

SANDRO CALDERANO JOINHAS

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA AÇÃO ANTIMICROBIANA
DA *Mikania glomerata* Sobre *Streptococcus
mutans* E *Candida albicans***

UBERABA - MG

2013

UNIVERSIDADE DE UBERABA – UNIUBE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA BIOPATOLOGIA

SANDRO CALDERANO JOINHAS

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA AÇÃO ANTIMICROBIANA
DA *Mikania glomerata* Sobre *Streptococcus
mutans* E *Candida albicans***

Projeto de Pesquisa de Mestrado em
Odontologia, área Biopatologia da
Universidade de Uberaba

Orientador: Tony de Paiva Paulino

UBERABA – MG

2013

Joinhas, Sandro Calderano

J667a Avaliação in vitro da ação antimicrobiana da Mikania glomerata sobre Streptococcus mutans e Candida albicans / Sandro Calderano Joinhas. - 2013.

53 f. , il. -

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade de Uberaba, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino

1. Boca - Doenças. 2. Cárie. 3. Streptococcus mutans. 4. Candida albicans. 5. Fitoterapia. 6. Plantas medicinais. 7. Mikania glomerata. II. Paulino, Tony de Paiva. III. Título.

CDD 616.31

DEDICATÓRIA

A Deus, pois nos momentos que eu não conseguia mais andar com minhas próprias pernas, ele me carregou no colo.

Aos meus pais, pois se eles não tivessem desempenhado com excelência a arte criar e educar filhos com amor e dedicação talvez este projeto não tivesse existido em minha vida.

A minha esposa pelo apoio, compreensão e pelo auxílio nas horas difíceis.

Aos meus filhos, pois mesmo nos momentos que não pude dar-lhes atenção me deram amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Tony de Paiva pelo comprometimento total, pela perseverança, pela dedicação, pelo otimismo, sinceridade e profissionalismo. Pelos ensinamentos passados com didática e paciência, mostrando sua extrema vocação em orientar e ensinar.

Ao Prof. José Bento pelo imenso apoio e incentivo, nos momentos mais difíceis deste projeto.

À Universidade de Uberaba e seus professores pela oportunidade de enriquecimento do meu saber.

Aos verdadeiros amigos que fiz neste curso, pois, o seu companheirismo foi de extrema importância para que juntos atingíssemos o objetivo comum.

Aos amigos de trabalho da FACLIN HC UFU, pois nos momentos que tive que dedicar-me totalmente a este projeto eles foram extremamente compreensivos e companheiros.

Ao aluno Gustavo Tavares aluno de iniciação científica pela dedicação, companheirismo e apoio técnico.

Ao Renato Ventresqui Oliveira pela colaboração, dedicação e apoio nos vários momentos deste projeto.

A técnica do laboratório Aline pela colaboração.

A todos os meus familiares e amigos, que torcem pelo meu sucesso.

O farmacêutico faz misturas agradáveis, compõe unguentos úteis à saúde, e seu trabalho não terminará, até que a paz divina se estenda sobre a face da terra...”.

(Eclesiástico 38: 7-8)

“... Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

SUMÁRIO

Resumo	I
Abstract	II
Lista de figuras	III
Lista de tabelas	IV
Lista de abreviaturas	V
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Lesões orais	18
2.1.1. Lesões orais de tecidos duros	18
2.1.1.1 Carie: conceito	18
2.1.1.2. O <i>Streptococcus mutans</i> na formação do biofilme	21
2.1.2 Lesões orais de tecidos moles	23
2.1.2.1 <i>Candida albicans</i> nas inflamações orais	23
2.2 Possíveis tratamentos de doenças bucais	25
2.3 Fitoterapia	26
2.3.1 Conceito de fitoterapia de acordo com a legislação brasileira	26
2.3.2 <i>Mikania glomerata</i>	27
2.3.3 Breve histórico do uso medicamentoso da <i>Mikania glomerata</i>	30
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Aquisição do derivado vegetal	33

4.2	<i>Streptococcus mutans</i>	33
4.2.1.	Crescimento do biofilme de <i>S.mutans</i> em placa de poliestireno	34
4.2.2.	Tratamento do biofilme do <i>S.mutans</i>	34
4.2.3.	Avaliação do pH do meio de cultivo durante o crescimento do <i>S.mutans</i>	35
4.2.4.	Avaliação do consumo de glicose do meio pelo biofilme de <i>S.mutans</i>	35
4.2.5.	Ação inibitória do crescimento de <i>S.mutans</i> – disco de difusão	37
4.2.6.	Ação do derivado vegetal sobre a formação do biofilme do <i>S. mutans</i>	37
4.3.	<i>Candida albicans</i>	38
4.3.1.	Formação do biofilme de <i>C.albicans</i> em placas de poliestireno	38
4.3.2.	Avaliação do consumo de glicose durante o crescimento da <i>C.albicans</i>	38
4.3.3.	Ação inibitória do derivado vegetal de <i>Mikania glomerata</i> sobre o crescimento de <i>C. albicans</i> - Disco de difusão	39
4.3.4.	Ação do derivado vegetal sobre a formação do biofilme de <i>C. albicans</i>	40
4.3.5.	Formação do tubo germinativo de <i>C. albicans</i>	41
4.3.6	Análise estatística	41
5	RESULTADOS	42
5.1	Avaliação do pH do meio de cultivo durante o crescimento do <i>S.mutans</i>	42
5.2	Avaliação do consumo de glicose do <i>S.mutans</i> do biofilme	42
5.3.	Avaliação do consumo de glicose da <i>C.albicans</i> do biofilme	43

5.4. Ação inibitória do derivado vegetal de <i>Mikania glomerata</i> sobre o crescimento de <i>C.albicans</i> – disco de difusão	44
5.5 Ação do derivado vegetal sobre a formação do biofilme de <i>C.albicans</i> e <i>S.mutans</i>	45
5.6. Formação do tubo germinativo de <i>C.albicans</i>	47
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÃO	50
8. REFERÊNCIAS	51

RESUMO

Uma das primeiras técnicas medicinais para o tratamento de doenças foi o emprego do uso de plantas medicinais no tratamento de doenças. O guaco é utilizado popularmente como broncodilatador, como expectorante, contra úlceras e infecções por micro-organismos. Neste trabalho avaliou-se a atividade antimicrobiana do guaco contra cepas de *Candida albicans* e de *Streptococcus mutans*. Foi preparada uma suspensão de *S. mutans* e outra *C. albicans* (CEC 1291) contendo 10^6 UFC/mL. *C. albicans* foi semeada em Agar Sabouraud dextrose (SBA) e incubada a 37°C por 24 horas. Já o *S. mutans* foi semeado em Ágar tripton de soja (TSA) e incubado a 37°C por 24 horas. Em ambos micro-organismos a formação do biofilme foi realizada em placa de poliestireno e em lamínula circular. A análise do consumo de glicose foi realizada utilizando método enzimático. Os ensaios de disco difusão foram realizados seguindo as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute M2-A8. A análise da capacidade do acidogênica do *S. mutans* foi realizada avaliando o pH. Para a cepa de *C. albicans* não se observou efeito inibitório na redução da formação do biofilme, porém houve uma diminuição na quantidade de levedura formada, quanto ao consumo de glicose por este, também não apresentou efeito. Os testes de disco difusão para *C. albicans* também não apresentaram atividade antifúngica. Já para a bactéria *S. mutans* houve redução na formação do biofilme formado, porém utilizando a avaliação do pH e do consumo de glicose como parâmetro de viabilidade não foi possível inferir a atividade antimicrobiana do derivado vegetal nos volumes testados. Com esse estudo foi possível sugerir que o guaco pode ter efeito antimicrobiano contra as cepas de *S. mutans* não presentes em biofilme. Já para as cepas de *C. albicans* não apresentou atividade fungicida, porém na formação do tubo germinativo ele mostrou-se reduzindo quantidade de levedura formada.

Palavras chaves: Fitoterapia, Biofilme, Carie.

ABSTRACT

One of the first techniques for the medicinal treatment of diseases has been the use of medicinal herbs in the treatment of diseases. The guaco is popularly used as a bronchodilator, expectorant, against ulcers, infections by microorganisms. In this paper we evaluate the antimicrobial activity of guaco against strains of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. A suspension was prepared from *S. mutans* and *C. albicans* (CEC 1291) containing 106 CFU / mL. *C. albicans* was grown on Sabouraud dextrose agar (SBA) and incubated at 37 ° C for 24 hours. *S. mutans* strains were seeded in Tryptone Soy Agar (TSA) and incubated at 37 ° C for 24 hours. In both micro-organisms in biofilm formation was carried out in polystyrene plate and circular coverslip. The analysis of glucose consumption was performed using enzymatic methods. The disk diffusion tests were performed following the standards of the Clinical and Laboratory Standards Institute M2 - A8. The analysis of the ability of *S. acidogenic mutans* was performed by evaluating the pH. For the strain of *C. albicans* no inhibitory effect on the reduction of biofilm formation was observed, but there was a decrease in the amount of yeast formed, as the consumption of glucose by this also had no effect. The disk diffusion testing for *C. albicans* did not show antifungal activity. As for the *S. mutans* bacteria decreased in biofilm formed, however using the evaluation of pH and glucose consumption as viability parameter was not determined the antimicrobial activity of the tested plant derived volumes. With this study we can suggest that guaco may have antimicrobial effect against *S. mutans* strains not present in the biofilm. As for the strains of *C. albicans* showed no fungicidal activity, but in the formation of germ tube it showed up reducing the amount of yeast formed.

Keywords: Phytotherapy, Biofilm, Carie.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Candidose oral	25
Figura 2. <i>Mikania glomerata in natura</i> (Guaco)	29
Figura 3. Halos de inibição das cepas de <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i>	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Aspectos clínicos da <i>Candida albicans</i>	25
Quadro 2. Ação do derivado vegetal sobre <i>Streptococcus mutans</i>	45
Quadro 3. Ação do derivado vegetal sobre <i>Candida albicans</i>	45
Quadro 4. Análise qualitativa da formação do biofilme de <i>Candida albicans</i>	47
Quadro 5. Análise qualitativa da formação do biofilme de <i>Streptococcus mutans</i>	47
Quadro 6. Análise qualitativa de tubo germinativo de cepas tratadas com o DV	48

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbância
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
BHI	Brain Heart Infusion
DV	Derivado Vegetal
Cels	células
GTF	Glicosiltransferase
GTF-I	Glicosiltransferase Insolúvel
GTF-S	Glicosiltransferase Solúvel
GTF-SI	Glicosiltransferase Solúvel e Insolúvel
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
°C	Grau Celsius
h	Horas
mg/dL	Miligramas por decilitro
mg/mL	Miligramas por mililitro
µL	Microlitro
mM	Mili molar
µm	micrometro
M	molar
mL	Mililitro
mm	milímetros
nm	Nanômetro

PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	Potencial Hidrogeniônico
SFB	Soro Fetal Bovino
T.A.	Temperatura ambiente
TSA	trypticase soy agar
TSB	Trypticase Soy Broth
UV	Ultra Violeta
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
UNIUBE	Universidade de Uberaba
v/v	proporção volume por volume
PPPM	Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais
OMS	Organização Mundial de Saúde

1. INTRODUÇÃO

As infecções bucais podem ser causadas tanto por micro-organismos invasores ou externos, quanto por micro-organismos que fazem parte da microbiota normal. Tais infecções podem tanto acometer os tecidos duros (biofilme dental), quanto os tecidos moles da cavidade bucal.

Biofilme dental é uma colônia microbiológica organizada e contida em uma matriz extracelular polimérica, produzida pelos próprios micro-organismos. Sob algumas condições (por exemplo, alto nível de consumo de carboidratos), alterações dos parâmetros bioquímicos e microbiológicos podem alterar a composição do biofilme, facilitando o aumento da proporção de espécies patogênicas, provocando a transformação do biofilme saudável em biofilme patogênico. O *Streptococcus mutans* e o *Streptococcus sobrinus*, são as bactérias mais representativas neste processo (ANDRÉ, *et al.* 2011).

O acúmulo de *Streptococcus mutans* é um dos maiores estímulos ao desenvolvimento do biofilme cariogênico, sintetizando glucanos a partir de carboidratos, produzindo ácidos que proporcionam a queda do pH, possibilitando assim, a desmineralização dos tecidos dentais (CARVALHO, *et al.* 2009).

A adequada remoção do biofilme reduz a proliferação de bactérias que podem desencadear o processo da cárie (ANDRÉ, *et al.* 2011). As células que constituem os biofilmes possuem características fenotípicas diferentes das células em suspensão (por exemplo, um aumento na resistência aos antimicrobianos).

Ainda não se descobriu nada tão vantajoso e eficaz para se remover o biofilme e minimizar a ocorrência de cárie, do que o atrito, ou seja, a escovação e a utilização de fio ou fita dental da forma correta, porém os enxaguatórios bucais vem como uma segunda opção para auxiliar aquelas pessoas que tenham alguma limitação, por exemplo, pacientes acamados, deficientes físicos ou mentais, entre outros.

Atualmente, entre os diversos agentes químicos utilizados no combate e na remoção do biofilme cariogênico ou periodonto-patogênico, o mais utilizado é o gluconato de clorexidina pela sua eficácia nesse tratamento. É um detergente catiônico, da classe das biguanidas, disponível nas formas de acetato, hidrocloreto e

digluconato, sendo este último o sal mais empregado em fórmulas e produtos (FREIRES, *et al.*, 2010).

No entanto, este produto apresenta efeitos colaterais como manchas, desequilíbrio da microbiota ou alteração de paladar, entre outros.

Já a *Candida albicans* tem sido apontada como um dos principais fatores patogênico de infecções orais de tecidos moles, inclusive com formação de biofilme. Tem sido identificada como patogênica em casos de candidose bucal, e especialmente relacionada à imunossupressão. Trata-se de um agente etiológico fúngico que faz parte da microbiota do trato gastrointestinal e genital, e demais superfícies do corpo humano.

As alterações sofridas pela microbiota ou por imunodepressão do paciente causam o desequilíbrio na relação hospedeiro-parasita, possibilitando a invasão de micro-organismo nos tecidos do hospedeiro, surgindo, assim, as infecções conhecidas como candidíases e, pelo fato de fazerem parte da microbiota do ser humano, podem entrar em contato “com dispositivos implantados”, tais como próteses, tubos endotraqueais e vários tipos de cateteres, facilitando a formação de uma comunidade microbiana altamente estruturada que são envolvidos por uma matriz extracelular, denominada de biofilme (DOUGLAS, 2002).

O biofilme de *Candida albicans* resulta da sua capacidade adesiva ao material e formação de uma camada basal de células confluentes que se dividem e produzem hifas, em forma de compartimentos. Estas células são responsáveis pela liberação de uma matriz extracelular estável de substâncias poliméricas (DOUGLAS, 2002).

O tratamento desta patologia consiste na tentativa de solucionar ou diminuir a causa da imunossupressão e ao mesmo tempo a utilização de fármacos a base de nistatina, anfotericina e fluconazol.

Segundo Pinheiro *et al.* (2012), os produtos naturais (fitoterápicos) vêm sendo pesquisados com maior intensidade nos últimos anos, devido à sua baixa toxicidade e maior biocompatibilidade, além de preços mais acessíveis aos usuários

A Organização Mundial da Saúde (OMS) vem estimulando o aproveitamento do potencial fitoterápico pelo setor farmacêutico.

Segundo o Ministério da Saúde, a adoção da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), abriu as portas de acesso ao conhecimento à infinidade de plantas medicinais brasileiras e o seu

emprego adequado na prevenção à saúde. Este programa visa integrar o conhecimento popular com o conhecimento científico, através de um programa conhecido pela sigla PPM (Programa de Pesquisas de Plantas Mediciniais) (BRASIL/MS, 2006).

Este apoio dado pelo Ministério da Saúde viabiliza o desenvolvimento por pesquisadores brasileiros do emprego da fitoterapia de base científica, podendo-se extrair da infinidade de plantas do nosso país mais opções de tratamentos à saúde, haja vista que a flora brasileira é riquíssima.

O Ministério da Saúde assegura que é correta a premissa de não se subestimar a sabedoria popular sobre o uso de plantas, mas deve ser repassada para a população após a confirmação de que sua ação é verdadeira, seus efeitos são efetivos e seu uso é seguro. Ademais, é uma iniciativa sábia, a partir do momento em que viabiliza a formação de novos técnicos e pesquisadores dos mais diversos níveis nas áreas de botânica, farmacologia experimental, química, farmacognosia, farmacotécnica e fitotecnia, essencial para o sucesso desta política que idealiza o projeto “Farmácia Viva” (BRASIL/MS, 2006).

Entre as plantas, que já são cultivadas em hortas urbanas, encontra-se a *Mikania glomerata*, citada pelo Ministério da Saúde como uma alternativa de ampla utilização por milhares de famílias brasileiras que conhecem seus efeitos, através da sua preparação e consumo. Segundo a instituição o uso de plantas medicinais é uma das iniciativas mais relevantes desta última década, resgatando o valor que lhes são dados desde tempos remotos. A ação de estímulo do Sistema Único de Saúde disciplinou o uso da fitoterapia sob bases científicas.

A *Mikania glomerata* é uma planta da família Asteracea, genericamente conhecida como “guaco” pela população em geral, sendo, desde longa data, utilizada como adjuvante no combate à tosse, asma e bronquite e foi incluída entre as plantas que compõem a edição pioneira da Farmacopeia Brasileira, em 1929 (DIAS DA SILVA, 1929).

Diante do exposto, a coleta de dados científicos que permitam a aquisição de dados referentes ao comportamento do *S. mutans* e da *C. albicans* frente ao tratamento com o derivado vegetal obtido da *M. glomerata* irá permitir uma considerável contribuição no que diz respeito ao uso (ou não) deste vegetal na clínica odontológica/caseira.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lesões Orais:

Podemos dividir estas lesões em dois tipos, lesões orais de tecidos duros e lesões orais de tecidos moles.

2.1.1 Lesões orais de tecidos duros:

Estas são causadas por micro-organismos invasores que se instalam na mucosa oral. Os mais prejudiciais à saúde bucal, são os *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, principalmente na formação de biofilme patogênico e conseqüentemente da cárie.

2.1.1.1 Cárie: conceito

A cárie dental é a doença com maior prevalência no mundo, sendo transmitida aos primeiros anos de vida, representando um dos maiores problemas de saúde pública em alguns países. É identificada em todas as populações do mundo e se não for tratada, tende a destruir os tecidos duros do dente (esmalte e dentina), resultando em perdas de elementos dentários (GALRÃO, *et al.*, 2012).

A lesão cariosa é um processo anormal. O homem primitivo, que vivia em condições excepcionalmente naturais, não desenvolvia lesões que pudessem ser consideradas cariogênicas. Segundo o autor, a biodiversidade no âmbito da qual o homem vivia, mantinha um equilíbrio físico-químico de forma natural mesmo estando presentes todos os elementos que favorecessem o desenvolvimento de cárie(LIMA, 2007).

Segundo o parecer do mesmo autor, não é fácil entender o equilíbrio proporcionado por essa biodiversidade. Se fosse realizado um estudo experimental, seria possível identificar a influência de um elemento ou de uma substância em certo momento a fim de se obter uma resposta isolada sobre a formação de uma lesão, mas sem se conseguir uma resposta que correspondesse a tão grande biodiversidade e às variações alimentares dos indivíduos.

Todavia, o ser humano já não vive somente da natureza e, ao adotar novos padrões alimentares, especialmente os alimentos industrializados, no qual se deu origem ao desequilíbrio da biodiversidade bucal, possibilitando o desenvolvimento de lesões na estrutura dentária chamadas de 'cáries' dentárias (LIMA, 2007).

A cárie já foi conceituada como uma simples cavidade nos dentes. Atualmente, os profissionais a compreendem como um problema maior e mais complexo, ao qual se dispensam cuidados específicos para o combate de tais lesões. O conceito e etiologia da lesão dentária foram estabelecidos universalmente desde o século XX na qual Fitzgerald e Keyes, (1960) conceituavam como uma doença infecciosa, transmissível e que pode levar a desmineralização das estruturas dentárias.

Outros estudos como os de Andreolli e Lara (2004) corroboram o conceito supra, acrescentando que, nas últimas décadas, o avanço de conhecimentos no setor de odontologia permitiu uma nova visão sobre a promoção da saúde bucal, a partir do reconhecimento de alguns importantes aspectos das lesões cariosas:

- São de natureza infecciosa;
- São multifatoriais;
- Há uma dinâmica dos processos saúde-doença que envolve a cárie;
- Compreendem-se os fenômenos de des-remineralização que ocorrem de forma permanente na boca;
- Comprova-se que há eficácia no uso de compostos fluoretados para a prevenção e cura;
- É necessário que haja um diagnóstico precoce da atividade cariogênica;
- O trabalho do odontólogo atual não focaliza a lesão e sim a doença.

Ao considerar as lesões como uma doença multifatorial, a odontologia reconhece que a sua origem pode estar relacionada a diferentes fatores, tais como os hábitos de higienização bucal, as características da saliva, a microbiota bucal, hábitos alimentares, entre outros.

Andreolli e Lara (2004) relatam que doenças infecciosas bucais podem acarretar infecções sistêmicas. Portanto, já se compreende que, ao contrário da tradicional crença de que as doenças bucais restringem-se à cavidade bucal, há um sistema dinâmico relacionado à saúde como um todo.

Em relação à microbiologia, as lesões cáries são inter-relacionadas à estrutura do biofilme dental. Trata-se de uma estrutura complexa, que envolve diversos micro-organismos, tais como o *Streptococcus sobrinus* e o *Streptococcus mutans* que por sua vez, colonizam a superfície dos elementos dentários após a erupção dos mesmos na cavidade bucal (MATTOS-GRANER, 2010).

Muitas são as evidências que apontam para a interferência destas espécies bacterianas na colonização por espécies bucais patogênicas envolvidas na cariogênese e doença periodontal. Cepas destas espécies podem tornar-se patogênicas quando atingem a corrente sanguínea e causam bacteremia (MATTOS-GRANER, 2010).

As bactérias aderem-se às superfícies dentárias através de uma película acelular adquirida, que é constituída por proteínas e glicoproteínas originadas da saliva e fluido gengival. Na colonização inicial ocorre o aumento da quantidade e da diversidade microbiana levando a formação e acúmulo do biofilme dental, sendo este o fator etiológico determinante da cárie dentária e da maioria das doenças bucais (CARVALHO, et al. 2009).

Dentre os microrganismos cariogênicos destaca-se o *Streptococcus mutans*, uma espécie de bactérias Gram-positivas com morfologia de coco, pertencentes ao gênero *Streptococcus*, do grupo A de Lancefield. A ação de três glicosiltransferases (GTF), ou seja, a GTF-I, a GTF-S e a GTF-SI, pela habilidade na produção de polissacarídeos extracelulares derivados da sacarose, aumentaram o potencial patogênico desta bactéria.

Cada um dos GTFs possui uma característica: a GTF-I, codificada pelo gene *gtf B*, tem capacidade de produzir o glucano insolúvel em água, denominado mutano; a GTF-S, que é um produto do gene *gtf-D*, sintetiza outro produto similar ao dextrano, sendo, na maioria das vezes, hidrossolúvel e, a GTF-SI, codificada por *gtf-C*, produz uma mistura de glucano solúvel e insolúvel em água (CANETTI, 2006).

Quando as células bacterianas aderem à superfície dos dentes ocorre o início de uma lesão cáries, um processo que vem sendo pesquisado com maior profundidade e caracterizado como uma destruição localizada do tecido dentário (LANDUCCI, 2003).

A aderência e o acúmulo de microrganismos são facilitados pelos glucanos produzidos por *S. mutans*, permitindo a formação de uma matriz extracelular levando

a uma resistência a forças mecânicas de remoção presentes no hospedeiro. (CANETTIERI, 2006).

2.1.1.2 O *Streptococcus mutans* na formação do biofilme

Embora existam tratamentos modernos, as lesões cariogênicas continuam sendo um dos maiores problemas da Saúde Pública Bucal, um processo que tem merecido a atenção de diversos estudiosos e é descrito por diferentes autores como uma destruição localizada do tecido dentário por ácidos, particularmente o ácido láctico, produzido através da fermentação de carboidratos por microrganismos presentes no biofilme bacteriano (LANDUCCI, *et al.*, 2003).

Neste sentido, Garcia *et al.* (2009) esclarecem que a formação da cárie necessita de cinco fatores: A saliva, a microbiota da cavidade oral, a dieta alimentar (rica em carboidratos), o estado imunológico e o tempo. A interatividade desses cinco elementos cria a condição ideal para que a cárie se forme.

De acordo com os mesmos autores, no caso dos testes bacteriológicos para a avaliação de riscos de cáries e prevenção das mesmas, a contagem de *Lactobacillus* e de *Streptococcus mutans* da saliva são as técnicas mais indicadas. Todavia, no Brasil não há divulgação de testes salivares e bacteriológicos em laboratórios de análises clínicas, não havendo, pois, o estímulo à inclusão dos mesmos na rotina laboratorial para atender à demanda odontológica.

Carvalho *et al.* (2009) esclarece como se forma o biofilme bacteriano. Segundo ele a aderência das bactérias às superfícies dentárias inicia-se através de uma película acelular adquirida, constituída por proteínas e glicoproteínas oriundas da saliva e do fluido gengival. Após a colonização inicial de bactérias, ocorre o aumento da quantidade e da diversidade microbiana possibilitando a formação e o acúmulo do biofilme dental, fator etiológico determinante da cárie dentária e da maioria das doenças bucais. Um dos fatores primordiais ao desenvolvimento do biofilme cariogênico é o acúmulo de estreptococos que leva à produção de ácidos, proporcionando a queda do pH e o aumento da possibilidade de desmineralização dos tecidos dentais.

Outro aspecto relevante é que *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp.*, são os dois grupos bacterianos (espécies odontopatogênicas) mais importantes na

produção do ácido lático e, atuando conjuntamente ou de forma isolada, são causadores das cáries dentárias de superfície lisa devido à sua capacidade de aderência, crescimento e de colonização, além de sintetizar os polissacarídeos extracelulares e produzir ácidos na superfície dental (FUKUSHIMA et al., 1988, apud LANDUCCI, et al., 2003; GARCIA, et al., 2009).

Contudo, Marinho e Araújo (2007) advertem que esta constatação não aponta as referidas bactérias como únicas causas da cárie, embora afirmem que são responsáveis por grande parte das mesmas. Assim a possibilidade de ocorrência de biofilme sem que haja doença, significando que este não esteja dominado pelos organismos odontopatogênicos.

No entanto, sem esta adesão de bactérias, não ocorrem cárie. Portanto, a higiene bucal é uma das mais importantes formas de se prevenirem as lesões cariosas, seja principalmente por métodos mecânicos, ou secundariamente por métodos químicos, na redução ou erradicação do biofilme dental. Tais meios preventivos podem minimizar tanto o surgimento quanto a severidade da cárie e demais doenças periodontais (LANDUCCI, 2003).

Uma higiene bucal adequada, dieta com menor concentração de carboidratos e ingestão de alimentos com baixa cariogenicidade, além de secreção salivar mantida dentro de parâmetros fisiológicos, contribuem para uma baixa adesão da placa bacteriana sobre a superfície dentária e, conseqüentemente, redução da patologia cárie (ANDREOLLI; LARA, 2004).

Neste sentido, a profilaxia básica para o controle da doença é um dos meios mais eficazes do autocuidado bucal, com escovação e limpeza com fio dental de forma adequada e frequente e com orientação dietética adequada por profissionais de odontologia.

O *Streptococcus mutans* vem sendo identificado como a mais importante espécie bacteriana envolvida na cárie dentária e, com frequência, é isolado de dentes humanos. Um dos principais habitat naturais conhecidos desta bactéria é a superfície dentária, pois não é encontrada na cavidade bucal antes da erupção dos dentes, bastando uma única cepa do micro-organismo para colonizar um hospedeiro (CANETTIERI, 2006).

2.1.2 Lesões orais de tecidos moles:

Estas são principalmente causadas por micro-organismos pertencentes a nossa microbiota. Entre as mais agressivas podemos citar a Candidíase, causada pela *Candida albicans*, este processo infeccioso ocorre especialmente em pessoas com imunodeficiência.

2.1.2.1 *Candida albicans* nas inflamações orais:

Segundo Cardoso (2004), a candidíase oral é mais comum em pessoas idosas que usam próteses dentárias. Em estudos realizados na Dinamarca, ficou demonstrado que, aproximadamente 60% dos indivíduos com mais de 60 anos, que apresentam placas dentárias sofriam de estomatites dentárias, associadas à candidíase oral.

A *Candida albicans* apresenta um grande potencial de aderência às células epiteliais, sendo este o seu principal fator de virulência.

Este fungo é oportunista e manifesta-se de forma infecciosa, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Além disso, é encontrado na estomatite por prótese e outras patologias bucais. Os métodos químicos atuam como coadjuvantes no controle e prevenção da candidose (MATOS, 2009).

A *Candida albicans* é considerada uma das leveduras mais patogênicas para o ser humano, causando um grande número de infecções oportunistas que em doentes imunocomprometidos podem ser fatais. Esta levedura é um organismo comensal, estando presente no ser humano sem causar infecções, coexistindo com o hospedeiro. Pode colonizar o trato intestinal, oral, vaginal, respiratório, urinário, sanguíneo, etc. Contudo, num paciente imunocomprometido, esta levedura pode causar sérias infecções nas mucosas, que incluem candidíases vaginais e infecções orais ou sistêmicas (CARDOSO, 2004).

Os fungos do gênero tornam-se patológicos quando encontram um ambiente favorável ao seu desenvolvimento. Um exemplo é a presença de imunodepressão do hospedeiro e estresse. Contudo, apontam-se três prováveis fatores dos quais depende a evidência clínica ou não de infecção: o estado imunológico do hospedeiro, o meio ambiente da mucosa bucal e a resistência da *Candida albicans*. Segundo Manguiera *et al* (2010) candidose oral pode ser considerada a lesão mais

comum dos tecidos moles na cavidade bucal. Os micro-organismos existentes ali podem se desenvolver em qualquer superfície da mucosa (MANGUEIRA, et al, 2010).

Tipos de lesão	Aspectos clínicos
Pseudomembranosa	Placas brancas e aderentes sobre a mucosa, destacáveis, deixando leito sangrante. Ocorrem principalmente em mucosa jugal, orofaringe e porção lateral do dorso da língua. Raramente dolorosa
Atrófica aguda	Eritema local ou difuso, doloroso. Áreas de despapilação e desqueratinização em dorso da língua, deixando-a dolorosa, edemaciada e eritematosa
Atrófica crônica	Eritema difuso com superfície aveludada, associada à forma pseudomembranosa ou como queilite angular
Hiperplásica	Infecção crônica, aspecto leucoplásico, não destacável em mucosa jugal, palato e língua

Quadro 1. Aspectos clínicos da *Candida albicans*

(FONTE: Constantino; Miziara, 2008)

As lesões são esbranquiçadas, em forma de placas ou nódulos, consistência variável, e suas bordas podem se apresentar eritematosas, com quadro de dores ou ardência, ou mesmo assintomáticas. O tratamento e controle das afecções são por alcalinização do pH bucal e uso de medicações antifúngicas.

Veja na Figura 1 a seguir, a manifestação de um tipo de lesão por *Candida albicans*.



(FONTE: Mangueira, DFB., 2010, p.70)

Figura 1. Candidose oral

2.2 Possíveis tratamentos de doenças bucais

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que 80% da população dos países em desenvolvimento utiliza práticas tradicionais na atenção primária, e desse total, 85% usa plantas medicinais ou preparações destas. A utilização de fitoterapia com fins profiláticos, curativos, paliativos ou para finalidades de diagnóstico já é reconhecida desde 1978 pela OMS (BRASIL/MS, 2001).

O Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos determina, na Diretriz 3, item 6, o incentivo ao desenvolvimento da implantação de áreas de concentração relacionadas a plantas medicinais e fitoterápicos nos cursos de pós-graduação (BRASIL, 2007).

De acordo com Lima (2007), não existem dentes que apresentem resistência às cáries, embora muito se faça para aumentá-la por métodos químicos e mecânicos. A resistência depende da sensibilidade do paciente e, neste sentido, busca-se estabelecer alguma estratégia preventiva de melhor resposta ao tratamento.

Para Marinho e Araújo (2007), atualmente, a prevenção de doenças bucais tem sido uma prioridade da odontologia. A remoção do biofilme é um aspecto relevante na prevenção e controle da doença periodontal. Além da remoção mecânica são utilizados como segunda opção produtos antimicrobianos na forma de enxaguatórios bucais visando a redução microbiana patogênica na cavidade oral.

A obtenção de um resultado satisfatório depende do produto utilizado ter o potencial de reduzir a adesão das bactérias à superfície lisa dental, a fim de impedir a reprodução dos micro-organismos.

Atualmente, como compostos enxaguatórios mais utilizados em assepsia bucal podemos citar a clorexidina, cloreto de cetilpiridíneo e triclosan, entre outros, sendo a clorexidina, o produto mais indicado, pois age principalmente sobre bactérias gram-positivas, além de leveduras e dermatófitos, conforme estudos realizados por Marinho e Araújo (2007).

De acordo com Pinheiro (2012), a clorexidina, utilizada em diversas fórmulas para o controle da evolução do biofilme, é um princípio ativo identificado em enxaguatórios na proporção de 0,12%, podendo ser também na concentração de 0,20%. Entretanto, seu uso diário apresenta efeitos colaterais, tais como: perda do

paladar, manchas nos dentes, sensação de queimação na mucosa oral, manchas na língua, sabor amargo intenso que, para ser amenizado, deverá receber substâncias adocicadas que interferem na eficácia de sua atividade.

Assim, a fitoterapia tem se evidenciado como alternativa eficiente de controle e prevenção em diversas patologias, destacando-se o setor de odontologia como novas experiências que prometem ótimos resultados. A seguir, apresentam-se os avanços de estudos e comprovações científicas da fitoterapia como fonte de tratamento odontológico na produção de enxaguatórios bucais.

2.3 Fitoterapia

2.3.1 Conceito de fitoterapia de acordo com a legislação brasileira

Fitoterapia, um termo originado do grego (*phyton* = planta + *therapia* = tratamento). Refere-se à utilização de plantas medicinais (bioativas), ocidentais e/ou orientais, *in natura* ou secas, cultivadas de forma tradicional, orgânica e/ou biodinâmica, podem ser apresentadas na forma de drogas vegetais ou drogas derivadas vegetais, nas suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas e preparadas de acordo com experiências populares tradicionais ou métodos modernos científicos (PORTAL FITOTERAPIA, 2013).

O Brasil possui uma biodiversidade riquíssima da qual detém a maior parcela do total mundial, cerca de 20%, destacando-se espécies nobres que compõem 24% dos biomas (BRASIL/MS, 2006).

Tais sistemas naturais são localizados na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Ecossistemas Costeiros e Marinheiros, Pampa e Pantanal, onde se encontram plantas nativas, endêmicas, introduzidas e exóticas. As práticas alternativas, complementares e outras não convencionais com vistas à prevenção de doenças, promoção e recuperação da saúde, como homeopatia, termalismo, acupuntura e afins estarão sendo beneficiadas com a fitoterapia por meio do fornecimento de matérias-primas, insumos vegetais e produtos (PORTAL FITOTERAPIA, 2013).

Com as uniões étnicas favorecidas pelas migrações, os conhecimentos sobre o uso de ervas tornou-se amplamente difundido, com a introdução de outras

espécies trazidas pelos povos migrantes. Os conhecimentos e usos foram transmitidos de geração em geração, com aprimoramento cada vez maior, representando também, um grande movimento do setor financeiro com preparações da indústria fitofarmacêutica (BRASIL/MS, 2006).

Os medicamentos fitoterápicos são uma complexidade de misturas de compostos químicos que podem causar diferentes reações antagônicas ou sinérgicas com outras medicações e, havendo muitas reações desconhecidas, há necessidade de pesquisas mais profundas sobre a sua interação com outros produtos medicamentosos.

Entretanto, faz-se necessário observar determinados cuidados no uso de plantas medicinais, pois, mesmo sendo indicadas como medicamentos que contribuem para a saúde do homem, se utilizadas indiscriminadamente, são prejudiciais, causando intoxicações e outros efeitos indesejáveis. Ademais, muitas espécies destas plantas nascem aleatoriamente em terrenos onde se utilizam agrotóxicos ou que podem estar contaminados por micro-organismos naturais do solo ou da água, devido ao descarte indevido de resíduos urbanos (MARINHO E ARAÚJO, 2007).

Segundo Carvalho *et al.* (2009), os estudos sobre os extratos fitoterápicos buscam comprovar os seus efeitos como antimicrobianos que possam contribuir nos tratamentos preventivos de doenças bucais, notadamente as que se relacionam ao biofilme dental, sem agredir o organismo humano. Os micro-organismos do gênero *Streptococcus* são o alvo de pesquisas atuais, com experimentos realizados a partir de diversos princípios ativos.

2.3.2 *Mikania glomerata*

Mikania glomerata, cujo nome popular é “guaco”, é uma planta trepadeira sublenhosa, de grande porte, perene. É uma espécie da família *Asteraceae*, planta nativa da Região Sul do Brasil, mas que vem sendo cultivada em diversas outras regiões nacionais, devido às suas conhecidas propriedades medicinais (**FIGURA 2**).



Figura 2. *Mikania glomerata* in natura (Guaco)

(FONTE: <http://www.tuasaude.com/guaco/>. Acesso em Setembro de 2013)

As flores são hermafroditas, reunidas em número de quatro capítulos, iguais entre si, de papus branco e corola tubulosa, de cor branco-creme; capítulos agrupados em ramos espiciformes congestos, ou em glomérulos.

As flores exalam um perfume intenso e característico que pode ser percebido à distância, em especial após a chuva. Por ser melífera, atrai as abelhas. Quando maceradas, as folhas desprendem um aroma agradável, semelhante ao da baunilha.

Podemos citar como os principais constituintes o óleo essencial (diterpenos: constituídos por ácido isobutiriloxi-caurenóico e levepol, ácido kaurenóico, engenol, cineol, ácido cinamiol, ácido grandiflórico e estigurasterol); esteróis, cumarinas livres (substâncias responsáveis pelo odor característico da planta fresca) e traços de saponina. Contém ainda taninos, resinas e flavonoides (NOLLA, et al., 2005).

Soares *et al.* (2006) acrescentam mais alguns dados de substâncias isoladas aos constituintes do guaco: cumarian (1,2-benzopirano), ácido kaurenóico, friedelina, lupeol e siringaldeído, ácido cinamolglandiflóroco, estgmasterol; entre estes, destacam-se a cumarina e o ácido kaurenóico (este último, possivelmente

com a propriedade de inibir o crescimento do *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, necessitando estudos mais profundos a respeito). É possível também que o ácido kaurenico e o ácido cinamolgrandiflórico, possam exercer a atividade antibiótica.

Na etnofarmacologia cita-se o seu uso (em decocção) para gargarejos e bochechos em inflamações bucais e garganta. Sua tintura é utilizada em aplicações locais por compressas ou fricções nas partes do corpo afetadas pelas dores reumáticas, nevralgias ou traumatismo. Citam-se também os seus efeitos antiprotozoários (parasitas), anticandida, na leishmaniose e diarreias.

No âmbito científico já foi provado que o guaco apresenta propriedades medicinais expectorantes e broncodilatadoras, sendo indicado no combate à tosse, asma, bronquite, rouquidão e outros sintomas associados a gripes e resfriados.

Na sabedoria popular, a *Mikania glomerata* também é conhecida como erva de serpentes e cipó-catinga.

Entre os indígenas as folhas eram utilizadas para a má digestão, dores de cabeça e dores lombares. Na região Sul do Brasil, a *Mikania glomerata* é tradicionalmente utilizada pela medicina popular. Suas folhas são indicadas pela sua ação tônica, depurativa, febrífuga, estimulante do apetite e antigripal.

Popularmente ela é usada para tratar reumatismo, infecções intestinais e cicatrizar ferimentos. A planta não apresenta princípios tóxicos comprovados, entretanto, deve ser usada com cautela, evitando-se todo tipo de excesso. Para o uso em crianças, é recomendável sempre a metade da dose indicada para os adultos (FITO SAÚDE, 2013).

Tipos de Guaco – segundo Vera Lúcia Garcia Rehder, da Divisão de Microbiologia da Unicamp, os dois tipos de *Mikania spp.* ou guaco (*Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*), embora tenham aparência física semelhante, possuem composições químicas diferenciadas.

2.3.3 Breve histórico do uso medicamentoso da *Mikania glomerata*

O uso medicamentoso do guaco é muito antigo. O relato mais antigo é sobre o médico medieval Fracastoro em sua obra "*Sifilide ou morbo gálico*" publicada em 1530, na qual ele relewa os efeitos do guaco, descoberto poucas décadas antes na América do Sul e considerada como um milagre na cura da sífilis (REDETEC, 2002).

Em 1870, chegou a ser criado um produto preparado com hastes e folhas da planta - era o Opodeldo de Guaco que durante décadas foi considerado um "santo remédio" contra bronquite, tosse e reumatismo. "

Desde 1929, as suas propriedades foram oficializadas na Farmacopeia Brasileira.

Já em 1942, a primeira farmacopeia (guia de plantas medicinais) brasileira, escrita por Pio Correa, recomendava a erva para chás e xaropes expectorantes, graças à sua riqueza em cumarina. Agora, descobre-se que as propriedades fitoterápicas dessa erva nativa da Mata Atlântica vão muito além do seu uso popular, em pesquisas coordenadas por Vera Lúcia Garcia Rehder, no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), na qual foram comprovados os efeitos do guaco contra diversas doenças (J. DE FLORES, 2013).

Entre os diversos extratos testados pela Unicamp, o extrato do guaco foi o que melhores resultados apresentou. Recomenda-se cuidado em seu uso por pessoas hemofílicas, haja vista que um dos compostos da planta pode alterar a coagulação do sangue, causando hemorragias. Mesmo para quem não sofre da doença, é recomendado evitar o seu uso prolongado.

Estes dados publicados pelo Jornal da Unicamp revelam que os experimentos científicos sobre a referida planta já vêm sendo realizados há mais de uma década no Brasil, comprovando a eficácia de sua ação em diversas patologias, além da sua conhecida eficácia sobre o trato respiratório.

Mais estudos estão sendo feitos sobre o efeito da *Mikania glomerata* contra outras neoplasias, tais como na próstata, ovários, rins e cólon, porém ainda não se comprovou sua não toxicidade sobre as células saudáveis.

Atualmente, cultiva-se a planta comercialmente, em especial no Paraná. A própria pesquisa da Unicamp iniciou-se com foco agrícola, visando o

desenvolvimento de um sistema de cultivo que evitasse o extrativismo predatório (JORNAL UNICAMP, 2002).

Seu poder de ação é relevante, em especial como analgésico, antisséptico e anti-inflamatório, ação diurética e contra os efeitos de picadas de insetos. Portanto, sua validade medicamentosa é indicada comprovadamente para esses sintomas em programas fitoterápicos de saúde pública.

Devido às propriedades terapêuticas atribuídas a esta espécie de planta, o xarope de Guaco foi incluído no elenco de referência de medicamentos e insumos complementares para a assistência farmacêutica na atenção básica em saúde, conforme anexo II da Portaria No. 3.237 de 24 de dezembro de 2007 (BRASIL, 2007).

A mesma indicação deste xarope encontra-se também incluída no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira da ANVISA (BRASIL/ANVISA, 2011).

Dessa forma, os medicamentos à base de guaco vêm sendo utilizados em larga escala na rede de saúde pública, através da implantação de programas de fitoterapia em vários municípios nos estados brasileiro, tais como, Rio de Janeiro, Pará, São Paulo, Goiás, Amapá, Ceará, entre outros Estados que abrangem o território nacional de Norte a Sul (BRASIL/MS, 2006).

O herborista Máximo Ghirello, de Campinas, que incorpora princípios da medicina chinesa ao seu trabalho, indica o chá de guaco como tratamento preventivo. Segundo o pesquisador, o chá, ingerido no outono, durante dez dias, tonifica e ativa os pulmões e os prepara para o inverno, período em que estes órgãos são mais sensíveis (REDETEC, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo verificar a ação antimicrobiana, antiaderente e antiacidúrica da *Mikania glomerata* sobre o *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar “in vitro” o consumo de glicose e acidogenia durante o crescimento de *S. mutans* na presença e ausência do derivado vegetal de *Mikania glomerata*
- Investigar a atividade antimicrobiana do derivado vegetal (D.V.) de *Mikania glomerata* sobre o crescimento do biofilme de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*.
- Investigar a capacidade inibitória do extrato de *Mikania glomerata* na formação do tubo germinativo da *Candida albicans*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aquisição do derivado vegetal

O derivado vegetal foi cedido pela professora Dra. Elizabeth Uber Bucek, do curso de engenharia ambiental, da Universidade de Uberaba - Laboratório de Farmacobotânica.

4.2 *Streptococcus mutans*

Para o estudo foi utilizada a cepa ATCC 25175 de *Streptococcus mutans*, adquirida da Fundação André Toselho. A bactéria foi armazenada no laboratório de microbiologia da UNIUBE, à temperatura de -20°C em uma solução de 40% de glicerol (v/v). Para o cultivo e a avaliação da pureza de *S. mutans* foi utilizado o meio de cultura líquido TSB (Trypticase Soy Broth), preparado de acordo com as instruções do próprio fabricante. O meio TSB é um meio não seletivo onde crescem diversas bactérias. O meio é rico em triptona e peptona, fonte de carboidratos, proteínas e lipídios e a reação de 4.0% de solução aquosa tem pH final de 7.3 ± 0.2 a 25°C. Para os testes de crescimento da bactéria na presença diferente fonte de carbono foi empregado o meio completo, descrito por Dhasper e Reynolds (1991).

Os materiais, os meios de cultura e as fontes de açúcar utilizadas durante o experimento, foram esterilizados em autoclave vertical a 121°C durante 20 minutos. O microrganismo foi cultivado na estufa a 37° C em atmosfera microaerofílica 20% CO₂. A inoculação *Streptococcus mutans* aos meios foi realizada em uma câmara de fluxo laminar.

Após descongelar a bactéria (ATCC 25175) em temperatura ambiente na câmara foi realizado um primeiro repique onde um pré-inóculo de 200 µL da bactéria foi inoculada em um tubo tipo falcon estéril contendo 5mL TSB e cultivado a 37° por 12 horas em atmosfera de ar 20% CO₂. Um segundo repique foi realizado após as 12 horas retirando 100µL do tubo (1° repique) e inoculando em 10 mL de TSB. Após 12 horas de cultivo a turbidez inicial de *S. mutans* foi padronizada em um espectrofotômetro, ajustando inicialmente a bactéria em 10⁶ UFC/mL. A padronização foi realizada utilizando o comprimento de onda 600 nm ajustando a turbidez a 0,5 ($A_{600\text{ nm}} = 0,5$), antes de iniciar os experimentos.

4.2.1 Crescimento do biofilme de *Streptococcus mutans* em placa de poliestireno

Após a turbidez das células bacterianas ter sido ajustada para $A_{600} = 0,5$, foi adicionado 1 mL de meio líquido TSB suplementado com 50 mmol de sacarose (concentração final) em cada poço de uma placa estéril de 24 poços (Corning Costar® 3524, flat bottom), seguido da inoculação de 50 μL da bactéria (10^6 UFC/mL) em cada poço. O crescimento do biofilme nas paredes das microplacas foi observado após 12 horas de incubação a 37°C a 20% CO_2 . O meio de cultura foi desprezado e os poços lavados 03 vezes com solução de PBS (phosphate buffer saline) estéril.

4.2.2 Tratamento do Biofilme de *Streptococcus mutans*

Após o crescimento do biofilme e lavagem com PBS os poços da placa de poliestireno foram preparados para o tratamento do biofilme. Foram utilizados seis (06) grupos de estudo:

- **Grupo A controle tratado com clorexidina (Periogard® s/ Álcool)** foi adicionado 950 μL de TSB e 50 μL de Periogard-Colgate (Clorexidina);
- **Grupo B sem tratamento:** adicionado 1000 μL de TSB;
- **Grupo C tratado com DV:** adicionado 990 μL de TSB e 10 μL do D.V. de *Mikania glomerata* (GUACO);
- **Grupo D tratado com DV:** adicionado 950 μL de TSB e 50 μL do D.V. de *Mikania glomerata* (GUACO);
- **Grupo E tratado com DV:** adicionado 900 μL de TSB e 100 μL do D.V. de *Mikania glomerata* (GUACO);
- **Grupo F sem tratamento:** Adicionado 900 μL de TSB e 100 μL de água

A placa foi incubada por intervalos subsequentes de 1 hora (60, 120, 180 e 240 minutos) em estufa a 37° 20% CO_2 .

4.2.3 Avaliação do pH do meio de cultivo durante o crescimento de *Streptococcus mutans*

As medidas do pH foram realizadas nos poços após a incubação de 60 minutos em estufa a 37° 20% CO₂ e a placa foi novamente incubada por 120, 180 minutos e 240 minutos. O pH do meio dos seis grupos de estudo foram avaliados (atividade metabólica dos biofilmes) a cada 60 minutos com a coleta simultânea de 1000 µL das alíquotas para posterior verificação do consumo de carboidrato durante o crescimento da bactéria. As alíquotas foram acondicionadas em eppendorfs e congeladas a -20° C.

4.2.4 Avaliação do consumo de glicose do meio pelo biofilme de *Streptococcus mutans*

O consumo de glicose de *Streptococcus mutans*, foi analisado pós a formação do biofilme em amostras coletadas em função do tempo, por um período de 240 minutos após o tratamento com D.V. de *Mikania glomerata* e clorexidina. As amostras coletadas após o tratamento do biofilme com o DV da planta, para a verificação do pH, foram submetidas à análise bioquímica da glicose (Kit Biotécnica) no meio líquido TSB. As alíquotas foram descongeladas na temperatura ambiente (T.A.) e centrifugadas (Microcentrifuga NT 805 Nova Técnica) antes dos ensaios bioquímicos. O experimento foi realizado em triplicada. A avaliação quantitativa da glicose no meio de cultivo durante os diferentes tempo (60, 120, 180,240 minutos) do crescimento da bactéria foi avaliado quantitativamente pelo método enzimático (Kit Biotecnica ref.1000800) utilizando um espectrofotômetro (T60UV Spectrofotometer) no comprimento de onda de 505 nm. O cálculo de concentração das amostras foi realizado através do fator de calibração usando como referencia a concentração de 100 mg/dL do padrão dosado em triplicata pelo método enzimático.

4.2.5 Ação inibitória do crescimento de *Streptococcus mutans* – disco de difusão

Para avaliar a atividade antibacteriana do extrato de *Mikania glomerata*, testes de sensibilidade antibacteriana in vitro, foi utilizada técnica de difusão no meio TSA – técnica do disco (BAUER et al., 1966).

Discos de papel de filtro qualitativo com 6 mm de diâmetro foram identificados e 4 µL do reagente tween 1%, veículo usado na impregnação dos discos, foi adicionado aos discos. Os discos de papel foram autoclavados a temperatura de 121 °C por 20 minutos, em seguida o derivado vegetal de *M. glomerata*, filtrado em filtro estéril de 0,22 µm, foi adicionado aos discos de antibiograma esterilizados. Os discos identificados foram tratados para realização do antibiograma:

- **Disco 1 - Controle discos de papel**, sem tratamento.
- **Disco 2 - Tratamento com DV**, adicionado com 02 µL D.V. de *M. glomerata*.
- **Disco 3 - Tratamento com tween**, adicionado com 4 µL de tween 0,1%.
- **Disco 4 – Controle tratamento com clorexidina** - adicionado com 4 µL de clorexidina.
- **Disco 5 – Tratamento com DV**, adicionado com 04 µL D.V. de *M. glomerata*.
- **Disco 6 – Tratamento com DV**, adicionado com 08 µL D.V. de *M. glomerata*.
- **Disco 7 – Tratamento com DV**, adicionado com 16 µL D.V. de *M. glomerata*.
- **Disco 8 – Tratamento com DV**, adicionado com 32 µL D.V. de *M. glomerata*.

Os procedimentos foram realizados com micropipetas e ponteiras estéreis dentro da câmara de fluxo laminar. Foi realizado o controle do disco sem adição do reagente tween.

Os discos contendo solução de clorexidina e o disco com tween sem tratamento foram utilizados como controle. O microrganismo padronizado (10^6 UFC) foi repicado nas placas com os meios: Agar Triptona de Soja (TSA) para o antibiograma de *S. mutans*. A bactéria foi incorporada no meio de cultura com a utilização de swabs, em camada uniforme através de estrias cruzadas. Os discos foram colocados sobre o Agar e as placas incubadas em estufa a 37°C -20% de CO₂ por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, as placas foram fotografadas e os

halos de inibição medidos com paquímetro e uma média a partir de triplicatas foram determinados.

Cada solução estoque: de clorexidina (controle positivo), *Mikania glomerata* (extrato), solução Tween® 0,1% (surfactante) foram previamente autoclavadas e/ou filtradas em filtro estéril de 0,22 micras antes de serem incorporadas nos discos de papel.

4.2.6 Ação do derivado vegetal sobre a formação do biofilme de *Streptococcus mutans*

A cultura da cepa ATCC 25175 de *Streptococcus mutans* após ajuste da turbidez ($A_{600nm}=0,5$) foi utilizada para o crescimento do biofilme. Para analisar o efeito do d.v. de *M. glomerata* sobre o crescimento do biofilme, foi preparado previamente uma solução em triplicata com 2850 μ L de TSB suplementado com 50 mM de sacarose (concentração final) incorporada com 100 μ L de bactéria (10^6 UFC/mL). Para a geração do biofilme foi transferido 100 μ L da solução preparada previamente e incorporado nos poços da placa de poliestireno, lamínulas de vidro (borossilicato) e incubada a 37° em atmosfera de ar suplementado com 20% CO₂ durante 1 hora com constante agitação. Em seguida foram incorporado 150 μ L do D.V. de *M. glomerata* (filtrado em filtro estéril 0,22 micras) ao meio e no poço controle foi incorporado 150 μ L de clorexidina. A placa foi incubada a 37° em atmosfera de ar suplementado com 20% CO₂ durante 2 horas e 3 horas. As lamínulas de vidro foram examinadas sucessivamente no período de 1h, 2 horas e 3 horas de incubação. O controle foi o meio TSB suplementado preparado previamente. Após cada período (1h, 2h, e 3h) as placas de vidro foram retiradas e o biofilme foi lavado 03 vezes com PBS (NaCl 0,13 mol/L, KCl 2,7 mmol/L, Na₂HPO₄ 8,1 mol/L e KH₂PO₄ 1,47 mol/L pH final de 7,5) e a imagens examinadas em microscópio de luz (ZEISS, Scope. A1). O experimento foi realizado simultaneamente em triplicata. Como apresentado a seguir:

4.3 *Candida albicans*

A cepa de *Candida albicans* CEC 1291 foi cedida pelo professor Christophe d'Enfert do Unité Biologie et Pathogenicité Fongiques do Instituto Pasteur-França. A mesma se encontra no laboratório, aliquotada em tubos criogênicos e congelada em nitrogênio líquido a -120°C. Após o descongelamento da cepa de *Candida albicans* foi semeada em Agar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, MI, USA) e incubada a 37°C por 48 h. Após a Incubação, colônias foram transferidas para 20 mL um meio líquido de cultivo de Infusão de cérebro e coração (BHI) por 16 h.

A padronização em 10⁶ UFC/mL de *Candida albicans* após o cultivo em BHI foi realizada através de um espectrofotômetro a 530 nm, ajustando a absorbância para 0,680 antes dos experimentos.

4.3.1 Formação do biofilme de *Candida albicans* em placas de poliestireno

Uma solução do meio de cultura foi preparada previamente (equivalente a 1 mL de meio BHI suplementado com 1,5% de glicose e 5 µL de suspensão de levedura 10⁶ UFC/mL) antes da adição aos poços da placa. Para a realização dos ensaios foram utilizadas placas para cultura celular de 24 poços e colocados em cada poço da placa 250 µL de soro bovino fetal (SBF), incubado a 37° C overnight. Após incubação foi adicionado nos 06 poços da placa 1 mL da suspensão de leveduras anteriormente preparada do meio líquido BHI suplementado com glicose e incubado a 37° C overnight.

O crescimento do biofilme de *C. albicans* foi observado após este período, o meio de cultura desprezado e os poços submetidos a um processo de lavagem com solução de PBS, sendo realizadas três lavagens consecutivas nos poços da placa.

4.3.2 Avaliação do consumo de glicose durante o crescimento de *Candida albicans*

Para a determinação do consumo de glicose pelo fungo após o tratamento, foram utilizados 06 grupos de estudo:

- Grupo A controle tratamento com clorexidina foi adicionado 950 µL de BHI estéril e 50 µL de Periogard-Colgate® s/ Álcool (clorexidina).
- Grupo B controle do meio de cultura foi adicionado 1000 µL de BHI estéril
- Grupo C - tratamento com DV foi adicionado 990 µL de BHI estéril e 10 µL do D.V. de *Mikania glomerata* (GUACO).
- Grupo D - tratamento com DV foi adicionado 950 µL de BHI estéril e 50 µL do D.V. de *Mikania glomerata* (GUACO).
- Grupo E - tratamento com DV foi adicionado 900 µL de BHI estéril e 100 µL do D.V. de *Mikania glomerata* (GUACO).
- Grupo F controle do meio de cultura foi adicionado 900 µL de BHI estéril e 100 µL de água.

Os poços foram lavados por enxágue com PBS 03 vezes e acrescentado 1 mL do meio BHI nos respectivos grupos e a placa encubada por 01 hora em estufa a 37° em atmosfera de ar. Decorrido esse tempo alíquota de 100 µL do meio de cultura dos 6 poços foi coletada para posterior dosagem bioquímica da glicose. A placa foi novamente incubada por 2 horas, 3 horas e 4 horas com a coleta sucessiva de alíquota para análise do consumo de carboidrato, sendo ao final da retirada de todos os meios de cultivo foram 2 triplicatas. As alíquotas do cultivo coletadas em diferentes intervalos de tempo foram congeladas em *eppendorf* para serem avaliadas posteriormente. O carboidrato glicose consumido durante o crescimento de *Candida albicans* foi avaliado quantitativamente pelo método enzimático Kit da Biotécnica no Espectrofotômetro (T60UV Spectrofotometer). As alíquotas foram descongeladas na temperatura ambiente (T.A.) e centrifugadas (Microcentrifuga NT Nova Tecnica) antes dos ensaios bioquímicos.

4.3.3 Ação inibitória do derivado vegetal de *Mikania glomerata* sobre crescimento de *Candida albicans* – disco de difusão

Para avaliar a atividade antifúngica do derivado vegetal de *Mikania glomerata*, testes de sensibilidade antifúngica *in vitro*, foi utilizada técnica de difusão em Agar Sabouraud – técnica do disco (BAUER et al., 1966).

Discos de papel de filtro qualitativo com 6 mm de diâmetro foram identificados e 4µL do reagente tween 1%, veículo usado na impregnação dos discos, foi adicionado nos discos. Os discos de papel foram autoclavados a temperatura de 121 °C por 20 minutos em seguida o derivado vegetal de *M. glomerata*, filtrado em filtro estéril de 0,22 microns, foi adicionado aos discos de antibiograma esterilizados. Os discos identificados foram tratados para realização do antibiograma:

- **Disco 1 - Controle discos de papel**, sem tratamento.
- **Disco 2 - Tratamento com DV**, adicionado com 2 µL D.V. de *M. glomerata*.
- **Disco 3 - Tratamento com tween**, adicionado com 4 µL de tween 0,1%.
- **Disco 4 – Controle tratamento com clorexidina** - adicionado com 4 µL de clorexidina.
- **Disco 5 – Tratamento com DV**, adicionado com 4 µL D.V. de *M. glomerata*.
- **Disco 6 – Tratamento com DV**, adicionado com 8 µL D.V. de *M. glomerata*.
- **Disco 7 – Tratamento com DV**, adicionado com 16 µL D.V. de *M. glomerata*.
- **Disco 8 – Tratamento com DV**, adicionado com 32 µL D.V. de *M. glomerata*.

Depois de tratados como descrito anteriormente, os discos foram colocados sobre as placas onde foi realizado o teste de inibição de crescimento (determinação do halo de inibição) das cepas de *C. albicans*.

O cultivo da *C.albicans* ocorreu a 37°C. Após o cultivo, os halos de inibição formados foram mensurados por Paquímetro e uma média a partir de triplicatas foi determinada.

Cada solução estoque: de clorexidina (controle positivo), *Mikania glomerata* (*extrato*), solução Tween® 0,1% (surfactante) foram previamente autoclavadas e/ou filtradas em filtro estéril de 0,22 µm antes de serem incorporadas nos discos de papel.

4.3.4 Ação do derivado vegetal sobre a formação do biofilme de *Candida albicans*

A suspensão de levedura a 1×10^6 UFC/mL foi utilizada para o crescimento do biofilme. Para analisar o efeito do D.V. de *M. glomerata* sobre o crescimento do biofilme de *Candida albicans*, foi preparado previamente uma solução em triplicata com 2850 µL do meio BHI suplementado com 150 µL de glicose 0,1 M (concentração final) incorporado com 150µL do fungo (10^6 UFC/mL). Conforme

descrito por Paulino e colaboradores (2006) para a geração do biofilme foi incorporado, aos poços da placa de poliestireno, lamínulas de vidro (borossilicato) e transferido 100 µL da solução com o meio BHI preparada previamente e incubada a 37° durante 1 hora. Em seguida foram incorporado 100 µL do d.v. de *M. glomerata* (filtrado em filtro estéril 0,22 micras) ao meio e incubada a 37° durante 2 horas e 3 horas.

As lamínulas de vidro foram examinadas sucessivamente durante o período de 1 hora, 2 horas e 3 horas de incubação. Após cada período as placas de vidro foram retiradas e o biofilme foi lavado três vezes com PBS (NaCl 0,13 mol/L, KCl 2,7 mmol/L, Na₂HPO₄ 8,1 mol/L e KH₂PO₄ 1,47 mol/L pH final de 7,5) e a imagens examinadas em microscópio óptico (ZIEZZ. Scope A1). O experimento foi realizado simultaneamente em triplicata.

4.3.5 Formação do tubo germinativo de *Candida albicans*.

O efeito do derivado vegetal de *M. glomerata* sobre a formação de tubos germinativos de *C.albicans* foi realizado após o cultivo do fungo em BHI e a padronização da turbidez equivalendo à concentração de 10⁶ em UFC/mL utilizando suspensão de levedura em SFB (Soro Fetal Bovino). No poço de uma placa de poliestireno foi colocado 100 µL de SFB, adicionado de 100 µL do derivado vegetal bruto de Guaco. Foram adicionados 100 µL da suspensão de *Candida albicans* em cada poço e incubada a 37°C durante 3 horas, com agitação suave. O efeito do sumo de Mikania glomerata sobre a formação do tubo germinativo foi observado através de microscópio de luz (ZIESS. Scope A1). Foi utilizados o SFB como controle negativo sem o sumo da planta e o SFB com Fluconazol como controle positivo.

4.3.6 Análise estatística.

Os dados foram apresentados como média de medidas em triplicata provenientes de três ensaios independentes. T-student foi empregada para analisar a diferença estatística. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do pH do meio de cultivo durante o crescimento de *Streptococcus mutans*

A capacidade acidogênica do biofilme de *S. mutans* não apresentou efeito bactericida após o tratamento com o DV. É possível observar que em todos os grupos testados, com exceção do controle positivo utilizando a clorexidina, houve a diminuição do pH, inferindo assim a viabilidade do biofilme, como apresentado no gráfico 1.

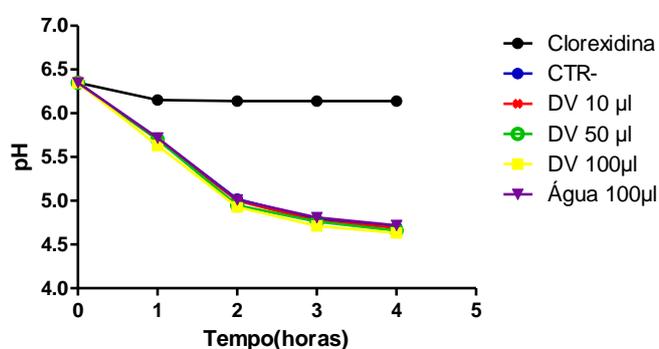


Gráfico 1. Variação de pH do meio TSB com biofilme de *S. mutans* ao longo de 4 horas de experimento. As diferenças estatísticas foram analisadas comparando-se os grupos experimentais com o grupo CTR-. Clorexidina ($p=0,0257$); DV10µL ($p=0,04896$), DV50 µL ($p=0,9485$) e DV100 µL ($p=0,8911$), Água 100 µL ($p=0,9860$)

5.2 Avaliação do consumo de glicose do *Streptococcus mutans* do biofilme

Colaborando com a avaliação de pH, na análise do consumo de glicose do biofilme de *S. mutans* observou-se que o tratamento com DV não apresentou eficácia bactericida, haja vista que em todos os volumes testados, houve o consumo de glicose indicando a viabilidade do biofilme, como apresentado no gráfico 2.

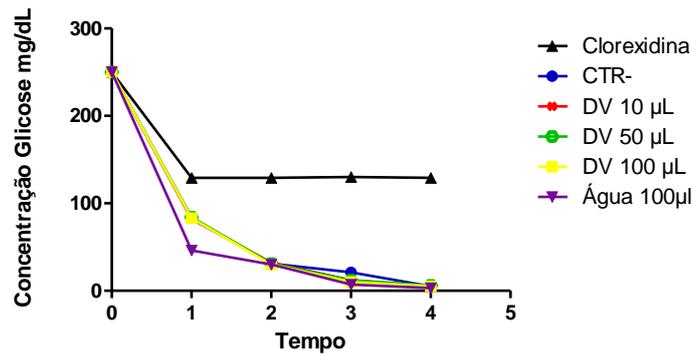


Gráfico 2. Consumo de glicose do biofilme de *S.mutans* ao longo de 4 horas de experimento. As diferenças estatísticas foram analisadas comparando-se os grupos experimentais com o grupo CTR-. Clorexidina($p=0,0113$); DV10µL ($p=0,9290$), DV50 µL ($p=0,9453$) e DV100 µL ($p=0,9067$), Água 100 µL ($p=0,5180$)

5.3 Avaliação do consumo de glicose da *Candida albicans* do biofilme

Na avaliação do consumo de glicose do biofilme de *C.albicans*, foi possível observar que todos os volumes testados apresentaram consumo ao longo do experimento quando comparados ao controle positivo com clorexidina que não houve nenhuma diminuição. Pode-se inferir assim a não eficácia antimicrobiana do DV.

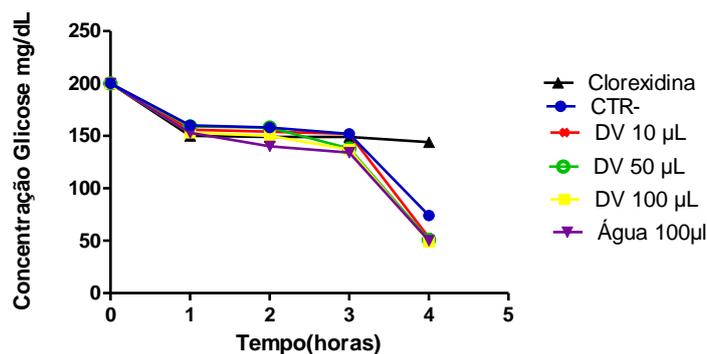


Gráfico 3. Consumo de glicose do biofilme de *C.albicans* ao longo de 4 horas de experimento. As diferenças estatísticas foram analisadas comparando-se os grupos experimentais com o grupo CTR. Clorexidina($p=0,6041$); DV10µL ($p=0,9407$), DV50 µL ($p=0,7829$) e DV100 µL ($p=0,6845$), Água 100 µL ($p=0,6116$)

5.4 Ação inibitória do derivado vegetal de *Mikania glomerata* sobre crescimento de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* – disco de difusão

Para análise do halo de inibição do DV sobre o *S.mutans* foram testados os seguintes volumes de DV: 2, 4, 8,16 e 32 μ L, impregnados a discos de papel previamente esterilizados. Nenhum dos volumes do DV apresentou halo de inibição conforme apresentado na quadro 2.

Para a cepa de *C.albicans* nenhum dos volumes do DV (2, 4, 8,16 e 32 μ L) apresentaram halo de inibição como apresentado no quadro 3.

Discos	mm do halo
1,	0,00
2,	0,00
3,	0,00
4,	2.00
5,	0,00
6,	0,00
7,	0,00
8,	0,00

Quadro 2. ¹Controle negativo; ²2 μ L extrato *M. glomerata*, ³Tween 0.1%; ⁴Clorexidina; ^{5, 6, 7,8}Diferentes concentrações do extrato de *M. glomerata*. Valores resultantes de uma média de uma triplicata

Discos	mm do halo
1,	0,00
2,	0,00
3,	0,00
4,	1,30
5,	0,00
6,	0,00
7,	0,00
8,	0,00

Quadro 3. ¹Controle negativo; ²2 μ L extrato *M. glomerata*, ³Tween 0.1%; ⁴Clorexidina; ^{5,6,7,8}Diferentes concentrações do extrato de *M. glomerata* Valores resultantes de uma média de uma triplicata

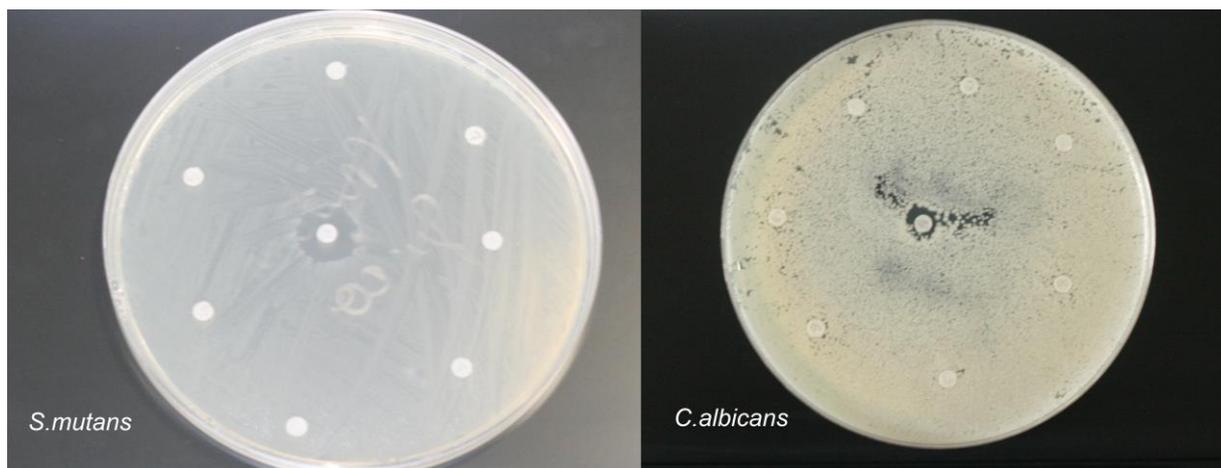
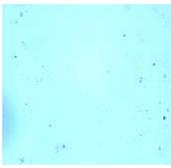
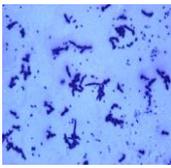
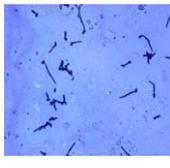
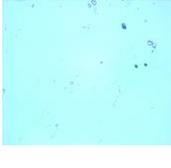
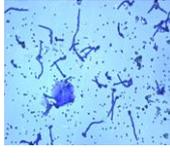
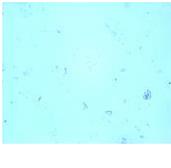
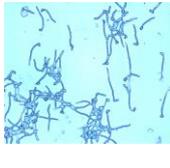


Figura 3. Halos de inibição das cepas de *S. mutans* e *C. albicans*.

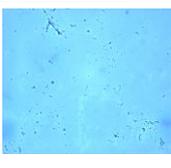
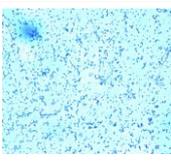
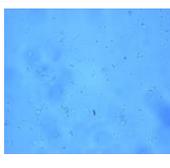
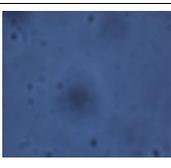
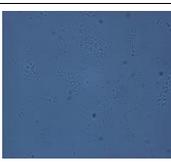
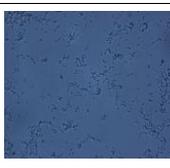
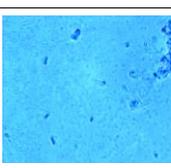
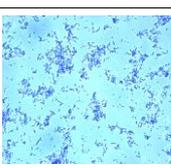
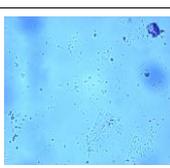
5.5 Ação do derivado vegetal sobre a formação do biofilme de *Candida albicans* e *S. mutans*

Para analisar a ação do derivado vegetal de *M. glomerata* sobre cepas de *C. albicans* e *S. mutans* 150 μ L de derivado vegetal (para o grupo experimental), e de clorexidina (para o grupo controle) foram misturadas ao inóculo (2850 μ L de BHI), tanto das cepas de *C. albicans* quanto para as cepas de *S. mutans*. Após 1 hora de incubação foram transferidos para de 24 poços contendo lamínulas de vidro circular. Após 1,2 e 3 horas de incubação as lamínulas foram retiradas, lavadas com PBS e coradas com Cristal Violeta, e observadas ao microscópio com aumento de 40x (optovariva de 2,5x).

Pode-se observar que, para as cepas de *C. albicans* não houve inibição da formação do biofilme, em acordo com os dados apresentados anteriormente. Já para as cepas de *S. mutans* foi possível observar que o DV apresentou uma redução na formação do biofilme, podendo inferir uma possível ação antimicrobiana do DV como apresentado nos quadros 4 e 5.

Horas	Clorexidina	CTR -	Guaco
1° Hora			
2° Hora			
3° Hora			

Quadro 4. Análise qualitativa da formação do biofilme da *C.albicans*

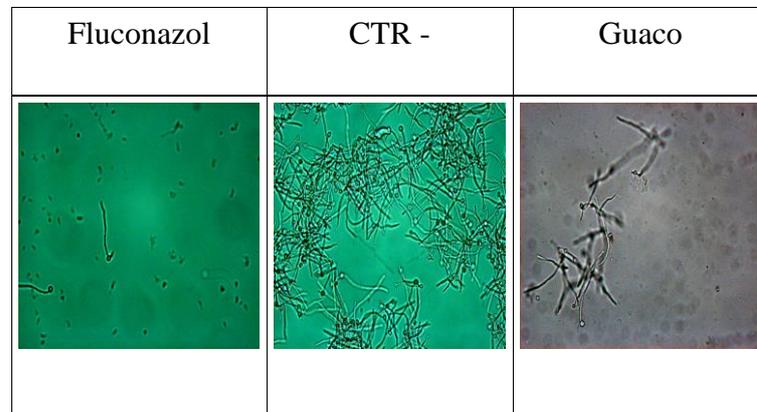
Horas	Clorexidina	CTR -	Guaco
1° Hora			
2° Hora			
3° Hora			

Quadro 5. Análise qualitativa da formação do biofilme do *S.mutans*.

5.6 Formação do tubo germinativo de *Candida albicans*.

Para a análise do efeito do derivado vegetal de *M. glomerata* sobre a formação do tubo germinativo, foi utilizado uma suspensão de leveduras em SFB, previamente tratadas com o derivado vegetal de *M. glomerata* (150 μ L).

Após incubação adequada as células tratadas com DV, controle, e fluconazol foram microscopicamente analisados, na qual foi possível observar que o DV não apresentou ação inibitória sobre a formação do tubo germinativo, porém parece ocorrer uma redução na quantidade de leveduras por campo.



Quadro 6. Análise qualitativa da formação de tubo germinativo de cepas tratadas com o DV.

6. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados apresentados anteriormente, a queda do pH em uma cultura de *Streptococcus mutans* indica a atividade metabólica das células ali presentes, visto a sua capacidade de metabolização e produção de ácidos orgânicos, fazendo com o que houvesse diminuição do pH (PAULINO et al, 2003). Com base nos dados nota-se que não houve eficácia antimicrobiana frente à exposição do derivado vegetal.

Frente aos dados expostos anteriormente sobre o consumo de glicose da cepa de *S.mutans* e *C.albicans*, observa-se que em todos os volumes testados, não houve efetividade da ação do DV, visto que houve consumo de glicose em todos os grupos de cultivo do biofilme.

Yatsuda *et al* (2005) realizou testes com frações hexânicas de *M. glomerata* na qual observou inibição na aderência a superfícies de vidro, e redução da susceptibilidade. Em comparação com o nosso estudo, pode-se inferir essas diferenças devido ao tipo de preparação dos materiais vegetais. No estudo de Yatsuda *et al* (2005), as frações foram frações hexânicas, já em nosso trabalho, foram frações aquosas, o que interfere em relação ao princípio ativo da planta apresentar mais afinidade química por um e não pelo outro.

A análise do consumo de glicose tem sido uma promissora ferramenta para a avaliação da viabilidade de células em meio líquido, ou formando biofilme haja vista que células viáveis têm metabolismo ativo, e conseqüentemente consumo de carboidratos para o funcionamento dos processos metabólicos.

A determinação do halo de inibição do derivado vegetal aquoso ocorreu através da técnica de disco difusão conforme metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standadards Institute* – CLSI (2003) documento M2-A8.

De acordo com os resultados apresentados, não houve atividade inibitória do crescimento sobre cepas de *S.mutans* e as cepas de *C.albicans*, em colaboração com os dados de avaliação de pH, e consumo de glicose que também não apresentaram inativação microbiana.

A formação de biofilme por bactérias e fungo é um dos principais fatores de virulência para a ocorrência de infecções. Nos resultados apresentados anteriormente, o DV mostrou-se eficiente no combate a cepas de *S.mutans* reduzindo a formação do biofilme, uma vez que essas células estavam em meio líquido, fato não ocorrente no biofilme já formado, como observado nas análises de

pH e consumo de glicose, visto que as cepas quando constituindo o biofilme apresentam uma resistência maior em até mil vezes do que cepas em suspensão.

Fato esse que não ocorreu para as cepas de *C. albicans* que não apresentaram alterações no crescimento.

Essa inibição da capacidade de formação do biofilme de *S.mutans* vem como um grande advento visto que em produtos de origem vegetal ainda não há descrição de cepas resistentes.

A formação do tubo germinativo em *C.albicans* é um importante fator de virulência que lhe confere a fase de transição para a forma filamentosa (ÁLVARES *et al*, 2007).

Nos resultados apresentados anteriormente, é possível observar que não há a inibição da formação do tubo germinativo nas cepas de *C.albicans*. Esse resultado está em acordo com o apresentado anteriormente que, a não inibição da formação do biofilme, e a existência desta estrutura podendo inferir sua capacidade de aderência a tecidos e superfícies abióticas. Porém uma redução do numero de células é visível, sugerindo possível inibição da cepa quando em meio liquido.

7. CONCLUSÃO

Segundo os resultados do consumo de glicose, e análise de pH, pode-se concluir que o derivado vegetal não apresentou atividade antimicrobiana contra o biofilme já formado para a cepa de *S.mutans* e *C.albicans*.

Através da avaliação da capacidade inibitória utilizando a técnica de disco-difusão, observou-se que os volumes testados, não apresentaram atividade antimicrobiana para a cepa de *S.mutans* e *C.albicans*.

O derivado vegetal foi ineficaz contra a formação do tubo germinativo da *C.albicans*, porém apresentou uma inibição do número de células.

Pode-se concluir que o derivado vegetal não apresentou efetividade contra a formação do biofilme da *C.albicans*. Porém para a cepa de *S.mutans*, observou-se redução na formação do biofilme.

8. REFERÊNCIAS

ÁLVARES, CASSIANA APARECIDA, TEREZINHA INEZ ESTIVALET SVIDZINSKI, AND MÁRCIA EDILAINÉ LOPES CONSOLARO. "Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras." *J Bras Patol Med Lab* 43.5 (2007): 319-27.

ANDREOLLI, RS; LARA, EHG. Avaliação "in vitro" da eficácia de enxaguatórios bucais remineralizantes. **Revista Infarma**, v.16, nº 7-8. CCF - Conselho Federal de Farmácia: Rio de Janeiro, 2004.

BRASIL/MS - Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

____MS/Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Ministério da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2006/a.

____MS/ de Políticas de Saúde. **Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos**. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

____/ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2011.

____/ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária **Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010**. DOU Nº 63, 5 de abril de 2010. Disponível em: www.crfma.org.br/site/estaticas/mostra_estat.php?id=19. Acesso em Agosto de 2013.

____PORTARIA GM Nº 3.237, de 24 de Dezembro de 2007 – Anexo II. **Portal da Saúde: Atenção Básica**, 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/>. Acesso em Setembro de 2013.

CANETTIERI ACV, *et al.* Efeito do anticorpo monoclonal 56G sobre o crescimento de *Streptococcus Mutans* em caldo e no acúmulo de placa bacteriana *in vitro*. In: **Cienc Odontol Bras**, 9 (4): out./dez, 2006. P. 67-75.

CARDOSO, BC. Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. Engenharia de Bioprocessos pela Universidade do Minho - Escola de Engenharia. Departamento de Engenharia Biológica, 2004 (Dissertação de Mestrado).

Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition*. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

CARVALHO, CM, *et al.* Efeito antimicrobiano *in vitro* do extrato de jabuticaba [Myrciaria cauliflora). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.11, n.1. Botucatu, 2009. p.79-83

DIAS DA SILVA, RA. **Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil**. 1.ed.: Companhia Editora Nacional, 1929.

DOUGLAS, L. J. Medical importance of biofilms in *Candida a.* infections. **Rev. Iberoam. Micol.** 19:139–143, 2002.

FITOSAÚDE – Saúde e Natureza. Guaco. Artigo, Maio de 2013. Disponível em: <http://fitosaude.blogspot.com.br/>. Acesso em Agosto de 2013.

FITZGERALD, R. J.; KEYES, P. H. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 61, no. 1. Chicago, July 1960. p. 9-19,

FUKUSHIMA, K. *et al.* Effects of exogenous insoluble glucan primer on insoluble glucan synthesis by *Streptococcus mutans*. **J Dent Res** 67 (1), 1988. P.51-5.

GALRÃO, J. *et al.* Prevalência da cárie dentária e presença de bactérias cariogênicas no dorso lingual – Estudo seccional cruzado. **Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac.** 53. Portugal, 2012. P. 11-6

GARCIA, LB., *et al.* Testes salivares e bacteriológicos para avaliação do risco de cárie (Bacteriological and salivary tests for evaluation of caries risk). **RBAC**, vol. 41(1): 2009. P.69-76.

JARDIM DE FLORES. Unicamp comprova as propriedades de cura do guaco. Disponível em: <http://www.jardimdeflores.com.br/>. Acesso em Agosto de 2013.

JORGE AOC. **Microbiologia bucal**. São Paulo: Ed. Santos, 1988.

LANDUCCI LF *et al.* Efeitos de *Coffea arábica* sobre a aderência de *Streptococcus mutans* à superfície de vidro. In **Cienc Odontol Bras**, 6 (3). jul./set., 2003. P. 58-64.

LIMA, JER. Cárie dentária: um novo conceito. **Dental Press Ortodon Ortop Facial**, v. 12, n. 6. Maringá nov./dez. 2007. p. 119-130,

MANGUEIRA, DFB., *et al.* Candidose Oral (Oral Candidosis). **Rev Bras Cien Saúde.** 14(2):69-72, 2010.

MATOS, BM. Comparação da atividade antimicrobiana de soluções de peróxido de hidrogênio e malva sobre *candida lbicans*. (Comparison of hydrogen peroxide and malva mouthrinses antimicrobial activity on candida albicans). **Cienc Odontol Bras.**; 12 (2): 24-28, abr./jun de 2009. Acesso em Novembro de 2013.

MATTOS-GRANER, RO. **Mecanismos de patogenicidade de Streptococcus mutans**. Área de Microbiologia e Imunologia. 2010. Disponível em: http://www.fop.unicamp.br/microbiologia/profa_renata_graner.htm.

MARINHO, BVS; ARAÚJO, ACS. Uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e biofilme dental. **International Journal of Dentistry**, 6(4). Recife, Out / Dez. de 2007. P.124-131

NOLLA, D., *et al.* **Plantas Mediciniais**. Passo Fundo (RS): Editora Universitária UPF, 2005.

PAULINO, TONY P., *et al.* "Fermentable and non-fermentable sugars: A simple experiment of anaerobic metabolism." *Biochemistry and Molecular Biology Education* 31.3 (2003): 180-184.

PINHEIRO, MA. *et al.* Efeito antimicrobiano de tinturas de produtos naturais sobre bactérias da cárie dentária. **Rev Bras Promoção Saúde**, 25(2). Fortaleza: abr./jun., 2012. P. 197-201.

PINTO, V.G.P. **Saúde bucal coletiva**. 4.ed. São Paulo: Santos Editora, 2000.

PORTAL FITOTERAPIA. O que é fitoterapia? In: **Portal Fitoterapia e terapias complementares**, 2013. Disponível em:

http://www.fitoterapia.com.br/portal/index.php?option=com_content&task=view&id=54.

Acesso em agosto de 2013.

REDETEC – Rede de Tecnologia. O Guaco. Artigo, 2002. Disponível em: <http://www.redetec.org.br/inventabrasil/guaco.htm>. Acesso em Julho de 2013.

ROSATO, A., VITALI, C., GALLO, D., BALENZANO, L., & MALLAMACI, R. (2008). The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*, 15(8), 635-638.

SOARES, AKA. *et al.* Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. **Rev Bras Farmacogn** 16, 2006. P.447-454

TEIXEIRA, KIR. *et al.* Processos físico-químicos no biofilme dentário, relacionados à produção da cárie. **Química Nova na Escola**. Vol. 32, N° 3, Agosto, 2010.

UNICAMP – CPQBA demonstra eficiência do guaco contra úlcera e outros males. **Jornal da Unicamp**, N° 184. 5 a 11 de agosto de 2002. Disponível em:

http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/agosto2002/unihoje_ju184pag4b.html.

Acesso em Agosto de 2013.

YATSUDA, R. *et al.* Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. **Journal of ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 183-189, 2005. ISSN 0378-8741.