

JIM BATTAGIN

**CINÉTICA ENZIMÁTICA E EFEITO DE
EXTRATOS NATURAIS NA ATIVIDADE DA
ENZIMA GLICOSILTRANSFERASE DE
*Streptococcus mutans***

**BRAGANÇA PAULISTA – SP
2010**

JIM BATTAGIN

**CINÉTICA ENZIMÁTICA E EFEITO DE
EXTRATOS NATURAIS NA ATIVIDADE DA
ENZIMA GLICOSILTRANSFERASE DE
*Streptococcus mutans***

ORIENTADORA

DRA. PATRÍCIA DE OLIVEIRA CARVALHO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da
Universidade São Francisco (USF) para obtenção
do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**BRAGANÇA PAULISTA – SP
2010**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADORA: Prof^ª Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho

MEMBROS:

- 1 - Prof^ª Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho
- 2 - Prof^ª Dra. Gabriela Alves Macedo
- 3 - Prof^ª Dra. Giovana Radomille Tofoli

SUPLENTES:

- 1 - Prof^ª Dra. Natália Reiko Sato Miyasaka
- 2 - Prof^ª Dra. Aparecida Érica Bighetti Ribas

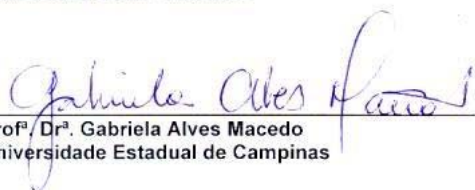
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Data: 26/02/2010



BATTAGIN, JIM. "Cinética Enzimática e Efeito de Extratos Naturais na Atividade da Enzima Glicosiltransferase de *Streptococcus mutans*". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e seis de Fevereiro de 2010 pela Banca examinadora constituída pelos professores:


Prof^a. Dr^a. Patrícia de Oliveira Carvalho- Orientadora e Presidente
Universidade São Francisco


Prof^a. Dr^a. Gabriela Alves Macedo
Universidade Estadual de Campinas


Prof^a. Dr^a. Giovana Radomille Tofoli
Universidade São Francisco

QW 142.5 B338c Battagin, Jim.
Cinética enzimática e efeito de extratos naturais na atividade da enzima glicosiltransferase de *Streptococcus mutans* / Jim Battagin.-- Bragança Paulista, 2010. 42 p.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.
Orientação de: Patrícia de Oliveira Carvalho.

1. *Streptococcus mutans*. 2. Glicosiltransferase. 3. *Rosmarinus officinalis*. I. Carvalho, Patrícia de Oliveira. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meu falecido pai, cuja presença em minha vida é constante, e seus ensinamentos produzirão frutos, advindos de sua capacidade como homem íntegro, honesto e trabalhador.

Dedico também a minha mãe, sem a qual eu jamais teria vivido o que vivi na vida, sempre amabilíssima, generosa, firme, rigorosa quando necessário, mas que Deus sempre a iluminou para ser tudo isso.

Dedico ainda aos meus irmãos, a minha namorada, as minhas sobrinhas, as minhas cunhadas e parentes que nos momentos de minha ausência nos eventos familiares, souberam entender meus objetivos e me incentivaram para que cumprisse com êxito até o final.

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito a Deus, o criador de tudo.

Agradeço a Universidade São Francisco, sempre com admiração e respeito.

Agradeço ao Coordenador Dr. José Pedrazolli Jr., pelo dinamismo e envolvimento com o ensino e a pesquisa.

Agradeço em especial a Prof^ª Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho, minha orientadora que servirá de exemplo em meu futuro e com certeza criou em mim um algo mais, motivando-me na pesquisa científica e mostrando-me o que é ser um professor firme, capaz e sábio.

Aos professores do curso de Pós-Graduação, em especial a Prof^ª Natália Reiko Sato Miyasaka, que contribuíram muito no meu aprendizado, exercendo a docência com grandeza e alto nível de conhecimento.

Aos amigos de curso pela amizade sincera, pelos momentos compartilhados com alegria.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisas: Fabiano Jares, Vânia, Verônica, Neusa, Isabel, Júlio, Rosemary, Rafael, Viviane, Fernandas, Maria Elisa, Tatiana, Marcelas, Juliana, Amandas, Gabrielle, Camila, Janilda, Bianca, Thais, Sônia, Leandro, Ana Augusta, Denise, Daniel, Aline e tantos outros que estiveram ao meu lado em todos os momentos.

Ao amigo e responsável pelo Laboratório de Pesquisas Fabiano Sallowicz pela colaboração e apoio notável.

A verdadeira sabedoria consiste em saber como aumentar o bem-estar do
mundo”

Benjamin Franklin

RESUMO

A cavidade oral apresenta uma complexa comunidade de microrganismos que podem estar aderidos aos dentes, a mucosa epitelial ou formando biofilmes. Dentre esses microrganismos encontramos o principal agente etiológico da cárie dental, o *Streptococcus mutans* (SM). A prevenção do acúmulo dessas bactérias e da formação do biofilme dental são meios de combater a cárie dental. Face ao exposto, torna-se importante utilizar terapias alternativas e produtos naturais, derivados de plantas, de forma segura, racional e benéfica, como agentes antimicrobianos e antiaderentes frente às afecções bucais. O emprego de extratos de plantas tem merecido a atenção de pesquisadores de vários países, já que podem inibir tanto a atividade da enzima glicosiltransferase (GTF) produzida pelo SM como diretamente o crescimento desta bactéria. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito inibitório *in vitro* de extratos vegetais de *Rosmarinus officinalis* Linn (alecrim), *Camelia sinensis* (chá verde) e *Ilex paraguariensis* (chá mate) sobre a atividade da glicosiltransferase e sobre o crescimento de *Streptococcus mutans*. Além disto, foram estudados alguns parâmetros cinéticos da enzima. Os resultados obtidos foram promissores com o extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) que nas concentrações acima de 4mg/mL mostraram inibição significativa da atividade da GTF (50 - 75%). Por outro lado, os outros extratos analisados não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano. Os resultados apontam que o extrato aquoso de alecrim pode ser uma fonte valiosa para a descoberta de novas moléculas bioativas empregadas para a inibição da enzima GTF e conseqüente inibição de síntese de glucanos envolvidos na cárie.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*, glicosiltransferase, *Rosmarinus officinalis*

ABSTRACT

The oral cavity presents a complex microbial community which can adhere to the teeth, the epithelial mucous and form biofilms. The main etiological agent causing dental caries, *Streptococcus mutans* (SM), can be found amongst these microorganisms. Thus one of the ways to prevent dental caries could be to inhibit the growth of these bacteria and the biofilm formation. Based on the above, the use of alternative therapies and natural products derived from plants in a safe, rational and beneficial way, as antimicrobial and anti-adherent agents has become of importance to overcome mouth infections. The use of plant extracts has attracted the attention of researchers in various countries, since they can both inhibit the activity of the enzyme glucosyltransferase (GTF) produced by the SM and also directly inhibit growth of these bacteria. The objective of the present research was to evaluate the *in vitro* inhibitory effect of the following vegetable extracts: *Rosmarinus officinalis* Linn (rosemary), *Camelia sinensis* (green tea) and *Ilex paraguariensis* (mate tea) on the activity of glucosyltransferase and *Streptococcus mutans*. Some of the kinetic parameters of the enzyme were also studied. The results obtained with the aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* (rosemary) were promising, since it showed significant inhibition of GTF activity (50 – 75%) in concentrations above 4mg/mL. On the other hand, the other extracts examined were unable to inhibit the bacterial growth. The results show that the aqueous extract of rosemary could be a valuable source for the discovery of new bioactive molecules for use in the inhibition of the enzyme GTF and consequent inhibition of the synthesis of glucans involved in caries formation.

Key-words: *Streptococcus mutans*, glucosyltransferase, *Rosmarinus officinalis*

LISTA DE ABREVIATURAS

A Absorbância

ABF Azul de Bromofenol

ANOVA Análise de variância

ATCC *American Type Culture Collection*

ATP Adenosina trifosfato

BHI *Brain Heart Infusion*

CBG-250 *Coomassie Brilliant Blue G*

CIM Concentração inibitória mínima

DMSO Dimetilsulfóxido

EAG Equivalente em ácido gálico

GC-MS cromatografia gasosa-espectrometria de massas

GTF Glicosiltransferase

Km Constante de *Michaelis-Menten*

PIC Polissacarídeo intra-celular

SM *Streptococcus mutans*

V_{máx} velocidade máxima

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição do meio BHI utilizado para crescimento de *Streptococcus mutans*

Tabela 2 Atividade da enzima glicosiltransferase de *Streptococcus mutans*

Tabela 3 Inibição da atividade da glicosiltransferase por clorexidina após 1 hora de reação

Tabela 4 Conteúdo de fenólicos totais dos extratos de alecrim, chá-verde e chá-mate

Tabela 5 Valores de Absorbância a 630nm do caldo BHI após 48 horas de crescimento de *Streptococcus mutans*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de crescimento da cultura de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 em caldo BHI em função do tempo

Figura 2. Variação do pH da cultura de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 após crescimento em caldo BHI em função do tempo

Figura 3. Variação do conteúdo de hexoses neutras nas frações de alto e baixo peso molecular do sobrenadante numa cultura de *Streptococcus mutans* crescida em BHI.

Figura 4. Efeito da concentração do substrato sacarose na atividade enzimática da glicosiltransferase de *Streptococcus mutans*.

Figura 5. Leitura da Absorbância em função do tempo para avaliação da formação de glucanos pela glicosiltransferase utilizando o substrato sacarose

Figura 6. Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) na atividade da Glicosiltransferase.

Figura 7. Efeito do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na atividade da Glicosiltransferase.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 Cárie dentária	1
1.2 <i>Streptococcus mutans</i>	3
1.3 A enzima glicosiltransferase	7
1.4 Os glucanos	8
1.5 O biofilme dental	9
1.6 Produtos naturais como inibidores da GTF	10
1.6.1 <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (alecrim)	10
1.6.2 <i>Camelia sinensis</i> (chá-verde)	11
1.6.3 <i>Ilex paraguariensis A. St.-Hill</i> (erva-mate)	13
2 - OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Microrganismo e condições de crescimento	15
3.2 Curva de crescimento de <i>Streptococcus mutans</i>	15
3.3 Quantificação dos produtos (expresso em hexoses neutras) presentes no sobrenadante da cultura	16
3.4 Obtenção e caracterização da glicosiltransferase (GTF)	16
3.4.1 Preparação de extratos de GTF	16
3.4.2 Determinação da atividade de GTF de <i>S mutans</i>	17
3.4.2.1 Determinação de açúcares redutores	17
3.4.2.2 Quantificação de proteína total	17
3.4.2.3 Quantificação dos glucanos	18
3.4.2.4 Determinação dos parâmetros cinéticos da reação	18
3.5 Inibição da atividade da glicosiltransferase por extratos vegetais	18

3.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de diferentes extratos sobre o crescimento de <i>S. mutans</i>	19
3.7 Determinação de fenóis totais	19
3.8 Análise estatística	20
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Crescimento do <i>Streptococcus mutans</i>	21
4.1.1 Curva de crescimento	21
4.1.2 Variação do pH ao longo do crescimento	22
4.2 Estudo da variação do conteúdo de hexoses neutras presentes no sobrenadante das culturas	23
4.3 Estudo da atividade e parâmetros cinéticos da glicosiltransferase (GTF)	24
4.4 Verificação da formação de glucanos	26
4.5 Inibição da atividade da glicosiltransferase por extratos vegetais	27
4.6 Determinação de fenóis totais	29
4.7 Concentração Inibitória Mínima (CIM) de extratos vegetais sobre crescimento de <i>S. mutans</i>	30
5 - CONCLUSÃO	32
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
7 - ANEXOS	41

1-INTRODUÇÃO

1.1-Cárie dentária

É aceito universalmente que a cárie dentária é uma doença multifatorial, infecciosa, transmissível e dieta dependente, que desmineraliza a estrutura dental (Keyes, 1960). Ao conceituar a cárie dentária e seus fatores etiológicos podem-se determinar estratégias preventivas de diagnóstico e tratamento.

Esse conceito é embasado na interação: dente suscetível, microrganismo e dieta determinando a “doença” cárie, como o Diagrama de Keyes (Keyes, 1962). Para Newbrun (1988), a cárie resulta de um processo crônico, após um tempo de interação desses 3 fatores citados. Baseando-se no controle desses fatores, as estratégias implementadas só diminuem a incidência de cárie, sem erradicá-la (Lima, 2008).

Assim hipoteticamente, o conceito de cárie e o entendimento sobre seus fatores etiológicos estão incompletos, devendo ser conhecidos profundamente para que estratégias preventivas objetivas possam ser realizadas (Lima, 2008).

O índice CPOD (dentes cariados, perdidos e obturados) é muito utilizado em levantamentos epidemiológicos de saúde bucal, sendo recomendado pela OMS (Organização Mundial de Saúde) para medir e comparar a experiência de cárie em populações expressando assim a média de dentes cariados, perdidos e obturados num grupo de indivíduos (World Health Organization, 1997). A OMS estabeleceu como meta para 2010, um índice CPOD menor ou igual a 1 para crianças aos 12 anos de idade (World Health Organization, 1997). A cidade de Bragança Paulista situada na região de Campinas obteve um índice CPOD de 2,51 em levantamento realizado entre 1998 e 2001 (Cypriano *et al*, 2005).

Com relação à suscetibilidade à cárie, o indivíduo pode apresentar fatores extrínsecos relacionados a estrutura sociocultural e fatores intrínsecos como fluxo, composição e capacidade tampão da saliva, aspectos hereditários e imunológicos difíceis de serem controlados, já os dentes possuem graus de mineralização do esmalte com maior ou menor resistência aos ácidos (Lima, 2008).

Não existe um dente suficientemente resistente à cárie, e mesmo procurando aumentar sua resistência, por métodos químicos e mecânicos, sempre depende-se do desafio cariogênico que o indivíduo será submetido. Assim o fator suscetibilidade, é de importância

relativa para as estratégias preventivas (Lima, 2008).

Com relação aos microrganismos, o *Streptococcus mutans* (SM) não é o único a participar do desenvolvimento da lesão (Sullivan *et al*, 1996), e somente sua presença na placa dentária não explica variação na experiência de cárie (Tenuta *et al*, 2003). Também há um declínio da cárie dentária, sem uma mudança aparente no nível de SM na saliva (Bjarnason *et al*, 1994).

Procurando esclarecer a correlação entre a cárie dentária e a presença de microrganismos, fluxo salivar, capacidade tampão da saliva e sacarose não se chegou a resultado conclusivo e definitivo em relação à influência desses fatores no controle da cárie dentária (Tenuta *et al*, 2003), sugerindo que os métodos de diagnóstico de pacientes de risco sejam revistos (Sullivan *et al*, 1996).

A simples presença de microrganismos na cavidade bucal, na saliva ou na placa bacteriana, não é um fator determinante para o aparecimento de cárie, mas sua participação é inquestionável e indispensável, pois a lesão de cárie passa pelo metabolismo bacteriano, culminando no processo fisiológico de “des-re” (desmineralização-rem mineralização), não determinando a “doença” cárie (Thylstrup e Fejerskov, 1995) e não se justificando a interpretação da cárie como uma doença infecciosa (Lima, 2008).

Com relação à dieta, considera-se que a desmineralização após uma ingestão cariogênica se dá num determinado tempo, até a ação da saliva paralisar o processo, determinando uma simples desmineralização reversível. Uma ingestão mais freqüente de alimentos cariogênicos, produz um desequilíbrio “des-re” maior sendo indispensável e inquestionável a necessidade de sua participação, mas não determinante, pois os resultados são inconclusivos quanto seu papel na etiologia da cárie dentária, sendo insatisfatórias as estratégias preventivas para sua eliminação ou controle (Lima, 2008).

Dependendo da freqüência da ingestão de dieta cariogênica, realiza-se um controle periódico de placa, que permite a saliva exercer potencial remineralizador, mantendo o equilíbrio da “des-re” e o tempo para formar a lesão de cárie será indeterminado, sendo um fator relativo na etiologia da cárie (Lima, 2008).

A lesão de cárie pode ser evitada e controlada mesmo em situações de alta experiência de cárie, pelo controle periódico de placa, que deve ser inversamente proporcional à freqüência de dieta cariogênica, permitindo o reequilíbrio “des-re”, impedindo a irreversibilidade das lesões. Outros fatores como: os salivares, imunológicos, socioeconômicos, culturais, comportamentais, contagem de microrganismos e fluoroterapia

são de importância relativa no estabelecimento de estratégias preventivas (Lima, 2008).

1.2- *Streptococcus mutans*

Streptococcus do grupo *mutans* (SM) foram descobertos no início do século XX, e descritos como “mutantes” por sua morfologia celular ser mais achatada do que outros estreptococos (Banas, 2003). A associação do *Streptococcus mutans* (SM) com a cárie dental não foi reconhecida até que em 1960 pesquisadores reavivaram o interesse pela bactéria. SM são versáteis microrganismos na etiologia da cárie dental (Menaker, 1984). SM são os principais habitantes da cavidade oral, sendo encontrados em 90% dos humanos (Baratieri, 1992).

SM são bactérias não esporuladas, catalase negativas, possuindo uma parede celular constituída de proteínas, carboidratos e peptidoglicanos (Jawetz *et al*, 1998). Microscopicamente as células do SM são cocos Gram positivas, tem morfologia ovalada e medem cerca 0,5 a 0,75 μm de diâmetro, unidas aos pares ou em cadeias curtas ou médias, e suas colônias tem tonalidade azul-clara, bordas onduladas e interior granular, são anaeróbios facultativos e sua temperatura ótima de crescimento é de 37°C (Burnet *et al*, 1978).

Para crescimento desta bactéria, exige-se a seleção de um meio de cultura rico em nutrientes onde essa espécie cresce mais quando na presença de 5% de gás carbônico (Uzeda, 2002). O melhor meio seletivo para isolar SM é o ágar *mitis salivarius* bacitracina, associado com 20% de sacarose e 0,2 unidades/ml de bacitracina, crescendo unicamente o SM e suprimindo a maioria dos outros estreptococos (Newbrun, 1988). SM não hidrolisa arginina, é α hemolítico promovendo no meio ágar sangue, onde suas colônias são brancas ou cinza, circular ou irregular e unidas ao ágar (Uzeda, 2002), hemólise parcial de eritrócitos (Newman e Nisengard, 1994). SM tem viabilidade de 100% em valores de pH entre 5,5 e 6,0 para seu crescimento e multiplicação, valores de 91% a 98% no pH 5,0 e no pH 3,0 suas células morrem (Li, 2001).

A identificação de SM é baseada na sua morfologia de suas colônias, seletividade ao meio de cultura, coloração de Gram, morfologia na microscopia ótica e suas características de crescimento em relação ao padrão enzimático e assimilação de açúcares (Koneman *et al*, 2001). A simples detecção não implica que haverá o desenvolvimento da cárie dental, já que fatores socioeconômicos, culturais, ambientais (Mattos-Graner *et al*, 2001), além de uma dieta de alto teor de sacarose e a qualidade e frequência da higiene bucal são primordiais

para o seu desenvolvimento (Barbieri, 2005).

SM foram originalmente descritos como uma única espécie dividida em 8 grupos de *a* a *h* devido a especificidade sorológica dos antígenos de carboidratos da parede celular e são classificados SM sorotipo *c*, *e* e *f* que são os membros do grupo *mutans* que predominam no homem (Bentley *et al*, 1991).

Segundo Kolenbrander e London (1993), SM se tornaram importantes agentes patogênicos, associados com o início e patogenia da cárie dental. Esses autores observaram que colonização de SM aos dentes ocorre em duas fases distintas, independentes, a fase primária é dependente da interação específica de proteínas da película adquirida do esmalte com moléculas de superfície da célula bacteriana denominadas adesinas, a fase secundária é denominada de acúmulo e propicia o aumento do número de células bacterianas na placa dental, porém SM não são bons colonizadores primários dos dentes devido suas adesinas terem pouca afinidade a película adquirida em relação as de outras bactérias.

A adesão de SM na placa dental pode ser mediada por uma via dependente de sacarose e responsável pela colonização ao hospedeiro com papel proeminente em iniciar mudanças na ecologia da placa e podendo envolver a ligação do glucano a bactéria ou a adesão do SM ao glucano na placa dental, já que *in vitro* na presença de sacarose, SM se encobre de glucano (Banas, 2003).

Existe ainda uma via independente de sacarose onde os componentes salivares na película adquirida do esmalte iniciam a adesão, influenciados por uma proteína de 185 kDa, o antígeno I/II que tem estrutura baseada ao domínio aminoácido, mas com função variável com relação a ligar-se a aglutininas salivares, componentes da película salivar e outras bactérias da placa dental, sendo que os domínios ricos em prolina e alanina parecem responsáveis pela interação antígeno I/II e componentes salivares (Banas, 2003).

As bactérias utilizam-se dos açúcares através de dois componentes enzimáticos: um que envolve o transporte de açúcar para dentro da célula e outro para convertê-lo num metabólito a ser degradado pela via glicolítica constitutiva do microrganismo (Thylstrup e Fejerskov, 1995).

Em altos níveis de concentração de açúcares o produto final de excreção é o ácido láctico da via lactato desidrogenase, e nos baixos níveis de açúcar, a via piruvato formato-liase gera ácido fórmico, acético e etanol (Takahashi-Abbe *et al*, 2003). No citoplasma, os açúcares são convertidos e degradados através da via glicolítica que em SM é a via *Embden-Meyorhof*, para obtenção de energia celular e síntese de material celular, e a glicose

metabolizada na via glicolítica tem a via hexose monofosfato que produz precursores celulares e diminui o gasto energético para a biossíntese (Thylstrup e Fejerskov, 1995).

A degradação da glicose fornece energia para célula em ATP (adenosina trifosfato) ou pela fosforilação no substrato ou no transporte de elétrons. Na fosforilação no substrato, compostos ricos em energia servem de substrato para quinase, formando ATP e na fosforilação por transporte de elétrons, eventos conservam a energia como gradiente eletromecânico de próton pela membrana celular, da transferência e elétrons dos substratos reduzidos (Takahashi-Abbe *et al*, 2003), resultando na expulsão de prótons da célula, formando gradiente de concentração de prótons e diferença de carga elétrica na membrana, a força motriz do próton para geração de ATP e o movimento flagelar e fornecer energia para o transporte celular (McNeill e Hamilton, 2003).

SM que não possui sistema de transporte de elétrons na sua membrana, a força motriz do próton é gerada pela expulsão de íons da célula pela ATPase de hidrogênios com produtos finais como ácido láctico, num processo denominado efluxo do produto final (Dashper e Reynolds, 1996).

Na cavidade oral ocorrem períodos maiores de falta de alimentos e também períodos de excesso de alimentos, prejudiciais às bactérias, assim, o metabolismo é regulado pelo índice de glicólise, pela conversão eficaz do açúcar em produtos finais metabólicos, pela síntese de polissacarídeos intra e extra-celulares e pela inibição do sistema de transporte de açúcares (Wright *et al*, 2002).

SM e outros estreptococos bucais produzem enzimas chamadas glicosiltransferases (GTF), que transformam a sacarose da dieta em glicose e frutose, além de unirem moléculas de glicose através de ligações glicosídicas α 1,6 e α 1,3 para formar glucanos insolúveis em água (Banas, 2003). Os glucanos capacitam, em parte ao hidrogênio ligado aos polímeros de glucano, a adesão de microrganismos ao esmalte dental por coagregação aderindo e permitindo a colonização de outras bactérias inábeis na adesão direta durante a formação da matriz do biofilme dental, chamada película adquirida (Nyvaad, 1993), sendo que especificamente SM formam ácidos que desmineralizam o esmalte dentário iniciando a lesão de cárie (Grönroos, 2000).

A aderência dos SM é mediada por adesinas das superfícies das bactérias associadas a fimbrias ou fibrilas e receptores da superfície oral que são componentes salivares como mucinas, glicoproteínas, amilase, lisozima, imunoglobulinas A e G, proteínas esterterinas e componentes bacterianos ligados a superfície oral (Rudney *et al*, 1995), constituídas de

polissacarídeos, GTF e lectinas, que são adesinas protéicas com afinidade específica por carboidratos. Existe mais de um tipo de adesina na superfície celular e interação multiplamente facilitando a ligação com as moléculas da película adquirida e receptores de outras bactérias (Marsh, 2004).

Essa relação dos SM com o biofilme é o mecanismo no qual ele se adapta ao meio ambiente e se torna dependente do biofilme para sobreviver e ter viabilidade no seu ecossistema (Li *et al*, 2001). Além de sintetizar os polissacarídeos extra-celulares (glucanos), SM são os únicos que aumentam a sua colonização, aderência e acúmulo em presença de sacarose, e parecem produzir mais ácidos do que outras bactérias bucais, pois fermentam vários tipos de açúcares, como manitol e sorbitol (De Lorenzo, 2004). SM são mais resistentes aos ácidos (Gronroos, 2000), sendo regulados pelo Sistema *Quorum Sensing* que é ativado para a tolerância ácida e formação do biofilme pela bactéria, através da sua expressão genética em resposta a alterações na densidade populacional de microrganismos (Li *et al*, 2002).

As propriedades de virulência do SM são a tolerância ácida, a produção de ácidos e a atividade proteolítica, que permitem a sobrevivência do microrganismo no biofilme adaptando-se no seu ambiente, por meio de adesinas, glicosiltransferases, polissacarídeos extracelulares e degradação de colágeno do substrato (Jackson *et al*, 1997).

SM também sintetizam polissacarídeos intra-celulares (PIC), que são metabolizados para produção de ácidos na falta de carboidratos fermentáveis exógenos (Gronroos, 2000), já que é importante que os microrganismos tenham energia para regulação osmótica, manutenção do pH intracelular e renovação de proteínas e ácidos nucleicos e as necessidades são suplementadas a partir de fontes endógenas. Quando houver açúcares em excesso, o glicogênio será a fonte de energia potencial em forma de polissacarídeo intracelular, assim ocorre um aumento no reservatório intracelular de frutose 1,6 bifosfato e intermediários glicolíticos e inicia-se a síntese de polissacarídeos pela atuação da ADP-glicose fosforilase (Thylstrup e Fejerskov, 1995). Os PIC atuam drenando os intermediários glicolíticos da célula, protegendo contra metabólitos intermediários tóxicos (Iwami *et al*, 2001). Quando nenhum açúcar for suplementado pela dieta, os PICs são utilizados como fonte de energia e os ácidos são excretados, num mecanismo regulado pelos níveis exógenos de açúcar, onde nos baixos níveis a reserva intracelular aumenta, resultando na ativação de glicogênio fosforilase e consumo da reserva intracelular de polissacarídeos (Thylstrup e Fejerskov, 1995).

1.3 – A enzima glicosiltransferase (GTF)

SM secreta 3 tipos de GTF: (B, C e D) que são oriundas de genes GTF B, C e D (Hanada e Kuramitsu, 1989). As GTF liberadas pelos SM na película adquirida do esmalte estão na sua forma ativa (Rolla *et al*, 1983). A GTF B tem um peso molecular de 148 kDa e catalisa a síntese de glucano insolúvel em água, predominantemente cadeias α 1,3 entre as glicoses (Fukushima *et al*, 1992), a GTF D em torno de 143 kDa e catalisa a produção de cadeias α 1,6 de glucano solúvel em água (Hanada e Kuramitsu, 1989) e a GTF C com peso molecular de 138 kDa forma os glucanos solúvel e insolúvel em água (Fukushima *et al*, 1992). A GTF solúvel é extracelular e sintetiza dextrano, a GTF insolúvel e a GTF insolúvel e solúvel são enzimas de superfície bacteriana e tem afinidade para o dextrano e sintetizam o mutano (Kuramitsu e Nakano, 1992).

Além do SM vários outros estreptococos secretam GTF extracelular que podem contribuir para aderência deles à película (Russell, 1994). As GTF do SM cooperativamente sintetizam glucano insolúvel em água a partir da sacarose, e facilitam a habilidade dos SM colonizarem sobre a superfície dental e formar a placa bacteriana (Ando *et al*, 2003).

As GTF são fortemente envolvidas na utilização de sacarose como substrato e produzem frutose e glucano com ligações α 1,3 e α 1,6 como produtos. As GTF B e C são fatores de virulência associados com a patogênese da cárie dental (Koo *et al*, 2002). Outros estudos mostram a importância da produção de glucano insolúvel na virulência de SM (Yamashita *et al*, 1993).

As GTF B, C e D foram purificadas por uma coluna de cromatografia de hidroxiapatita e o sobrenadante da cultura analisados, sendo que todas enzimas foram ativas em solução e em película experimental, formada de saliva humana em contato com a GTF em uma superfície de hidroxiapatita. Os valores de Km para o substrato sacarose de todas as enzimas foram baixos quando a enzima foi adsorvida à superfície, comparados quando em solução. Os autores relataram que o glucano formado pela GTF B ou GTF C, mas não pela D, sobre a película experimental da GTF aumentou a aderência de SM por 7 a 9 vezes comparado a aderência quando nenhum glucano estava presente na superfície da película. Os resultados mostram que as GTF B, C e D são enzimicamente ativas no estado adsorvido e que a natureza do glucano produzido por elas pode influenciar a aderência dos estreptococos orais em uma película experimental (Venkitaraman *et al*, 1995).

1.4 – Os Glucanos

O glucano é formado por monômeros de glicose unidos por ligações glicosílicas de tipo α 1,3 e α 1,6, sendo um polissacarídeo extracelular. Glucanos são constituídos de matrizes altamente hidratadas, os glicocálices, formados por heteropolissacarídeos e podendo conter polipeptídeos. Os precursores dos glucanos formam-se no citoplasma, sendo transportados pela membrana celular por carreadores lipídicos e polimerizados externamente a membrana. SM e outros estreptococos sintetizam polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose, por meio de enzimas, as GTF, que clivam a sacarose, liberando a frutose e obtendo energia para conversão extracelular de glicose em glucanos ramificados (Banas, 2003).

Alguns dos glucanos que tem as moléculas de glicose com ligações α 1,3, são altamente insolúveis em água, rígidos e formam agregados fibrosos, chamados mutanos. O glucano insolúvel formado pela GTF B e C tem uma preponderância maior que 85% de cadeias α 1,3 entre as moléculas de glicose, e o restante sendo cadeias α 1,6 e α 1,3 (Fukushima *et al*, 1992). Por outro lado, os glucanos chamados dextransos, que tem ligações α 1,6, possuem cadeias flexíveis e são solúveis em água (Banas, 2003).

Os glucanos promovem o acúmulo de SM na superfície dental (Wiater *et al*, 1999) e contribuem para o volume, cariogenicidade e integridade estrutural do biofilme dental (Cury *et al*, 2000), e, além de ser um essencial fator de virulência dos SM relacionado a patogênese da cárie dental (Yamashita *et al*, 1993), são reserva de energia para bactérias, reguladores da permeabilidade da placa dental controlando a acidez nos dentes (Colby e Russell, 1997).

1.5 – O biofilme dental

O termo biofilme corresponde a comunidade estruturada de microrganismos aderidos a uma superfície inerte ou viva dentro de uma matriz de polímeros extracelulares sob contínua ação de um fluxo num ambiente não estável (Leite *et al*, 2001).

Os biofilmes são formados de um ou vários microrganismos, um deles predomina numa alta diversidade microbiana e passa a interagir com o hospedeiro e conviver junto aos microrganismos oportunistas, além disso o biofilme facilita a sobrevivência e protege os microrganismos contra adversidades ambientais e nutricionais (Leite *et al*, 2001).

O biofilme dental é essencial para que ocorra a cárie dental e a doença periodontal. No biofilme cariogênico prevalece espécies de SM que produzem ácido lático quando na

presença de glicose, baixando o pH e desmineralizando o esmalte dental, além de outros microrganismos acidogênicos (Hamada e Slade, 1980).

É importante compreender a formação e virulência do biofilme em função do tempo, fatores imunológicos e microbianos, pois este é o fator chave para resolver as patologias bucais de origem bacteriana (Montanaro *et al*, 2004).

O biofilme dental forma-se em 4 fases: formação de um filme condicionante ou película no dente formada por glicoproteínas salivares, aderência, maturação e desenvolvimento (Rozen *et al*, 2001). A adesão das bactérias é um processo complexo multifatorial, influenciado pelo ambiente bucal, morfologia dental, superfície bacteriana, hábitos do hospedeiro e superfície do substrato (Alves *et al*, 2006).

A remoção mecânica do biofilme é o método mais aceito para o seu controle (Jardim *et al*, 1998). Diante da dificuldade em manter indivíduos motivados a realizar adequada limpeza da cavidade bucal, com o objetivo de controlar o biofilme bucal é válido e necessário associar métodos químicos aos mecânicos para controle da microbiota (Castro, 2001).

Vários fatores estão associados ao processo de adesão: interação de proteínas, adesinas, lectinas e interações hidrofóbicas. A interferência com a adesão bacteriana na superfície dos dentes pode ser um caminho para obter-se controle do biofilme dental, influenciada por ação de agentes antimicrobianos naturais, nos estágios iniciais e reversíveis de formação do biofilme, que ocorre na aderência bacteriana à película adquirida, prevenindo a instalação de patologias orais. No segundo estágio de desenvolvimento do biofilme, pode ser prevenida a síntese de glucanos insolúveis, inibindo atividade da GTF que ocorre via dependente de sacarose (Pereira *et al*, 2006).

1.6 - Produtos naturais como inibidores de GTF

Em decorrência da incidência de doenças orais, do aumento da resistência de bactérias aos antibióticos e dos efeitos adversos de alguns agentes antibacterianos usados na odontologia, existe a necessidade de novas alternativas de prevenção e tratamento que sejam seguras, efetivas e econômicas (Palombo, 2009).

Além disso, os produtos naturais são preferidos por uma grande parte da população e demonstram possuir atividade antimicrobiana. Os extratos isolados de plantas usados na medicina tradicional têm sido apontados como uma excelente alternativa às substâncias

químicas sintéticas para prevenir as cáries (Palombo, 2009). Muitos agentes químicos usados comercialmente podem alterar a microbiota e ter efeitos indesejáveis como vômitos, diarreia e manchamento dental (Palombo, 2009).

Dentre as plantas que tem mostrado efeito antibacteriano e antiaderente está a *Punica granatum L.* (Pereira *et al*, 2006). Otake *et al* (1991) mostraram que o chá-verde possui efeito anti-cárie. Já o chá-preto, num estudo de Linke e Geros (2003) inibiu a formação de cáries em ratos. Estudo recente realizado com o chá-verde por Ghaemi *et al* (2008), mostrou inibição do crescimento e formação do biofilme dental. Segundo Koo *et al* (2002) a própolis também tem efeito inibitório sobre a atividade da enzima glicosiltransferase. Tsai *et al* (2007), observou efeito inibitório sobre a atividade da enzima glicosiltransferase usando extratos de *Rosmarinus officinalis Linn* sobre *Streptococcus sobrinus*.

1.6.1 – *Rosmarinus officinalis L.* (alecrim)

O alecrim é amplamente usado em todo mundo como erva medicinal. As plantas medicinais são encontradas no Brasil de diversas formas, chá, xarope e tinturas (Matos, 1997).

O alecrim é um arbusto aromático da família *Labiatae* e possui folhas com pequenas glândulas contendo óleo aromático (Al-Sereiti *et al*, 1999).

O alecrim apresenta propriedade analgésica, espasmolítica, antiinflamatória, antifúngica, bem como atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Porém são raros relatos da atividade antimicrobiana do extrato de alecrim sobre microrganismos do biofilme dental (Queiroz, 2008).

Seu óleo essencial constitui-se de hidrocarbonetos monoterpênicos, ésteres terpênicos, linalol, verbinol, terpineol, 3-octanona acetato de isobornila. Os terpenóides são carnosol, ácido carnosílico, oleânico, ursólico e outros. Os flavonóides são diosmetina, diosmina, gencuonina, luteolina, hispidulina e apigenina. Contém ácido rosmarínico, caféico, clorogênico, neoclorogênico e labiático (Alonso, 1998).

O extrato de alecrim é usado na indústria de alimentos por seu potencial antioxidante (Frankel *et al*, 1996), além de ser benéfico para saúde com efeitos de proteção do fígado (Sotelo-Felix *et al*, 2002) e antiulcerogênico (Dias *et al*, 2000).

Takarada *et al* (2004), afirmaram que o óleo essencial de alecrim demonstrou efeito

inibitório da aderência de *S. mutans* e atividade inibitória do crescimento de bactérias Gram-negativas (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum*).

1.6.2- *Camelia sinensis* (chá verde)

As catequinas do chá verde, como as epicatequinas, epicatequinas galato, e epigalocatequinas galato são responsáveis pelos efeitos biológicos tais como bactericidas, a inibição da produção de glucano e a prevenção da aderência bacteriana à superfície dental (Sasaki *et al*, 2004). Além disto, estas substâncias podem ter o potencial de reduzir a destruição periodontal, resultante da atividade da proteinase da *Porphyromonas gingivalis* (Okamoto *et al*, 2004).

Estudos mostram que as catequinas do chá verde podem inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas com potencial moderado, entre elas SM (Sakanaka *et al*, 1989). A atividade dos compostos fenólicos pode ser explicada baseando-se em fortes ligações de hidrogênio, que poderiam alterar o ataque inicial de SM *in vitro* pela ligação de proteínas ricas em prolina encontradas na película salivar ou com ácido lipoteicóico sobre a superfície bacteriana (Badria e Zidan, 2004). A decocção do chá verde inibe a α -amilase na saliva humana, reduzindo a maltose liberada em 70% e diminuindo o potencial cariogênico do amido da comida (Mckay e Blumberg, 2002).

Zhang e Kashket (1998), também observaram que o extrato do chá verde inibe a amilase salivar humana e pode reduzir o potencial cariogênico do amido presente nos alimentos como as bolachas e bolos, pois este reduz a tendência deste tipo de alimento liberar lentamente porções de carboidratos fermentáveis. Parece que a simultânea presença de chá verde na dieta pode reduzir o potencial cariogênico da dieta. Apesar do conteúdo de polifenol, o chá verde é uma natural reserva de flúor e um veículo de liberação de flúor na cavidade oral.

Segundo Ghaemi *et al* (2008), o chá verde (não fermentado) na concentração de 1 mg/ml, não causou inibição da formação de biofilme após 7 dias de tratamento, porém com 3 mg/ml do extrato houve efeito bactericida sobre SM. O extrato de chá-verde exibiu a maior inibição da atividade da glicosiltransferase entre vários outros extratos de ervas (Limsong *et al*, 2004). Num estudo recente com 2 tipos de chás testados sobre SM, o chá preto, semi-fermentado da *Camelia sinensis* pareceu ser mais efetivo contra crescimento e formação do biofilme do que o chá verde, não fermentado (Ghaemi *et al*, 2008).

Foi demonstrado que o chá verde pode inativar a glicosiltransferase e a dextranucrase, e assim inibir a formação de glucano insolúvel em água e ácido láctico (Otake *et al*, 1991).

A suplementação da água ingerida pelos ratos com 0,1% de chá verde junto a uma dieta cariogênica foi capaz de reduzir significativamente as lesões de cárie de fissura (Wu e Wei, 2002). Linke e LeGeros (2003) indicaram que o freqüente consumo de chá verde pode diminuir a formação de cáries, mesmo na presença de açúcares da dieta. Ratos infectados com SM e alimentados com uma dieta cariogênica em presença de chá verde tiveram seus níveis de cárie reduzidos (Cabrera *et al*, 2006).

De acordo com Simpson *et al* (2001), após ingerir a infusão de chá-verde, cerca de 34% do fluoreto contido nele se liga fortemente aos tecidos orais, tendo um impacto positivo na prevenção da perda dental.

Isso ocorre pelo mecanismo de ação do flúor, onde os dentes trocam íons cálcio e fósforo com a saliva, variando de acordo com o pH do meio. Quando o flúor está presente no meio bucal, a reposição mineral da saliva aumenta com formação de hidroxiapatita, num pH maior ou igual a 5,5, e o dente ainda recebe íons na forma de fluorapatita. Se o pH cair abaixo de 5,5, a saliva perde a capacidade de reposição mineral, e o dente recebe íons cálcio e fósforo, na forma de fluorapatita, devido à presença de flúor. Constata-se a grande atuação preventiva do flúor, que só é mantida se o pH estiver acima de 4,5. Se o pH cair abaixo deste valor, ocorre a perda de íons cálcio e fósforo, e caso perdure, haverá cavitação. Caso o pH volte a subir, o dente volta a receber íons na forma de fluorapatita ou na forma de hidroxiapatita e fluorapatita, dependendo do pH do meio (Pinto, 1998).

Sugere-se que o extrato do chá verde pode ser responsável por notados efeitos na saúde oral, pela inibição do crescimento das bactérias como SM. Muitos estudos indicaram que o chá verde inibe o crescimento, produção ácida, metabolismo, e atividade da enzima glicosiltransferase do SM e placa dental bacteriana, como conseqüência, o chá verde é considerado como alimento funcional para saúde oral e é usado em formulações de cremes dentais (Wu e Wei, 2002).

1.6.3– *Ilex paraguariensis* A. St.-Hill (erva-mate)

É uma planta perene que cresce no Sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina, sendo a fonte de uma bebida estimulante chamada “mate”, preparada após a infusão de folhas secas ricas em cafeína (Kubo *et al* 1993).

O consumo de bebidas a base de erva-mate remonta de centenas de anos, e sua utilização na medicina popular e por herboristas é recomendada para artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, hemorróidas, obesidade, fadiga, retenção de líquido, hipertensão, digestão lenta e desordens hepáticas. As xantinas cafeína, teobromina, teofilina e os compostos fenólicos como ácido cafeico e seus derivados, principalmente os ácidos clorogênicos são responsáveis por vários dos efeitos farmacológicos citados (Bastos *et al*, 2007). Suas propriedades estimulantes são devidas a presença de metilxantinas, cafeína e teobromina (Coelho *et al* 2001).

Os chás são bebidas populares e fontes significativas de compostos fenólicos, são considerados integrantes das dietas devido ao seu potencial antioxidante. Alguns estudos anteriores indicaram atividade antioxidante de infusões de erva-mate (Chandra e Mejia, 2004). Nestes trabalhos, os autores relataram a potente atividade antioxidante de infusões aquosas de erva-mate, tanto *in vitro* como *in vivo*. O mecanismo proposto relaciona-se com a presença, nas infusões, de substâncias capazes de seqüestrar radicais livres formados no início do processo de oxidação.

Em experimentos recentes realizados utilizando animais, foi verificado que a atividade antioxidante, relativo a proteção da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados (Martins *et al*, 2009) e proteção de dano de DNA (Miranda *et al*, 2008), pode ser detectada após a administração oral por 60 dias de chá mate solúvel (fabricante Leão Jr.) nas concentrações de 1,0 g/kg e 2,0 g/kg de peso do animal. Estudos em humanos também comprovaram estes efeitos (Matsumoto *et al*, 2009).

Kubo *et al* (1993), comprovaram a atividade antimicrobiana de *Ilex paraguariensis* frente a bactérias e fungos patogênicos. Dentre as bactérias que sofreram inibição total encontram-se *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. O extrato n-hexano da erva-mate inibe espectro de atividade antimicrobiana.

Por outro lado, na literatura não há nenhum trabalho sobre o efeito do extrato de *Ilex paraguariensis* na atividade da glicosiltransferase.

2 – OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral:

Investigar o efeito inibitório *in vitro* de extratos vegetais sobre a atividade da

glicosiltransferase e sobre o crescimento de *Streptococcus mutans*.

2.2-Objetivos específicos:

1. Estudar a cinética de crescimento de *Streptococcus mutans*, bem como a quantificação dos glucanos produzidos por esta bactéria.
2. Determinar a atividade e parâmetros cinéticos da glicosiltransferase de *Streptococcus mutans*.
3. Investigar o efeito inibidor do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a atividade da GTF produzida por *Streptococcus mutans*.
4. Investigar a atividade antibacteriana dos extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), mate (*Ilex paraguariensis*) e chá verde (*Camelia sinensis*) sobre o crescimento de *Streptococcus mutans*.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismo e condições de crescimento

Utilizamos no estudo a linhagem bacteriana de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (ATCC; Rockville, MD, USA), armazenada no Laboratório de Microbiologia da Universidade São Francisco. O microrganismo foi cultivado a 37°C em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Tabela 1), em anaerobiose, com os tubos colocados dentro de um recipiente com tampa fechada e vedados junto à chama de vela para consumo quase total do oxigênio. O caldo (1200 mL) foi preparado após dissolução em água destilada (37g/L) e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. Os meios de cultura foram inoculados com uma suspensão celular de SM numa concentração final de 10% (v/v). A manipulação foi realizada numa câmara de fluxo laminar e à chama.

Tabela 1 – Composição do meio BHI utilizado para crescimento de *S mutans*

	<i>Composição (g/L)</i>
Infusão de cérebro de vitelo	12,5
Infusão de coração de boi	5
Peptona	10
Cloreto de Sódio	5
D (+) – Glicose	2
Dihidrogenofosfato de Sódio	2,5

3.2. Curva de crescimento de *Streptococcus mutans*

O perfil de crescimento de células de *Streptococcus mutans* em caldo BHI ao longo do tempo de incubação foi obtido por leituras de absorvância a 600nm. Após a incubação das culturas a 37°C por 24horas, retirou-se de hora em hora alíquotas de 5mL para determinar a absorvância a 600nm no espectrofotômetro (Jenway 6105 UV/VIS) e o valor de pH em pHmetro (Digimed DM-20). O restante da cultura foi centrifugado a 10000 g por 30 minutos, para remoção de células. O sobrenadante congelado para experimentos posteriores. Os ensaios foram realizados em duplicata (n=2).

3.3. Quantificação dos produtos (expresso em hexoses neutras) presentes no sobrenadante da cultura.

Streptococcus mutans utiliza uma enzima, a GTF, para produzir glucanos usando como substrato a glicose, monossacarídeo presente no meio de cultura. Assim, ao longo do crescimento celular das culturas de SM, a bactéria faz uso da glicose para a síntese de glucano, o que resulta numa variação da quantidade de açúcares redutores presentes no sobrenadante da cultura.

Com o objetivo de separar as frações de elevada massa molecular das de baixa massa molecular, estas últimas provavelmente compostas por componentes do meio de cultura inicial, 1,5 mL de sobrenadante foi centrifugado com *centricons* YM-30 (limite de exclusão 30000 *Milipore*) durante 30 minutos a 3000g a 4°C. Foram obtidas duas frações: a de baixa massa molecular e a de alta massa molecular, e em seguida foi determinada a concentração em hexoses neutras para cada fração segundo o método do fenol-ácido sulfúrico e leitura da absorvância a 490 nm (Dubois, 1956). Os resultados foram expressos em concentração de

hexoses (μg) por mL de meio de cultivo utilizando a curva padrão de glicose (Anexo 1).

3.4. Obtenção e caracterização da Glicosiltransferase (GTF)

3.4.1. Preparação de extratos de GTF

Foram preparados e autoclavados 1200 mL de meio de cultura BHI, e inoculados com 100 mL de suspensão celular de *Streptococcus mutans*, e posteriormente incubados a 37° C por 18 horas em condições anaeróbicas. As células foram removidas por centrifugação a 10000g a 4° C por 30 minutos e o pH do sobrenadante ajustado para 6,8 com NaOH 2M. O sobrenadante recolhido foi precipitado com sulfato de amônio (50% p/v de saturação) por 1 hora a 4° C e centrifugado a 10000g a 4° C por 20 minutos. O precipitado foi dissolvido em tampão fosfato 0,1M (pH 6,8) e dialisado (em sacos de diálise da Sigma, tamanho do poro 12 kDa) por 24 horas contra tampão fosfato 0,001M (pH 6,0) contendo 0,01 de azida de sódio e 1mM de PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) a 4° C (Tsai *et al*, 2007). Posteriormente o extrato foi liofilizado num período de 12 horas e denominado extrato de GTF bruto, o qual foi utilizado para os estudos subsequentes. O extrato seco ficou armazenado em freezer a -20° C.

3.4.2. Determinação da atividade de GTF de *Streptococcus mutans*

Considerando que a GTF degrada a sacarose em seus monossacarídeos constituintes e depois utiliza a glicose para formar os glucanos, os testes de atividade da enzima foram realizados a partir da quantidade de açúcares redutores presentes no meio de reação, contendo o substrato sacarose. A atividade específica da enzima foi expressa em μmol de glicose residual (U) no meio/ mg de proteína total. Além disto, foi realizada também a determinação dos glucanos (solúveis e insolúveis) formados nesta reação conforme item 3.4.2.3.

3.4.2.1. Determinação de açúcares redutores

Ao meio de reação contendo 400 μL de solução de sacarose 10% (m/v) em solução tampão citrato-fosfato 0,1M pH 6,3 foi adicionado a 50 μL de extrato de GTF, preparado em três concentrações diferentes (0,5, 0,75 e 1 mg/mL) em solução tampão citrato-fosfato

0,1M pH 6,3. A mistura foi incubada a 35° C por 20 minutos com leve agitação. Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogy-Nelson (Somogy, 1945) conforme descrito abaixo.

Após incubação misturou-se 0,5 mL do meio de reação descrito acima + 1 mL de reagente Somogy-Nelson I, agitou-se e pôs em banho-maria em ebulição por 6 minutos. Resfriou-se os tubos a temperatura ambiente, em seguida adicionou-se 1 mL de reagente Somogy-Nelson II, agitou-se os tubos e foram deixados em repouso por 5 minutos. Então foram adicionados 10 mL de água destilada e misturados por inversão. Mediu-se a absorbância a 540 nm contra o branco. Foi preparado tubo branco substituindo-se a enzima por água destilada no sistema de reação. Os resultados foram expressos em concentração de glicose (μg) por mL de meio de cultivo utilizando uma curva padrão de glicose (Anexo 2).

3.4.2.2. Quantificação de proteína total

A concentração de proteínas totais das preparações enzimáticas foi determinada baseada na metodologia proposta por Lowry *et al* (1951), utilizando albumina bovina como padrão.

3.4.2.3. Quantificação dos glucanos

A formação dos glucanos foi determinada utilizando um sistema de reação composto de 3mL de solução de sacarose 10% (m/v) em solução tampão citrato-fosfato 0,1M pH 6,3, e 0,5 mL de extrato de GTF (1 mg/mL) preparado no mesmo tampão. A mistura foi incubada a 37° C na estufa por 18 horas com leve agitação. A absorbância foi lida de hora em hora a 560 nm até o tempo final de 18 horas (Makaya, 2007). Foi realizado um tubo controle sem adição da enzima.

3.4.2.4. Determinação dos parâmetros cinéticos da reação

Para determinação do efeito da concentração do substrato sacarose na velocidade da reação enzimática, alíquotas de 50 μL de extrato de GTF (0,5 e 1,0 mg/mL) foram adicionados aos tubos contendo 400 μL de solução de sacarose em diferentes concentrações (de 1 a 10% m/v), em solução tampão citrato-fosfato 0,1M pH 6,3. A mistura foi incubada a 35° C por 20 minutos e os açúcares redutores determinados pelo método de Somogy-Nelson conforme item 3.4.2.1. A velocidade da reação foi expressa como quantidade de glicose

formada (μg) por mL de meio utilizando uma curva padrão de glicose (Anexo 2).

3.5. Inibição da atividade da glicosiltransferase por extratos vegetais

As folhas secas de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) e do chá mate (*Ilex paraguariensis*) foram adquiridas em supermercado em Bragança Paulista – SP, Brasil. As folhas foram embebidas em água deionizada (5% m/v) aquecendo por 5 minutos. A infusão aquosa foi resfriada a temperatura ambiente, centrifugada, filtrada e armazenada em geladeira.

No meio de reação contendo 400 μL de solução de sacarose (10 % m/v) e 50 μL de extrato de GTF (1 mg/mL) foram adicionados diferentes concentrações finais de extrato aquoso de alecrim e de mate (4, 8 e 16mg/mL). A mistura foi incubada a 35° C por 20 minutos e os açúcares redutores determinados pelo método de Somogy-Nelson conforme descrição do item 3.4.2.1. Os controles foram preparados sem a presença dos extratos vegetais e os resultados expressos em quantidade de açúcares redutores residuais presentes no meio. Para efeitos de comparação, alguns testes foram realizados com o uso de clorexidina (0,06 e 0,12 mg/mL) utilizando as mesmas condições descritas acima. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de diferentes extratos sobre o crescimento de *Streptococcus mutans*

A atividade anti-estreptocócica dos extratos vegetais foi avaliada por determinar os valores obtidos de Concentração Inibitória Mínima por um método modificado de diluição em caldo BHI. Os extratos utilizados foram: alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*), mate (*Ilex paraguariensis*) e chá verde (*Camelia sinensis*), os quais foram preparados por infusão na concentração de 5% m/v conforme descrito acima.

Em resumo, culturas de *Streptococcus mutans* foram ajustados a 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Os extratos de alecrim, chá verde e chá-mate foram diluídos com água destilada resultando em concentrações de 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 e 8 mg/mL de extrato aquoso. Em tubos estéreis contendo 6mL de BHI, 500 μL dos extratos inibidores diluídos nas diferentes concentrações foram adicionados 100 μL de suspensão salina bacteriana ajustada na Escala de Mcfarland de 0,5. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada concentração testada. Foram feitos 3 controles: O primeiro tubo

contendo BHI, DMSO e solução salina sem bactéria; no segundo BHI, DMSO e solução salina com bactéria e no terceiro tubo BHI e solução salina com bactéria. Após a incubação por 24 e 48h a 37° C sob condições anaeróbicas, o crescimento de *Streptococcus mutans* foi estimado com espectrofotômetro a 630nm e observada a turbidez das amostras. A CIM foi considerada a menor concentração do extrato onde não houve crescimento bacteriano visível, ou seja, uma leitura da absorbância menor que 0,05.

3.7. Determinação de fenóis totais:

O conteúdo de fenóis totais dos extratos aquosos foi determinado de acordo com o Método de Folin-Ciocalteu (Caetano, 2002). Inicialmente foi feita uma solução a 10% do extrato seco em metanol. A partir desta solução, diluiu-se 100 vezes, obtendo-se assim uma solução 0,01% m/v. Tomou-se uma alíquota de 1 mL e acrescentou-se 0,25 mL de solução tampão carbonato-tartarato (750 mL de água quente, 200g de Na₂CO₃ e 12g de tartarato de sódio), em seguida, adicionou-se então 0,025 mL de reagente Folin-Ciocalteu (Merck) e deixou-se agir em repouso por 30 minutos a temperatura de 20°C. A absorbância foi medida a 700 nm. O conteúdo de fenólicos totais expresso em mg por grama de extrato sólido, foi calculado utilizando uma curva padrão de fenol (mg/L) (Anexo 3).

3.8. Análise estatística

Análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey foram utilizados para determinar a diferença nos valores de média, baseados nos dados coletados das triplicatas de cada experimento. A significância estabelecida é de $p \leq 0,05$.

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Crescimento de *Streptococcus mutans*

4.1.1. Curva de crescimento

A Figura 1 mostra a os valores médios de variação de Absorbância (A) em função do tempo referente ao crescimento de *Streptococcus mutans* obtidos em duas medidas.

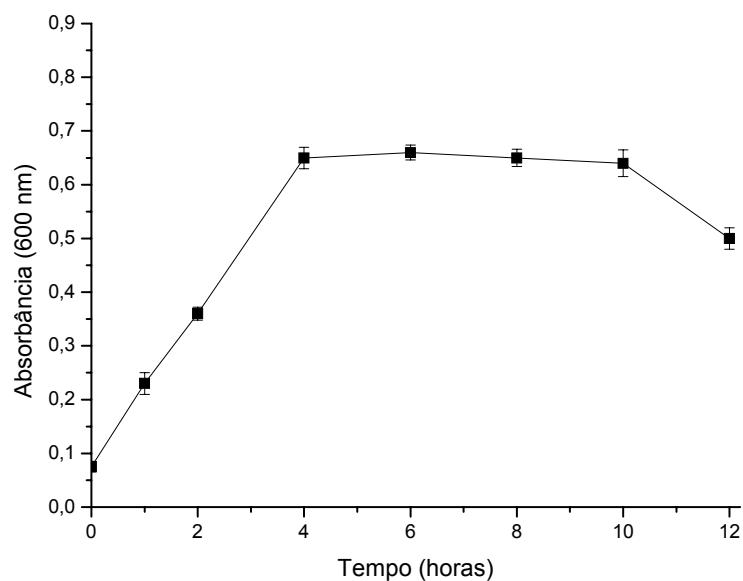


Figura 1. Perfil de crescimento da cultura de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 em caldo BHI em função do tempo

Conforme demonstrado na Figura 1 pode-se identificar três fases do crescimento bacteriano: a fase “log” ou exponencial, a fase estacionária e a fase de declínio. A fase “lag” ou de adaptação não foi possível visualizar, possivelmente devido a rápida adaptação da bactéria ao meio.

Passado este tempo de adaptação, as células começam a dividir-se a uma taxa constante até atingirem um máximo de crescimento e o número de células aumenta exponencialmente. É a chamada fase “log” ou exponencial. Pode ser verificado na Figura 1 que esta fase se estendeu até 4 horas.

Num sistema fechado este crescimento exponencial não pode ocorrer indefinidamente, pois a produção de metabólitos e o consumo de nutrientes essenciais chegam a um nível tal que leva a reduzir ou cessar o crescimento exponencial. A população atinge assim uma fase estacionária (a partir de 4 horas até aproximadamente 10 horas) em que não há variações significativas do número total de células. Nesta fase existe um equilíbrio entre a taxa de morte e a taxa de divisões na população bacteriana.

Depois de atingida a fase estacionária pode-se observar um pequeno declínio, o que corresponde a fase denominada fase de declínio. Nesta fase, as células morrem devido à escassez de alimentos e ao nível elevado de produtos tóxicos, criando um ambiente onde as células são incapazes de manter as suas funções vitais. Na Figura 1 podemos observar que

um pequeno declínio inicia-se após 10 horas de incubação. Essas observações são semelhantes aos estudos de Makaya (2007).

4.1.2. Variação do pH ao longo do crescimento

Conforme demonstrado na Figura 2 podemos verificar uma diminuição nos valores de pH em função do tempo (horas) obtidos pela média de duas medidas. Observamos que existe uma diminuição pronunciada do valor de pH durante as primeiras 4 horas de crescimento, que corresponde à fase exponencial da curva de crescimento de *S. mutans* em BHI. A partir das 6 horas ocorre uma estabilização do pH que corresponde à fase estacionária da curva de crescimento. Ao longo do crescimento o valor de pH variou entre 7,4 e 6,0.

Com o crescimento celular devido a produção de ácido lático é esperado a redução no valor de pH do meio de cultura. Segundo a literatura os valores de pH do caldo após crescimento de *S. mutans* tem variado entre 7,3 e 5,5 (Wiater *et al*, 1999). Makaya (2007), obtiveram valores de pH entre 6,96 e 5,99.

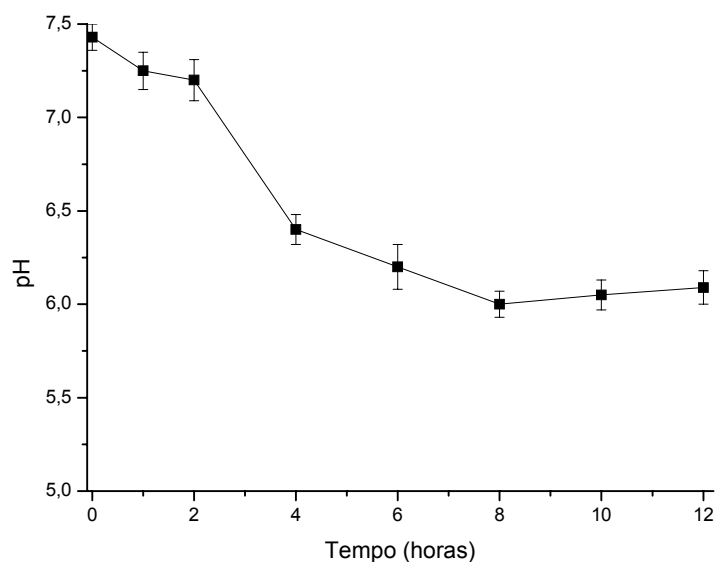


Figura 2. Variação do pH da cultura de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 após crescimento em caldo BHI em função do tempo

4.2. Estudo da variação do conteúdo de hexoses neutras presentes no sobrenadante das culturas

Conforme demonstrado na Figura 3 verifica-se que a concentração em hexoses neutras dos compostos de baixa massa molecular presentes no sobrenadante decresce ao longo do tempo, com uma queda de 50 % aproximadamente após 10 horas de crescimento bacteriano em relação ao valor inicial.

Por outro lado, a concentração em hexoses neutras determinada na fração de compostos de alta massa molecular sofre grandes variações no decorrer do tempo. Inicialmente observa-se um crescente aumento até por volta de 6 horas de crescimento bacteriano e após este período a quantidade total de hexoses neutras na fração de alto peso molecular é reduzida.

A fração de compostos de baixa massa molecular é rica em compostos presentes no meio de cultivo e também em glicose. O decréscimo na concentração de hexoses neutras observado nesta fração indica um alto consumo da glicose pela bactéria presente no meio de cultura e uma possível formação de glucanos, seja solúvel ou insolúvel.

Em relação à inesperada redução do conteúdo de hexoses na fração de alto peso molecular a partir de 6 horas de reação é possível que seja decorrente da queda de nutrientes do meio e conseqüente uso dos glucanos como fonte de energia. Makaya (2007) observaram que os compostos de alta massa molecular permaneciam constantes, tendo um pequeno aumento após a 8ª hora de crescimento, indicando o início da formação de glucanos.

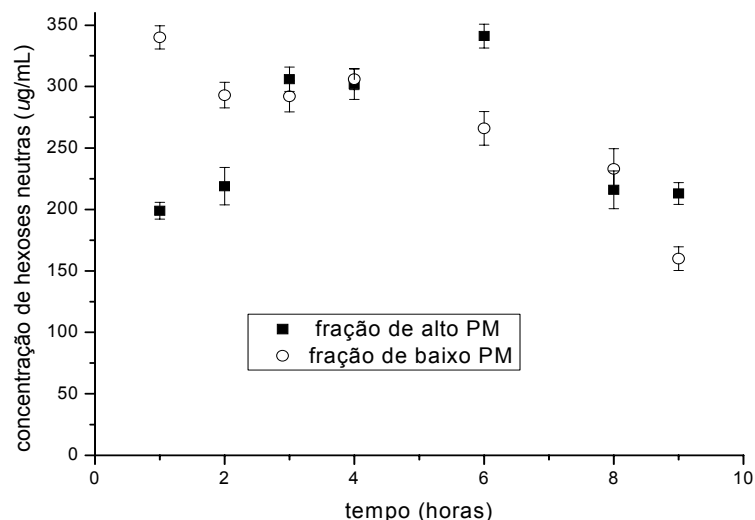


Figura 3. Variação do conteúdo de hexoses neutras nas frações de alto e baixo peso molecular do sobrenadante numa cultura de *Streptococcus mutans* crescida em BHI.

4.3. Estudo da atividade e parâmetros cinéticos da glicosiltransferase (GTF)

A Tabela 2 expressa os resultados da média da atividade da enzima bruta obtidos em dois ensaios diferentes. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de glicose residual no meio, expressa em μmol nas condições do ensaio.

Tabela 2. Atividade da enzima Glicosiltransferase de *Streptococcus mutans*

Ensaio	Atividade de GTF (U /mL de meio)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Atividade específica (U/mg de proteínas)
1	$13,4 \pm 1,6$	$10,2 \pm 0,4$	1,31
2	$15,6 \pm 2,4$	$11,4 \pm 0,7$	1,36

Para determinação dos parâmetros cinéticos da enzima utilizou-se a representação de Lineweaver-Burk (Figura 4), duplamente recíproca, ou seja, a relação $1/V$ e $1/[S]$ é linear se a enzima tiver comportamento que obedeça a equação de *Michaelis-Menten*. A inclinação da reta corresponde a razão $K_m/V_{m\acute{a}x}$, a interseção com o eixo $1/V$ corresponde a $1/V_{m\acute{a}x}$ e a interseção da reta extrapolada com o eixo $1/[S]$ é igual a $-1/K_m$. Assim os parâmetros K_m e $V_{m\acute{a}x}$ podem ser obtidos por leitura direta no gráfico (Bracht e Iwamoto, 2003)

A velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) de reação foi de 12,5 e 25,6 μmol de glicose/minuto

quando os sistemas de reações foram realizados com 0,5 e 1,0 mg/mL de enzima, respectivamente. Nestas condições o valor da constante de *Michaelis-Menten* (K_m) determinado foi de aproximadamente 2,5 mM. Segundo Venkitaraman *et al* (1995) os valores de K_m obtidos para a enzima GTF em presença do substrato sacarose (10mM) em solução (1000mM) e quando adsorvidas à superfície foram respectivamente de 30 e 12mM.

A constante de *Michaelis-Menten* corresponde à concentração de substrato para a qual a velocidade da reação é metade da velocidade máxima e indica a afinidade da enzima pelo substrato, sendo uma constante característica da enzima mesmo que seja também em função de condições tais como temperatura, pH e força iônica (Bracht e Iwamoto, 2003) A velocidade de reação inicial aumenta proporcionalmente com a concentração de substrato quando esta é baixa. Progressivos aumentos do substrato produzem incrementos cada vez menores de velocidade.

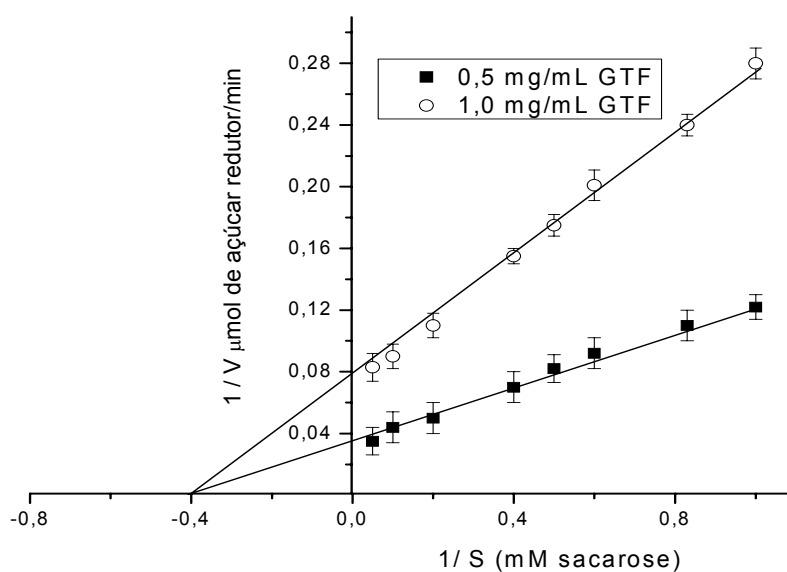


Figura 4. Efeito da concentração do substrato sacarose na atividade enzimática da glicosiltransferase de *Streptococcus mutans*.

4.4. Verificação da formação de glucanos

Os valores obtidos de leitura de Absorbância medidos a 560 nm para a verificação de formação de glucanos utilizando o sistema de reação descrito no item 3.4.2.3. estão expressos na Figura 5. Foi observado um aumento gradativo na Absorbância devido

possivelmente à formação de glucano no decorrer do tempo de reação, confirmando a atuação da enzima sobre o substrato sacarose e posterior polimerização. Os valores de A do controle (sem enzima) foram mantidos em níveis próximos de zero.

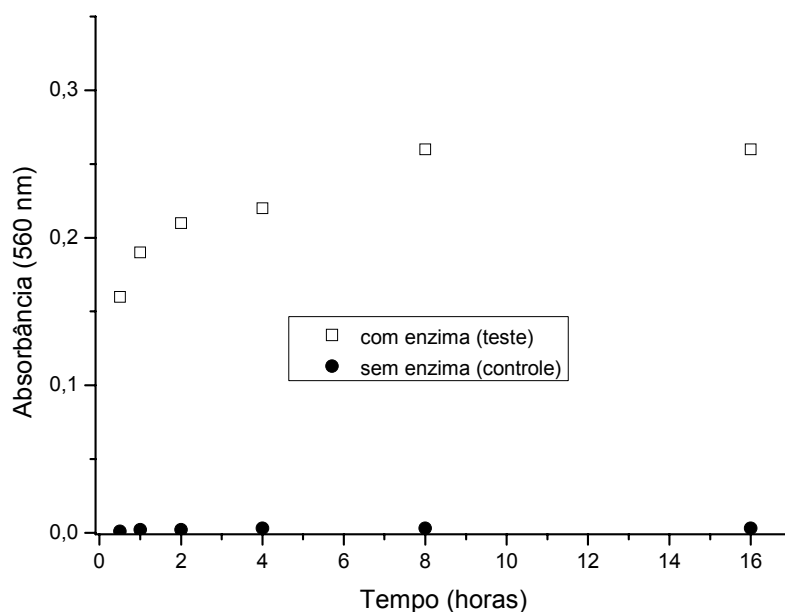


Figura 5. Leitura da Absorbância em função do tempo para avaliação da formação de glucanos pela glicosiltransferase utilizando o substrato sacarose

Os valores obtidos neste experimento utilizando o substrato sacarose estão condizentes com os valores expressos na Figura 3, o qual expressa a formação de glucanos medido diretamente no meio de cultivo em presença do substrato glicose presente no meio BHI.

4.5. Inibição da atividade da Glicosiltransferase por extratos vegetais

Conforme descrito no item 3.5., ao meio de reação contendo 400 μ L de solução de sacarose (10 % m/v) e 50 μ L de extrato bruto de GTF (1 mg/mL) foram testados a ação de diferentes inibidores na atividade da enzima. Os resultados obtidos utilizando o extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de mate (*Ilex paraguariensis*) em diferentes concentrações estão demonstrados nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

Na Figura 6 pode-se observar que a presença do extrato aquoso de alecrim reduz significativamente a concentração de açúcares redutores no meio, o qual é proporcional a

concentração do inibidor. Por outro lado, na Figura 7, pode-se observar que o efeito inibidor do extrato aquoso de mate quando comparado ao teste controle (sem inibidor) é praticamente nulo.

Tsai *et al* (2007), observaram a inibição completa da atividade da GTF em presença do extrato aquoso de alecrim na concentração de 16 mg/mL, sendo que em menor concentração (1,42 mg/mL) ainda é um efetivo inibidor comparado ao extrato metanólico de alecrim.

O estudo comparativo da ação do extrato de *Rosmarinus officinalis* com o gluconato de clorexidina, revelou igual atividade de inibição de síntese de glucano para o extrato e a clorexidina em relação a *S. mutans* ATCC 25175 (Silva *et al*, 2008). Os mesmos autores reportaram ainda que o extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. foi efetivo na inibição de aderência de *S. mitis* ATCC 98811, *S. mutans* ATCC 25175 e *S. sobrinus*.

Para efeitos de comparação, alguns testes foram realizados com o uso de clorexidina (0,06 e 0,12 mg/mL), um conhecido inibidor da atividade desta enzima, que possui propriedades bacteriostáticas e bactericidas dependendo de sua concentração. Os resultados estão expressos na tabela 3.

A clorexidina, um agente catiônico com amplo espectro de ação, inibe o metabolismo do *Streptococcus mutans*, pois quando adsorvida às superfícies oral e bacteriana carregadas negativamente, interferem no equilíbrio osmótico bacteriano, na formação da película adquirida e adsorção bacteriana ao dente (Silva, 2008). Leonardo *et al* (2001), numa análise anti-microbiana da solução de clorexidina 2% sobre bactérias Gram-positivas, dentre elas *Streptococcus mutans*, por meio do teste de difusão em Agar, relataram que a solução apresentou atividade antimicrobiana sobre todos os microrganismos indicadores.

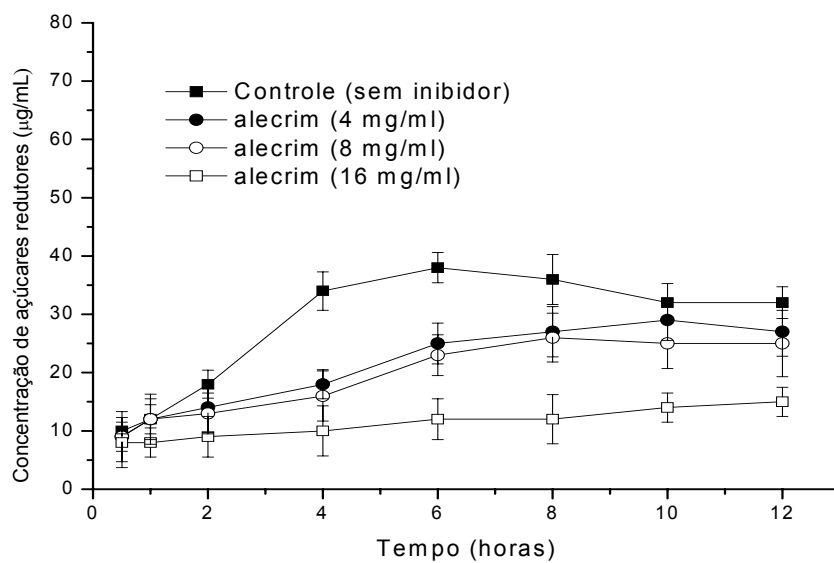


Figura 6. Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) na atividade da Glicosiltransferase.

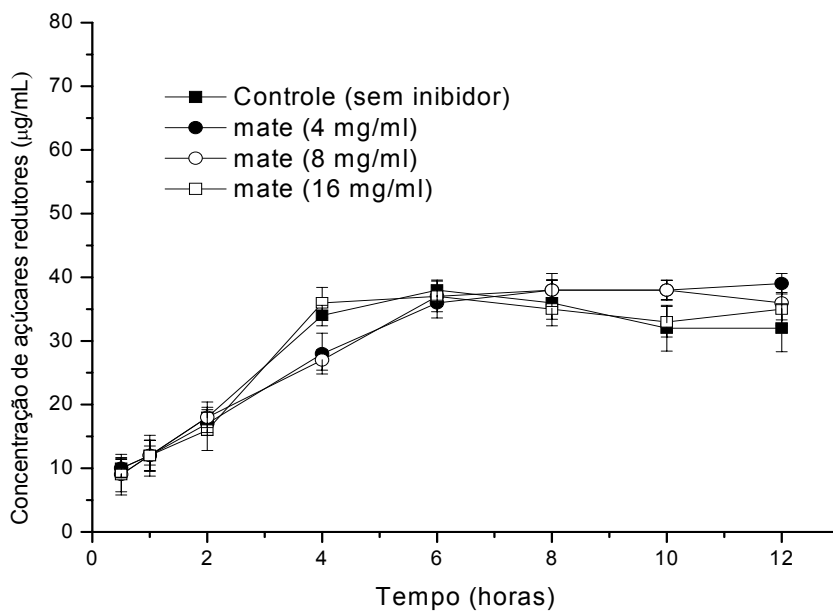


Figura 7. Efeito do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na atividade da Glicosiltransferase.

Tabela 3. Inibição da atividade da Glicosiltransferase por clorexidina após 1 hora de reação

Atividade de GTF ($\mu\text{g/ml}$) meio sem inibidor	Atividade de GTF ($\mu\text{g/ml}$) meio com inibidor (clorexidina 0,06 mg/ml)	Atividade de GTF ($\mu\text{g/ml}$) meio com inibidor (clorexidina 0,12 mg/ml)
13,4 \pm 1,3	7,2 \pm 1,8*	2,29 \pm 0,7*

P < 0.01 comparado ao controle (sem inibidor)

4.6. Determinação de fenóis totais

Conforme demonstrado na Tabela 4, variações não significativas no teor de fenólicos totais dos extratos foram observadas. Embora quantidades ligeiramente superiores de fenólicos totais tenham sido detectadas no extrato de chá-mate ele não teve efeito inibitório sobre a atividade da GTF, quando comparado ao alecrim (Figura 6 e 7). Isto sugere que a concentração de compostos fenólicos totais não determina a capacidade inibitória dos extratos analisados na atividade da enzima GTF, mas sim possivelmente a natureza destes compostos fenólicos presentes.

Segundo Asolini *et al* (2006), a erva-mate apresentou maior quantidade de compostos fenólicos (145 mg equivalente de ácido gálico/g folha seca) diferindo estatisticamente de outros tipos de chás analisados (arruda, alecrim, macela, alcachofra, sálvia, camomila capim-limão e malva) sendo maiores nos extratos aquosos do que nos extratos etanólicos. Entretanto, os autores não observaram nenhuma atividade antibacteriana do extrato aquoso de erva-mate.

Tabela. 4 Conteúdo de fenólicos totais dos extratos de alecrim, chá-verde e chá-mate preparados na concentração de 0,1mg/mL

Extrato vegetal analisado (0,1mg/mL)	Concentração de fenólicos totais (mg/g)
Alecrim	183 \pm 12,3
Chá verde	185 \pm 15,7
Chá mate	204 \pm 8,4

4.7. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de extratos vegetais sobre o crescimento de *Streptococcus mutans*

O potencial de atividade antibacteriana de um extrato de planta pode ser determinado a partir dos seus valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Para efeitos de comparação a Tabela 5 mostra a média dos resultados de leitura de Absorbância após 48 horas de crescimento bacteriano utilizando diferentes concentrações dos três extratos testados. Os valores correspondem às suspensões bacterianas diluídas 1:1.

Tabela 5. Valores de Absorbância a 630nm do caldo BHI após 48 horas de crescimento de *Streptococcus mutans*

Concentração (mg/mL)	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Ilex paraguariensis</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>
0,125	0,223	0,555	ND
0,25	0,244	0,737	0,876
0,5	0,104	0,636	0,776
1,0	0,114	0,715	0,765
2,0	0,130	0,764	ND
4,0	0,187	0,714	ND
8,0	0,189	0,651	ND
Controle (sem diluição)	0,904		

ND: não determinado (valores de leitura superiores a 1,0)

Considerando que a CIM é a menor concentração do extrato onde não houve crescimento bacteriano visível, ou seja, uma leitura da absorbância menor que 0,05, podemos observar que os extratos testados não foram capazes de inibir o crescimento de *Streptococcus mutans*.

Takarada *et al* (2004), buscaram verificar a ação do extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis* sobre *Streptococcus mitis* ATCC 9811, *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609, espécies bacterianas predominantes no biofilme supragengival, e *Lactobacillus casei* ATCC 7469 . Todas as linhagens foram sensíveis ao extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis*, exceto *Streptococcus mitis* ATCC 9811. Foram observados halos de inibição de crescimento

bacteriano que variaram de 11 mm a 18 mm de diâmetro, sendo considerado ativo o extrato que mostrou halos de inibição superior a 12 mm. A inibição do crescimento apresentou-se homogênea, de acordo com o grau de concentração do extrato hidroalcoólico de alecrim. Houve diminuição proporcional do diâmetro dos halos de inibição, à medida que a concentração do extrato foi diminuída. Esses dados sugerem que o extrato de alecrim possui compostos bioativos com atividade antimicrobiana *in vitro* sobre as cepas de *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469.

Queiroz *et al* (2008), demonstraram que as linhagens bacterianas de *Streptococcus mutans*, *S.mitis*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus casei*, mostraram ser susceptíveis a ação do extrato hidroalcoólico da *Rosmarinus officinalis* Linn., observando-se halos de inibição que variaram entre 11 e 20 mm. O extrato do alecrim não apresentou atividade antimicrobiana sobre a linhagem de *S. sanguis*. Houve uma diminuição proporcional dos halos de inibição a medida que a concentração do extrato foi diminuída. Em relação ao controle positivo (gluconato de clorexidina à 0,12%), observa-se que também inibiu o crescimento de todas as linhagens analisadas, mas com halos de inibição que variaram de 11 a 18 mm.

Kubo *et al.* (1993) comprovaram a atividade antimicrobiana de *Ilex paraguariensis* frente a bactérias e fungos patogênicos. Dentre as bactérias que sofreram inibição total encontram-se *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. Segundo relato dos autores os princípios ativos de uma bebida como a erva-mate podem ser superiores como agentes antimicrobianos quando comparados a muitos produtos naturais.

5-CONCLUSÃO

1. Os resultados permitem concluir que o crescimento da linhagem de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 leva a produção da enzima GTF, a qual é a responsável pela formação de glucanos ao longo do tempo de incubação.

2. Segundo os parâmetros cinéticos da reação a enzima GTF apresenta alta afinidade pelo substrato sacarose ($K_m = 2,5\text{mM}$), sugerindo sua participação na síntese de glucanos, e

portanto, na formação da lesão de cárie.

3. Dentre os extratos testados como inibidores da atividade da GTF somente o extrato aquoso de alecrim (a partir da concentração de 4 mg/mL) foi capaz de inibir a atividade da enzima. Entretanto, mesmo sendo um bom inibidor de atividade da enzima, esta capacidade não está envolvida na inibição do crescimento de SM. Portanto, sugere-se que o alecrim pode ser uma fonte valiosa para uso direto, ou ainda como precursor de novas moléculas bioativas a serem empregadas para a inibição da GTF.

4. O efeito inibitório sobre a atividade da GTF verificado com o uso do extrato aquoso de alecrim parece não estar relacionado com a concentração de compostos fenólicos totais, mas possivelmente com a natureza destes compostos fenólicos presentes.

5. Modelos de estudos que possam reproduzir situações mais próximas aquelas encontradas na cavidade oral são requeridas para avaliação de agentes antimicrobianos no tratamento e prevenção de infecções orais biofilme-dependentes. Além disto, são necessários mais estudos com extrato aquoso de alecrim sobre a atividade das enzimas glicosiltransferases individualmente e purificadas.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, J.R. **Tratado de fitomedicina: Bases clínicas y farmacológicas**. Isis: Buenos Aires, 1998.

Al-Sereiti, M.R.; Abu-Amer, K.M.; Sen P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. **Indian J Exp Biol**, 37: 124-130, 1999.

Alves, P.M.; Pereira, J.V.; Higino, J.S.; Pereira, M.S.V.; Queiroz, L.M.G. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* da aroeira-do-sertão sobre o biofilme dental. **RBO**, 63: 271-4, 2006.

Ando, T., Tsumori, H.; Shimamura, A.; Sato, Y.; Mukasa, H. Classification of oral *streptococci* by two-dimensional gel electrophoresis with direct activity stain for

- glucosyltransferases. **Oral Microbiol Immunol**, 18: 171–175, 2003.
- Asolini, F. C.; Tedesco, A. M.; Carpes, S. T.; Ferraz, C.; Alencar, S. M. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Braz J Food Technol**, 9: 209-215, 2006.
- Banas, J.A.; Vickerman, M.M. Glucan-binding proteins of the oral *streptococci*. **Crit Rev Oral Biol Med**, 14: 89–99, 2003.
- Banas, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Front Biosci**, 9: 1267-1277, 2004.
- Baratieri, L.N. **Dentística, procedimentos preventivos e restauradores**. 2. ed. São Paulo: Quintessence, 1992.
- Barbieri, D.S.V. **Análise da aderência *in vitro* de *Streptococcus mutans* e *Cândida albicans* na superfície dentária**. 92p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2005.
- Bastos, D. H. M.; Catharino, R.; Sawaya, A. C. H. F.; Cunha, I. B. S.; Carvalho, P. O.; Eberlin, M. N. Phenolic Antioxidants identified by ESI-MS from Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, 12: 423-432, 2007.
- Bentley, R. W.; Leigh, J. A.; Collins, M.D. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. **Int J Syst Bacteriol**, 41 (4): 487-494, 1991.
- Bjarnason, S. Caries experience in Icelandic 12-year-old urban children 1984 and 1991. **Community Dent Oral Epidemiol**, 21: 194-197, 1994.
- Bracht, A.; Iwamoto, E. I. **Métodos de Laboratório em Bioquímica**. 1ª ed. Ed. Manole, 2003.
- Burnet, G.W.; Scherp, H.W.; Schuster, G.S. **Microbiologia Oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978.
- Cabrera, C; Artacho, R.; Gimenez, R. Beneficial effects of Green tea – a Review. **J Am Coll Nutr**, 25 (2): 79-99, 2006.
- Caetano, F.M. **Metodologia de Extração de Própolis do Sul de Minas, Bragança Paulista**. p.28- 29. Dissertação de Mestrado – Universidade São Francisco 2002.
- Castro, S.L. “*In vivo*” Study efficacy of antiseptics on microaerobic microorganisms of

theoral cavity. **Rev Dent**, 1: 1-9, 2001.

Chandra, S.; Mejia, E.G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinine reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camelia sinensis*) teas. **J Agric Food Chem**, 52: 3583-3589, 2004.

Cypriano, S.; Sousa, M.L.S.; Wada, R.S. Avaliação de índices CPOD simplificados em levantamentos epidemiológicos de cárie dentária. **Rev Saúde Pública**, 39 (2): 285-92, 2005.

Coelho, G.C.; Athaide, M. L.; Schenkel, E. P. Methylxantines of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *vestita* Loes. and var. *paraguariensis*. **Braz J Pharm Sci**, 37: 153-158, 2001.

Colby, S.M.; Russell, R.R.B.: Sugar metabolism by *mutans streptococci*. **J Appl Microbiol Symp**, 83: 80S-88S, 1997.

Cury, J.A.; Rocha, E.P.; Francisco, S.B.; Koo, H.; Del Bel Cury, A.A. Effect of saccharin on antibacterial of chlorhexidine gel. **Braz Dent J**, 11: 29-34, 2000.

Dashper, S.G., E.C. Reynolds: Lactic acid excretion by *Streptococcus mutans*. **Microbiol**, 142: 33-39, 1996.

De Lorenzo, J. L. **Microbiologia para o estudante de odontologia**. São Paulo: Atheneu, 2004.

Dias, P.; Foglio, M.; Possenti, A.; Ernesto de Carvalho, J. Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis*. **J Ethnopharmacology**, 69: 57–62, 2000.

Dubois, M. Colorimetric Method for determinations of sugars and related compounds, **Anal Chem**, 28 (3): 350-356, 1956.

Frankel, E. N.; Huang, S.; Prior, E.; Aeschbach, R. Evaluation of antioxidant activity of Rosemary extracts, carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. **J Sci Food Agri**, 72: 201–208, 1996.

Fukushima, K.; Ikeda, T.; Kuramitsu, H.K. Expression of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase genes in *Streptococcus milleri*. **Infect Immun**, 60: 2815-2822, 1992.

Ghaemi, A.; Nazari, R.; Hamdi, K.; Ordouzadeh, N.; Amirmozafari, N.; Hassani, A. S. Volatile components of *Camélia sinensis* inhibit growth and biofilm formation of oral *streptococci in vitro*. **Pakistan J Biol Sci**, 11 (10): 1336-1341, 2008

Grönroos, L. **Quantitative and Qualitative Characterization of *Mutans Streptococci* in Saliva and in the Dentition**. 80 f. Dissertação Acadêmica. Department of Pedodontics and

Orthodontics, Institute of Dentistry, University of Helsinki and Department of Oral and Maxillofacial Diseases, Helsinki University Central Hospital, Helsinki, 2000.

Hamada, S., H.D. Slade: Biology, Immunology, and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev**, 44: 331-384, 1980.

Hammer, K.A.; Carson, C.F.; Riley, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **J Applied Microbiol**, 86: 985-990, 1999.

Hanada, N., Kuramitsu, H.K. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* *gtf d* gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. **Infect Immun**, 57: 2079-2085, 1989.

Iwami, Y; Takahashi-Abbe, S; Takahashi, N. The time-course of excretion, levels of fluorescence dependent on cellular nicotinamide adenine nucleotide and glycolytic intermediates of *Streptococcus mutans* cells exposed and not exposed to air in the presence of glucose and sorbitol. **Oral Microbiol Immunol**, 16: 34-39, 2001.

Jackson, R. J.; Lim, D. V.; Dao, M. L. Identification and analysis of a collagenolytic activity in *Streptococcus mutans*. **Current Microbiol**, 34: 49-54, 1997.

Jardim Jr, E.G.; Pedrini, D.; Xavier, E.A.; Jardim, P.S. Eficácia do listerine sobre a placa. **RGO**, 46: 70-8, 1998.

Jawetz, M.A.; Brooks, G.F.; Bulel, J.S. **Microbiologia Médica**. 21^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

Keyes, P. H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. **Arch Oral Biol**, 1: 304-320, 1960.

Keyes, P. H. Recent advances in dental research: bacteriology. **Int Dent J**, 12 (4): 443-464, 1962.

Kolenbrander, P. E.; London, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **J Bacteriol**, 175 (11): 3247-3252, 1993.

Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C.; Winn Jr., W. C. **Diagnóstico microbiológico**- 5a ed. MEDSI-Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro-RJ, 2001.

Koo, H.; Rosalen, P.L.; Cury, J.A.; Park, Y.K.; Bowen, W.H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrob Agents Chemother** 46: 1302-1309, 2002.

Koo, M.W.L.; Cho, C.H. Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal

system, **Eur J Pharmacol**, 500: 177-185, 2004.

Kubo, I.; Muroi, H.; Himejima, M. Antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* of mate tea flavor components. **J Agric Food Chem**, 41: 107-111, 1993.

Kuramitsu, H. K.; Nakano, Y.J. Mechanism of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases: hybrid-enzyme analysis. **J Bacteriol**, 5639-5646, 1992.

Lee, M.; Lambert, J.D.; Prabhu, S.; Meng, X.; Maliakal, H.J.; Ho, C.; Yang, C.S.. Delivery of tea polyphenols to the oral cavity by green tea leaves and black tea extract. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 1 (13): 132, 2004

Leite, B.; Pascholati, S. F.; Kitajima, E. W.; Ishida, M. L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 9: 1-41, 2001.

Leonardo, M.R.; Silva, L.A.B.; Filho, M.T.; Bonifacio, K.C.; Ito, I.Y. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. **J Endod**, 27 (12): 717-9, 2001.

Lima, J.E.O. Cárie dentária: um novo conceito. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**, 12 (6): 119-130, 2007.

Limsong, J.; Benjavongkulchai, E.; Kuvatanasuchati, J. Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. **J Ethnopharmacol**, 92: 281–9, 2004.

Linke, H. A. B.; LeGeros, R. Z. Black tea extract and dental caries formation in hamsters. **Int J Food Sci Nutr**, 54: 89–95, 2003.

Li, Y.H.; Aspiras, M.B.; Lau, P.C.Y.; Lee, J.H.; Ellen, R.P.; Cvitkovitch, D.G. A quorum sensing signaling system essencial for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. **J Bacteriol**, 184 (10): 2699-2708, 2002.

Li, Y.H.; Hanna, M.N.; Svensater, G.; Ellen, R.P.; Cvitkovitch, D.G. Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. **J Bacteriol**, 183 (23): 6875-6884, 2001.

Loesche, W.J. **Cárie Dental, Uma Infecção Tratável**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1993.

Lowry, O.H. Protein measurements with the Folin phenol reagent, **J Biol Chem**, 193: 265-275, 1951.

Makaya, N. **Relatório de Projecto Tecnológico I da Licenciatura em Química Tecnológica: Avaliação do crescimento de culturas de *Streptococcus mutans* e de actividade de glucosiltransferase**. Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2007.

- Marsh, P.D. Dental plaque as a microbial biofilm. **Caries Res**, 38: 204-211, 2004.
- Martins, F.; Suzan, A. J.; Arcari, D. P.; Ribeiro, M. L.; Bastos, D. H. M.; Carvalho, P. O.. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. **British J Nutr**, 101: 519-524, 2009
- Matos, F.J.A. Living pharmacies. Ciência e cultura. **J Braz Assoc Adv Sci**, 49: 409-412, 1997.
- Matsumoto, R. L. T.; Bastos, D. H. M.; Mendonça, S.; Nunes, V. S.; Bartchewesky Jr., W. ; Ribeiro, M. L.; Carvalho, P. O. Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. **J Agric Food Chem**, 57: 1775-1780, 2009.
- Mattos-Graner, R.O.; Jin, S.; King, W.F.; Chen, T.; Smith, D.J. ; Duncan, M.J. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. **Infect Immun**, 69: 6931-6941, 2001.
- McKay, D.L; Blumberg, J.B. The role of tea in human health: An update. **J Am Coll Nutr**, 21: 1–13, 2002.
- McNeill, K., Hamilton, I.R. Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiol Lett**, 221: 25-30, 2003.
- Ministério da Saúde. **Plano Regional de Saúde do Norte 2009-2010**. p. 29, 2009.
- Miranda, D. D. C.; Arcari, D. P.; Pedrazzoli Jr, J.; Carvalho, P. O.; Cerutti, S. M.; Bastos, D. H. M.; Ribeiro, M. L. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, 23: 261-265, 2008.
- Montanaro, L.; Campoccia, D.; Rizzi, S.; Donati, M. E.; Breschi, L.; Prati, C.; Arciola, C. R. Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. **Biomaterials**, 25: 4457-4463, 2004.
- Newbrun, E. **Cariologia**. 2. ed. São Paulo: Santos, 1988.
- Newman, M.G.; Nisengard, R.J. **Microbiologia Oral e Imunologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994
- Nyvaad, B. Microbial colonization of human tooth surfaces. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand**, 101: 7-45, 1993.
- Okamoto, M.; Sugimoto, A.; Legun, K.P.; Nakayama, K.; Kamaguchi, A.; Maeda, N. Inhibitory effect of green tea catechins on cysteine proteinases in *Porphyromonas gingivalis*. **Oral Microbiol Immunol**, 19: 118 –120, 2004.

Otake, S.; Makimura, M.; Kuroki, T. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. **Caries Res**, 25: 438–442, 1991.

Palombo, E. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. **Oxford J**, 1-26, 2009.

Pereira, J.V.; Pereira, M.S.V.; Sampaio, F.C. Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato da *Punica granatum Linn.* sobre microrganismos do biofilme dental. **Rev Bras Farmacogn**, 16: 88-93, 2006.

Queiroz, L.M.G.; Pereira, M.S.V.; Higino, J.S.; Pereira, J.V.; Alves, P. M. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis Linn.* (alecrim) sobre microrganismos cariogênicos. **Arquivos em Odontologia**, 44 (02): 2008.

Rolla, G., Ciardi, J.E.; Eggen, K.; Bowen, W.H.; Afseth, J. Free glucosyl- and fructosyltransferase in human saliva and adsorption of these enzymes to teeth *in vivo*. **IRL Press**, 21-30, 1983.

Rozen, R.; Bachrach, G.; Bronshteyn, M.; Gedalia, I.; Steinberg, D. The Role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. **FEMS Microbiol Lett**, 195 (2): 205-210, 2001.

Rudney, J.D.; Z, J.I.; Larson, C.J.; Liljemark, W. F.; Hickey, K. L. Saliva protein binding to layers of oral *streptococci in vitro* and *in vivo*. **J Dent Res**, 74: 1280-1288, 1995.

Russell, R.R.B. The application of molecular genetics to the microbiology of dental caries. **Caries Res**, 28: 69-82, 1994.

Sakanaka, S. Antibacterial substances in japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a carcinogenic bacterium. **Agr Biol Chem**, 53: 2307-2311, 1989.

Sasaki, H.; Matsumoto, M.; Tanaka, T.; Maeda, M.; Nakai, M.; Hamada, S. Anti bacterial activity of polyphenol components in oolong tea extract against *Streptococcus mutans*. **Caries Res**, 38: 2–8, 2004.

Silva, M. S. A.; Silva, M. A. R.; Higino, J. S.; Pereira, M. S. V.; Carvalho, A. A. T. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus Officinalis Linn* sobre bactérias orais planctônicas. **Rev Bras Farmacogn**, 18 (2): 236-240, 2008.

Simpson, A; Shaw, L; Smith, A.J. The bio-availability of fluoride from black tea. **J Dent**, 29: 15 –21, 2001.

Somogyi, M. A new reagent for the determination of sugars. **J Biol Chem**, 160: 61-73,

1945.

Sotelo-Felix, J.; Martinez-Fong, D.; Mureil De la Torre, P.. Protective effect of carnosol on CCl4-induced acute liver damage in rats. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, 14: 1001–1006, 2002.

Sullivan, A. Number of *mutans streptococci* or *lactobacilli* in a total dental plaque sample does not explain the variation in caries better than the numbers in stimulated whole saliva. **Community Dent Oral Epidemiol**, 24 (3): 159-163, 1996.

Takahashi-Abbe, S.; Abbe, K.; Takahashi, N. Biochemical and functional properties of a pyruvate-formate-lyase (PFL)-activating system in *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiol Immunol**; 18: 293-297, 2003.

Takarada, K.; Kimizuka, R.; Takahashi, N.; Honma, K.; Okuda, K.; Kato, T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. **Oral Microbiol Immunol**, 19: 61-64, 2004.

Tenuta, L. M. A.; Lima, J. E. O.; Cardoso, C. L.; Tabchoury, C. P. M.; Cury, J. A. Effect of period of plaque accumulation and salivary factors on enamel demineralization and plaque composition *in situ*. **Pesqui Odontol Bras**, 17 (4): 326-331, 2003.

Thylstrup, A.; Fejerskov, O. **Cariologia clínica**. 2.ed. São Paulo: Santos, 1995.

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

Uzeda, M. **Microbiologia Oral**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda., 2002.

Venkitaraman, A.R.; Vacca-Smith, A.M.; Kopec, L. K.; Bowen, W. H. Characterization of glucosyltransferase B, Gtf C, and Gtf D in solution and in the surface of hydroxyapatite. **J Dent Res**, 74(10): 1695-1701, 1995.

Wiater, A.; Choma, A.; Szczodrak, J. Insoluble glucans synthesized by cariogenic *streptococci*: a structural study, **J Basic Microbiol**, 39: 265-273, 1999.

World Health Organization. **Oral health surveys: basic methods**. 4. ed. Genebra, 1997.

Wright, W.G.; Thelwell, C.; Svensson, B . Inhibition of catalytic and glucan-binding activities of a *streptococcal* GTF forming insoluble glucans. **Caries Res**, 36: 353-359, 2002.

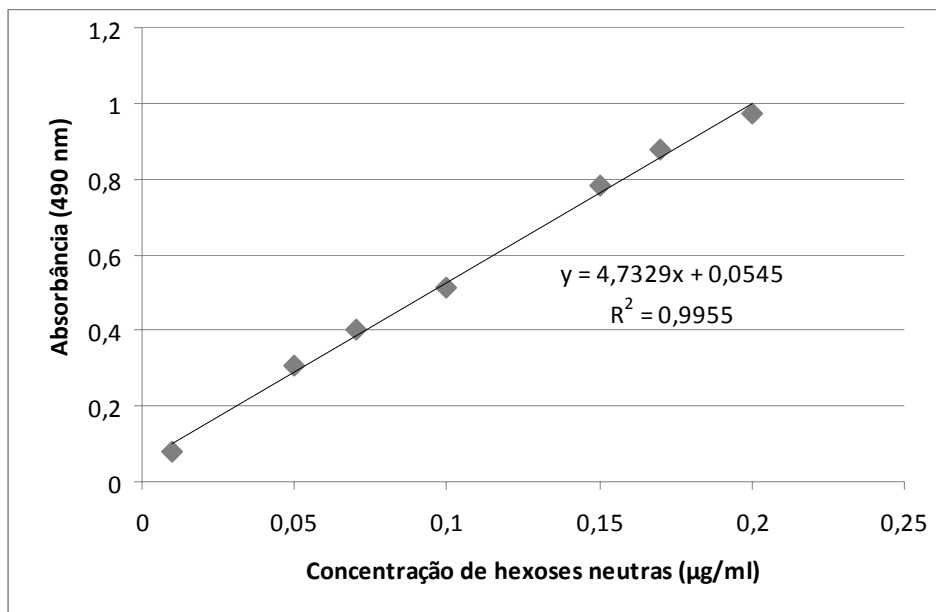
Wu, C.D.; Wei, G.X. Tea as a functional food for oral health. **Nutrition**, 18: 443 –444, 2002

Yamashita, Y.; Bowen, W.H.; Burne, R.A.; Kuramitsu, H.K. Role of the *Streptococcus*

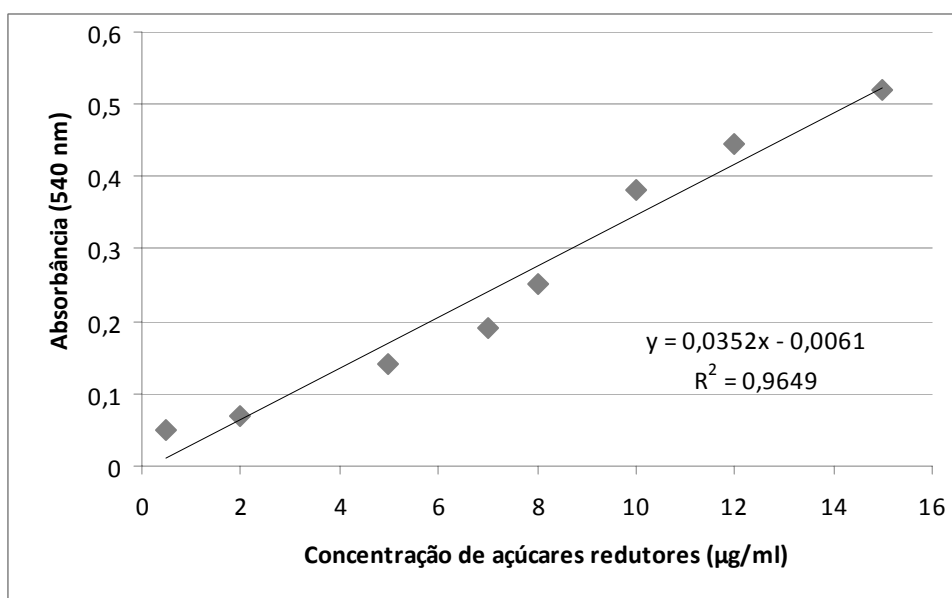
mutans gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. **Infect Immun**, 61: 3811-3817, 1993.

Zhang, J.; Kashket, S. Inhibition of salivary amylase by black and green teas and their effects on the intraoral hydrolysis of starch. **Caries Res**, 32: 233 –236, 1998.

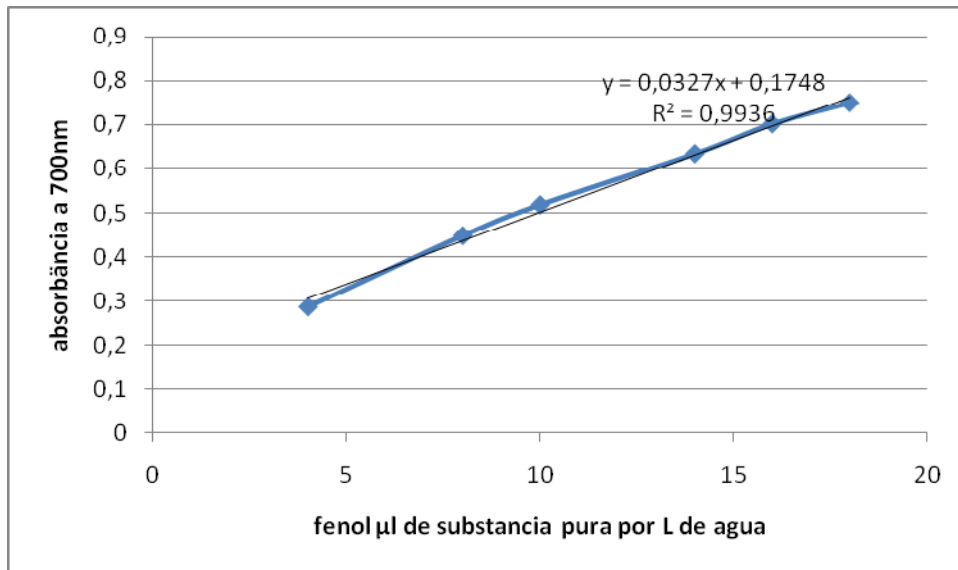
7-ANEXOS



Anexo 1. Curva padrão de glicose para determinação das hexoses neutras pelo método do fenol-ácido sulfúrico



Anexo 2. Curva padrão de glicose para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogy-Nelson



Anexo 3. Curva padrão de fenol para determinação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

