente fosfomolibdénio e fosfotungsténio), formando um composto de cor azul intenso que absorve a 750nm. Este complexo cobre-proteína provoca o desdobramento da estrutura tridimensional da proteína, expondo à superfície os resíduos de tirosina e triptofano. A redução do reagente de Folin-Ciocalteu é feita pelos resíduos de tirosina e triptofano.

O reagente de Folin-Ciocalteu também é reduzido pelos fenóis e por muitas substâncias cromáticas de baixa massa molecular, por isso, para evitar a coloração não específica utiliza-se o método de Lowry modificado, em que a proteína é precipitada com desoxicolato de sódio (DOC) e ácido tricloroacético (TCA) antes de ser doseada (Bensadoun e Weinstein, 1976). Uma das grandes vantagens deste método é a sua grande sensibilidade que detecta níveis de proteínas de 5 a 100 µg/mL.

O doseamento da proteína em estudo exigiu a definição de uma curva padrão *à priori*, a partir de uma proteína padrão – albumina do soro bovino (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumine*) (Anexo IV.2).

Amostras contendo diferentes concentrações (entre 0 e 300µg) de BSA foram preparadas através da adição de um determinado volume de solução E (Anexo IV.1), correspondente à quantidade de proteína pretendida, e uma quantidade de água destilada de forma a perfazer um volume final igual a 1 mL.

Preparou-se também um branco, onde a solução E foi substituída por água destilada.

As amostras de enzima foram preparadas da mesma forma, adicionando-se 200 µL de extracto de GTF a 800 µL de água destilada. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. Seguidamente, a cada uma das amostras adicionou-se 0,1 mL da solução B (Anexo IV.2). Após agitação, aguardou-se 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 0,1 mL da solução C (Anexo IV.2) e submeteu-se a amostra a agitação. Centrifugou-se a 3000xg durante 15 minutos numa centrífuga de bancada (*Eppendorf Centrifuge 5804 R*). Desprezou-se o sobrenadante e o *pellet* foi dissolvido (proteína) em 1 mL de água destilada, seguida da adição de 1 mL da solução A (Anexo IV.2). Após uma breve agitação, aguardou-se mais 10 minutos à temperatura ambiente. Por fim, acrescentou-se 0,5 mL da solução D (Anexo IV.2) seguida de uma breve agitação. As amostras foram guardadas no escuro durante 30 minutos e depois foi medida a absorvência a 750nm num espectrofotómetro *Shimadzu UV – 160A*.

Este ensaio não foi realizado para GTF extracelular extraída de *S. sobrinus*, uma vez que o mesmo já foi realizado por Aguiar (2008).

#### **IV.2.1.3. Actividade de GTF-extracelular**

Com o objectivo de confirmar a presença de GTF activo no extracto, investigou-se a formação de glucanos insolúveis em água ao longo do tempo e mediu-se a actividade do enzima.

##### **IV.2.1.3.1. Síntese de Glucanos Insolúveis**

Para verificar a formação de glucanos insolúveis em água, adicionou-se à solução de sacarose (*Fluka*) 0,1 M em tampão fosfato 0,1M (pH 6) e 0,01% de azida de sódio o homogenato de GTF, numa proporção de 3:1 respectivamente. Os controlos (só o enzima e só a sacarose) foram preparados da mesma forma, sendo que para perfazer o volume final se adicionou tampão fosfato 0,1M. A

mistura foi incubada durante 18 h a 37°C na estufa. Leu-se a absorvência a 550nm.

#### **IV.2.1.3.2. Quantificação da Actividade de GTF-extracelular**

A quantificação da actividade de GTF pode ser feita através da determinação da frutose formada a partir da hidrólise da sacarose, uma vez que a glucose resultante da mesma reacção é imediatamente consumida para formar os glucanos. Sendo a frutose um açúcar redutor, a sua quantificação pode ser feita através da análise de açúcares redutores. Para essa finalidade, utilizou-se o método do azul de tetrazólio.

A utilização deste método baseia-se no facto dos sais de tetrazólio serem um agente oxidante. Este agente na sua forma oxidada apresenta-se incolor e é solúvel em água, por outro lado, na sua forma reduzida apresenta uma coloração de tom cereja intenso e é insolúvel em água. No entanto a forma reduzida deste agente é solúvel em reagentes orgânicos, como o benzeno e o iso-butanol (Fairbridge *et al.*, 1951). Perante estas características, Mattson e Jensen (1950) descreveram um método que permite utilizar este composto na determinação de açúcares redutores. Apesar de ser promissor, o método apresentado por Mattson e Jensen apresentava alguns contratempos no que diz respeito às condições óptimas para ocorrer a reacção, uma vez que este propõe o uso de uma temperatura de 25 °C. A esta temperatura, apenas é possível obter uma faixa de cor, o que diminui a sensibilidade, e também pode levar a erros da ordem de 10%. No entanto, foi descoberto que a redução máxima de sais de tetrazólio ocorre em meios fortemente básicos e a uma temperatura de 100°C (Fairbridge *et al.*, 1951).

Adicionou-se à solução de sacarose 0,1 M em tampão fosfato 0,1M (pH 6) e 0,01% de azida de sódio o homogenato de GTF, numa proporção de 3:1 respectivamente, e incubou-se durante 30 minutos a 37°C. Adicionou-se 900 µL da solução preparada de azul de tetrazólio (Anexo V.1) a 100 µL da solução

contendo GTF e sacarose, controlo (só sacarose e só GTF) e padrão (solução de frutose) e agitou-se.

De seguida estas soluções foram sujeitas a aquecimento a 100°C durante 30 segundos. O arrefecimento deu-se à temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se 1 mL de tolueno e agitou-se, até à formação de duas fases bem definidas. Leu-se a absorvência a 570nm. A partir dos valores de absorvência das várias concentrações de frutose, definiu-se uma curva padrão (Anexo V.2).

#### **IV.2.1.4. Efeito dos Extractos na Actividade de GTF- extracelular**

Para investigar o efeito dos extractos de *P. barbatus* e *P. ecklonii* na actividade do enzima procedeu-se à quantificação da síntese de glucanos insolúveis em água na presença dos mesmos extractos em diferentes concentrações. Este ensaio foi realizado seguindo a metodologia descrita por Ooshima *et al.*, 2000, com algumas modificações.

A reacção foi preparada em tubos de ensaio, sendo que o meio reaccional era constituído pelo homogenato de GTF e uma solução de sacarose 0,1M em tampão fosfato (pH 6) e 0,01% de azida de sódio. A proporção do homogenato de GTF em relação à sacarose foi de 1:3, respectivamente. A esta mistura reaccional, foi adicionado extracto de plantas e de ácido rosmarínico em diferentes concentrações finais (0,5 - 5mg/mL). Seguidamente incubou-se as amostras a 37°C durante 18h.

A formação de glucanos insolúveis em água foi seguida pela leitura da absorvência da suspensão à 550nm. De forma a minimizar os erros, devido a interferência dos próprios extractos, uma série da mistura reaccional foi preparada, em paralelo, sem a adição de sacarose. Efectuou-se, ainda, a preparação de um tubo de ensaio só com tampão fosfato e outro com tampão fosfato mais sacarose 0,1M em 0,1M de tampão fosfato (pH 6) e 0,015 de azida de sódio, numa proporção de 1:3 respectivamente. Todas as misturas reaccionais foram preparadas em triplicado.

## IV.2.2. Efeito dos Extractos no Biofilme

A actividade dos extractos de plantas relativamente ao biofilme bacteriano foi testada ao nível do efeito na formação do biofilme e no biofilme formado, através da reprodução *in vitro* do mesmo. Estes ensaios tinham como finalidade investigar a capacidade dos extractos, em estudo, na prevenção e/ou remoção do biofilme dentário.

### IV.2.2.1. Efeito dos Extractos na Formação do Biofilme

Para testar o efeito dos extractos aquosos e metanólicos de *P. barbatus* e *P. ecklonii* na formação de biofilme *in vitro*, inoculou-se culturas de *S. sobrinus* e *S. mutans* na fase estacionária (18 h) em frascos antibióticos de vidro (10 mL) contendo meio BHI-S (proporção 1:10), contendo diferentes concentrações dos extractos e de ácido rosmarínico. As culturas foram incubadas a 37°C numa estufa e em condições de anaerobiose. Para minimizar os erros associados à interferência dos próprios extractos, realizou-se, em paralelo, um controlo negativo (sem inóculo) para todas as concentrações testadas. Realizou-se também um controlo positivo (concentração: 0 mg/mL de extracto) e outro com a adição de DMSO sem extracto. Após 48 horas de incubação, removeu-se a cultura em suspensão (células planctónicas) seguidamente, recorrendo a ultrasons (*Elma Transsonic* T 460/H), ressuspendeu-se em água destilada (volume igual ao retirado) o biofilme aderente ao frasco de vidro. Em seguida, quantificou-se por espectrofotometria a 630nm e por contagem as células sésseis presentes no biofilme. Para além da quantificação do biofilme formado, também se investigou a variação do pH na suspensão obtida a partir do biofilme. Os ensaios foram realizados em triplicado. Este ensaio não foi realizado para o efeito dos extractos aquosos e do ácido rosmarínico na formação de biofilme pelo *S. sobrinus*, uma vez que o mesmo ensaio já havia sido realizado por Sara Aguiar (2008).

#### IV.2.2.2. Efeito dos Extractos no Biofilme Formado

A um biofilme formado por culturas de *S. mutans* e *S. sobrinus*, em condições de anaerobiose durante 48 horas a 37°C em meio BHI-S, adicionou-se o extracto aquoso e metanólico de *P. barbatus* e *P. ecklonii*, substituindo o meio de cultura por um meio contendo diferentes concentrações sobre-MIC dos extractos. O biofilme foi novamente incubado durante um período de 48 horas a 37°C em condições de anaerobiose. Após este período de incubação investigou-se a viabilidade das células, a variação do pH e quantificou-se o biofilme aderente ao frasco de vidro. Realizou-se um controlo positivo sem adição de extracto (Concentração: 0 mg/mL de extracto) e outro com adição de DMSO sem extracto.

Para investigar a viabilidade das células do biofilme, retirou-se uma alíquota e diluiu-se 10 vezes em meio BHI. Desta alíquota, 50 µL foi plaqueado em meio BHI sólido e incubado durante 48 horas a 37°C em condições de anaerobiose. Para quantificar o biofilme aderente, removeu-se as células em suspensão, recorrendo a ultrasons, e seguidamente ressuspendeu-se em água destilada (volume igual ao removido) o biofilme aderente ao frasco de vidro. Em seguida, quantificou-se por espectrofotometria (630nm) e por contagem as células sésseis presentes no biofilme.

Este ensaio não foi realizado para o ácido rosmarínico devido às dificuldades de solubilização do mesmo em água, uma vez que para testar o efeito inibitório era necessária uma concentração elevada (sobre-MIC).

### IV. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### IV.3.1. Susceptibilidade de GTF aos Extractos

Nas espécies *streptococci mutans*, os glucanos são substâncias produzidas a partir de sacarose que promovem a adesão e formação do biofilme dentário por estas espécies (Banas & Vickerman, 2003). Estes glucanos são sintetizados a partir da sacarose por acção enzimática de GTFs e são responsáveis pela adesão dependente de sacarose na etiologia da cárie dentária. Portanto a inibição da actividade de GTFs é uma das estratégias de prevenção desta doença.

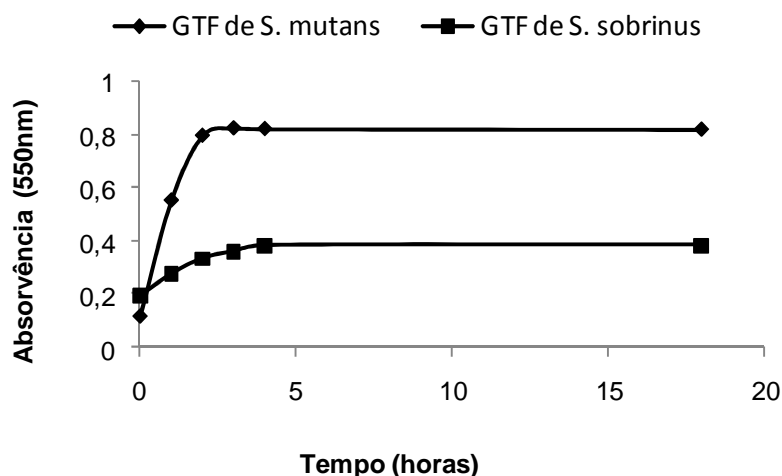
##### IV.3.1.1. Preparação de GTF-extracelular e Síntese de Glucanos Insolúveis

Após a extracção de GTF, fez-se uma análise ao nível da quantidade e actividade do enzima presente no homogenato.

A determinação da quantidade de GTF presente neste homogenato foi efectuada através do doseamento de proteínas pelo método de Lowry modificado. A partir da curva padrão definida, calculou-se a concentração de GTF presente no extracto, sendo que a concentração de GTF de *S. mutans* era da ordem de  $58,13 \pm 10,63 \mu\text{g/mL}$ .

A análise da actividade de GTF foi investigada através da produção de glucanos insolúveis em água a partir da hidrólise de sacarose, seguida de uma quantificação da mesma. A partir dos resultados obtidos foi possível traçar uma curva que representa a quantidade de glucanos produzidos na mistura reaccional em função do tempo (Figura 24), na qual se observou um aumento exponencial da absorvência nas primeiras quatro horas seguida de uma estabilização, ao fim deste período. Este resultado comprovou, assim, que havia um aumento de formação de glucanos, o que indicava que o enzima estava activo. No entanto verificou-se uma diferença considerável de glucanos formados pela GTF de *S. mutans* e de *S. sobrinus*, ao fim de 18 horas de incubação. Esta diferença registada pode estar ligada à menor quantidade de GTF extracelular de *S.*

*sobrinus* presente no homogenato (Aguiar, 2008) e/ou a maior sensibilidade da mesma. Contudo estes resultados estão de acordo com os obtidos por Aguiar (2008) para GTF de *S. sobrinus* e por Makaya (2007) para GTF de *S. mutans*.



**Figura 24:** Actividade enzimática de GTF-extracelular, produção de glucanos insolúveis a partir de sacarose.

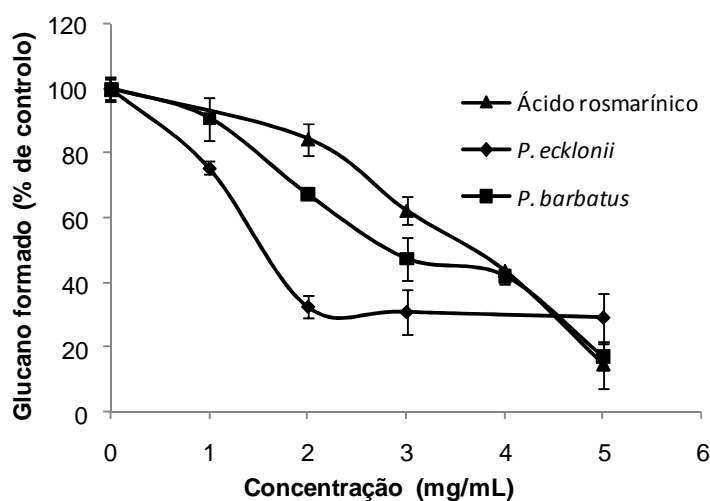
Após esta confirmação, quantificou-se a actividade enzimática através da determinação da frutose formada a partir da hidrólise da sacarose, uma vez que a glucose resultante da mesma reacção é imediatamente consumida para formar os glucanos. A partir da curva padrão (Anexo V (Figura V.2)) extrapolou-se a concentração de frutose produzida pelo enzima num determinado intervalo de tempo (30 minutos), o que permitiu definir que a actividade enzimática de GTF de *S. mutans* era de  $18,01 \pm 3,57$  mol de frutose  $\text{mg}^{-1}$  de GTF  $\text{min}^{-1}$ .

#### IV.3.1.2. Efeito Inibitório dos Extractos na Actividade de GTF

O ensaio da avaliação do efeito de extractos de plantas na actividade de GTF, tinha como objectivo o estudo do comportamento do enzima na presença dos extractos aquosos e metanólicos de *P. barbatus* e de *P. ecklonii* e de ácido rosmarynico. Os resultados aqui apresentados são apenas para os extractos aquosos e o ácido rosmarynico sobre GTF extracelular de *S. mutans*, uma vez que

o estudo do efeito destes extractos e do ácido rosmarínico sobre GTF de *S. sobrinus* já foi realizado por Aguiar, 2008. Também não são apresentados resultados para os extractos metanólicos sobre as duas espécies, uma vez que não foi possível obter resultados conclusivos devido à constante precipitação destes extractos na presença da mistura reaccional.

Os resultados obtidos são apresentados no gráfico da Figura 25, que relaciona a percentagem de glucanos formados pela GTF extracelular de *S. mutans* com as concentrações crescentes dos extractos aquosos de *P. barbatus* e *P. ecklonii* e do ácido rosmarínico. A partir destes gráficos, observou-se uma diminuição progressiva de glucanos formados consoante o aumento da concentração de extracto de *P. barbatus* e de ácido rosmarínico. O mesmo resultado foi exibido para o extracto de *P. ecklonii* somente até à concentração de 2 mg/mL.



**Figura 25:** Gráfico de percentagem de glucanos formados pelo GTF de *S. mutans* na presença de concentrações crescente de extracto aquoso de *P. barbatus* e *P. ecklonii* e de ácido rosmarínico.

Na Tabela 8 são apresentados os valores de  $IC_{50}$ . O extracto aquoso de *P. ecklonii* apresentou menor valor de  $IC_{50}$ . Na comparação dos extractos com o ácido rosmarínico, verificou-se que este último apresentou um valor aproximadamente uma e duas vezes superior ao valor de *P. barbatus* e *P. ecklonii*, respectivamente. Comparando estes valores obtidos para a inibição de

GTF de *S. mutans* e os resultados obtidos por Aguiar (2008) para GTF extraída de culturas de *S. sobrinus*, verificou-se que a GTF de *S. sobrinus* é mais sensível aos extractos aquosos destas duas plantas assim como ao ácido rosmarínico.

**Tabela 8:** Efeito inibitório de extractos aquosos de *P. barbatus* e *P. ecklonii* e ácido rosmarínico na síntese de glucanos insolúveis por GTF extracelular de *S. mutans* e *S. sobrinus*.

\* Resultados obtidos por Aguiar, 2008.

IC <sub>50</sub> (mg/mL)			
Espécie	Composto	Extracto	
	Ácido rosmarínico	<i>P. barbatus</i>	<i>P. ecklonii</i>
<i>S. mutans</i>	3,9±0,3	3,1±0,5	1,6±0,0
<i>S. sobrinus</i>	2,1±0,1*	1,1±0,0*	1,2±0,1*

Os resultados apresentados para a susceptibilidade de GTF de *S. mutans* aos extractos aquosos de *P. barbatus* e *P. ecklonii* e ao ácido rosmarínico revelam que este enzima é sensível tanto aos extractos como ao ácido. Portanto a sensibilidade aos extractos poderá estar associada à presença de ácido rosmarínico e, adicionalmente, a outros compostos fenólicos não identificados. Os compostos fenólicos podem ser responsáveis pela inibição e/ou inactivação de enzimas e isto poderá explicar a maior sensibilidade de GTF ao extracto aquoso de *P. ecklonii*, uma vez que este extracto apresenta maior teor em compostos fenólicos (Figura 18). Este efeito inibitório também poderá estar ligado à possível presença de flavonóides, tais como luteolina e apigenina que foram identificadas no extracto hidrometanólico de *P. ecklonii* (Hawas, et al., 2008) e no extracto aquosos de *P. barbatus* (através dos estudos realizados por Falé). Um estudo realizado por Koo et al. (2002) indica que as flavonas e os flavonóis, em particular a apigenina, apresentam grande capacidade inibidora sobre GTFs. Esta capacidade inibitória poderá estar associada à existência de uma dupla ligação entre C-2 e C-3 nestes compostos, que ao reagir com um nucleófilo formado por

um conjunto de aminoácidos essenciais à expressão da actividade catalítica, causa a inibição de GTFs.

O efeito inibitório dos extractos aquosos de *P. ecklonii* e *P. barbatus* sobre GTF extracelular poderá ser devido à presença de compostos fenólicos na composição química destes extractos, nomeadamente o ácido rosmarínico e outros ácidos fenólicos, e possível presença de flavonóides do tipo flavonas e flavonóis.

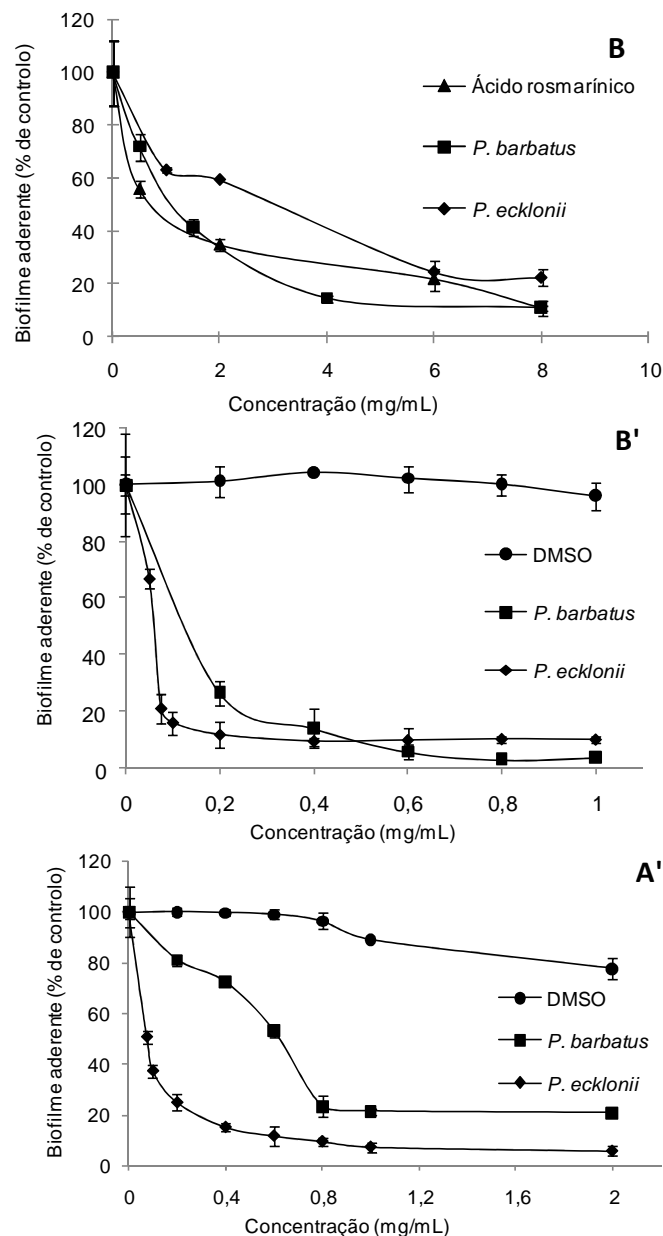
#### **IV.3.2. Efeito Inibitório dos Extractos no Biofilme**

A formação de placa dentária é derivada, principalmente, da formação de um biofilme por parte da flora microbiana que coloniza a superfície do dente. Portanto, a capacidade de formar o biofilme pelas duas espécies *streptococci mutans* em estudo, é um dos factores de virulência, associado a estas espécies, que tem um papel fundamental na actividade cariogénica das mesmas. O controlo do biofilme tem sido considerado como a principal estratégia de prevenção de cárie dentária. Esta prevenção pode ser feita com base em várias abordagens: (a) prevenir a formação do biofilme, (b) disrupção do biofilme existente, (c) prevenção de crescimento de futuros biofilmes, e (d) diminuir a viabilidade dos microrganismos no biofilme (Sbordone & Bortolaia, 2003). Portanto um bom agente anti-biofilme deve possuir dupla funcionalidade, reduzir a viabilidade do biofilme e controlar a colonização e acumulação das bactérias cariogénicas na superfície dos dentes.

Com o objectivo de investigar o efeito dos extractos aquosos e metanólicos de *P. barbatus* e *P. ecklonii* sobre o biofilme, procedeu-se à investigação do efeito destes extractos na formação de biofilme e no biofilme formado.

### IV.3.2.1. Efeito Inibitório dos Extractos na Formação de Biofilme

Os resultados do efeito inibitório dos extractos aquosos e metanólicos de *P. ecklonii* e *P. barbatus* na formação de biofilme por *S. mutans* e *S. sobrinus* são apresentados na Figura 26 e os valores de IC<sub>50</sub> na Tabela 9.



**Figura 26:** Efeito inibitório de extractos aquosos de *P. barbatus* e *P. ecklonii* e do ácido rosmarínico na formação de biofilme por *S. mutans* (**B**) e do extracto metanólico das plantas na formação de biofilme pelo *S. sobrinus* (**A'**) e *S. mutans* (**B'**).

Pela análise dos gráficos da Figura 26, verifica-se que concentrações sob MIC de ambos extractos das duas plantas inibem de 90 a 100% a formação de biofilmes pelas duas espécies de *streptococci mutans* em estudo, sendo que o efeito inibitório é directamente proporcional à concentração dos extractos. O mesmo resultado foi verificado por Aguiar (2008) para o efeito do extracto aquoso de *P. barbatus* e *P. ecklonii* e do ácido rosmarínico na formação do biofilme por *S. sobrinus*.

**Tabela 9:** Inibição de formação de biofilme por *S. mutans* e *S. sobrinus* pelos extractos aquosos e metanólicos de *P. ecklonii* e *P. barbatus* e pelo ácido rosmarínico. \* Valores obtidos por Sara Aguiar, 2008.

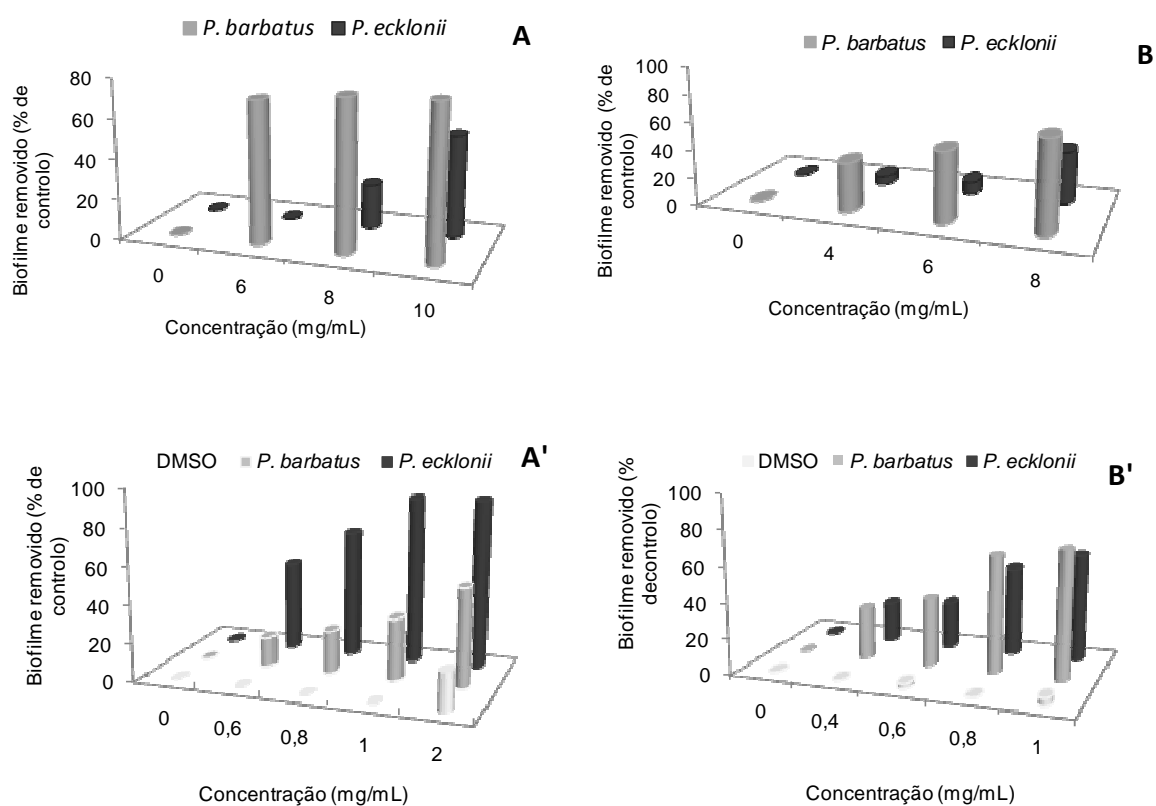
Extracto	Plantas	Composto	IC <sub>50</sub> (mg/mL)	
			<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>
Aquoso	<i>P. barbatus</i>	-----	0,6 ± 0,1*	1,4 ± 0,7
	<i>P. ecklonii</i>	-----	1,0 ± 0,2*	2,7 ± 0,6
	-----	<b>Ácido rosmarínico</b>	3,1 ± 1,2*	1,3 ± 0,7
Metanólico	<i>P. barbatus</i>	-----	0,52 ± 0,1	0,13 ± 0,0
	<i>P. ecklonii</i>	-----	0,12 ± 0,0	0,12 ± 0,0

Comparando os valores obtidos para os dois extractos, verificou-se que o extracto metanólico apresenta maior efeito inibitório, uma vez que as concentrações inibitórias são muito mais baixas do que as concentrações requeridas pelos extractos aquosos. Analisando as duas plantas, verificou-se que, em relação aos extractos aquosos, o extracto de *P. barbatus* tem maior actividade inibitória sobre a formação do biofilme, o que é comprovado pelo seus valores de IC<sub>50</sub> de 0,6 e 1,4 mg/mL para *S. sobrinus* e *S. mutans*, respectivamente. Ao contrário destes, para os extractos metanólicos, é o extracto de *P. ecklonii* que apresenta maior actividade inibitória, com o valor de IC<sub>50</sub> da ordem de 0,12 mg/mL para ambas as espécies.

Comparando os valores obtidos para os extractos e para o ácido rosmarínico, verificou-se que o efeito inibitório do ácido na formação de biofilme não se distanciou significativamente do efeito verificado para os extractos aquosos. Esta verificação é comprovada pelo valor de IC<sub>50</sub> de 1,3 e 3,1 mg/mL de ácido rosmarínico sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*, respectivamente. Estes valores indicam que à presença de elevada quantidade deste composto bioactivo no extracto aquoso de *P. barbatus* e *P. ecklonii* pode justificar à capacidade inibitória na formação do biofilme duas espécies *streptococci mutans* em estudo.

#### IV.3.2.2. Efeito dos Extractos no Biofilme Formado

Os resultados do efeito inibitório dos extractos sobre o biofilme formado são apresentados na Figura 27 e na Tabela 10. Estes resultados indicaram que concentrações sobre MIC (aproximadamente  $3 \times \text{MIC}$ ), dos extractos das plantas em estudo, têm capacidade para remover/destruir o biofilme formado à superfície do vidro. Em geral, esta capacidade de remoção do biofilme verificada foi proporcional a concentração do extracto aplicada.



**Figura 27:** Percentagem de biofilme removido pelos extractos aquosos das plantas: biofilme de *S. sobrinus* (A) e de *S. mutans* (B); e pelos extractos metanólicos das plantas: biofilme de *S. sobrinus* (A') e de *S. mutans* (B').

Os extractos metanólicos apresentaram maior capacidade para remover o biofilme formado, uma vez que as concentrações requeridas foram muito mais baixas. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  comprovam esta evidência, uma vez que estes valores

variaram de 0,6 a 1,9 mg/mL, para os extractos metanólicos, e de 4 a 9mg/mL, para os extractos aquosos.

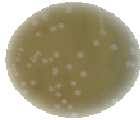
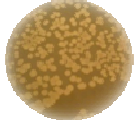




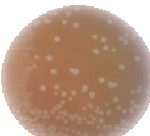
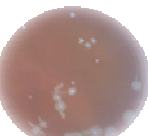
**Tabela 10:** Valores de IC<sub>50</sub> de remoção de biofilme formado por *S. mutans* e *S. sobrinus* pelos extractos aquosos e metanólicos de *P. ecklonii* e *P. barbatus*.

Extracto	Plantas	IC <sub>50</sub> (mg/mL)	
		<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>
Aquoso	<i>P. barbatus</i>	4 ± 0,2	6,0 ± 0,5
	<i>P. ecklonii</i>	9,0 ± 1,0	>8,0
Metanólico	<i>P. barbatus</i>	1,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1
	<i>P. ecklonii</i>	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1

Comparando as duas plantas verificou-se que para o extracto aquoso, *P. barbatus* é mais eficiente na remoção de biofilme, com o IC<sub>50</sub> a variar entre 4 a 6 mg/mL, do que o extracto de *P. ecklonii*. Em relação ao extracto metanólico não se verifica um padrão conclusivo, no entanto o extracto metanólico de *P. ecklonii* aparenta ser mais eficiente sobre *S. sobrinus*, apresentando o valor de IC<sub>50</sub> mais baixo (0,6mg/mL).

Para investigar a acção bactericida dos extractos sobre as células bacterianas presentes no biofilme, inoculou-se, em meio sólido, uma alíquota do biofilme incubado com concentrações crescentes de ambos os extractos de *P. ecklonii* e *P. barbatus*, durante 48 h. Ao fim deste período, verificou-se que, para ambos os extractos de ambas as plantas sobre as duas espécies, houve crescimento bacteriano (Tabela 11), o que comprova a viabilidade das células. Portanto ainda não se atingiu concentrações bactericidas sobre o biofilme. Este resultado pode ser explicado pela idade do biofilme (48 h) e pela maior capacidade de resistência do mesmo.

**Tabela 11:** Efeito do extracto aquoso e metanólico de *P. barbatus* e *P. ecklonii* na viabilidade de um biofilme de 48 horas formado por células de *S. sobrinus* e *S. mutans*. Apenas são apresentadas as culturas submetidas à concentração máxima testada.

Extracto	Planta	Espécie	
		<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>
Aquoso	<i>P. barbatus</i>	 [10 mg/mL]	 [10 mg/mL]
	<i>P. ecklonii</i>	 [10 mg/mL]	 [10 mg/mL]
Metanólico	<i>P. barbatus</i>	 [2 mg/mL]	 [2 mg/mL]
	<i>P. ecklonii</i>	 [1 mg/mL]	 [1 mg/mL]

### IV.3.2.3. Discussão do Efeito Inibitório dos Extractos no Biofilme

Os biofilmes como comunidades complexas são muito mais resistente aos agentes antimicrobianos do que as células planctónicas. Neste contexto, investigou-se o efeito dos extractos aquosos e metanólicos de *P. ecklonii* e *P. barbatus* na formação de biofilme e no biofilme formado *in vitro*, à superfície de vidro. Os resultados obtidos revelaram que tanto a formação de biofilme como o biofilme formado é sensível aos extractos aplicados, sendo que este efeito foi mais acentuado aquando da utilização do extracto metanólico.

A inibição da formação do biofilme e a disrupção do biofilme formado pelas duas espécies *streptococci mutans* pelos extractos aquoso e metanólico das plantas em estudo poderá estar relacionado com a actividade antibacteriana, inibição de GTFs e efeito anti-adesivo causados pelos mesmos.

Como já foi verificado anteriormente, tanto os extractos como o ácido rosmarínico têm actividade antibacteriana sobre as células de *S. mutans* e *S. sobrinus* em suspensão (planctónicas). Esta actividade é derivada da capacidade bacteriostática e bactericida dos extractos que reduzem significativamente o número de células viáveis no meio de cultura. Portanto esta actividade pode ser uma das responsáveis pela interferência destes extractos na capacidade de formação do biofilme e no biofilme formado. Addy, *et al.* (1992) referem que a acção bacteriostática de um composto/extracto previne a proliferação da fase de crescimento do biofilme. Logo, quanto maior for a actividade antibacteriana de um extracto/composto maior será o seu efeito inibitório na formação biofilme e no biofilme formado. Portanto, a elevada actividade antibacteriana do extracto metanólico destas duas plantas pode explicar o maior efeito inibitório do mesmo sobre o biofilme de ambas espécies, comparativamente com o efeito registado pelo extracto aquoso.

Para além da actividade antibacteriana, a inibição da actividade enzimática de GTFs pode estar relacionada com a inibição da formação do biofilme e interferência com o biofilme existente. Esta hipótese advém do facto de que a actividade deste enzima é fundamental na adesão dependente de sacarose, que ao

promover a adesão entre as células bacterianas e destas à superfície é a principal causa da formação e manutenção do biofilme. Portanto o efeito inibitório de extractos das plantas em estudo sobre GTF extracelular poderá justificar a actividade anti-biofilme registada.

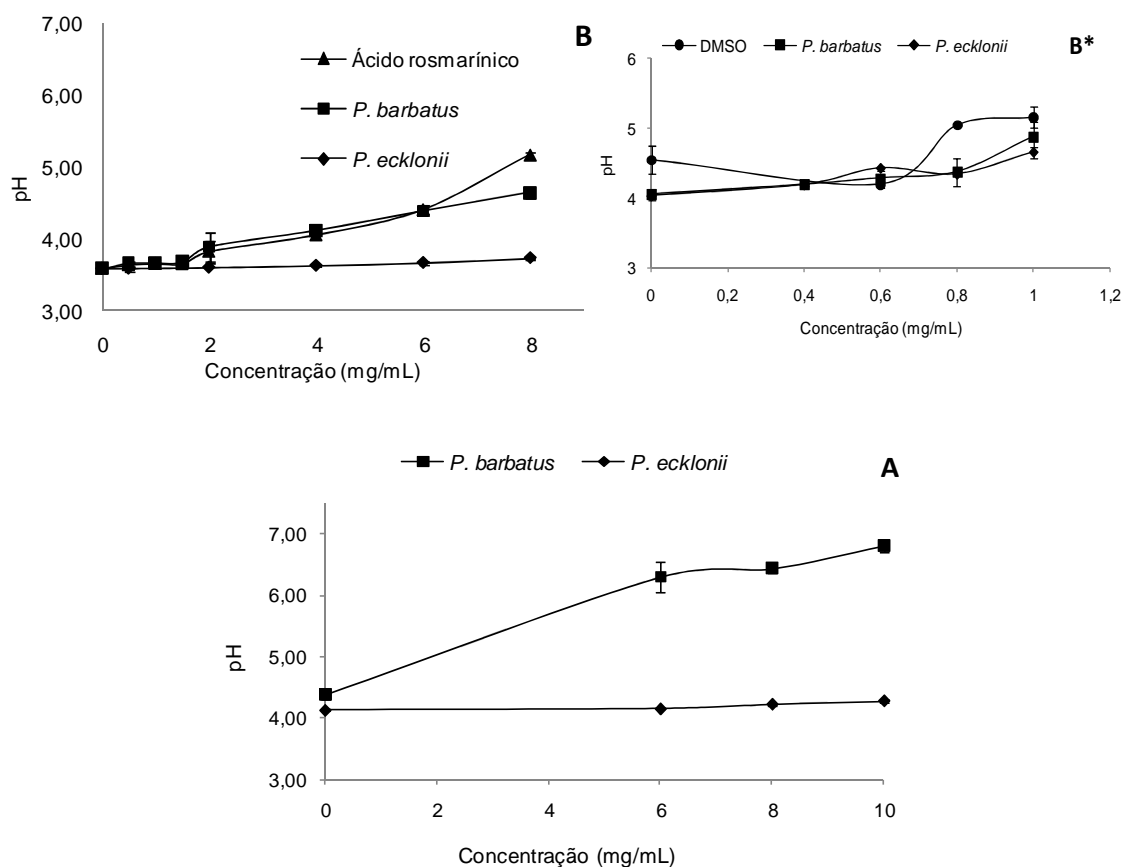
A capacidade de adesão de *S. sobrinus* e *S. mutans* a uma superfície é fundamental na formação do biofilme. Portanto a existência de compostos no meio que impossibilitem esta adesão poderá comprometer o processo de formação do biofilme assim como a subsistência do mesmo. A capacidade anti-adesiva de um composto está associada à sua capacidade de alterar as propriedades hidrofóbicas da superfície de adesão (Addy et al., 1992). Os compostos anti-adesivos, são aqueles que se ligam à superfície, através da ligação das cadeias hidrofóbicas, e expõem para o exterior as suas cadeias hidrofílicas, tornando a superfície hidrofílica. A alteração da propriedade hidrofóbica da superfície bloqueia as interações entre as bactérias e superfície, impedindo que estas adiram à superfície. Portanto a capacidade de inibição de formação de biofilme pelos extractos em estudo também poderá ser explicada, em parte, pela possível existência de compostos anti-adesivos com na mistura extraída das plantas em estudo.

#### **IV.3.3. Interferência dos Extractos na Capacidade Acidogénica**

A produção de ácidos, pelas bactérias presentes no biofilme dentário, é um dos principais factores responsáveis pela indução da cárie dentária. Como já foi verificado, tanto a estirpe de *S. mutans* como a de *S. sobrinus* utilizadas neste estudo possuem capacidade acidogénica (Figura 17).

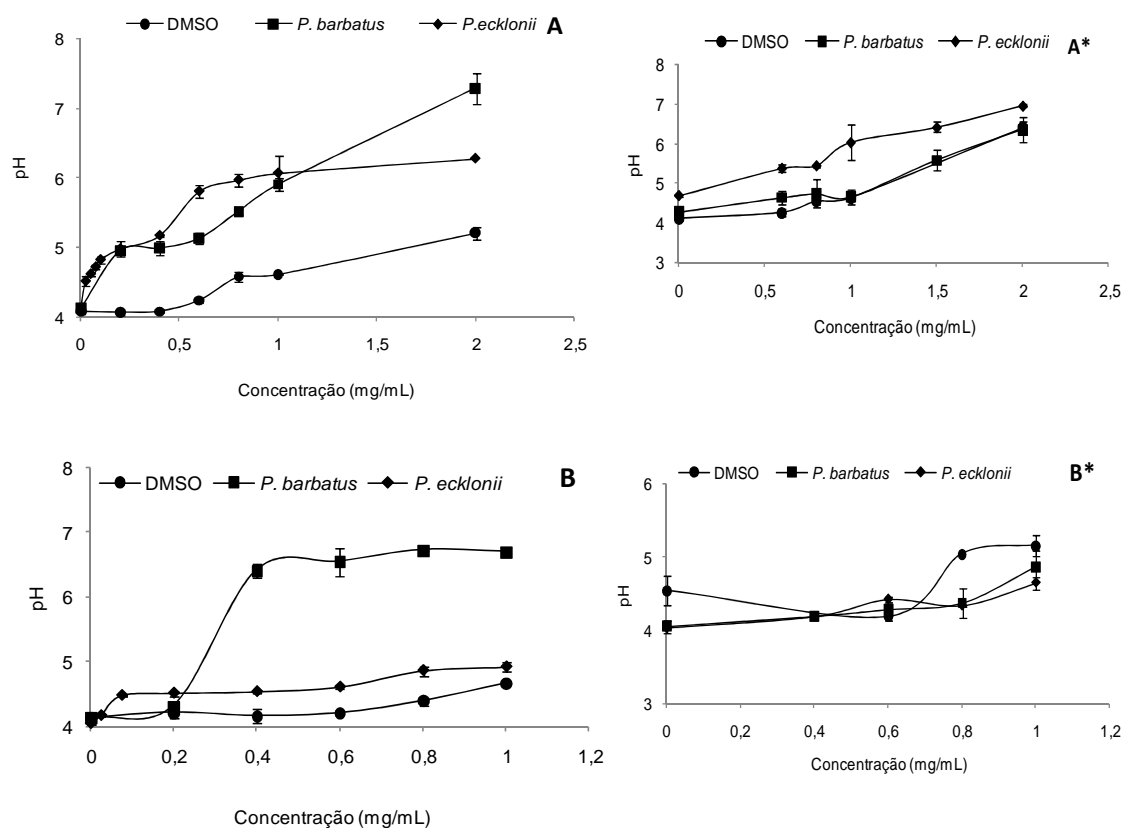
Com o objectivo de avaliar o efeito dos extractos aquosos e metanólicos de *P. ecklonii* e *P. barbatus* assim como do ácido rosmarínico na capacidade acidogénica destas espécies, seguiu-se as alterações do pH do biofilme sob acção dos mesmos extractos e do ácido. Na Figura 28 apresenta-se a variação do pH do biofilme ressuspendido de *S. mutans* na presença de concentrações crescentes de extracto aquoso de *P. ecklonii* e *P. barbatus* e ácido rosmarínico, ao fim de 48

horas. A partir do gráfico representado nesta figura verificou-se que há um aumento de pH consoante o aumento da concentração do extracto aquoso/composto, tanto para o biofilme formado na presença dos extractos e do ácido como para o biofilme já formado que foi submetido a concentrações sobre MIC dos extractos. O mesmo padrão foi registado para o biofilme formado por *S. sobrinus* sob acção dos extractos aquosos e do ácido rosmarynico (Figura 28 e Aguiar, 2008).



**Figura 28:** Variação do pH do biofilme ressuspensionado de *S. mutans* e *S. sobrinus* sob efeito do extracto aquoso de *P. ecklonii* e *P. barbatus* e do ácido rosmarynico. B -, variação de pH de biofilme de *S. mutans* formado na presença do extracto /composto; B\*- variação de pH de biofilme de *S. mutans* existente, que posteriormente foi sujeito aos extractos; A – variação do pH do biofilme de *S. sobrinus* existente, que posteriormente foi sujeito aos extractos.

Verificou-se, igualmente, que também há um aumento de pH do biofilme ressuspensionado das duas espécies em função das concentrações crescentes do extracto metanólico. Esta evidência pode ser comprovada através da Figura 29, que apresenta os gráficos de variação de pH de biofilmes de *S. mutans* e *S. sobrinus* na presença de concentrações crescentes de extracto metanólico de *P. barbatus* e *P. ecklonii*.



**Figura 29:** Variação do pH do biofilme ressuspensionado de *S. mutans* e *S. sobrinus* sob efeito do extracto metanólico de *P. ecklonii* e *P. barbatus*. B e B\*- variação de pH do biofilme de *S. mutans*, formado na presença dos extractos e existente que posteriormente foi sujeito aos extractos, respectivamente; A e A\* – variação de pH do biofilme de *S. sobrinus*, formado na presença dos extractos e existente, que posteriormente foi sujeito aos extractos, respectivamente.

Os resultados obtidos demonstram que ambos os extractos e o ácido rosmarínico interferem com a capacidade acidogénica de *S. mutans* e *S. sobrinus*, inibindo a diminuição do pH do meio provocado pelas mesmas. Estes resultados

indicam que tanto os extractos como o ácido têm capacidade inibitória sobre o potencial acidogénico de ambas as espécies. Este efeito inibitório poderá estar ligado à actividade antibacteriana destes extractos/ácido ou ainda poderá dever-se à sua interferência com a via glicolítica destas bactérias. Um estudo realizado por Koo *et al.*, 2005, revela que a disrupção da produção de ácidos pela via glicolítica é causada pela acidificação citoplasmática. A presença de ácidos, tais como o ácido rosmarínico, nestes extractos pode provocar a acidificação citoplasmática, inibindo assim a produção de ácidos pelas espécies em estudo.

#### IV.4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que os extractos aquosos e metanólicos de *P. barbatus* e *P. ecklonii* têm efeito inibitório sobre os factores de virulência das duas principais espécies cariogénicas em humanos, *S. mutans* e *S. sobrinus*. Este efeito foi verificado para a actividade de GTF-extracelular, biofilme e potencial acidogénico. O efeito inibitório sobre GTF poderá estar, principalmente, ligado à existência de compostos fenólicos nestes extractos, nomeadamente a presença de ácido rosmarínico. Também se pode concluir que o efeito inibitório sobre GTF mais a actividade antibacteriana verificado para estes extractos, assim como para o ácido rosmarínico, está na origem do efeito inibitório no biofilme, comprovado através da inibição da formação biofilme e manutenção do mesmo por ambos os extractos. Por fim, concluiu-se que a presença de alguns ácidos fenólicos, tais como o ácido rosmarínico pode ser o responsável pelo efeito inibitório no potencial acidogénico.



# **CAPÍTULO V**

---

**V.1. Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras**

**V.2. Bibliografia**



### V.1.1 CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo teve como principal objectivo testar o efeito de extractos de *P. barbatus* e *P. ecklonii*, duas espécies do género *Plectranthus*, sobre a viabilidade e factores de virulência de duas espécies de *streptococci mutans*, *S. mutans* e *S. sobrinus*. Para atingir este objectivo, avaliou-se a actividade antibacteriana e o efeito inibitório sobre os factores de virulência de extractos metanólicos e aquosos destas duas plantas. A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que ambos os extractos têm actividade antibacteriana e efeito inibitório sobre os factores de virulência destas duas espécies.

A actividade antibacteriana verificada para *P. barbatus* e *P. ecklonii* sobre ambas as espécies *streptococci mutans* pode estar directamente associada à composição fitoquímica destas plantas, nomeadamente à presença de compostos fenólicos e diterpenóides. De entre os compostos fenólicos presentes nestes extractos poder-se-á apontar o ácido rosmarínico como o possível responsável por esta actividade. Também se pode concluir que a presença de diterpenóides em maior quantidade nos extractos metanólicos está ligada à sua maior actividade antibacteriana.

Adicionalmente à actividade antibacteriana, também se verificou o efeito inibitório de extractos metanólicos e aquosos de *P. barbatus* e *P. ecklonii* sobre os factores de virulência de ambas as espécies de *streptococci mutans*, nomeadamente sobre o enzima GTF, biofilme e potencial acidogénico. Concluiu-se que o efeito inibitório sobre a actividade enzimática de GTF pode estar associado principalmente à presença de compostos fenólicos presentes nestes extractos, nomeadamente o ácido rosmarínico, e possível presença do de apeginina. Também se concluiu que a actividade anti-biofilme está directamente ligada ao efeito inibitório sobre GTFs e à actividade antibacteriana. O efeito inibitório na formação do biofilme permite inferir que estes extractos são bons agentes na prevenção da formação do biofilme dentário, mas também se concluiu que os mesmos são bons agentes no combate ao biofilme dentário existente, através da remoção do mesmo.

Tendo em conta a actividade antibacteriana e o efeito inibitório nos factores de virulência de *S. mutans* e *S. sobrinus* dos extractos de *P. ecklonii* e *P. barbatus*, pode-se concluir que estes extractos poderão ser bons agentes anti-placa dentária e, conseqüentemente, anti-carie dentária.

### V.1.2. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos revelam que os extractos de *P. barbatus* e *P. ecklonii* têm efeito antibacteriano sobre as duas espécies de *streptococci mutans* presentes na flora oral humana, *S. mutans* e *S. sobrinus*, assim como efeito inibitório sobre os factores de virulências das mesmas. Estas evidências poderão permitir fazer uma extrapolação de um possível efeito anti-cariogénico dos mesmos extractos. No entanto, este efeito só poderá ser confirmado através de algumas investigações adicionais, nomeadamente a melhor compreensão dos efeitos verificados e a confirmação do efeito anti-placa dentária.

A melhor compreensão do efeito antibacteriano e inibitório sobre os factores de virulência apresentado pelos extractos das duas plantas em estudo é um dos pontos fundamentais para este tipo de estudo. A identificação dos compostos maioritários destes extractos e uma análise minuciosa da actividade antibacteriana e efeito inibitório nos factores de virulência destes compostos poderá contribuir para esta compreensão.

A confirmação da actividade anti-placa dentária dos extractos de *P. barbatus* e *P. ecklonii* necessitará de um estudo que tenha em conta as condições do ambiente oral. Portanto a partir deste estudo não se pode confirmar com exactidão se as concentrações inibitórias poderão ser as mesmas no ambiente oral. Assim será fundamental testar o efeito inibitório destes extractos sobre um biofilme formado por *S. mutans* e *S. sobrinus* em condições mais próximas do ambiente oral, nomeadamente a utilização da saliva humana e sobre hidroxilapatite ou outros materiais dentários.

## V.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MOGIB, M., Albar, H.A., & Batterjee, S.M., 2002. Chemistry of the genus *Plectranthus*. *Molecules*, 7: 271-301.
- ADDY, M., Slayne, M.A., Wade, W.G., 1992: The formation and control of dental plaque –overview. *Journal of Applied Bacteriology*, 73: 269-278.
- AGUIAR, S.R.M.M., 2008. Efeito inibitório das espécies *Plectranthus* e ácido rosmarínico no crescimento, na formação de biofilme e actividade de glucosiltransferase de *Streptococcus sobrinus*. Relatório do Projecto da Licenciatura em Química.
- ALBUQUERQUE, R.L., Kentopff, M.R., Machado, M.I.L., Silva, M.G.V., Matos, F.J.A., 2007. Diterpenos tipo abietano isolados de *Plectranthus barbatus* Andrews. *Química Nova*, 30: 1882-1886.
- ALLISON, D.G., 2003: The biofilm matrix. *Biofouling*, 19:139 -150.
- ALMEIDA, L.S.B., Murata, R.M., Yatsuda, R., Dos Santos, M.H., Nagem, T.J., Alencar, S.M., Koo, H., Rosalen, P.L., 2008. Antimicrobial activity of *Rhedia brasiliensis* and 7- epiclusianone against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine*, 15: 886-891.
- ALVIANO, W.S., Alviano, D.S., Diniz, C.G., Antoniolli, A. R., Alviano, C.S., Farias, L.M., Carvalho, M.A.R., 2008. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Archives of Oral Biology*, 53: 545-552.
- ANDREWS, J. M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 5-16.

- ASOLINI, F.C., Tedesco, A.M., Carpes, S.T., Ferraz, C., Alencar, S.M., 2006. Antioxidant and antibacterial activities of phenolic compounds from extracts of plants used as tea. *Brazilian Journal of Food Technology*, 9: 209-215.
- BAKER, C.N., Stocker, S.A., Culver, D.H., Thornsberry, C., 1991. Comparison of the E test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 29:533-538.
- BANAS, A.J., 2004. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Frontiers in Bioscience*, 9:1267-1277.
- BANAS, A.J., Vickerman, M.M., 2003. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 9:1267-1277.
- BARD, M., Albrecht, M.R., Gupta, N., Stillwell, W., 1998. Graniol interfer with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. *Lipids*, 23: 534-538.
- BENSADOUN, A.E., Weinstein, D., 1976. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical Biochemistry*, 70: 241-250.
- BOWEN, W.H., 2002. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13:126-131.
- BURNE, R.A., 1998. Oral streptococci: products of their environment. *Journal Dental Research*, 77: 445-452.
- COSTA, M.C.C.D., 2006. Uso popular e ações farmacológicas de *Plectranthus barbatus* Andr. (*Lamiaceae*): revisão dos trabalhos publicados. *Revista Brasileira Pl. Médica, Botucatu*, 8: 81-88.

- COWAN, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564-582.
- COYKENDALL, A.L., 1989. Classification and identification of viridans streptococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 2: 315-328.
- CUSHNIE, T.P.T., Lamb, A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 343-356.
- DELLAR, J.E., Cole, M.D. & Waterman, P.G., 1996. Antimicrobial abietane diterpenoids from *Plectranthus elegans*. *Phytochemistry* 41: 735-738.
- DUARTE, S. Rosalen, P.L., Hayacibara, M.F., Cury, J.A., Bowen, W.H., Marquis, R.E., Rehder, V.L., Sartoratto, A., Ikegaki, M., Koo, H., 2006. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. *Archives Oral Biology*, 51: 15-22.
- ELEY, B.M., 1999. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque – a review. *British Dental Journal*, 189: 286-293.
- EVARISTO, I.M., & Leitão, M. C., 2001. Identificação e quantificação por DAD-HPLC, da fracção fenólica contida em folha de *Quercus suber L. Silva Lusitana*, 9: 135-141.
- FAIRBRIDGE, R.A., Willis, K.J., Booth, R.G., 1951. The direct colorimetric estimations of reducing sugars and other reducing substances with tetrazolium salts. *Bovril Research Laboratory*, 49: 423-426.
- FALÉ, P.L., Borges, C., Amorim Madeira, P.J., Ascensão, L., Araújo, M.E.M., Florêncio, M.H., Serralheiro, M.M., 2008. Rosmarinic Acid, scutellarein 4'-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* ("Falso Boldo"). *Food Chemistry*, 114: 798-805.

- FERREIRA, W.F.C., Sousa, J.C.F., 2000. Microbiologia. Lisboa: *LIDEL-edições técnicas*.
- FIGUEIREDO, N.L.L., 2007. Estudo de um mutante fotossintético em *Chlamydomonas reinhardtii*. Relatório de Estágio Intercalar da Licenciatura em Biologia, Lisboa.
- GIBBONS, S., 2004. Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural Product Report*, 21: 263-277.
- HAMADA, S. & Slade, H.D., 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Reviews*, 44: 331-381.
- HANSON, J., 1998. Diterpenoids. *Natural Product Reports*, 14. 93-106.
- HAWAS, U.W., El-Toumy, S.A., Meyer, J.J.M., 2008. Phenolic constituents and antimicrobial studies on the aqueous methanolic extract of the *Plectranthus ecklonii* leaves. *Plant Medical*, 74.
- HOUTE, J., 1994. Role of micro-organisms in caries etiology. *Journal of Dental Research*, 73:672-681.
- HUANG, B.B., Fan, M.W., Wang, S.L., Han, D.X., Chen, Z. & Bian, Z., 2006. The inhibitory effect of magnolol from *Magnolia officinalis* on glucosyltransferase. *Archives of Oral Biology*, 51:899-905.
- KOLENBRANDER, P.E., Andersen, R.N., Kazmerak, K.M. & Palmer, R.J., 2000. Coaggregation and coadhesion in oral biofilms. Community Structure and Co-Operation in Biofilms. Society for General Microbiology Symposium 59. Cambridge, Cambridge University Press, pp 65–85.
- KOO, H., Schobel, B., Scott-Anne, K., Watson, G., Bowen, W.H., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Park, Y.K., 2005. Apigenin and tt- farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. *Journal of Dental Research*, 84: 1016-1020.

- KOO, H., Hayacibara, M. F., Schobel, B. D., Cury, J. A., Rosalen, P. L., Park, Y. K., Vacca-Smith, A. M., Bowen, W. H., 2003. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and *tt*-farnesol. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52:782–789.
- KOO, H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Park, Y.K., Bowen, W.H., 2002. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 1302-1309.
- KOO, H., Vacca Smith, A.M., Bowen, W.H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Park, Y.K., 2000. Effects of *Apis mellifera* propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferase in solution and adsorbed on saliva-coated hydroxyapatite. *Caries Research*, 34: 361-442.
- KUBO, I., Matsumoto, T., Tori, M., Asakawa, Y., 1984. Structure of plectrin and aphid antifeedant diterpene from *Plectranthus barbatus*. *Chemistry Letters*, pp. 1513-1516.
- LAMONT, R.J. & Jenkinson H.F., 2000. Adhesion as an ecological determinant in the oral cavity. *Oral Bacterial Ecology: The Molecular Basis*. Wymondham, *Horizon Scientific Press*, pp 131–168.
- LEE, H. J., Jeong, Y.-I., Lee, T.-H., Jung, I.D., Lee, J.S., Lee, C.-M., Kim, J.-I., Joo, H., Lee, J.-D. & Park, Y.-M., 2007. Rosmarinic acid inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in murine dendritic cells. *Biochemical Pharmacology*, 73: 1412-1421.
- LEITE, B., Pascholati S.F., Kitajima, E.W., Ishida, M.L, 2001. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 9: 1-41.
- LEMOS, J.A., Abranches, J., Burne, R.A., 2005. Response of cariogenic streptococci to environmental stress. *Current Issues in Molecular Biology*, 7: 95-107.

- LIM, T.Y., Lim, Y.Y., Yule, C.M., 2009. Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four *Macaranga* species. *Food Chemistry*, 114: 594-599.
- LIMA, J.E.O., 2007. Cárie dentária: um novo conceito. *Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial*, 12:119-130.
- LOESCHE, W.J., 1986. Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay. *Microbiological Reviews*, 50: 353-380.
- LOESCHE, W.J., 1993. Metabolismo dos carboidratos pelos microorganismos da placa. In: Cárie dentária: uma infecção tratável. *Rio de Janeiro: Cultura médica*, cap.9.
- LOWRY, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*, 193: 265-275.
- LUKHOBBA, C.W., Simmonds, M.S.J. & Paton, A., J., 2006. *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. *Journal of Ethnopharmacology* 103: 1-24.
- MARTINS, I.S., Ispolnov, K., Lino, A.R., Carolino, M.M., Almeida, A., 2007. Effects of culture conditions on *Streptococcus mutans* cariogenic potencial. *Microbiotec XXXIII JPG*, p. 195.
- MARTINS, N.C.S., Gerald, B.P., Oliveira, R., Azeredo, J., 2005. The relationship between inhibition of bacterial adhesion to a solid surface by sub-MICs of antibiotics and subsequent development of a biofilm. *Research of Microbiology*, 156:650-655.
- MAKINO, T., Ono, T., Muso, E., Yoshida, H., Honda, G. & Sasayama, S., 2000. Inhibitory effects of rosmarinic acid on the proliferation of cultured murine mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant*, 15: 1140-1145.

- MAKAYA, N.I.C., 2007. Avaliação do crescimento de culturas de *Streptococcus mutans* e de actividade de glucosiltransferase. Relatório de Projecto Tecnológico I da Licenciatura em Química Tecnológica.
- MARSH, P.D., 1994. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Advances in Dental Research*, 8:263-271.
- MARSH, P.D., 2004: Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Research*, 38: 204-211.
- MARSH, P.D., 2006: Dental plaque as a biofilme and microbial community – implications for health and disease. *Biomedical Central Oral Health*, 6: S14.
- MATTSON, A.M., Jensen, C.O., 1950. Colorimetric Determination of reducing sugars with triphenyltetrazolium chloride. *Analytical Chemistry*, 22: 182-185.
- MCNEILL, K., Hamilton, I.R., 2003. Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*, 221: 25-30.
- MITCHELL, T.J., 2003. The pathogenesis of streptococcal infections: from Tooth decay to meningitis. *Nature Reviews Microbiology*, 1: 219-230.
- MOREIRA, A.C.A., Carvalho M.R., Cisalpino, E.I., Damasceno, C.A., 2003. Cocos gram-positivos anaeróbios estritos da cavidade oral e do trato intestinal de primatas Calitriquídeos (*Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*) mantidos em cativeiro. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 2: 94-103.
- MONCHOIS, V., Willemont, R.M. & Monsan, P., 1999. Glucansucrase: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 131-151.
- MOUTON, C., Robert, J., 1995. Bacteriología bucodental. *Masson, S.A*

- OOSHIMA, T., Okasa, Y., Sazaki, H., Osawa, K., Yasuda, H., Matsumura, M., Sobue, S. Matsumoto, M., 2000. Caries inhibitory effects of cacao bean husk extract in in vitro and animal experiments. *Archives of Oral Biology*, 45: 639-643.
- OKTAY, M., Gulcin, I., Kufrevioglu O. I., 2003. Determination of *in vitro* antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologi*, 36: 263–271.
- O'TOOLE, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews of Microbiology*, 54: 49-79.
- PETERSEN, F.C., Assev, S., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Scheie, A.A., 2002. Functional variation of the antigen I/II surface protein in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius*. *Infection and Immunity*, 70: 249-256.
- PETERSEN, M., Simmonds, M.S.J., 2003. Molecules of interest: Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62: 121-125.
- ROSAN, B., Lamont, R.J., 2000. Dental plaque formation. *Microbes and Infection*, 2: 1599–1607.
- SBORDONE, L. & Bortolaia, C., 2003: Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clinical Oral Investigation*, 7: 181-188.
- SCANNAPIECO, F.A., 1994. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 5:203-248.
- SONG, J., Kim, S., Chang, K., Han, S., Yi, H., Jeon, J., 2006. In vitro inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Archives of Oral Biology*, 51: 1131-1140.

- SONG, J., Yang, T., Chang, K., Han, S., Yi, H., Jeon, J., 2007. In vitro effects of fraction separated from *Polygonum cuspidatum* root on the viability, in suspension and biofilms, and biofilme formation of mutans streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*, 112: 419-425.
- SOUSA, C.M.M., Silva, H.R., Vieira-Jr., G.M., Ayres, M.C.C., Costa, C.L.S., Araújo, D.S., Cavalcante, L.C.D., Barros, E.D.S., Araújo, P.B.M., Brandão, M.S, Chaves, M.H., 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30: 351-355.
- STANIER, R. Y., Doudoroff, M., Adelberg, E. A., 1971. General Microbiology. Third Edition, *Macmillan Student Editions*.
- STENUDD, C., Nordlund, A., Ryberg, M., Johansson, I., KdIIestai1, C., Stromberg, N., 2001. The association of bacterial adhesion with dental caries. *Journal of Dental Research*, 80:2005-2010.
- STOODLEY, P., Sauer, K., Davies, D.G., & Costerton, J.W., 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews of Microbiology*, 56: 187-209.
- SUNTHARALINGAM, P., Cvitkovitch D.G., 2005. Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. *Trends in Microbiology*, 13:3-6.
- TAMESADA, M., Kawabata, S., Fujiwara, T., & Hamada, S., 2004. Synergistic effects of *Streptococcal* glucosyltransferases on adhesive biofilm formation. *Journal of Dental Research*, 83: 874-879.
- TEIXEIRA, A.P., Batista O., Simoes M.F., Nascimento J., Duarte A., de la Torre M.C., Rodriguez B., 1997. Abietane diterpenoids from *Plectranthus grandidentatus*. *Phytochemistry*, 44: 325-327.
- TICLI, F.K., Hage, L.I.S., Cambria, R.S., Pereira, P.S., Magro, A.J., Fontes, M.R.M., Stabeli, R.G., Giglio, J.R., França, S.C., Soares, A.M., & Sampaio, S.V., 2005. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase

A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon*, 46: 318-327.

TSAI, P. J., Tsai, T. H., Ho, S. C., 2007. In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. *Food Chemistry*, 105: 311-316.

VALDEVITE, L.M, 2007. Estudo do efeito *in vitro* de extracto das folhas e do óleo-resina de capaíba sobre factores de virulência de *Streptococcus mutans*. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade de S. Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

WELLSOW, J., Grayer, R.J., Veitch, N.C., Kokubun, T., Lelli, R., Kite, G.C., Simmonds, M.S.J., 2006. Insect-antifeedant and antibacterial activity of diterpenoids from species of *Plactranthus*. *Phytochemistry*, 67: 1818-1825.

WIATER, A., Choma, A., Szcodrak, J., 1999. Insoluble glucans synthesized by cariogenic streptococci: a structural study. *Journal Basic Microbiology*, 39: 265-273.

WEYNE, S. & Baratieri, L.N, 1992: Dentística: procedimentos preventivos restauradores. 2ª ed. Rio de Janeiro: *Quintessence*, p. 1-42.

YOSHIDA, A., Kuramitsu H.K., 2002. *Streptococcus mutans* biofilm formation: utilization of a *gtfB* promoter–green fluorescent protein (*PgtfB::gfp*) construct to monitor development. *Microbiology*, 148: 3385–3394.

[1] <http://trilhos.limaris.net/>

[2] <http://student.ccbcmd.edu/>

[3] <http://www.infoescola.com>

[4] <http://www.unilavras.edu.br>

[5] <http://www.anniesannuals.com>

[6] <http://www.pathmicro.med.sc.edu>

[7] <http://www.poultry.baytril.com>

# ANEXOS

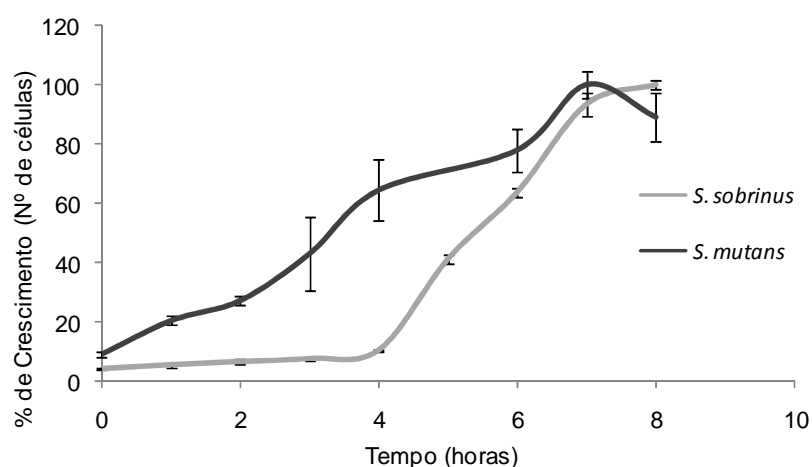
---



## ANEXO I – CURVA DE CRESCIMENTO

### I.1. Curva de Crescimento por Número de Células

A determinação da curva de crescimento de *S. sobrinus* e *S. mutans* também foi realizada por contagem do número de células visualizada ao microscópio e sobre um hematocítmetro.



**Figura I.1:** Curva de crescimento de *S. sobrinus* e *S. mutans* a partir do número de células.

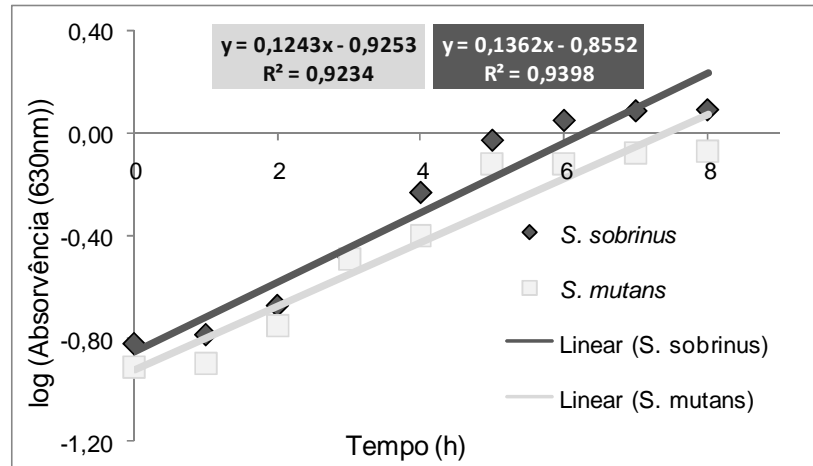
### I.2. Parâmetro Cinéticos

Para determinar os parâmetros cinéticos de crescimento de *S. sobrinus* e *S. mutans*, em meio BHI, a 37 °C e em condições de anaerobiose, traçou-se uma recta de logaritmo das absorvências (630nm) da fase exponencial das curvas de crescimento (Figura I.2).

A taxa específica de crescimento foi determinada a partir da equação da recta de regressão linear da curva, uma vez que ela é determinada pela seguinte equação:  $\mu g = \frac{dx}{dt} \times \frac{1}{x}$ , onde o x corresponde à biomassa. A integração desta equação, em ordem ao tempo, resulta numa equação da recta linear:  $\ln x_t = \mu g . t + \ln x_0$ .

A partir desta equação pode-se determinar o tempo de duplicação, tendo em conta

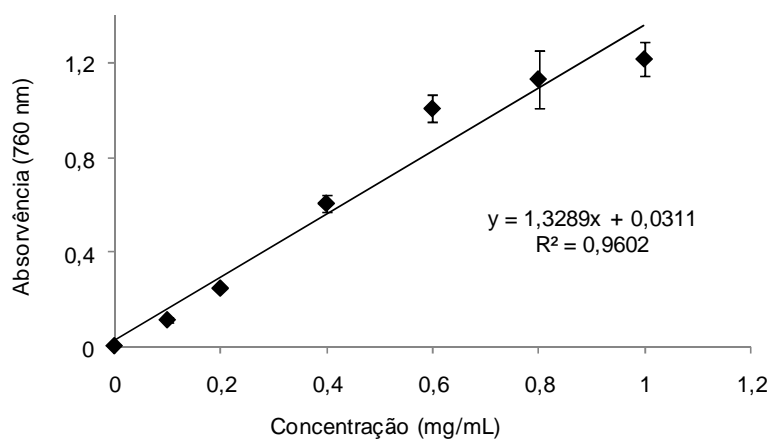
$$\text{que: } Td = \frac{\ln 2}{\mu g}$$



**Figura I.2:** Recta de logaritmo da fase exponencial das curvas de crescimento de *S. mutans* e *S. sobrinus*.

## ANEXO II- DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

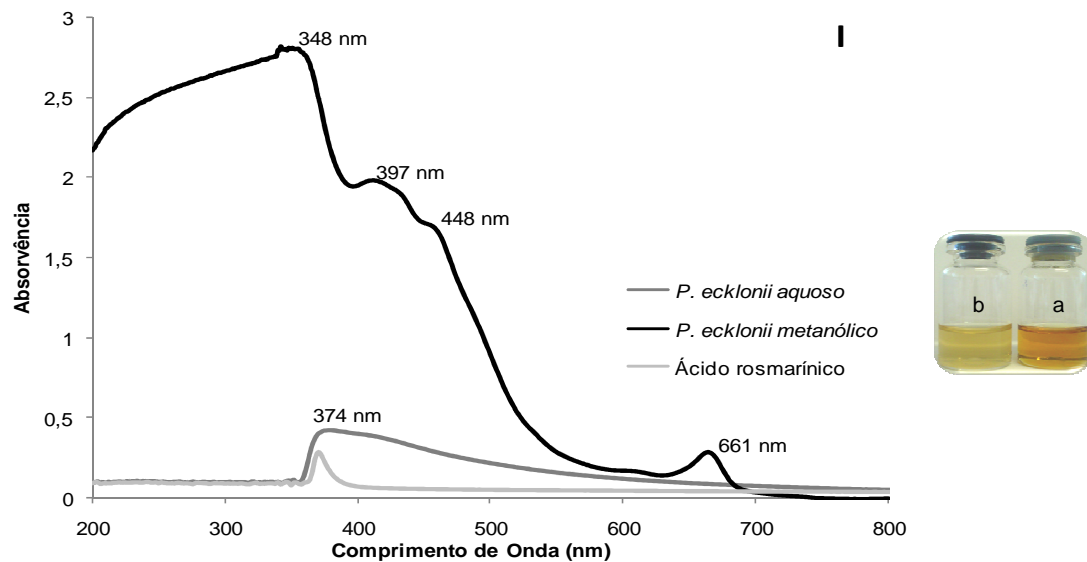
O teor em fenóis totais foi calculado através de uma curva padrão, construída a partir de valores de absorvência das várias amostras de pirogalol com concentrações definidas (0-1mg/mL) (Figura II.1). As amostras dos padrões foram preparados da mesma forma que as amostras em estudos.



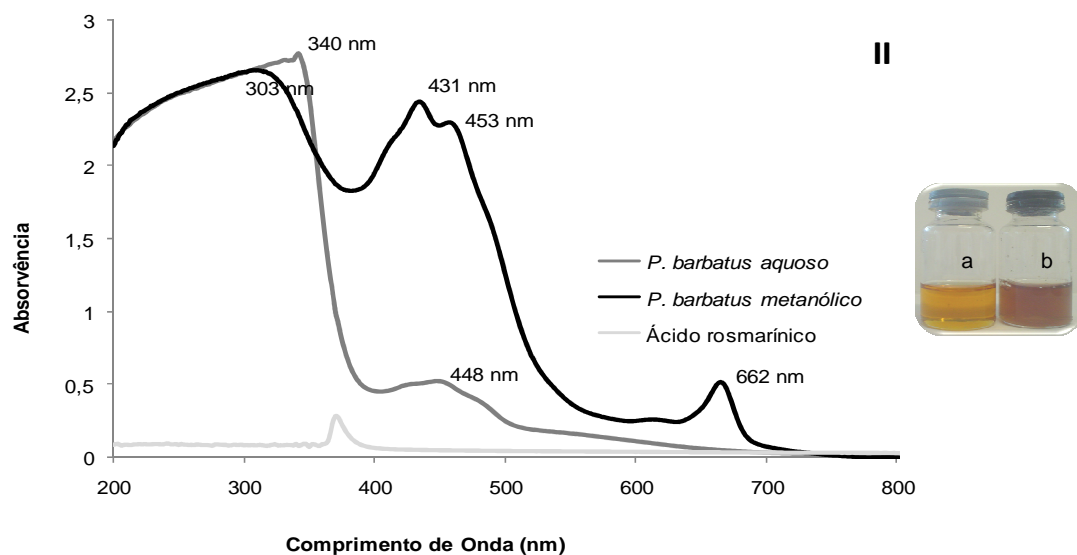
**Figura II.1:** Curva padrão para determinação de fenóis totais.

### ANEXO III- ESPECTRO DE ABSORÇÃO DOS EXTRACTOS

Na análise dos extractos, também se traçaram os espectros de absorção do extracto aquoso e metanólico de *P. ecklonii* e *P. barbatus* e do ácido rosmarínico (Figuras III.1 e III.2).



**Figura III.1:** Espectro de absorção dos extractos de *P. ecklonii*. Fotos dos extractos: (a) extracto metanólico e (b) extracto aquoso.



**Figura III.2:** Espectro de absorção dos extractos de *P. barbatus*. Fotos dos extractos: (a) extracto metanólico e (b) extracto aquoso.

## ANEXO IV – DOSEAMENTO DE GTF-EXTRACELULAR

Para determinar a concentração de GTF-extracelular presente no homogenato recorreu-se ao método de Lowry modificado.

### IV.1. Soluções

**Solução A:** solução 1+ solução 2 + solução 3 + solução 4 (1:1:1:1)

Solução 1: CTC, Uma solução a 20% (p/v) de carbonato de sódio é adicionada lentamente e com agitação a uma mistura de uma solução a 0,2% (p/v) de sulfato de cobre e uma solução a 0,4% (p/v) de tartarato de potássio;

Solução 2: NaOH 0.8M;

Solução 3: Dodecilsulfato de sódio (SDS) a 10% (p/v);

Solução 4: água destilada.

**Solução B** – DOC a 0.15% (p/v)

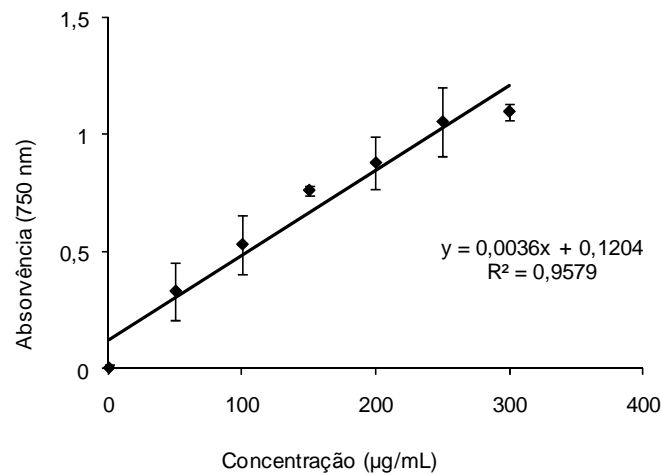
**Solução C** – TCA a 72% (p/v)

**Solução D** – Reagente de Folin-Ciocalteu (*Merck*) diluído 1:6

**Solução E** – Padrão de proteína BSA (Albumina de Soro Bovino) da *Sigma*. Solução-mãe de 0,333 mg/mL para a curva padrão.

### IV.2. Curva Padrão

Definiu-se uma curva padrão *à priori*, a partir da absorvência das várias concentrações (0-300 µg/mL) de uma proteína padrão – BSA (Figura IV.2).



**Figura IV.2:** Curva padrão para doseamento de proteínas a partir do método de Lowry modificado.

## ANEXO V - QUANTIFICAÇÃO DE ACTIVIDADE DE GTF

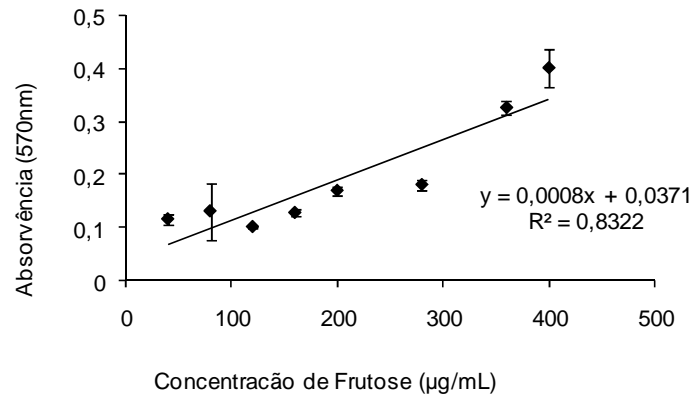
A quantificação da actividade do enzima foi determinado através do método de azul de tetrazólio. Este método requer a preparação prévia de uma solução de azul de tetrazólio.

### V.1. Solução

Azul de tetrazólio: suspensão aquosa de Azul de Tetrazolium (1% (p/v)) (*Sigma – Aldrich*), NaOH 0,3 M 1 e água destilada numa proporção de 1:3:5. Armazenada no escuro a 5°C.

### V.2. Curva Padrão

De forma a extrapolar o valor da actividade enzimática, foi necessário definir-se uma curva padrão. Esta curva foi construída a partir de absorvência de várias concentrações (0-400 µg/mL) de frutose (Figura V.2).



**Figura V.2:** Curva padrão para determinar a actividade enzimática de GTF a partir do método de azul tetrazólio.

## ANEXO VI – ARTIGO PUBLICADO

Alguns dos resultados apresentados neste trabalho deram origem a um artigo científico que está *in press* na revista *Food Chemistry*.

### Referência bibliográfica do artigo

Figueiredo, N.L., Aguiar, S.R.M.M., Falé, P.L., Ascensão, L., Serralheiro, M.L.M., Lino, A.R.L., 2009. The inhibitory effect of *Plectranthus barbatus* and *Plectranthus ecklonii* leaves on the viability, glucosyltransferase activity and biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. *Food Chemistry*, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.07.0008.

