

KARINA GERHARDT BIANCO

**Avaliação da atividade antimicrobiana
de extratos vegetais da savana brasileira sobre
Streptococcus mutans e a sua capacidade de
desmineralização e a adesão à superfície de vidro**

Araçatuba

2004

KARINA GERHARDT BIANCO

**Avaliação da atividade antimicrobiana
de extratos vegetais da savana brasileira sobre
Streptococcus mutans e a sua capacidade de
desmineralização e a adesão à superfície de vidro**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, para obtenção do título de mestre em Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior

Araçatuba

2004

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

B578a	Bianco, Karina Gerhardt Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais da savana brasileira sobre <i>Streptococcus mutans</i> e a sua capacidade de desmineralização e a adesão à superfície de vidro / Karina Gerhardt Bianco. Araçatuba : [s.n.], 2004. 94 f. : il. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2004 Orientador: Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior 1.Desmineralização. 2.Extratos vegetais. 3.Aderência bacteriana. Black D27 CDD 617.601
-------	---

Dados Curriculares

Nascimento 01.03.1978 – Araçatuba / SP

Filiação Roberto Silva Bianco
Márcia Gerhardt Bianco

1996/1999 Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Lins – UNIMEP

2001/2002 Curso de Especialização em Odontopediatria, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

2003/2004 Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus Pais,

“Existem dois legados duradouros que podemos deixar para nossos filhos. Um deles, raízes; o outro, asas”.

Hodding Cartier

Vocês me deixaram esses dois legados: raízes, que me mantêm sempre com os pés no chão, e asas, que possibilitam buscar e alcançar meus sonhos, por mais distantes que estejam. Tenham a certeza de que cumpriram sua difícil missão de pais e cada degrau alcançado é consequência do que recebi de vocês.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus, que na sua imensa bondade, sabedoria e misericórdia, nos agraciou com integridade física e moral, essenciais para me qualificar naquilo que sempre almejei.

Aos meus Pais, Roberto e Márcia, exemplos de amor, sabedoria, dedicação e honestidade, que sacrificaram suas vidas, não medindo esforços na minha formação moral e profissional.

Ao meu irmão André, amigo inseparável, que este amor que nos une seja eterno.

As minhas avós Martha e Laís, que me incentivaram desde criança e que vibraram ao me ver superando mais um obstáculo.

Aos meus avôs Álvaro e Idemur (in memorian), que tenho certeza que estariam vibrando comigo mais esta conquista.

Ao meu namorado, Pedro, a quem eu amo muito, ponto de apoio e de incentivo nos momentos mais difíceis que passei, pela ajuda dispensada em várias situações e pela paciência que teve comigo em muitas ocasiões.

Aos meus Familiares, que mesmo à distância, torceram e vibraram com a minha vitória.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, nas pessoas do Diretor Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin e Vice-Diretor Prof. Dr. Célio Percinoto, por proporcionar a realização desta pesquisa e pelo crescimento profissional que alcancei na realização do curso.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Prof. Dr. Célio Percinoto, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Profa. Dra. Rosângela dos Santos Nery e Profa. Dra. Sandra Maria Herondina Coelho Ávila de Aguiar, que são exemplos de dedicação à docência, pela amizade, por todas as lições transmitidas e pela confiança em mim depositada.

Aos colegas da minha turma de Mestrado, em Odontopediatria, Fernanda Lourenção Brighenti, Karine Takahashi, Kélio Garcia Silva, Mariana Machado Teixeira de Moraes Costa e Rebeca Lima Afonso, pela amizade e apoio nesta caminhada em comum.

Aos alunos do atual Programa de Mestrado em Odontopediatria, Ana Carolina Soares Fraga Zaze, Antônio Hernandes Chaves Neto, Gracieli Prado Elias, Karina Mirela Ribeiro Pinto Alves, Luciana Reichert da Silva Assunção e Márcio José Possari dos Santos, pelo bom relacionamento durante o curso.

Agradecimentos

Aos alunos do atual Programa de Doutorado em Odontopediatria, Daniela Maria Carvalho Pugliesi, Edo Hirata, Fátima Ioko Mochidome, Eduardo Antônio de Souza, Sueli Satomi Murata e Ana Elisa de Melo Vieira pela amizade que fizemos durante o curso.

As alunas da graduação Ana Paula Albuquerque Guedes, Amanda Galves Vieira, Camila Ribeiro de Paula e Vanessa Akemi Mizobuchi Matsumoto, muito obrigado pelo apoio e ajuda fundamental em vários momentos dentro do laboratório.

Aos meus amigos que não são dentistas, pelo grande incentivo e torcida.

A minha amiga de tantos anos, Ana Carolina Almeida Prado, pela tradução dos textos.

Aos funcionários da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Mário Luis da Silva, Maria dos Santos Ferreira Fernandes, Maria Bertolina Mesquita de Oliveira e Nair Ramos Macedo Cardoso pela dedicação, amizade e ajuda a mim dispensada.

A todos os funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Ana Cláudia Grieger Manzatti, Cláudia de Souza Frare, Cláudio Hideo Matsumoto, Isabel Pereira de Matos, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Izamar da

Agradecimentos

Silva Freitas, Luzia Anderlini, Maria Cláudia de Castro Benez e Jéssica Duberger Neves, pela atenção, paciência e eficiência com que sempre me atenderam.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Francisco Inácio Pinheiro, Adélia Barreto Claro da Silva e Marina Midori Sakamoto Hawagoe e Valéria de Queiroz Marcordes Zagatto, pelo excelente profissionalismo, atenção dispensada e ótimo relacionamento.

Aos funcionários da Diretoria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Adélia Barreto Claro da Silva e Célia Cristina Antonello Cunha, pela atenção a mim dispensada.

A funcionária Mirian Regina Mouro Ferraz Lima, pela paciência em atender milhares de telefonemas meus por dia.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de Estudo.

Aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, meu muito obrigado...

Agradecimentos

Ao Professor Elerson Gaetti Jardim Júnior...

*pela orientação a qual possibilitou a elaboração deste trabalho e pela ajuda e
atenção a mim dispensada, ajudando na minha formação profissional...*

Meus agradecimentos.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

	Introdução Geral	21
1	Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais de plantas da savana brasileira sobre bactérias cariogênicas	25
1.1	Introdução	25
1.2	Proposição	27
1.3	Material e Método	28
1.3.1	Microrganismos	28
1.3.2	Preparo dos Extratos Vegetais	28
1.3.2.1	Preparo de Extratos Hidroalcoólicos das Drogas Vegetais	28
1.3.2.2	Preparo de Extratos Aquosos dos Vegetais	29
1.3.3	Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais	30
1.3.4	Avaliação da cinética da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais sobre microrganismos em estado planctônico	30
1.3.5	Avaliação da cinética da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais sobre microrganismos em biofilme	31
1.3.6	Determinação da máxima diluição inibitória dos extratos vegetais	32
1.4	Resultado	33
1.5	Discussão	37
1.6	Conclusão	44

2	Avaliação da influência de diluições sub-inibitórias de extratos de vegetais da savana brasileira sobre a capacidade de desmineralização e adesão à superfície do vidro de <i>Streptococcus mutans</i>	46
2.1	Introdução	46
2.2	Proposição	49
2.3	Material e Método	50
2.3.1	Preparo dos Extratos Vegetais	50
2.3.2	Microrganismos	50
2.3.3	Determinação da máxima diluição inibitória dos extratos vegetais	51
2.3.4	Teste de aderência ao vidro	51
2.3.5	Preparação dos corpos de prova para os testes de capacidade de desmineralização	52
2.3.6	Análise da microdureza superficial inicial do esmalte e seleção dos blocos dentais	53
2.3.7	Teste de desmineralização in vitro	54
2.3.8	Análise da microdureza final após o período de desmineralização in vitro	54
2.3.9	Análise estatística	55
2.4	Resultado	56
2.5	Discussão	58
2.6	Conclusão	63
	Referências	65
	Anexos	72

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

Apesar da prevalência da cárie dentária em crianças ter declinado na maioria dos países ocidentais nos últimos 20 anos, essa doença continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública no mundo ¹⁵. O processo carioso tem sido intensamente estudado e descrito ^{8,15,33}, sendo caracterizado como uma destruição localizada do tecido dentário por ácidos, particularmente o ácido láctico, produzido através da fermentação de carboidratos por microrganismos presentes no biofilme bacteriano ^{8,33}.

Os dois mais importantes grupos de bactérias cariogênicas são os estreptococos do grupo *mutans* e os lactobacilos ¹⁵. Estreptococos do grupo *mutans* são os principais responsáveis pela cárie de superfície lisa, uma vez que possuem a capacidade de aderir, colonizar, sintetizar polissacarídeos extracelulares e produzir ácidos na superfície dos dentes ^{7,17,49}.

A adesão de células bacterianas à superfície dos dentes é de fundamental importância para o início da lesão cariosa. Segundo Gibbons e Nigaard ¹⁹, a aderência desse microrganismo na superfície do dente e subsequente formação do biofilme microbiano bucal ocorre em dois estágios. O primeiro estágio é a aderência reversível da célula bacteriana à película adquirida presente na superfície do esmalte e o segundo estágio é a acumulação de *Streptococcus mutans* através da sua proliferação e produção de glucanos extracelulares. A interferência em alguns desses estágios pode prevenir a formação da cárie dentária ⁷.

Essas bactérias acidogênicas estão presentes no biofilme de indivíduos cárie-ativos ou inativos e indivíduos livres de cárie. A capacidade de produzir ácido varia de

acordo com as diferentes espécies de bactérias, que em condições ótimas, produzem mais ácido do que outras. Os estreptococos do grupo *mutans* são notadamente acidúricos e acidogênicos, podendo proliferar em um ambiente de pH = 5,2, sendo esse aspecto de grande valor na desmineralização dental.

Os níveis salivares desses cocos cariogênicos parecem refletir, com maior ou menor propriedade, o risco à cárie do indivíduo, o que facilita o acompanhamento da estratégia preventiva instituída, bem como a resposta da microbiota às mesmas ²⁶, particularmente em populações que recebem atenção odontológica precoce ³¹.

Na população em geral, existe um costume em considerar a utilização de ervas medicinais e outros produtos naturais como recursos farmacológicos eficientes no tratamento de patologias bucais, existindo também a idéia que estes compostos não causam efeitos colaterais. Em países como o Brasil, que concentra uma parcela significativa da biodiversidade vegetal do planeta, esses aspectos apresentam grande importância.

Merece destaque o fato que apenas minúscula parcela das denominadas “plantas medicinais” tenha sido avaliada em experimentos *in vitro* ou *in vivo* capazes de comprovar ou não sua eficácia farmacológica, sendo que o ritmo de ocupação antrópico dos diferentes biomas vegetais é infinitamente maior do que a capacidade de avaliação das propriedades biológicas das plantas que se extinguem ²¹, particularmente quando falamos de ecossistemas complexos e ricos como o cerrado brasileiro ³⁴, que representa a mais produtiva das fronteiras agrícolas e vem experimentando um ritmo de devastação sem precedentes na história nacional.

Sendo assim, este trabalho desenvolveu-se em dois manuscritos, nos quais foram abordados os parâmetros acima mencionados.

No primeiro capítulo “Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais da savana brasileira sobre *Streptococcus mutans*”, a proposta foi avaliar através de um estudo *in vitro*, a atividade antimicrobiana de extratos vegetais de plantas da savana brasileira sobre bactérias cariogênicas. Já o segundo capítulo “Avaliação da influência de diluições sub-inibitórias de extratos vegetais da savana brasileira sobre a adesão de *Streptococcus mutans* à superfície do vidro e capacidade de desmineralização”, a proposta foi avaliar, através de um estudo *in vitro*, a influência que esses extratos possuem sobre a adesão à superfície do vidro de bactérias cariogênicas e a capacidade de desmineralização desses mesmos microrganismos.

1

Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais da savana brasileira sobre Streptococcus mutans

Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais da savana brasileira sobre Streptococcus mutans

1.1 INTRODUÇÃO

A patogênese da cárie dental está diretamente associada à produção de ácidos orgânicos, particularmente ácido láctico, por microrganismos acidogênicos e acidúricos, levando à destruição das estruturas dentais adjacentes ⁸. Entretanto, para que esses microrganismos venham a participar de fato desse processo é necessário que os mesmos sejam capazes de aderir à estrutura dental e contribuir para a elaboração do próprio biofilme microbiano, além de sintetizar extensa quantidade desses ácidos orgânicos.

Muitos gêneros microbianos do biofilme bucal, mesmo em biofilme de indivíduos cárie-ativos ou inativos e indivíduos livres de cáries, são capazes de metabolizar carboidratos em ácidos. Os estreptococos do grupo *mutans* são extremamente acidúricos e acidogênicos, podendo proliferar em um ambiente de pH = 5,2. Mesmo nessas condições esses estreptococos irão manter sua capacidade de produzir ácido, principalmente o láctico, e posteriormente abaixar esse pH.

Os níveis salivares desses cocos cariogênicos parecem refletir, com maior ou menor propriedade, o risco à cárie do indivíduo, o que facilita o acompanhamento da estratégia preventiva instituída, bem como a resposta da microbiota à mesma ²⁶, particularmente em populações que recebem atenção odontológica precoce ³¹.

A despeito da significativa redução no índice CPOD observado em nosso país, com a implementação de numerosos programas preventivos em diferentes âmbitos da esfera social, novas modalidades preventivas devem ser encontradas e pesquisadas e, uma vez declaradas eficazes, adicionadas ao arsenal preventivo disponível.

Na população em geral, existe um costume em considerar a utilização de ervas medicinais e outros produtos naturais como recursos farmacológicos eficientes no tratamento de patologias bucais, existindo também a idéia que estes compostos não causam efeitos colaterais. Em países como o Brasil, que concentram uma parcela significativa da biodiversidade vegetal do planeta, esses aspectos apresentam grande importância.

Merece destaque o fato que apenas minúscula parcela das denominadas “plantas medicinais” tenha sido avaliada em experimentos *in vitro* ou *in vivo* capazes de comprovar ou não sua eficácia farmacológica, sendo que o ritmo de ocupação antrópico dos diferentes biomas é infinitamente maior do que a capacidade de avaliação das propriedades biológicas das plantas que se extinguem ²¹, particularmente quando falamos de ecossistemas complexos e ricos como o cerrado (mais adequadamente denominado de savana brasileira) ³⁴, que representa a mais produtiva das fronteiras agrícolas e vem experimentando um ritmo de devastação sem precedentes na história nacional.

1.2 PROPOSIÇÃO

A proposta deste estudo foi de verificar, através de um estudo *in vitro*, a atividade antimicrobiana de extratos vegetais da savana brasileira sobre *Streptococcus mutans*.

1.3 MATERIAL E MÉTODO

1.3.1 Microrganismos

Foram utilizados *Streptococcus mutans* GS 5 e *Streptococcus mutans* ATCC 1910 e 5 isolados clínicos obtidos de pacientes com alto risco à cárie e identificados de acordo com suas características bioquímico-fisiológicas e morfológicas²⁴.

1.3.2 Preparo dos extratos vegetais

1.3.2.1 Preparo de Extratos Hidroalcoólicos dos Vegetais

Para o preparo dos extratos vegetais aproveitaram-se apenas as folhas e casca das plantas (Anexo C) que se mostravam integras, sem quaisquer sinais de decomposição ou de dano. As plantas foram coletadas nas regiões dos municípios de Camapuã (MS) e de Carolina (MA), em áreas não desmatadas e mantidas como reserva permanente nas propriedades rurais (Anexo B). O período de coleta corresponde ao período chuvoso (dezembro a fevereiro) dos anos de 2002 e 2003.

Vinte e cinco gramas de cada vegetal sofriam fragmentação, que consistiu na divisão das plantas em partículas grosseiras em fragmentos de dimensões homogêneas. Cada planta fragmentada foi transferida para frascos âmbar (250 mL) identificados por códigos. Adicionou-se então, 125 mL de etanol 80% e os frascos foram agitados por três minutos. Esta operação foi realizada cinco vezes, diariamente durante 12 dias. A seguir, procedeu-se à filtração das preparações e o produto resultante, foi transferido a frascos âmbar (100 mL). Foi obtido um mínimo de 25 mL de macerado para cada vegetal pesquisado. Posteriormente, os extratos vegetais foram esterilizados

por filtração em membranas de éster de celulose Millipore 0,22µm e imediatamente utilizados nos testes.

Foram preparados extratos vegetais de casca e folha de angico (*Anadenanthera falcata*), casca e folha de araçá (*Psidium cattleianum*), caule de arnica do campo (*Solidago microglossa*), casca e folha de aroeira do sertão (*Astronium urundeuva*), casca do caju (*Anacardium occidentale*), folha do caju-açu (*Anacardium giganteum*), caule da cancerosa (*Maytenus ilicifolius*), casca e folha da candeia (*Vanillosmopsis erythropappa*), casca do capitão do campo (*Terminalia argentea*), casca e folha do cedro (*Cedrela fissilis*), casca e folha da figueira (*Ficus enormis*), folha da folha de carne (*Roupala montana*), folha de guajuvira (*Patagonula americana*), casca e folha do ipê roxo (*Tabebuia impetiginosa*), casca do jacarandá (*Platypodium elegans*), folha de jacarandá caroba (*Jacaranda cuspidifolia*), folha de pau d'alho (*Gallepsia gorarema*) e folha e casca de pequi (*Caryocar brasiliense*).

1.3.2.2 Preparo de Extratos Aquosos dos Vegetais

Os extratos foram preparados de acordo com metodologia descrita por Turng et al.⁴⁵. Para tanto, 100 gramas de folhas ou cascas e caules, de cada planta eram adicionadas a 100 mL de solução salina fosfatada tamponada a 0,1 M (PBS) (Anexo J) e deixadas por 5 minutos a 100°C, por 1 hora a 55°C e por 72 horas em temperatura ambiente. Cada mistura foi agitada a cada 24 horas. A seguir os extratos aquosos eram purificados através de filtração em membranas de éster de celulose de porosidade 0,65 µm e esterilizadas por filtração em membranas de 0,22 µm (Millipore®).

1.3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais

Inicialmente, fez-se uma triagem empregando-se o método de difusão em ágar. Para tanto, empregou-se o infuso de cérebro e coração acrescido de 0,5% de extrato de levedura, inoculado previamente com 10^8 UFC da cepa bacteriana a ser testada. Os extratos vegetais (20µL) eram adicionados a discos esterilizados de papel de filtro, que eram posicionados de maneira eqüidistante e em número de 4 por placa. Como controles positivos empregou-se o álcool 70 iodado e hipoclorito de sódio a 1%. Todos os extratos aquosos e hidroalcoólicos foram testados em duplicata. A seguir, as placas foram incubadas em condições de microaerofilia, em dessecadores de vidro (Anexo D), por 48 horas. A presença de zonas de inibição do crescimento bacteriano (Anexo E) foi observada com auxílio de lupa esteroscópica (Anexo D). Todos os extratos que mostraram qualquer capacidade de inibição do crescimento bacteriano foram submetidos a testes para avaliar a cinética de sua atividade inibitória e qual a máxima diluição dos extratos que inibiu o crescimento microbiano.

1.3.4 Avaliação da cinética da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais sobre microrganismos em estado planctônico

Foram utilizadas as cepas *Streptococos mutans* GS-5 e ATCC 1910.

Esses testes foram realizados de acordo com a metodologia empregada por Barnard et al.³. As células bacterianas foram cultivadas em caldo peptona extrato de levedura com 1% de sacarose (Anexo J), em condições de microaerofilia, a 37°C, por 48 horas. Alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para tubos Eppendorf e lavadas três vezes em tampão fosfatado tamponado, pH 7,2, por centrifugação a 3000 x g por 3

minutos. A seguir, a solução salina fosfatada tamponada foi removida cuidadosamente e o inóculo resultante (10^6 UFC) foi adicionado a 1,5 mL do extrato vegetal testado. Essa mistura foi incubada a 37°C, em microaerofilia por 5, 10, 20, 30, 60 minutos, 2 horas, 1, 7 e 14 dias. Alíquotas de 0,1mL dessa mistura foram removidas nos diferentes períodos de tempo e submetidas a diluições seriadas em PBS e inoculadas em placas de ágar infuso de cérebro e coração suplementado com extrato de levedura e acrescido de 5% de sangue de cavalo desfibrinado. As placas foram incubadas a 37°C, em microaerofilia, por 48 horas. Após o que, procedeu-se à leitura dos resultados através de contagem do número de colônias. Como controle, o inóculo bacteriano permaneceu em contato com a solução salina fosfatada tamponada (PBS) nas condições descritas acima.

1.3.5 Avaliação da cinética da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais sobre microrganismos em biofilme

Foram utilizadas as cepas *Streptococcus mutans* GS-5 e ATCC 1910.

Os microrganismos foram cultivados em caldo infuso de cérebro coração suplementado, em microaerofilia a 37°C, por 18 a 24 horas. A seguir, o inóculo foi centrifugado a 3000xg por 3 minutos, sendo que o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado 3 vezes com PBS. Assim, 10^5 UFC foram transferidas para placas de microtitulação contendo 150 µL de caldo infuso de cérebro e coração suplementado com extrato de levedura e acrescido de 5% de sacarose e incubadas em microaerofilia, a 37°C, por 7 dias, com a substituição diária do meio de cultura.

A seguir alíquotas de 200 µL dos extratos testados (que apresentaram atividade inibitória no teste de difusão em ágar) foram adicionadas as microplacas e ali mantidas a 37°C, em microaerofilia, por até 24 horas. Após incubação por 5, 10, 20, 30, 60 minutos, 2 e 24 horas, alíquotas de 0,1mL dessa mistura foram removidas e submetidas a diluições seriadas de PBS e inoculadas em placas de ágar sangue (Anexo J). As placas foram incubadas a 37°C, em microaerofilia, por 48 horas. Após, procedeu-se à leitura dos resultados através de contagem do número de colônias em contador de colônias (Anexo D). Como controle, o biofilme bacteriano permaneceu em contato com a solução salina fosfatada tamponada (PBS) nas condições descritas acima.

1.3.6 Determinação da máxima diluição inibitória dos extratos vegetais

Foram avaliadas de acordo com a metodologia de diluição em caldo. Os testes foram realizados em duplicata. Os extratos vegetais foram adicionados a tubos contendo caldo infuso de cérebro e coração acrescido de extrato de levedura (0,5%) previamente inoculados com 10^5 UFC das cepas testadas de forma que representassem 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 e 1/64, 1/128 da concentração original do extrato. A seguir os tubos eram incubados em condições de microaerofilia em dessecadores de vidro do tipo Pyrex a 37°C, por 48 horas. Conceituou-se a máxima diluição inibitória do extrato vegetal como sendo a maior diluição do mesmo que foi capaz de inibir totalmente o crescimento microbiano. Como controle utilizou-se o próprio caldo infuso de cérebro e coração suplementado e inoculado com as cepas teste.

1.4 RESULTADO

Todos os extratos vegetais testados mostraram nítida associação entre a atividade antimicrobiana da preparação hidroalcoólica e aquosa, de forma que os resultados da Tabela 1 foram expressos sem evidenciar o tipo de extrato testado. Essa tabela evidencia os resultados da triagem inicial envolvendo os extratos testados, revelando que apenas os extratos da folha de araçá (*Psidium cattleianum*), folha da aroeira do sertão (*Astronium urundeuva*) e folha da guajuvira (*Patagonula americana*), além da casca de jacarandá (*Platypodium elegans*) tiveram atividade inibitória frente a todos os microrganismos testados. Os extratos de caule de cancerosa (*Maytenus ilicifolius*), casca de candeia (*Vanillosmopsis erythropappa*), folha de figueira (*Ficus enormis*) bem como a folha do jacarandá caroba (*Jacaranda cuspidifolia*), inibiram a maioria dos microrganismos testados.

Observou-se que os extratos que mostraram maior atividade frente às cepas de referência testadas também demonstraram uma maior e mais rápida atividade inibitória frente aos microrganismos em estado planctônico e formando biofilmes (Tabela 2 e 3, respectivamente). Esses evidenciam também, que os extratos vegetais com atividade antimicrobiana mais evidente se revelaram como aqueles capazes de atuar nas maiores diluições (Tabela 4).

Tabela 1 - Triagem inicial da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais

Extrato vegetal	Cepa						
	1	2	3	4	5	GS 5	1910
Casca de angico (<i>A. falcata</i>)	-	-	-	-	-	-	-
Folha de angico (<i>A. falcata</i>)	-	-	-	-	-	-	-
Casca de araçá (<i>P. cattleianum</i>)	-	-	-	-	-	-	-
Folha de araçá (<i>P. cattleianum</i>)	+	+	+	+	+	+	+
Caule de arnica do campo (<i>S. microglossa</i>)	-	-	-	-	-	-	-
Casca da aroeira do sertão (<i>A. urundeuva</i>)	-	-	-	-	-	-	-
Folha da aroeira do sertão (<i>A. urundeuva</i>)	+	+	+	+	+	+	+
Casca do caju (<i>A. occidentale</i>)	-	-	-	-	-	-	-
Folha do caju-açu (<i>A. giganteum</i>)	-	-	-	-	-	-	-
Caule da cancerosa (<i>M. ilicifolius</i>)	+	+	+	-	+	+	+
Casca da candeia (<i>V. erythropappa</i>)	+	+	-	+	+	+	+
Folha da candeia (<i>V. erythropappa</i>)	-	-	-	-	-	-	-
Casca do capitão do mato (<i>T. argentea</i>)	-	-	-	-	-	-	-
Casca de cedro (<i>C. fissilis</i>)	-	-	-	-	-	-	-
Folha de cedro (<i>C. fissilis</i>)	-	-	-	-	-	-	-
Casca da figueira (<i>F. enormis</i>)	-	-	-	-	-	-	-
Folha da figueira (<i>F. enormis</i>)	+	-	-	+	+	+	+
Folha da folha de carne (<i>R. montana</i>)	-	-	-	-	-	-	-
Folha de guajuvira (<i>P. americana</i>)	+	+	+	+	+	+	+
Casca do ipê roxo (<i>T. impetiginos</i>)	-	-	-	-	-	-	-
Folha do ipê roxo (<i>T. impetiginos</i>)	-	-	-	-	-	-	-
Casca de jacarandá (<i>P. elegans</i>)	+	+	+	+	+	+	+
Folha de jacarandá caroba (<i>J. cuspidifolia</i>)	+	-	-	+	+	+	+
Folha de pau d'alto (<i>G. gorarema</i>)	-	-	-	-	-	-	-
Folha de pequi (<i>C. brasiliense</i>)	-	-	-	-	-	-	-
Casca de pequi (<i>C. brasiliense</i>)	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 2 - Atividade inibitória de extratos vegetais sobre microbianos em estado planctônico

Extrato	Tempo necessário para eliminar 90% dos microrganismos (em minutos)
Folha de araçá (<i>P. cattleianum</i>)	10
Folha de aroeira do sertão (<i>A. urundeuva</i>)	20
Caule de cancerosa (<i>M. ilicifolius</i>)	120
Casca de candeia (<i>V. erythropappa</i>)	120
Folha de figueira (<i>F. enormis</i>)	1440
Folha de guajuvira (<i>P. americana</i>)	10
Casca de jacarandá (<i>P. elegans</i>)	5
Folha de jacarandá caroba (<i>J. cuspidifolia</i>)	1440

Tabela 3 - Atividade inibitória de extratos vegetais sobre biofilmes microbianos

Extrato	Tempo necessário para eliminar 90% dos microrganismos (em minutos)
Folha de araçá (<i>P. cattleianum</i>)	60
Folha de aroeira do sertão (<i>A. urundeuva</i>)	120
Caule de cancerosa (<i>M. ilicifolius</i>)	1440
Casca de candeia (<i>V. erythropappa</i>)	1440
Folha de figueira (<i>F. enormis</i>)	___ ^a
Folha de guajuvira (<i>P. americana</i>)	120
Casca de jacarandá (<i>P. elegans</i>)	120
Folha de jacarandá caroba (<i>J. cuspidifolia</i>)	___ ^a

^a Extrato que não conseguiu inibir o biofilme significativamente

Tabela 4 - Atividade inibitória de extratos vegetais sobre microrganismos planctônicos

Extrato	Máxima diluição do extrato vegetal que manteve atividade inibitória sobre microrganismos planctônicos
Folha de araçá (<i>P. cattleianum</i>)	1/64
Folha de aroeira do sertão (<i>A. urundeuva</i>)	1/64
Caule de cancerosa (<i>M. ilicifolius</i>)	1/4
Casca de candeia (<i>V. erythropappa</i>)	1/4
Folha de figueira (<i>F. enormis</i>)	1/4
Folha de guajuvira (<i>P. americana</i>)	1/32
Casca de jacarandá (<i>P. elegans</i>)	1/32
Folha de jacarandá caroba (<i>J. cuspidifolia</i>)	1/4

1.5 DISCUSSÃO

A microbiota bucal desempenha importante papel na resistência inespecífica da cavidade bucal, competindo com microrganismos oriundos do meio externo, por nutrientes e espaço, o que viria prevenir a instalação de diferentes patologias de natureza infecciosa na cavidade bucal^{44,48}. Entretanto, as doenças infecciosas bucais são, em sua grande maioria, fruto da perda do equilíbrio entre essa microbiota autóctone e o hospedeiro, sendo, pois, endógenas^{44,48}. Desta forma, o controle do biofilme microbiano bucal se mostra indispensável para a manutenção do equilíbrio entre o mesmo e os tecidos do hospedeiro, que com ele continuamente interagem através de componentes microbianos, metabólitos, mecanismos do sistema imunológico, presentes ou não na saliva^{44,48}.

A importância da participação de algumas espécies de estreptococos na etiopatogênese do processo carioso torna esses microrganismos os principais alvos de uma abordagem ecológica de controle da cárie dental, objetivando reduzir a participação dos mesmos na população do biofilme e a expressão de seus fatores de virulência, associados à sua acidogenicidade, aciduridade e capacidade de adesão às estruturas mineralizadas^{44,48}.

A grande maioria dos colutórios e antimicrobianos disponíveis no mercado possui desvantagens sérias quando utilizados por longos períodos de tempo, como manchamento dos dentes, perda de paladar, ardor e sensação de queimação. Desta forma, a avaliação da atividade antimicrobiana e antiaderente de extratos naturais merece ser melhor estudada, já que muitos desses compostos são largamente

utilizados na medicina popular ou mesmo na dieta. Além desse aspecto é notável o interesse de grupos de pesquisa ao redor do mundo buscando novas e seguras alternativas para o controle químico do biofilme microbiano e seus impactos na ecologia microbiana bucal.

No presente estudo optou-se por estudar extratos de plantas do cerrado em função da importância desse bioma no panorama da exploração comercial do solo no Brasil, bem como pela sua enorme variedade botânica, que agrega espécies oriundas até da floresta ombrófila densa litorânea ou do planalto atlântico (mata atlântica) e da floresta ombrófila densa equatorial (floresta amazônica) e vem sofrendo uma devastação sem paralelos nas últimas duas décadas ⁴⁶, sendo que menos de 1% do potencial farmacológico dessas plantas foi avaliado.

As áreas escolhidas para coleta dos espécimes de vegetais são representativas dos principais tipos de vegetação genericamente denominados de “cerrado”, sendo que optou-se pela inclusão de áreas não submetidas a agressões humanas e que pudessem representar a vegetação que cobria originalmente grande parte do Brasil central. Coletaram-se amostras na região de Pedra Caída e Grajaú (Estado do Maranhão), bem como no município de Camapuã (Estado do Mato Grosso do Sul) durante o período chuvoso, nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro. As plantas estudadas representam alguns dos principais gêneros de plantas do cerrado e são utilizadas na medicina popular, como evidenciado por Vieira e Martins ⁴⁶.

Dos 26 extratos vegetais testados, oriundos de 18 espécies de plantas típicas do cerrado, 8 evidenciaram atividade inibitória sobre todos ou, pelo menos, a maioria das amostras microbianas testadas, o que representa um percentual muito elevado e, até

certo ponto, inesperado. As preparações hidroalcoólicas e aquosas mostraram a mesma atividade antimicrobiana em todas as modalidades de testes realizados, o que indica que o(s) princípio(s) ativo(s) pode(m) ser extraídos por métodos simples, empregando-se água como líquido extrator sem prejuízo para a atividade antimicrobiana. Esses resultados contrastam com os de Alade e Irobi ¹, que evidenciaram afinidade antimicrobiana mais significativa de extratos hidroalcoólicos de *Acalypha wilkesiana*, em detrimento do extrato aquoso. A Tabela 1 evidencia que apenas os extratos da folha de araçá (*Psidium cattleianum*), aroeira do sertão (*Astronium urundeuva*) e guajuvira (*Patagonula americana*), além da casca de jacarandá (*Platypodium elegans*) tiveram atividade inibitória frente a todos os microrganismos testados. Os extratos da casca de candeia (*Vanillosmopsis erythropappa*), da folha de figueira (*Ficus enormis*), jacarandá caroba (*Jacaranda cuspidifolia*), bem como do caule de cancerosa (*Maytenus ilicifolius*) inibiram a maioria dos microrganismos testados.

Até onde se pôde verificar, essas plantas não são utilizadas para controle de biofilme microbiano e mesmo para tratamento das infecções superficiais, embora possam ser encontradas referências ao seu uso como parte da medicina popular em outras áreas, como antiinflamatórios, anti-reumáticos, antidiarréicos e outros usos populares.

Em extensa revisão de literatura sobre o emprego popular dessas plantas, Vieira e Martins ⁴⁶ revelaram que o caju nativo vem sendo empregado como analgésico para odontalgias e como antiinflamatório, a aroeira teria propriedades cicatrizantes e analgésicas, o pequi é considerado adequado para o tratamento de resfriados, tosse e

queimaduras, enquanto a candeia teria atividade anti-esquistossomática e os ipês teriam indicação no tratamento de rouquidão e seriam diuréticos. O jacarandá caroba teria atividade anti-sifilítica e anti-reumática, enquanto o capitão do campo seria útil no tratamento e controle da estomatite aftosa e o angico poderia colaborar no tratamento da bronquite. Entretanto nenhum estudo procurou verificar se, de fato, a essas indicações populares correspondia a uma realidade passível de comprovação científica, tampouco que princípio ativo poderia exercer os alegados efeitos terapêuticos.

Observou-se que os extratos que mostraram maior atividade frente às cepas de referência testadas também demonstraram uma maior e mais rápida atividade inibitória frente aos microrganismos em estado planctônico (Tabela 2) e formando biofilmes (Tabela 3). Sabe-se que a sensibilidade a antimicrobianos em microrganismos proliferando no interior de biofilmes é significativamente menor do que a observada em células em estado planctônico, sendo que diferentes fatores podem contribuir para o fenômeno.

Inicialmente, tem-se que a limitação de nutrientes observada no interior dos biofilmes condiciona uma redução da atividade metabólica desses microrganismos³², o que também reduziria a efetividade de drogas capazes de interferir com a atividade metabólica bacteriana^{6,20}. A presença de numerosas espécies bacterianas diferentes no interior do biofilme, *in vivo*, também colaboraria para reduzir ainda mais a atividade dessas drogas, visto que um microrganismo resistente poderia, pela exportação de enzimas ou outros compostos capazes de inativar os antimicrobianos, tornar os microrganismos vizinhos mais resistentes, sendo que as bases genéticas do fenômeno também podem ser transferidas de uma célula bacteriana para outra através de

conjugação, transformação e transdução, como ocorre com os genes de resistência aos antibióticos e quimioterápicos com atividade antimicrobiana ²⁰. No biofilme criado no presente estudo, esse último mecanismo pode ser considerado desprezível, visto que o mesmo possui composição microbiana definida e nenhum dos cocos utilizados possui capacidade de resistir aos produtos testados quando em estado planctônico, como evidenciado nas Tabelas 1 e 2.

Além desses aspectos, merece destaque a menor penetração do princípio ativo no interior do biofilme, devido à existência de uma densa matriz extracelular de polissacarídeos e proteínas envolvendo os microrganismos em proliferação ⁴¹. Como os estreptococos do grupo *mutans* estão entre os maiores produtores desses polissacarídeos extracelulares é de se conjecturar a importância desse fenômeno na maior resistência do estado de biofilme sobre a condição planctônica, como também observado comparando-se a Tabela 2 com a Tabela 3. Entretanto, para maiores discussões sobre esse aspecto, necessita-se de um maior conhecimento sobre que compostos poderiam ter atividade inibitória sobre microrganismos bucais e que estariam presentes nesses extratos. Os resultados evidenciam que os extratos vegetais com atividade antimicrobiana mais evidente nessas tabelas também se revelaram como aqueles capazes de atuar nas maiores diluições (Tabela 4).

A literatura relata efeito inibitório do chá ou de outros extratos aquosos frente a *Streptococcus mutans* ou o efeito sobre a experiência de cárie da população ^{13, 14, 37, 39, 43, 49, 50}. Segundo Paolino et al.³⁹, o ácido tânico presente em plantas inibe enzimas bacterianas como a aminocidase, β -galactosidase, glicose isomerase e dextrano-sucrase em *Streptococcus mutans*.

De acordo com Wu-Yuan et al.⁴⁹, compostos fenólicos poderiam levar à precipitação de proteínas e inibir o crescimento bacteriano em concentrações similares às encontradas em bebidas ²³. Extratos vegetais também parecem capazes de inibir microrganismos não relacionados com os estreptococos, como periodontopatógenos Gram negativos ⁴, e leveduras do gênero *Candida* (Gaetti-Jardim Jr, 2004, estudo em andamento, comunicação pessoal). Infelizmente, o princípio ativo ainda precisava ser caracterizado.

Ikigai et al. ²⁵ evidenciaram que a epigallocatequina, um dos compostos fenólicos presentes no chá, podia levar à perfuração da membrana, o que explica a maior sensibilidade das bactérias Gram-negativas, como *Fusobacterium nucleatum*. Esses compostos fenólicos (polifenóis, flavonóis, epicatequina, epigallocatequina) ainda são capazes de inibir bactérias Gram-positivas ¹², a enzima transcriptase reversa do vírus HIV ³⁵, hemolisinas de *Streptococcus aureus* e de *Vibrio parahaemolyticus* ³⁶.

O estudo dos efeitos desses princípios ativos sobre o metabolismo microbiano é dificultado até pela falta de um conhecimento mais profundo sobre a estrutura química e atividade biológica dos mesmos ⁹. Esse fato se mostra verdadeiro até para plantas como a *Camellia sinensis* e *Coffea arabica*, já bem estudados, e que fazem parte da dieta humana³⁰.

Contudo, desde que os colutórios, geralmente permanecem por pequenos períodos de tempo na cavidade bucal em concentrações inibitórias é de relevância avaliar a cinética da atividade antimicrobiana desses extratos, visto que resíduos desses compostos podem permanecer tempo suficiente na cavidade bucal para

interferir com o processo de formação do biofilme, ou interferir com a expressão da virulência microbiana em concentrações sub-inibitórias.

Os resultados desse estudo sugerem que extratos aquosos de plantas presentes no segundo maior bioma em extensão do Brasil podem exercer uma ação inibitória sobre cocos cariogênicos *in vitro*, evidenciando a necessidade de estudos em modelos animais para se avaliar a eficácia dos mesmos *in vivo* e a segurança de seu emprego clínico, associado a um maior conhecimento dos princípios ativos, poderia colaborar para um futuro emprego em ensaios clínicos.

1.6 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu concluir que:

- a ocorrência de plantas com atividade antimicrobiana mostrou-se muito elevada;
- os mesmos extratos que mostraram maior atividade inibitória sobre microrganismos em estado planctônico também revelaram atividade semelhante frente aos cultivados em biofilmes, com exceção do extrato da folha da figueira e do jacarandá caroba;
- a maioria dos extratos com atividade antimicrobiana conservou essa atividade mesmo quando o extrato foi significativamente diluído.

2

Avaliação da influência de diluições sub-inibitórias de extratos vegetais da savana brasileira sobre a adesão de Streptococcus mutans à superfície do vidro e capacidade de desmineralização

Avaliação da influência de diluições sub-inibitórias de extratos vegetais da savana brasileira sobre a adesão de *Streptococcus mutans* à superfície do vidro e capacidade de desmineralização

2.1 INTRODUÇÃO

Apesar da prevalência da cárie dentária em crianças ter declinado na maioria dos países ocidentais nos últimos 20 anos, essa doença continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública no mundo ¹⁵. A grande maioria dos processos patológicos que acometem a cavidade bucal é de natureza infecciosa ², merecendo destaque as periodontopatias e a cárie dental em função de suas elevadas prevalências e dos danos que causam ao aparelho estomatognático ¹¹. O processo carioso tem sido intensamente estudado e descrito ^{8,15,33}, sendo caracterizado como uma destruição localizada do tecido dentário por ácidos, particularmente o ácido lático, produzido através da fermentação de carboidratos por microrganismos presentes no biofilme bacteriano ^{8,33}.

Os dois mais importantes grupos de bactérias cariogênicas são os estreptococos do grupo *mutans* e os lactobacilos ¹⁵. Estreptococos do grupo *mutans* são os principais responsáveis pela cárie de superfície lisa, uma vez que possuem a capacidade de aderir, colonizar, sintetizar polissacarídeos extracelulares e produzir ácidos na superfície dos dentes ^{7,17,49}.

A adesão de células bacterianas à superfície dos dentes é de fundamental importância para o início da lesão cariosa. Segundo Gibbons e Nygaard ¹⁹, a aderência

desse microrganismo na superfície do dente e subsequente formação do biofilme microbiano bucal ocorre em dois estágios. O primeiro é a aderência reversível da célula bacteriana à película adquirida presente na superfície do esmalte e o segundo estágio é a acumulação de *Streptococcus mutans* através da sua proliferação e produção de glucanos extracelulares. A interferência em alguns desses mecanismos pode prevenir a formação da cárie dentária ⁷.

Essas bactérias acidogênicas estão presentes no biofilme de indivíduos cárie-ativos ou inativos e indivíduos livres de cárie. A capacidade de produzir ácido varia de acordo com as diferentes espécies de bactérias, que em condições ótimas, produzem mais ácido do que outras. Os estreptococos do grupo *mutans* são notadamente acidúricos e acidogênicos, podendo proliferar em um ambiente de pH = 5,2, sendo esse aspecto de grande valor na desmineralização dental.

Os níveis salivares desses cocos cariogênicos parecem refletir, com maior ou menor propriedade, o risco à cárie do indivíduo, o que facilita o acompanhamento da estratégia preventiva instituída, bem como a resposta da microbiota às mesmas ²⁶, particularmente em populações que recebem atenção precoce ³¹.

Na população em geral, existe um costume em considerar a utilização de ervas medicinais e outros produtos naturais como recursos farmacológicos eficientes no tratamento de patologias bucais, existindo também a idéia que estes compostos não causam efeitos colaterais. Em países como o Brasil, que concentra uma parcela significativa da biodiversidade vegetal do planeta, esses aspectos apresentam grande importância.

Merece destaque o fato que apenas minúscula parcela das denominadas “plantas medicinais” tenha sido avaliada em experimentos *in vitro* ou *in vivo* capazes de comprovar ou não sua eficácia, sendo que o ritmo de ocupação antrópico dos diferentes biomas vegetais é infinitamente maior do que a capacidade de avaliação das propriedades biológicas das plantas que se extinguem ²¹, particularmente quando falamos de ecossistemas complexos e ricos como o cerrado brasileiro ³⁴, que representa a mais produtiva das fronteiras agrícolas e vem experimentando um ritmo de devastação sem precedentes na história nacional.

2.2 PROPOSIÇÃO

A proposta deste estudo foi de verificar, através de um estudo *in vitro*, a influência de diluições sub-inibitórias que esses extratos vegetais possuem sobre a adesão de *Streptococcus mutans* à superfície do vidro e sua capacidade de desmineralização.

2.3 MATERIAL E MÉTODO

2.3.1 Preparo dos extratos vegetais

Foram preparados extratos vegetais de folha de araçá (*Psidium cattleianum*), folha de aroeira do sertão (*Astronium urundeuva*), caule de cancerosa (*Maytenus ilicifolius*), casca de candeia (*Vanillosmopsis erythropappa*), folha de figueira (*Ficus enormis*), folha de guajuvira (*Patagonula americana*), casca de jacarandá (*Platypodium elegans*) e folha de jacarandá caroba (*Jacaranda cuspidifolia*).

Os extratos foram preparados de acordo com metodologia descrita por Turng et al.⁴⁵. Para tanto, 100 gramas de folhas ou cascas e caules, de cada planta eram adicionadas a 100 mL de solução salina fosfatada tamponada a 0,1 M (PBS) e deixadas por 5 minutos, a 100°C, por 1 hora a 55°C e por 72 horas a temperatura ambiente. Cada mistura foi agitada a cada 24 horas. A seguir os extratos aquosos eram purificados através de filtração fracionada em membranas de éster de celulose de porosidade 0,65 µm e esterilizadas por filtração em membranas de 0,22 µm (Millipore®).

2.3.2 Microrganismos

Foram utilizados *Streptococcus mutans* GS 5 e *Streptococcus mutans* ATCC 1910, mantidos em nitrogênio líquido e, posteriormente, cultivados em caldo infuso de cérebro e coração (Difco) acrescido de 0,5 % de extrato de levedura, em condições de microaerofilia em dessecadores de vidro, a 37°C, por 48 horas.

2.3.3 Determinação da máxima diluição inibitória dos extratos vegetais

Foram avaliadas de acordo com a metodologia de diluição em caldo. Os extratos vegetais foram adicionados a tubos contendo caldo infuso de cérebro e coração acrescido de extrato de levedura previamente inoculados com 10^5 UFC das cepas testadas de forma que representassem 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 e 1/64, 1/128 da concentração original. A seguir os tubos eram incubados em condições de microaerofilia em dessecadores de vidro do tipo Pyrex a 37°C, por 48 horas. Conceituou-se a máxima diluição inibitória do extrato vegetal como sendo a maior diluição do extrato testado capaz de inibir totalmente o crescimento microbiano. Como controle utilizou-se o próprio caldo infuso de cérebro e coração suplementado e inoculado com as cepas teste.

Os testes de aderência ao vidro e de desmineralização foram realizados acrescentando-se o extrato vegetal na diluição equivalente a duas vezes a diluição máxima inibitória, representando 50% da concentração que inibiu o crescimento bacteriano.

2.3.4 Teste de aderência ao vidro

Para a verificação da aderência bacteriana ao vidro foi empregada a metodologia descrita por Otake et al.³⁸ com modificações. As células bacterianas foram cultivadas em caldo infuso de cérebro e coração suplementado com extrato de levedura (0,5%) e sacarose (1%) por 36 horas, em microaerofilia a 37° C. A seguir as células bacterianas

eram lavadas em tampão fosfato 0,01M (pH 7,0) por centrifugação (5000xg) e ressuspendidas no mesmo tampão até a obtenção de 10^6 UFC/mL, determinada em escala de MacFarland. A seguir, 10^5 UFC foram transferidas para cada tubo contendo caldo infuso de cérebro e coração suplementado com extrato de levedura (0,5%) e sacarose (10%). A seguir, bengalas de vidro (Anexo H) de tamanho padronizado foram inseridas no caldo e incubadas a 37°C por 72 horas. Aos tubos também foram adicionados extratos das plantas testadas de forma que a mistura final representasse o dobro da diluição máxima inibitória. Os tubos controle de cada cepa não recebiam o extrato vegetal.

A seguir, as células bacterianas foram incubadas em dessecadores de vidro em condições de microaerofilia, por 5 dias, a 37°C. Bactérias que se adsorveram das bengalas foram dispersas no tampão fosfato utilizando o agitador de tubos (Vortex), submetidas a diluições seriadas e transferidas para placas contendo ágar infuso de cérebro e coração acrescido de 10% de sacarose e 5% de sangue desfibrinado de cavalo. A determinação do número de unidades formadoras de colônia que aderiram ao vidro foi realizada em contador de colônia.

2.3.5 Preparação dos corpos de prova para os testes de capacidade de desmineralização

Blocos de esmalte (4x4 mm) foram obtidos de dentes incisivos bovinos (Anexo F). Inicialmente, as coroas foram separadas das raízes e foram fixadas em placas de acrílico para a secção da porção palatina. A porção vestibular das coroas foi fixada nas

placas de acrílico para obtenção de blocos de esmalte. Foram realizadas 2 secções, na porção mais plana, sendo uma no sentido longitudinal e outra no sentido transversal da coroa, obtendo blocos medindo 4 x 4 mm. Todos os procedimentos foram feitos sob refrigeração com água deionizada para evitar trincas no esmalte.

Após a obtenção dos blocos de esmalte, realizou-se o ajuste da dentina, na politriz, para obtenção de superfícies paralelas entre esmalte e dentina. O desgaste foi realizado sob baixa rotação e refrigeração. Em seguida, foi realizado o polimento da superfície de esmalte dos blocos com uma seqüência de lixas e refrigeração a água. Entre cada polimento, os corpos de provas foram submetidos ao ultra-som Branson 2210, em água deionizada durante 2 minutos. Na seqüência o esmalte foi polido com papel feltro para polimento e suspensão de diamante. A seguir, os corpos de provas foram lavados com jato de água deionizada e submetidos ao ultra-som, imersos em solução detergente diluída em água destilada. Finalmente, os corpos de provas foram lavados em jatos de água deionizada, e após, conservados em ambiente úmido prontos para análise da microdureza superficial inicial do esmalte ^{16,51}.

2.3.6 Análise da microdureza superficial inicial do esmalte e seleção dos blocos dentais

Os testes de microdureza nos blocos de esmalte foram baseados no trabalho descrito por Zero ⁵¹. No centro de cada bloco, foram realizadas 5 indentações (Anexo G) no esmalte (Microdureza Superficial Inicial – MDSI), utilizando-se carga de 25 gramas e o tempo de 10 segundos, separadas entre si por uma distância de 100 µm.

Foram selecionados os blocos que apresentaram média de comprimento de indentação dentro do intervalo de confiança $\pm 3 \mu\text{m}$ e não apresentaram trincas ou defeitos no esmalte.

2.3.7 Teste de desmineralização *in vitro*

As células bacterianas foram cultivadas em caldo infuso de cérebro e coração suplementado com extrato de levedura (0,5%) e sacarose (1%) por 36 horas, em microaerofilia a 37° C. A seguir as células bacterianas eram lavadas em tampão fosfato 0,01M (pH 7,0) por centrifugação (5000xg) e ressuspensas no mesmo tampão até a obtenção de 10^6 UFC/mL, determinada em escala de MacFarland. Estes corpos de prova foram adicionados em caldo infuso de cérebro e coração suplementado com extrato de levedura (0,5%) e sacarose (10%) e esterilizados em autoclave adicionando-se, a seguir, o inóculo de 10^5 UFC. Aos tubos também foram adicionados extratos das plantas testadas de forma que a mistura final representasse o dobro da diluição máxima inibitória. Foi realizada a incubação a 37°C por 7 dias em microaerofilia. Os tubos controle de cada cepa não recebiam o extrato vegetal. Após a incubação, os fragmentos dentais foram removidos, esterilizados em autoclave e a avaliação da microdureza final ⁵¹ foi realizada.

2.3.8 Análise da microdureza final após o período de desmineralização *in vitro*

A microdureza de superfície foi determinada (Microdureza Superficial Final - MDSF) utilizando-se o microdurômetro Shimadzu HMV-2000 (Knoop) (Anexo G), sob

carga de 25 g por 10 s. Realizaram-se cinco indentações eqüidistantes entre si e, em relação a SMH inicial, 100 µm, sendo a porcentagem de variação de microdureza de superfície (%SMHC) calculada [$\%SMHC = ((SMH \text{ final} - SMH \text{ inicial}) / SMH \text{ inicial}) \times 100$].

2.3.9 Análise estatística

Os resultados dos testes de desmineralização foram analisados estatisticamente pelo Teste de Wilcoxon e os resultados da capacidade de adesão à superfície do vidro pelo Teste do Qui-quadrado, com significância de $p < 0,05$.

2.4 RESULTADO

Os resultados do presente estudo são apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3. Pela Tabela 1 evidencia-se que todos os extratos testados, com exceção do extrato de casca de candeia, foram capazes de reduzir significativamente a adesão de *S. mutans* ATCC 1910 ao vidro. Quanto aos resultados referentes à cepa *S. mutans* GS 5, apenas os extratos de caule de cancerosa e folha de figueira não inibiram significativamente a adesão microbiana ao vidro (Tabela 2).

Os resultados da Tabela 3 evidenciaram que os extratos vegetais testados não tiveram atividade significativa sobre a capacidade de desmineralização de fragmentos de esmalte pelos microrganismos testados (Anexo I).

Tabela 1 - Influência de extratos vegetais em concentrações sub-inibitórias sobre a capacidade de adesão ao vidro de *S. mutans* ATCC 1910

Extrato	Controle	Teste	p
Folha do araçá (<i>P. cattleianum</i>)	148.10 ⁵	72.10 ⁵	0,0000001
Folha de aroeira do sertão (<i>A. urundeuva</i>)	148.10 ⁵	67.10 ⁵	0,0000001
Caule de cancerosa (<i>M. ilicifolius</i>)	148.10 ⁵	109.10 ⁵	0,0150
Casca de candeia (<i>V. erythropappa</i>)	148.10 ⁵	181.10 ⁵	0,06890*
Folha de figueira (<i>F. enormis</i>)	148.10 ⁵	103.10 ⁵	0,0045
Folha de guajuvira (<i>P. americana</i>)	148.10 ⁵	38.10 ⁵	0,0000001
Casca de jacarandá (<i>P. elegans</i>)	148.10 ⁵	53.10 ⁵	0,0000001
Folha de jacarandá caroba (<i>J. cuspidifolia</i>)	148.10 ⁵	91.10 ⁵	0,0002

*Sem significância estatística

Tabela 2 - Influência de extratos vegetais em concentrações sub-inibitórias sobre a capacidade de adesão ao vidro de *S. mutans* GS 5

Extrato	Controle	Teste	p
Folha do araçá (<i>P. cattleianum</i>)	211.10 ⁵	162.10 ⁵	0,01120
Folha de aroeira do sertão (<i>A. urundeuva</i>)	211.10 ⁵	126.10 ⁵	0,0000001
Caule de cancerosa (<i>M. ilicifolius</i>)	211.10 ⁵	173.10 ⁵	0,0525*
Casca de candeia (<i>V. erythropappa</i>)	211.10 ⁵	128.10 ⁵	0,0000001
Folha de figueira (<i>F. enormis</i>)	211.10 ⁵	186.10 ⁵	0,20960*
Folha de guajuvira (<i>P. americana</i>)	211.10 ⁵	70.10 ⁵	0,0000001
Casca de jacarandá (<i>P. elegans</i>)	211.10 ⁵	145.10 ⁵	0,0005
Folha de jacarandá caroba (<i>J. cuspidifolia</i>)	211.10 ⁵	139.10 ⁵	0,0001

*Sem significância estatística

Tabela 3 - Influência de concentrações sub-inibitórias de extratos vegetais sobre a capacidade microbiana de modificar a microdureza superficial de blocos esmalte

Extrato Vegetal	Microdureza média final em relação a microdureza inicial (%)	
	Cepas bacterianas testadas	
	GS 5	ATCC 1910
Folha de araçá (<i>P. cattleianum</i>)	95,14	94,67
Folha de aroeira do sertão (<i>A. urundeuva</i>)	99,82	87,86
Caule de cancerosa (<i>M. ilicifolius</i>)	96,14	89,45
Casca de candeia (<i>V. erythropappa</i>)	97,57	95,03
Folha de guajuvira (<i>P. americana</i>)	98,54	96,17
Casca de jacarandá (<i>P. elegans</i>)	89,13	98,82
Folha de jacarandá caroba (<i>J. cuspidifolia</i>)	95,77	102,62

2.5 DISCUSSÃO

A capacidade de adesão à superfície dental é condição predisponente para que um microrganismo exerça o papel de colonizador inicial do biofilme microbiano bucal ¹⁸. Esse fenômeno de adesão é mediado por diferentes tipos de interações entre o microrganismo e seu hospedeiro, iniciando-se por eventos mais reversíveis e culminando com o estabelecimento de ligações específicas entre componentes microbianos e do hospedeiro.

O microrganismo que não é capaz de aderir a essas superfícies é rapidamente removido pela saliva e pelos movimentos das estruturas anatômicas, e conseqüentemente não colonizará o hospedeiro e ficará impossibilitado de expressar seus fatores de virulência e causar danos ⁴⁷. Nesse sentido, um dos principais fatores de virulência dos estreptococos do grupo *mutans* reside em sua notável capacidade de adesão às superfícies lisas, conferindo-lhe papel fundamental no desenvolvimento da cárie de esmalte ^{7, 10, 17, 49}. A adesão desse microrganismo na superfície dental e subseqüente formação do biofilme microbiano ocorre em dois estágios, sendo que o primeiro estágio é a aderência reversível da célula bacteriana à película adquirida presente na superfície do esmalte e o segundo estágio é a acumulação de *S. mutans* através do seu crescimento e produção de glucanos extracelulares ¹⁹.

A produção de polissacarídeos extracelulares parece colaborar para o próprio processo de adesão, bem como na estabilização do processo e desenvolvimento do biofilme microbiano bucal ⁵. Como demonstrado por Burne et al. ⁵, a presença de

sacarose pode potencializar sobremaneira a cinética de formação do biofilme por esses cocos acidogênicos.

A maioria dos estudos sobre adesão microbiana e expressão de fatores de virulência foram realizados com microrganismos planctônicos e a formação do biofilme, como ocorre na própria cavidade bucal afetando desta maneira, a expressão e regulação dos genes *gtfB*, *gtfC* e *gtfD*, responsáveis pela síntese dos polissacarídeos extracelulares dos *S. mutans* ²⁹.

Para que um composto com atividade antimicrobiana exerça sua atividade sobre microrganismos em biofilmes é necessário que o mesmo seja empregado em concentrações elevadas, o que poderia produzir reações adversas nos pacientes, e que o composto permaneça por um período prolongado no interior da cavidade bucal, visto que a penetração de produtos antimicrobianos no interior de biofilmes é dificultada pela própria composição do mesmo e pela menor sensibilidade que esses microrganismos do biofilmes possuem em relação aos seus congêneres planctônicos ²⁰.

Substâncias naturais capazes de reduzir a formação do biofilme e com atividade anticárie parecem agir principalmente na síntese dos polissacarídeos extracelulares ^{9,38,40}. Nesse particular, o ácido tânico, encontrado em vários tipos de plantas, mostrou-se um importante inibidor de crescimento bacteriano e da ação da enzima glicosiltransferase ^{28, 38}, além de formar um complexo estável com proteínas ricas em prolina presentes na saliva ²², as quais estão diretamente envolvidas com a adsorção de bactérias bucais à película adquirida, iniciando a adesão dos colonizadores iniciais do biofilme microbiano bucal, como *S. mutans*.

A produção de polissacarídeos extracelulares por *S. mutans* também pode ser influenciada pela concentração de flúor nos extratos testados, como também observado por Elvin-Lewis e Steelman ¹⁴ em algumas variedades de chá. Outros estudos envolvendo extratos de cacau, chá e café inibiram a enzima glicosiltransferase de estreptococos orais, sendo que os extratos de cacau e café não perderam essa habilidade mesmo após a retirada do ácido tânico presente em seus extratos ^{27, 28}. Deve-se, nesse particular o estudo de Stralfors ⁴², que observou que a teobromina, cafeína e xantina na concentração de 0,2% promoveram inibição de cárie em 37% dos animais testados.

Os dados das Tabelas 1 e 2 evidenciam que os padrões de adesão das duas cepas microbianas de referência testadas são semelhantes e sofreram influências similares dos extratos vegetais testados em diluições sub-inibitórias, que provavelmente permaneceriam por um tempo maior na cavidade bucal. Verificou-se que a adição dos extratos vegetais a suspensão de caseína e de gelatina levaram à precipitação do conteúdo protéico (resultados não apresentados), sugerindo que a inibição do processo de adesão, como evidenciado nas Tabelas 1 e 2, esteja relacionado não apenas com uma alteração na produção de polissacarídeos extracelulares, mas também, na estrutura das adesinas dessas bactérias. A modificação dessas adesinas poderia afetar a adesão microbiana por dificultar o reconhecimento entre essas proteínas bacterianas e aqueles receptores presentes na película adquirida, uma vez que esse processo apresenta notável especificidade.

Além da modificação das adesinas bacterianas de superfície e da possível inibição da síntese dos polissacarídeos extracelulares, extratos vegetais também

poderiam competir com as adesinas bacterianas pela adesão aos receptores do hospedeiro, como observado por Daglia et al.¹⁰. Nesse estudo, os autores responsabilizaram o ácido nicotínico, o ácido clorogênico, a cafeína e a trigonelina como responsáveis pelo fenômeno. Entretanto, no presente estudo, esses compostos não poderiam responder pelos resultados visto que a superfície do vidro não possui os mesmos tipos de receptores que podem ser encontrados na película adquirida, a menos que se tivesse criado condições para a deposição de proteínas típicas da saliva e do sangue. Assim, acredita-se que os resultados observados nas Tabelas 1 e 2 venham se dar pela interferência na síntese de polissacarídeos extracelulares por esses extratos, reduzindo a capacidade de acumulação desses cocos na superfície dental.

Uma vez que a agregação e a adesão bacteriana a células do hospedeiro dependem da interação de adesinas (proteínas) presentes na superfície da bactéria e receptores do hospedeiro, os fenóis contidos nos extratos de plantas poderiam também desnaturar as proteínas³⁷ da superfície bacteriana, inibindo a ligação adesina / receptor. Entretanto esse fenômeno somente poderia ser confirmado para os extratos utilizados no presente estudo através de ensaios que permitissem a formação de uma estrutura semelhante à película adquirida, como já mencionado.

Dentre os compostos presentes em vegetais capazes de levar à precipitação das proteínas bacterianas deve-se destacar o ácido tânico, como demonstrado por Wu-Yuan e Wu⁵⁰, entretanto ainda não se conhece a composição química, tampouco a proporção ocupada pelo ácido tânico e compostos fenólicos nos extratos vegetais testados e, até onde se pôde avaliar, o presente estudo se mostrou único quanto às

plantas estudadas, o que limita a possibilidade de uma análise comparativa com a literatura.

Paolino et al.³⁹ evidenciaram que o ácido tânico presente em chás e outros alimentos, inibe enzimas como β -galactosidase, glicose isomerase e dextrano-sucrase em *Streptococcus mutans*, sendo que essas enzimas possuem um papel essencial no metabolismo de carboidratos desse coco cariogênico. No entanto, os resultados da Tabela 3 não evidenciaram quaisquer efeitos dos extratos vegetais testados sobre a capacidade de desmineralização do esmalte pelas cepas bacterianas estudadas, o que poderia ter se dado pelo pouco tempo de contato do microrganismo com os corpos-de-prova, uma vez que o pH final em todos os ensaios, quer no grupo controle, quer nos grupos que receberam as diluições sub-inibitórias dos extratos, oscilou de pH 5,3 a pH 5,8, evidenciando que a capacidade acidogênica dos microrganismos, bem como sua aciduridade não foram afetados pelos extratos vegetais.

Entretanto, para se confirmar esses resultados, tornam-se necessários novos estudos como forma de se avaliar em qual etapa do processo de adesão os extratos viriam a exercer maior influência e quais componentes teriam maior atividade na inibição desse processo.

CONCLUSÃO

- A adesão de *S.mutans* sobre a superfície lisa do vidro foi inibida pela maioria dos extratos vegetais testados em concentrações sub-inibitórias;
- Sobre *S. mutans* GS 5 os extratos de aroeira do sertão, candeia e guajuvira foram os que mais afetaram a adesão microbiana;
- Sobre *S. mutans* ATCC 1910 os extratos de aroeira do sertão, araçá, jacarandá e guajuvira foram os que mais afetaram a adesão microbiana;
- A adição dos extratos vegetais não interferiu significativamente com a capacidade de desmineralização dos cocos cariogênicos sobre fragmentos de esmalte.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. ALADE, P. I, IROBI, O. N. Antimicrobial activities of crude leaf extracts of *Acalypha wilkesiana*. **J Ethnopharmacol.**, Limerick, v.39, n.3, p. 171-174, Aug. 1993.
2. ALALUUSUA, S. et al. Mutacin activity of strains isolated from children with varying levels of *mutants streptococci* and caries. **Arch Oral Biol.**, Oxford, v.36, n.4, p.251-255, 1991.
3. BARNARD, D.; DAVIES, J.; FIGOR, D. Susceptibility of *Actinomyces israelii* to antibiotics, sodium hypochlorite and calcium hydroxide. **Int. Endod. J.**, Oxford , v.29, n.5, p.320-326, Sept. 1996.
4. BIRCH, B. et al. Growth inhibiting of anaerobic oral pathogens by select plant extracts. **J. Dent. Res.**, p.327, 1990. (abstract n. 1717).
5. BURNE, R.A.; CHEN, Y.Y.M.; PENDERS, J.E.C. Analysis of genes expression *mutans* in Biofilms *in vitro*. **Adv. Dent. Rev.**, Washington, v. 11, n.1, p.100-109, Apr. 1997.
6. CARLSSON, J. Bacterial metabolism in dental biofilms. **Adv. Dent. Rev.**, Washington, v. 11, n.1, p.75-80, Apr. 1997.
7. CIARDI, J. E.; ROSENTHAL, A. B.; BOWEN, W. H. Rapid quantitative determination of the effect of antiplaque agentes and antisera on the growth, acid production, and adherence of *Streptococcus mutans*. **J. Dent. Res.**, Washington, v.60, n.3, p. 756-762, Mar. 1981.
8. CLANCY, K. A., et al. Characterization of recombinant, ureolytic *Streptococcus mutans* demonstrates an inverse relationship between dental plaque ureolytic capacity and cariogenicity. **Infect. Immun.**, Washington, v.68, n.5, p.2621-2629, May 2000.
9. DAGLIA M., et al. Isolation of antibacterial component from roasted coffee. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v.18, n. ½, p. 219-225, Oct. 1998.

-
10. DAGLIA, M., et al. Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans* adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v.50, n.5, p.1225-1229, Feb. 2002.
 11. DAROUT I. A. et al. Salivary microbiota levels in relation to periodontal status, experience of caries and miswak use in Sudanese adults. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.29, n.5, p.411-420, May 2000.
 12. EL-GAMMAL, A.A., MANSOUR, R.M.A. Antimicrobial activity of some flavonoid compounds. **Z. Mikrobiol.**, v.14, p.561-565, 1986.
 13. ELVIN-LEWIS M, VITALE M, KOPJAS J. Anticariogenic potencial of commercial teas. **J. Prev. Dent.**1980; 6:273-284.
 14. ELVIN-LEWIS, M., STEELMAN, R. The anticariogenic effects of tea drinking among Dallas school children. **J. Dent. Res.** Washington, v.65, nesp., p.198, 1986. (abstract n. 257).
 15. FEATHERSTONE J.D.B. The science and practice of caries prevention. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.131, n.7, p.887-899, July 2000.
 16. FEATHERSTONE, J. D. B.; ZERO, D. T. An in situ model for simultaneous assessment of inhibition of demineralization and enhancement of remineralization. **J. Dent. Res.** Washington, v.71, nesp, p.804-810, Apr.1992.
 17. FUKUSHIMA, K.; MOTODA, R.; IKEDA, T. Effects of exogenous insoluble glucan primer on insoluble glucan synthesis by *Streptococcus mutans*. **J. Dent. Res.** Washington, v.60, n.9, p.1707-1712, Sept. 1981.
 18. GAETTI-JARDIM JÚNIOR, E. Estudo da microbiota anfibiônica presente no interior dos canais radiculares com polpa necrótica: susceptibilidade ao hidróxido de cálcio e fatores de virulência. 2001. 416f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2001.

-
19. GIBBONS, R.J.; NYGAARD, M. Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque-forming streptococci. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.13, n.10, p.1249-1262, Oct. 1968.
20. GILBERT, P; DAS J; FOLEY, I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. **Adv. Dent. Rev.**, Washington, v.11, n.1, p.160-167, Apr.1997.
21. GOTTLIEB, O.R., KAPLAN, M.A.C. Amazônia: tesouro químico a preservar. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.11, n.61, p.17-20, jan./fev. 1990.
22. HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.256, n.9, p.4494-4497, May 1981.
23. HAMILTON-MILLER, J.M.T. Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.). **Antimicrob. Agents. Chemother.**, Washington, v.39, n.11, p.2375-2377, Nov. 1995.
24. HOLT, J.G. et al. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9.ed. Baltimore: Williams Wilkins, 1994. p.96.
25. IKIGAI, H.T. et al. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. **Biochim. Biophys. Acta. Amsterdam**, v.1147, n.1, p.132-136, Apr. 1993.
26. JAMES, S.M.; TAGG, J.R. The prevention of dental caries by BLIS-mediated inhibition of *mutans streptococci*. **N.Z. Dent. J.**, Dunedin, v.87, n.389, p.80-83, July 1991.
27. KASHKET, S. et al. Glucosyltransferase inhibition by tannin-like constituents of beverages. **J. Dent. Res.** Washington, v.64, nesp., p.212, 1985.
28. KASHKET, S. et al. In vitro inhibition of Glucosyltransferase from the dental plaque bacterium *Streptococcus mutans* by common beverages and food extracts. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.30, n.11/12, p.821-826, 1985.
-

-
29. KURAMITSU, H.K. Virulence factors of mutans streptococci; role of molecular genetics. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Alexandria, v.4, n.2, p.159-176, 1993.
30. LANDUCCI, L. F. et al. Efeitos de *Coffea arabica* sobre a aderência de *Streptococcus mutans* à superfície de vidro. **Ciênc. Odontol. Bras.**, v.6, n.3, p.58-64, jul.set. 2004.
31. LANGENDIJK-GENEVAUX, P.S.; GRIMM, W.D.; VAN DER HOEVEN, J.S. Sulfate-reducing bacteria in relation with other potential periodontal pathogens. **J.Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.28, n.12, p.1151-1157, Dec. 2001.
32. LILJEMARK, W.F. et al. Growth dynamics in a natural biofilm and its impact on oral disease management. **Adv. Dent. Rev.**, Washington, v.11, n.1, p.14-23, Apr.1997.
33. MARSH, P.D. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.43, n.4, p.599-614, Oct.1991.
34. MENDONÇA, R. C., FELFILNI, J.M., WALTER, B.M.T. Flora vascular do cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. Cerrado, ambiente e flora. Planaltina: Embrapa/CPAC, 1998. p.289-556.
35. NAKANE, H., ONO, K. Differential inhibitory effects of some catechin derivatives on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and cellular deoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases. **Biochemistry**, Washington, v.29, n.11, p.2841-2845, Mar. 1990.
36. OKUBO, S.H. et al. The anti-haemolysin of tea and coffee. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.9, p.65-66, 1989.
37. OOSHIMA, T. et al. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. **Caries Res. Basel**, v.27, n.2, p.124-129, 1993.
38. OTAKE, S. et al. Anticaries effects of polyphenolic compounds from japanese green tea. **Caries Res., Basel**, v.25, n.6, p.438-443, 1991.
-

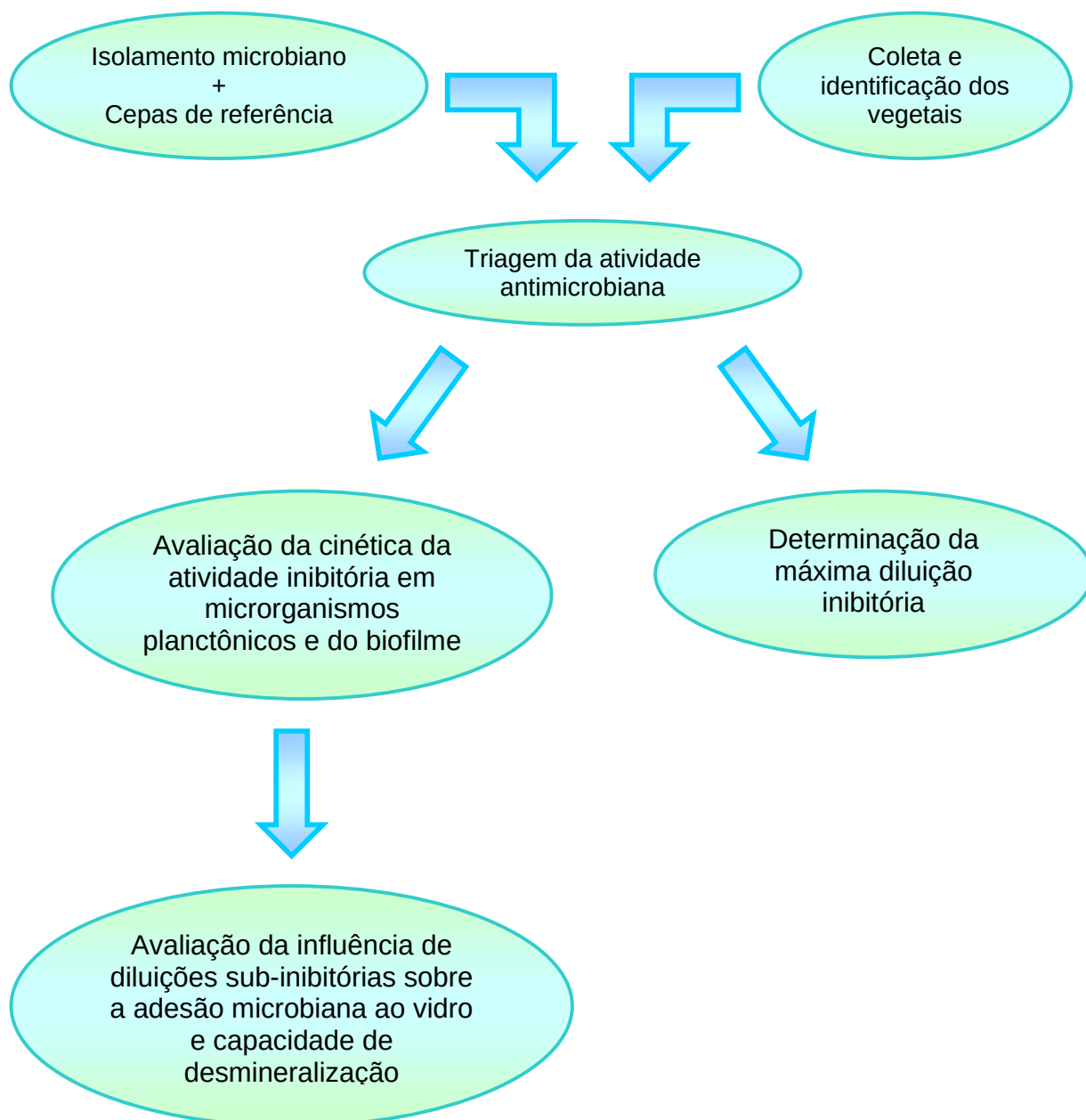
-
39. PAOLINO, V.J.; KASHKET, S.; SPARAGA, C.A. Inhibition of dextran synthesis by tannic acid. **J. Dent. Res.**, Washington, v.59, nesp.A, p.389, 1980. (abstract n. 389).
40. ROSEN, S. et al. Anticariogenic effects of tea in rats. **J. Dent. Res.**, Washington, v.63, n.5, p.658-660, May 1984.
41. SINGLETON, S. et al. Methods for microscopic characterization of oral biofilms: analysis of colonization, microstructure, and molecular transport phenomena. **Rev. Adv. Dent. Rev.**, Washington, v. 11, n.1, p.133-149, Apr. 1997.
42. STRALFORS A. Effect on hamster caries by purine derivatives vanillin and some tannin-containing materials. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.12, n.3, p.321-332, Mar. 1967.
43. TAMACAS, J.C.; RAMSEY, A.C.; HARDWICK, J.L. Fluoride contents of beverages commonly used in England. **J. Dent. Res.**, Oxford, v.53, supp.1, p.179, 1974.
44. THYLSTRUP A.; FEJERSKOV O. Cariologia clínica. São Paulo: Ed. Santos, 1995. p.45-69.
45. TURNG, B.F.; MINHAH, G.E.; FALKLER, J.R. Development of an agar medium for the detection of oral H₂S producing organisms. **J. Dent. Res.** Washington, v.76, nesp., p.226, 1997. (abstract n. 1702).
46. VIEIRA, R.F.; MARTINS, M.V.M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. **Revista Bras. Pl. Méd.**, Botucatu, v.3, n.1, p.13-36, 2000.
47. WINKLER, J.R. et al. An *in vitro* model to study bacterial invasion of periodontal tissues. **J. Periodontol.**, v.59, n.1, p.40-45, Jan 1981.
48. WOLINSKY L.E. Caries and cariology. In: NISENGARD, R. J.; NEWMAN, M. G.: Oral microbiology and immunology. Philadelphia: Saunders, 1994. p. 341-359.
-

-
49. WU-YUAN, C. D.; CHEN, C.Y.; WU, R.T. Gallotannins inhibit growth, water-insoluble glucan synthesis, and aggregation of mutans streptococci. **J. Dent. Res.** Washington, v.67, n.1, p.51-55, Jan. 1988.
50. WU-YUAN, C.D.; WU, R.T. Potential of selected plant extracts as anticaries agents. **J. Dent. Res. Washington**, v.64, nesp., p.213, 1985. (abstract n. 344).
51. ZERO, D. T. In situ caries models. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v.9, n.3, p.214-230, Nov.1995.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A - FLUXOGRAMA DA PESQUISA



ANEXO B - ORIGEM BOTÂNICA DAS PLANTAS UTILIZADAS



Campo nativo na savana de Pedra Caída – MA.
Fazenda Dona Elza.
Cortesia de Ellen Cristina Gaetti Jardim



Campos nativos na savana de Pedra Caída – MA.
Fazenda Vovó Cecília.
Cortesia de Ellen Cristina Gaetti Jardim.



Cerrado “denso estrito” em Pedra Caída – MA.
Fazenda Santa Giulia.
Cortesia de Ellen Cristina Gaetti Jardim.



Vista geral do Rio Tocantins, separando os estados do Tocantins e Maranhão. Notar a integridade da vegetação ciliar.



Cerrado de encosta.
Região de Pedra Caída – MA.
Fazenda Dona Elza.
Cortesia de Ellen Cristina Gaetti Jardim.



O maior inimigo do Cerrado são as queimadas.

ANEXO C - PLANTAS UTILIZADAS



angico (*Anadenathera falcata*)

<http://www.polmil.sp.gov.br>



angico (*Anadenathera falcata*)

<http://www.polmil.sp.gov.br>



araçá (*Psidium cattleianum*)

<http://eis.bris.ac.uk/~bzmlh/strgua.htm>



araçá (*Psidium cattleianum*)

<http://www.noarovivaio.it/galleria7.htm>



arnica do campo (*Solidago microglossa*)

<http://www.pousadatrilhadosol.com.br>



arnica do campo (*Solidago microglossa*)

http://www.saguaro.com.br/SG/fot_arnic.htm



aroeira do sertão (*Astronium urundeuva*)

<http://www.esalq.usp.br/trilhas/lei/lei10.php>



aroeira do sertão (*Astronium urundeuva*)

<http://www.esalq.usp.br/trilhas/lei/lei10.php>



caju (*Anacardium occidentale*)

<http://www.rain-tree.com/Plant-Images>



caju (*Anacardium occidentale*)

<http://www.uog.edu/cals/site/POG/anacard.html>



caju-açu (*Anacardium giganteum*)

<http://www.jornaldapaisagem.com.br/artigos>



caju-açu (*Anacardium giganteum*)

<http://www.cspwebservices.com/dohr>



cancerosa (*Maytenus ilicifolius*)

<http://micol.fcien.edu.uy/flora/Maytenus-ilicifolius.htm>



candeia (*Vanillosmopsis erythropappa*)

<http://davesgarden.com/pdb/showimage/26478/>



candeia (*Vanillosmopsis erythropappa*)

<http://davesgarden.com/pdb/showimage/26478/>



capitão do campo (*Terminalia argentea*)

<http://eadmelo.sites.uol.com.br/cerrd>



capitão do campo (*Terminalia argentea*)

<http://www.cjb.unige.ch/BotSyst/EspListeTop.htm>



cedro (*Cedrela fissilis*)

<http://www.amazonlink.org/sementesamazonia>



cedro (*Cedrela fissilis*)

<http://www.amazonlink.org/sementesamazonia>



Figueira (*Ficus enormis*)

<http://www.plantarum.com.br/gameleira.html>



Figueira (*Ficus enormis*)

<http://www.plantarum.com.br/gameleira.html>



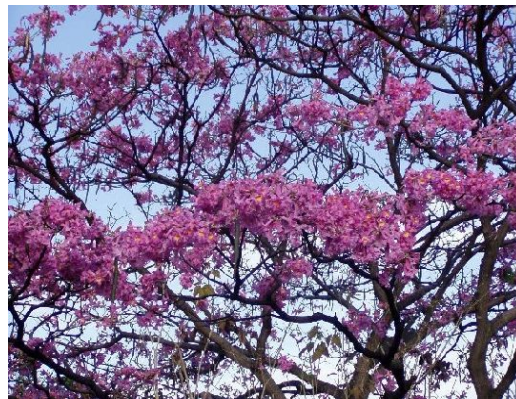
folha de carne (*Roupala Montana*)

<http://www.botanypages.org/Nee/ambo/Checklist/slides-ros/pages>



guajuvira (*Patagonula americana*)

http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema6/6_9diseminac.htm



ipê roxo (*Tabebuia impetiginosa*)

<http://kathie.hp.infoseek.co.jp/Pink%20Trumpet%20tree.htm>



jacarandá (*Platypodium elegans*)

http://fm2.fieldmuseum.org/plantguides/herb_demonstration.asp



jacarandá caroba (*Jacaranda cuspidifolia*)

<http://www.clubedasemente.org.br>



jacarandá caroba (*Jacaranda cuspidifolia*)

<http://www.clubedasemente.org.br>



pau d'algo (*Gallepsia gorarema*)

<http://www.brotasonline.com.br>



pequi (*Caryocar brasiliense*)

www.clubedasemente.org.br



pequi (*Caryocar brasiliense*)

www.clubedasemente.org.br

ANEXO D - EQUIPAMENTOS UTILIZADOS PARA TESTES MICROBIOLÓGICOS



Estufa bacteriológica



Estufa bacteriológica com dessecadores de vidro do tipo Pyrex



Dessecadores de vidro do tipo Pyrex contendo placas de ágar sangue



Centrífuga de células para tubos Eppendorf utilizada na lavagem de células bacterianas

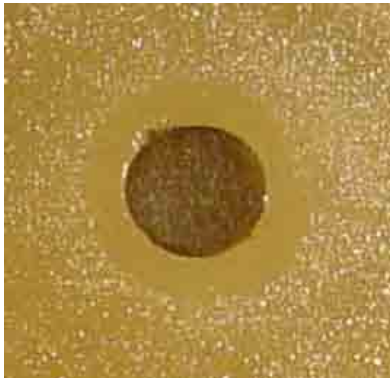


Espectrofotômetro para determinação do inóculo bacteriano



Lupa estereoscópica do contador de colônias

ANEXO E - TESTES MICROBIOLÓGICOS



Presença de halo de inibição do crescimento bacteriano em placas de Petri contendo ágar infuso de cérebro e coração suplementado com extrato de levedura

ANEXO F - PREPARO E SELEÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE

Confecção dos blocos de esmalte bovino (4 x 4 mm)



1. Coroa do dente bovino incisivo central inferior, separada da raiz através de disco diamantado de duas faces (KG Sorensen D 91), montado em motor de bancada (Nevoni), mantido sob refrigeração (água destilada/deionizada).



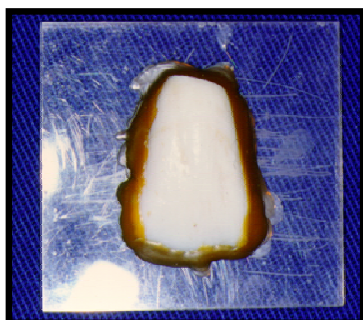
2. Coroa dentária fixada em placa de acrílico (4x4 cm e 4 mm de espessura) com cera pegajosa (Kota Ind. e Com. LTDA) pela sua face proximal.



3. Placa montada em cortadeira (Isomet Low Speed Saw – Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA) sob refrigeração com água destilada/deionizada.



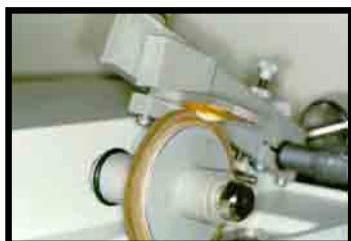
4. Secção da coroa utilizando disco diamantado (série 15 HC Diamond– n. 11-4244 Buehler) separando a superfície vestibular da lingual.



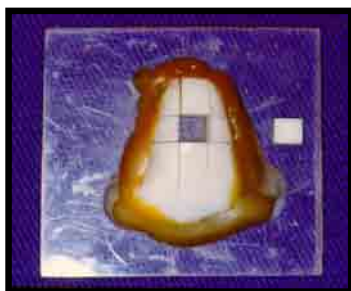
5. Face vestibular fixada na placa de acrílico.



6. Secção da face vestibular no sentido longitudinal, na porção mais plana, utilizando-se 2 discos diamantados (série 15 HC Diamond –n. 11-4243 Buehler), montados em cortadeira sob refrigeração com água destilada/deionizada e separados por um disco espaçador de alumínio com 4 mm de espessura.

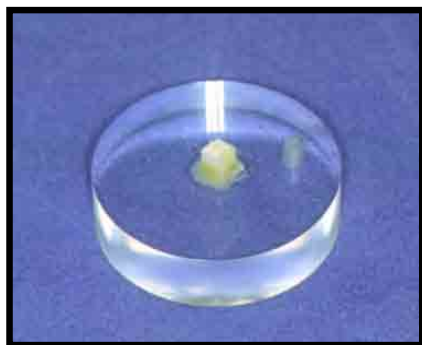


7. Secção da face vestibular no sentido transversal, na porção mais plana, utilizando-se 2 discos diamantados (série 15 HC Diamond - n. 11-4243 Buehler), montados em cortadeira sob refrigeração com água destilada/deionizada e separados por um disco espaçador de alumínio com 4 mm de espessura.



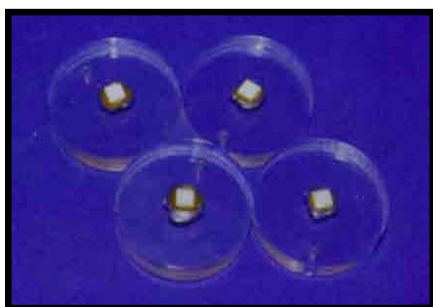
8. Fragmento vestibular do dente bovino, fixado sobre placa de resina. Ao lado, bloco de esmalte dentário.

Planificação da dentina e polimento do esmalte



1. Bloco de esmalte fixado em disco de resina acrílica pré-fabricada (± 3 cm de diâmetro por ± 8 mm de espessura), com auxílio de cera pegajosa (Kota Ind. e Com. LTDA), com a superfície dentinária voltada para cima.

2. Ajuste da dentina para obtenção de superfícies paralelas entre esmalte e dentina, utilizando Politriz APL-4 AROTEC e lixas de granulação 320 (CARBIMET Paper Discs, 30-5108-320, BUEHLER), 2 pesos, durante 20 segundos sob baixa rotação e refrigeração.



3. Blocos fixados com a superfície do esmalte voltada para cima, a qual será polida.

Seqüência do polimento de esmalte:

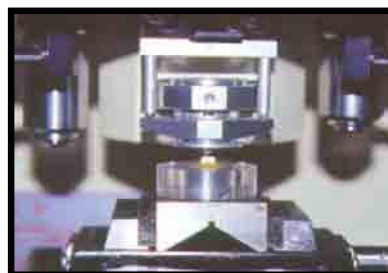
1. Pedra-pomes, água deionizada e taça de borracha montada em contra-ângulo em baixa-rotação.
2. Na Politriz APL-4 AROTEC - lixa de granulação 600, 800 e 1200 (30 segundos – 2 pesos) e refrigeração a água. Limpeza em lavadora ultrassônica e água destilada/deionizada por 2 minutos, entre cada lixa;
3. Na Politriz APL-4 AROTEC - acabamento final com disco de papel feltro TEXMET 1000 (Buehler Polishing Cloth) (1 minuto – 2 pesos) e suspensão de diamante 1 micron base-água (Buehler);
4. Limpeza em lavadora ultrassônica utilizando solução detergente (Ultramet Sonic Cleaning Solution - Buehler) diluída 20:1 em água destilada/deionizada (3 minutos);
5. Lavagem durante 30 segundos com jato de água destilada/deionizada.

ANEXO G - MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE (SMH)



1. Microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2.000 (Shimadzu Corporation - Kyoto-Japan), com penetrador tipo Knoop, acoplado ao Software para análise de imagem CAMS-WIN (NewAge Industries, USA).

2. Bloco de esmalte sendo submetido à leitura no microdurômetro, carga estática de 25 gramas e tempo de 10 segundos, para análise da microdureza de superfície.



3. Fotomicrografia das indentações das análises de microdureza de superfície inicial e final do esmalte (Aumento: 100x).

ANEXO H - ENSAIO DE ADESÃO E DESMINERALIZAÇÃO



Bengala de vidro para ensaio de adesão microbiana



Bengala de vidro com crescimento bacteriano ao redor



Bloco de esmalte dental imerso em caldo de sacarose para ensaio de desmineralização

ANEXO I - TESTES DE MICRODUREZA

Casca de Aroeira do sertão (*Astronium urundeuva*)

Microorganismos	Inicial					Final					%ADS	P
ATCC 1910	330	347	324	343	343	355	353	355	353	353	4.9	p=0.179694
	349	352	364	349	371	361	359	359	360	361	0.8	
GS 5	341	343	341	347	341	350	351	350	350	351	2.3	p=0.654742
	400	411	392	400	400	357	357	355	357	357	-11	
Controle s/ MO	352	334	368	347	345	360	359	359	360	360	3	p=0.317298

Folha de Aroeira do sertão (*Astronium urundeuva*)

Microorganismos	Inicial					Final					%ADS	P
ATCC 1910	400	394	414	408	400	352	352	352	352	352	-12.7	p=0.179694
	381	392	384	392	394	359	360	359	360	359	-7.5	
GS 5	352	361	347	361	368	358	358	359	358	358	0.1	p=0.654742
	345	352	373	352	373	357	358	358	357	357	-0.5	
Controle s/ MO	381	371	373	384	386	355	354	355	355	355	-6.4	p=0.317298

Caule de Cancerosa (*Maytenus ilicifolius*)

Microorganismos	Inicial					Final					%ADS	P
ATCC 1910	345	338	379	406	400	354	354	354	354	356	-5.2	p=0.179694
	411	420	426	436	436	358	357	357	359	359	-15.9	
GS 5	359	359	343	341	336	351	351	351	351	350	0.9	p=0.654742
	386	379	389	392	376	352	352	350	352	350	-8.6	
Controle s/ MO	400	400	417	400	400	359	360	361	359	360	-10.8	p=0.317298

Casca de Candeia (*Vanillosmopsis erythropappa*)

Microorganismos	Inicial					Final					%ADS	P
ATCC 1910	371	356	368	368	343	359	358	358	358	359	-0.8	p=0.179694
	397	403	384	392	386	357	356	357	357	357	-9.1	
GS 5	389	381	386	371	384	335	335	334	336	335	-12.3	p=0.654742
	324	330	349	349	343	350	351	350	351	351	3.4	
Controle s/ MO	356	356	359	364	326	358	356	357	358	356	1.4	p=0.317298

Folha de Guajuvira (*Patagonula americana*)

Microorganismos	Inicial					Final					%ADS	P
ATCC 1910	389	384	379	389	394	361	362	361	361	360	-6.8	p=0.179694
	349	359	366	376	371	360	361	361	362	361	-0.9	
GS 5	345	343	361	341	345	350	350	351	350	351	1	p=0.654742
	381	376	373	371	350	354	356	357	356	356	-3.9	
Controle s/ MO	356	371	371	373	379	358	357	358	358	358	-3.3	p=0.317298

Casca de Jacarandá (*Platypodium elegans*)

Microorganismos	Inicial					Final					%ADS	P
ATCC 1910	330	345	352	345	334	356	357	358	356	356	4.5	p=0.654742
	386	366	386	392	389	358	357	358	358	357	-6.9	
GS 5	400	392	400	392	394	357	357	357	359	358	-9.6	p=0.179694
	403	408	411	403	408	357	358	358	357	357	-12.1	
Controle s/ MO	352	343	356	356	349	354	354	355	355	355	0.9	p=0.317298

Folha de Jacarandá caroba (*Jacaranda cuspidifolia*)

Microorganismos	Inicial					Final					%ADS	P
ATCC 1910	359	354	349	345	368	354	355	356	356	355	0.1	p=0.179694
	352	334	334	332	352	357	359	359	359	359	5.2	
GS 5	376	371	376	371	352	356	357	357	356	355	-3.6	p=0.179694
	376	386	373	381	371	360	358	358	359	359	-4.9	
Controle s/ MO	373	376	368	376	368	356	358	357	357	356	-4.1	p=0.317298

Sem Extrato Vegetal

Microorganismos	Inicial					Final					%ADS	P
ATCC 1910	381	379	381	384	384	358	357	357	356	356	-6.6	p=0.108806
	373	373	376	359	364	360	361	361	360	360	-2.4	
	361	373	384	356	361	357	357	356	357	357	-2.8	
GS 5	343	352	368	347	368	352	353	351	352	352	-1.1	p=0.317298

ANEXO J - SOLUÇÕES UTILIZADAS

SOLUÇÃO SALINA FOSFATADA TAMPONADA (PBS)

Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O	2,898 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
NaCl	7,65 g
KCl	0,2 g
H ₂ O	1000 mL

ÁGAR SANGUE

Ágar infuso de cérebro e coração	40 g
Extrato de levedura.....	5g
Sangue.....	50 mL
H ₂ O	1000 mL

CALDO SACAROSE

Peptona ágar de soja tripticaseína	15 g
Extrato de levedura	5,0 g
Solução estoque de L-Cystina 20 mg/mL	10 mL
Solução estoque de sulfito de sódio a 10%	1,0 mL
Cloreto de sódio	1,0 mL
Fosfato de sódioNa ₂ HPO ₄ – (12H ₂ O)	2,0 g
Bicarbonato de sódio(NaHCO ₃).....	02,0 g
Acetato de sódio.....	20,0 g
Sacarose (açúcar comum)	50,0 g
Água destilada	1000 mL

CALDO DE PEPTONA (PY)

Peptona	0,5 g
Caldo de soja tripticaseína	0,5 g
Extrato de levedura	1,0 g
Solução de sais	4 mL
L – cisteína	0,05 g
H ₂ O	100 mL

RESUMO

RESUMO

BIANCO, K.G. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais da savana brasileira sobre *Streptococcus mutans* e a sua capacidade de desmineralização e a adesão à superfície de vidro. 2004. 94 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2004.

Através de um estudo *in vitro*, foram avaliados os efeitos de diferentes extratos vegetais na aderência de *Streptococcus mutans* à superfície de vidro, a sua atividade antimicrobiana e a influência que esses extratos possuem sobre a capacidade de desmineralização da hidroxiapatita por esses microrganismos. Foram utilizados *Streptococcus mutans* GS 5 e *Streptococcus mutans* ATCC 1910 e 5 isolados clínicos obtidos de pacientes com alto risco à cárie e identificados de acordo com suas características bioquímico-fisiológicas e morfológicas. Extratos vegetais, aquosos e hidroalcoólicos, de casca e folha de angico (*Anadenanthera falcata*), casca e folha de araçá (*Psidium cattleianum*), caule de arnica do campo (*Solidago microglossa*), casca e folha de aroeira do sertão (*Astronium urundeuva*), casca de caju (*Anacardium occidentale*), folha do caju-açu (*Anacardium giganteum*), caule de cancerosa (*Maytenus ilicifolius*), casca e folha de candeia (*Vanillosmopsis erythropappa*), casca de capitão do campo (*Terminalia argentea*), casca e folha de cedro (*Cedrela fissilis*), casca e folha da figueira (*Ficus enormis*), folha da folha de carne (*Roupala montana*), folha de guajuvira (*Patagonula americana*), casca e folha de ipê roxo (*Tabebuia impetiginosa*), casca de jacarandá (*Platypodium elegans*), folha de jacarandá caroba (*Jacaranda cuspidifolia*), folha de pau d'alho (*Gallepsia gorarema*) e folha e casca de pequi (*Caryocar brasiliense*) foram preparados. De todos os vegetais testados, somente os extratos de folha de araçá, folha da aroeira do sertão, caule da cancerosa, casca da candeia, folha da figueira, folha da guajuvira, casca de jacarandá, folha de jacarandá caroba apresentaram a capacidade de inibir o crescimento bacteriano. Quanto ao tempo necessário para a eliminação de 90% do inóculo bacteriano em contato com os extratos vegetais, verificou-se que o mesmo ficou entre 5 e 1440 minutos para os microrganismos planctônicos e entre 60 e 1440 minutos para os microrganismos formando biofilme. Os extratos de figueira e de jacarandá caroba não foram capazes de inibir significativamente os microrganismos no biofilme. Observou-se que os extratos que mostraram maior atividade frente às cepas de referência testadas também demonstraram uma maior e mais rápida atividade inibitória frente aos microrganismos em estado planctônico e formando biofilmes. Para avaliar a aderência de *Streptococcus mutans* à superfície de vidro e a capacidade de desmineralização da hidroxiapatita por esses microrganismos só foram utilizados os extratos que tiveram atividade antimicrobiana. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo Teste de Wilcoxon e pelo Teste do Qui-quadrado e mostraram que a maioria dos extratos vegetais testados inibiu a adesão de *S. mutans* sobre a superfície lisa do vidro, sendo que sobre *S. mutans* GS 5 os extratos de aroeira do sertão, candeia e guajuvira foram os que mais afetaram a adesão microbiana, enquanto para *S. mutans* ATCC 1910 os extratos de araçá, aroeira do sertão, guajuvira e jacarandá foram os que mais afetaram

Resumo

a adesão. A adição dos extratos vegetais não interferiu significativamente com a capacidade de desmineralização dos fragmentos de esmalte pelos cocos cariogênicos.

Palavras-chaves: Aderência Bacteriana. Desmineralização. Extratos vegetais.

ABSTRACT

ABSTRACT

BIANCO, K.G. Evaluation of antimicrobial activity of plant extracts from the Brazilian savannah on *Streptococcus mutans* and its capacity of desmineralization and adherence to glass surface. 2004. 94 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2004.

Through an in vitro study, the effects of different plant extracts on *Streptococcus mutans* adherence to glass surface, its antimicrobial activity and the influence these extracts on the capacity of desmineralization of hydroxyapatite by these microorganisms were evaluated. *Streptococcus mutans* GS 5 and *Streptococcus mutans* ATCC 1910 and 5 clinical isolates from patients with high caries risk and identified according to their biochemical-physiological and morphologic characteristics were used. Aqueous and hydroalcoholic plant extracts of skin and leaf of *Anadenanthera falcata*, skin and leaf of *Psidium cattleianum*, stem of *Solidago microglossa*, skin and leaf of *Astronium urundeuva*, skin of *Anacardium occidentale*, leaf of *Anacardium giganteum*, stem of *Maytenus ilicifolius*, skin and leaf of *Vanillosmopsis erythropappa*, skin of *Terminalia argentea*, , skin and leaf of *Cedrela fissilis*, skin and leaf of *Ficus enormis*, leaf of *Roupala montana*, leaf of *Patagonula americana*, skin and leaf of *Tabebuia impetiginosa*, skin of *Platypodium elegans*, leaf of *Jacaranda cuspidifolia*, leaf of *Gallepsia gorarema* and leaf and skin of *Caryocar brasiliense* were prepared. Of all tested plants only the *Psidium cattleianum* leaf extracts, leaf of *Astronium urundeuva*, stem of *Maytenus ilicifolius*, skin of *Vanillosmopsis erythropappa*, leaf of *Ficus enormis*, leaf of *Patagonula Americana*, skin of *Platypodium elegans*, leaf of *Jacaranda cuspidifolia* showed the capacity of inhibiting the bacterial growth. Considering the necessary time to eliminate 90% of the bacterial inoculum in contact with the plant extracts, it was checked that it was from 5 and 1440 minutes for planktonic microorganisms and from 60 and 1440 minutes for the microorganisms forming biofilm. The extracts of *Ficus enormis* and *Jacaranda cuspidifolia* were not able to inhibit the microorganisms significantly. It was observed that the extract that showed greater activity related to the strains de reference tested also showed a greater and faster activity of inhibition related to the microorganisms in planktonic state and forming biofilms. To evaluate the adherence of *Streptococcus mutans* to glass surface and the capacity of desmineralization of hydroxyapatite by these microorganisms only the extracts that showed antimicrobial activity were used. The results were analysed statistically through Wilcoxon test and test X2. They showed that the majority of tested plant extracts inhibited the adherence of *S. mutans* to the smooth glass surface, considering that to *S. mutans* GS 5 the extract of *Astronium urundeuva*, *Vanillosmopsis erythropappa* and *Patagonula americana* affect the microbial adherence the most, on the contrary for *S. mutans* ATCC 1910 where extracts, *Psidium cattleianum*, *Astronium urundeuva*, *Patagonula Americana* and *Platypodium elegans* affect the adherence the most. The addition of plant extracts did not interfere significantly the capacity of demineralization of the enamel fragments by cariogenic cocci.

Key words: Bacterial Adhesion. Desmineralization. Plant Extracts.