

1 INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença multifatorial, vinculada a fatores do hospedeiro e relacionada à questões como dieta e higiene bucal. Observe-se ainda que a presença de certos tipos de microrganismos e as suas atividades bioquímicas na superfície dental possui grande influência para o seu desenvolvimento (FEJERSKOV, 1997; LIMA, 2007; NEWBRUM, 1988).

Por seu turno, as lesões carióticas e as doenças periodontais estão entre os mais importantes problemas mundiais de saúde bucal. Isto porque, e entre outros fatores, nos países em desenvolvimento a despesa com cuidados da saúde bucal é baixa, o acesso aos cuidados da saúde dental é limitado e muitas vezes, ficam restringidos aos atendimentos de emergência ou alívio da dor (PALOMBO, 2011).

O biofilme, que é definido pela literatura como um grupo de microrganismos presentes em uma matriz de polissacarídeos encontrados na superfície do dente (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Em virtude de suas características, o biofilme permite que microorganismos sobrevivam em um ambiente hostil com uma maior tolerância aos agentes antimicrobianos e proteção contra o sistema imunitário do hospedeiro (MARSH, 2003). Assim, importantes patologias estão associadas à formação do biofilme, dentre elas as endocardites, osteomielites, infecções do ouvido médio, infecções de âmbito hospitalar, implantes oculares e as infecções pulmonares (JEFFERSON, 2004).

Um microorganismo amplamente envolvido no desenvolvimento destas patologias é o *Streptococcus mutans*, uma bactéria Gram positiva freqüentemente encontrada no biofilme dental. Esta bactéria utiliza os carboidratos presentes na dieta realizada como fonte de energia, o que acarreta a produção de ácidos orgânicos, que são responsáveis pela diminuição do pH na superfície do dente, com a sua conseqüente desmineralização, resultando na produção da lesão cariótica (MARCH, 2003).

Com a finalidade de inibir a atividade do biofilme dental, algumas formulações antimicrobianas têm sido utilizadas, tais como os extratos vegetais e os compostos presentes nos enxaguatórios bucais como a clorexidina. A escovação diária, o uso de fio dental e o uso de agentes quimioterapêuticos são também eficazes na prevenção da cárie, porém, estes agentes podem causar alguns efeitos colaterais

como irritação gastrointestinal, mudança na coloração dos dentes e irritação gengival (CIANCIO, 2003).

Ainda, destaque-se a existência da candidíase, que é uma infecção fúngica causada por espécies do gênero *Candida* e que ocorre em condições que favoreçam o seu desenvolvimento. Ela pode ser cutânea, mucosa, cutaneomucosa ou visceral e, dependendo da localização, pode se manifestar de diferentes formas. As espécies *Candida* são responsáveis pelas candidíases locais, o que pode ser uma via de disseminação de infecção sistêmica, sendo que a colonização de membranas mucosas e pele é um passo crítico na patogênese da candidíase invasiva. (DELALOYE; CALANDRA, 2013; RAMAGE; WICKES; LOPEZ-RIBOT, 2001).

A espécie *Candida albicans* ocorre como uma comensal em diferentes localizações do corpo humano de indivíduos sadios e é encontrada principalmente na mucosa dos tratos urogenital e gastrointestinal (KLEIN et al., 2009). A colonização na cavidade bucal é freqüente por *C. albicans* e em menor extensão por outras *Candidas* ssp, podendo ser encontrada na saliva, nas mucosas e nos biofilmes dentais (ZAREMBA et al., 2006).

Leveduras do gênero *Candida* também estão presentes no grupo de microorganismos associados à formação de biofilmes. Esta associação tem sido cada vez maior com o aumento, nas últimas décadas, da utilização de implantes de dispositivos médicos associados ou não a indivíduos imunodeprimidos. A espécie *C. albicans* é a mais freqüente causadora de candidíase em pacientes imunodeprimidos (ZAREMBA et al., 2006).

Desta forma, leveduras do gênero *Candida* são os maiores agentes fúngicos causadores de infecção hospitalar e representam um desafio para a sobrevivência de pacientes com doenças graves e aqueles em período pós-operatório. Em hospitais norte-americanos com sistema de vigilância operante, a *Candida* foi notificada como 6º patógeno nosocomial e a 4ª causa mais comum de infecções de corrente sanguínea, adquiridas em hospitais (ANVISA, 2004). Candidemia é uma condição altamente letal quando complicada por choque séptico, com taxas de mortalidade de 40% a 60%, além de aumentar o tempo de permanência do paciente em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) ou internação hospitalar com impacto negativo sobre os custos de tratamento (DELALOYE; CALANDRA, 2013).

Observe-se que os antifúngicos disponíveis para tratamento possuem sérias desvantagens, toxicidade para o hospedeiro, sendo que alguns possuem espectro

de ação limitado, e outros não possuem seletividade para o fungo. Desta forma, o aumento de aparecimento de espécies resistentes aos antifúngicos de uso clínico tornou-se um problema crescente (CHEN; SORRELL, 2007).

Por sua vez, as plantas ocupam os mais diversos *habitats* e constituem importante fonte de produtos naturais, biologicamente ativos, que são utilizados para o desenvolvimento de muitos fármacos sintetizados pela indústria farmacêutica. Existem no planeta cerca de 500.000 espécies de plantas e somente 1% foram fitoquimicamente investigadas, sendo os metabólitos secundários, produtos do metabolismo da planta, os responsáveis pelas atividades anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana (PALOMBO, 2011; SIMÕES et al., 2002).

Mencione-se que nos países em desenvolvimento, aproximadamente 80% das pessoas utilizam plantas medicinais para os seus cuidados de saúde. Desta forma, as propriedades antibacterianas e antifúngicas de plantas comumente conhecidas e utilizadas para fins medicinais tem sido amplamente estudadas nas últimas décadas. (PAREKH; CHANDA, 2007; HOLETZ et al., 2002, PALOMBO, 2011; SIMÕES et al., 2002).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Streptococcus mutans* e Cárie

A cárie é uma doença infectocontagiosa, crônica, causada pelo processo de desmineralização da superfície dental por ácidos orgânicos provenientes da fermentação dos carboidratos da dieta, como por exemplo, pela sacarose e bactérias (NEWBRUM, 1988).

O *Streptococcus mutans* é uma bactéria gram-positiva, do grupo Viridans, com formato ovóide apresentando-se aos pares ou em cadeias. São bactérias não esporuladas, com catalase negativas e possuem uma parede celular constituída de proteínas, carboidratos e peptidoglicanos (JAWETZ; BROOKS; BULEL, 1998), medindo cerca 0,5 a 0,75 µm de diâmetro e tem como temperatura ótima de crescimento 37°C (BURNET; SCHERP; SCHUSTER, 1978).

Após a descoberta de Clarke em 1924, o *S. mutans* permaneceu por muito tempo esquecido, até que, em 1960, Fitzgerald e Keyes iniciaram o interesse por esta bactéria. A partir daí a sua correlação com a cárie tem sido extensivamente estudada, indicando ser esta bactéria um dos principais agentes etiológicos da cárie (LEITES et al., 2006), sendo encontrado em 90% dos humanos (NEWBRUM, 1988).

Podem ser citadas como principais características de virulência de *S. mutans* a sua capacidade de produzir ácidos orgânicos (acidogenicidade) por meio da fermentação de carboidratos, bem como a capacidade de viver em pH baixo e de sintetizar glucanos extracelulares a partir de homopolímeros de sacarose, os quais são condições necessárias na formação e manutenção do biofilme dentário (LOESCHE, 1986; BOWEN; KOO, 2011). Esta cepa produz principalmente o ácido láctico e outros hidratos de carbono, como subprodutos do metabolismo da sacarose, levando à produção da cárie dentária através da erosão do esmalte dentário e da dentina (LOESCHE, 1986).

Ainda, a respeito do *S. mutans*, mencione-se que são anaeróbios facultativos, capazes de metabolizar uma grande variedade de açúcares, incluindo glicose, lactose, sacarose, trealose, maltose, manitol, sorbitol, rafinose e melobiose (COYKENDALL, 1989) sendo considerados ácido-lático-homo-fermentativa (DRUCKER; MELVILLE, 1969).

A sacarose, por sua vez, é um dissacarídeo formado pela ligação entre uma hexose (glicose) e uma pentose (frutose). E a ligação glicosídica entre estas duas moléculas é rica em energia, sendo a sacarose o único açúcar a partir do qual as glicosiltransferases (GTFs) catalizam a síntese de glucanos. As enzimas GTF-S sintetizam glucanos solúveis em água, também denominados dextransos, os quais têm predominância de ligações glicosídicas alfa-1,6. Já as enzimas GTF-I e GTF-SI sintetizam glucanos insolúveis em água com predominância de ligações glicosídicas alfa-1,3. Estes glucanos insolúveis sintetizados, denominados de mutana, estão associados com uma aderência mais consistente à superfície do dente e o desenvolvimento do biofilme (LOESCHE, 1986; MONSAN, et al., 2001).

A capacidade de aderir firmemente à superfície do dente, na presença de sacarose, é uma característica importante de *S. mutans* no desenvolvimento da doença cárie. A ação das enzimas GTFs e FTTs (Frutasiltransferases), responsáveis pela síntese de glucanos e frutanos, e das proteínas de ligação ao Glucano, são importantes na patogênese da cárie dentária e determinação da arquitetura do biofilme (BANAS; VICKEMAN, 2003; LYNCH et al., 2007).

A síntese de glucanos em *S. mutans* é catalisada por três GTFs: *GtfB*, *GtfC* e *GtfD*, também conhecidas por Gtf-I, Gtf-SI e Gtf-S, respectivamente, e os genes codificadores e reguladores da expressão de GTFs em *S. mutans* foram identificados como *gtfB*, *gtfC* e *gtfD*. Por sua vez, o operon *vicRKX* regula a expressão de vários genes associados à virulência que afetam a síntese de polissacarídeos, e *vicR*, um provável gene regulador de transdução de sinal *vicRKX*, parece modular a aderência e formação do biofilme (SENADHEERA, 2005).

Esta bactéria se adapta a condições adversas ambientais, crescendo sob condições ácidas, adequando-se às mudanças de temperatura e elevada tensão de oxigênio, e persistindo sob condições limitadas de nutrientes (BURNE, 1998). Portanto, para a adaptação do *S. mutans* no biofilme é necessário a sua aderência inicial na superfície do dente e mudanças nos padrões de expressão de alguns genes bacterianos (COSTERTON et al., 1987; ARGIMÓN; CAUFIELD, 2011).

Um flavonóide denominado Morina, com atividade antioxidante e anti-inflamatória foi capaz de inibir a formação do biofilme de *S. mutans* por meio da inibição da enzima Sortase (SrTA) envolvida na modulação de aderência do microrganismo na película do dente (HUANG et al., 2013). Assim, um dos caminhos para controlar a formação do biofilme dental pode ser a interferência da adesão

bacteriana na película adquirida, por agentes antimicrobianos, nos estágios iniciais e reversíveis de sua formação (PEREIRA et al., 2006).

2.2 *Candida albicans* e Candidíase

A levedura *Candida* é encontrada na cavidade bucal de 50% dos indivíduos saudáveis, sendo a *C. albicans* a espécie mais virulenta, que se adapta a diferentes habitats e é capaz de formar biofilme em superfícies abióticas, como no caso de próteses. Destaque-se que as leveduras produzem tubos germinativos, filamentos e secretam substâncias poliméricas extracelulares (SPE) que contribuem para a formação da estrutura tridimensional do biofilme (SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008; RAMAGE et al., 2005).

Os fungos são microrganismos eucarióticos, anaeróbicos facultativos, podendo utilizar oxigênio ou um componente orgânico comoceptor final de elétrons, o que permite que estes fungos sobrevivam em vários ambientes na ausência ou presença de oxigênio. Na presença de oxigênio há a formação do dióxido de carbono e água, enquanto que na sua ausência, ocorre a fermentação com produção de etanol e dióxido de carbono (TORTORA; FUNKE; CASEC, 2005).

A parede celular fúngica é constituída de nanoproteínas, quitina e α - e β -glucanas, que são importantes para a proteção, manutenção da morfologia e rigidez celulares, metabolismo e trocas iônicas, sendo um alvo seletivo para agentes antifúngicos (CARRILO-MUNHÔZ et al., 2006).

A *Candida albicans* é parte integrante da microbiota humana encontrada nas mucosas do trato geniturinário, gastrointestinal e da boca, vivendo saprofiticamente no tecido cutâneo. Na forma de leveduras, ela se fixa a células epiteliais humanas, mas normalmente precisa estar na forma de pseudo-hifas para colonizar tecidos mais profundos (dimorfismo). A maioria das infecções causadas por *Candida* é de causa endógena, consequência dada por modificações microbiota normal ou perturbações do sistema imune do hospedeiro (DELALOYE; CALANDRA, 2013).

Esta espécie, juntamente com *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida glabrata*, *Candida Krusei*, dentre outras, são as principais causadoras da Candidíase e podem acometer a pele, as unhas, mucosas, boca e órgãos, sendo que as infecções invasivas estão associadas com alta morbidade e mortalidade, especialmente em UTI's. Além disso, espécies do gênero

Candida são responsáveis por 70-90% de todas as infecções fúngicas invasivas e *Aspergillus* por 10-20% (ARENDRUP, 2010; DELALOYE; CALANDRA, 2013).

Neste sentido, as espécies não-*Candida albicans* são responsáveis, em alguns centros de saúde, por até 50% de infecções causadas por *Candidas*, sendo a *C. albicans* responsável por dois terços de infecções por *Candida* em todo o mundo (ARENDRUP, 2010).

O aumento de infecções causadas por *Candida* nas últimas décadas está associado à formação de biofilmes, tornando suas células mais resistentes aos medicamentos antifúngicos. A formação de biofilmes em dispositivos médicos pode trazer algumas complicações para o hospedeiro, além de servir como fonte e reservatório de infecções, sendo muitas vezes necessária a remoção do dispositivo (KOJIC; DAROVICHE 2004). Os biomateriais implantados como *stents*, *shunts*, próteses, tubos endotraqueais, marca-passos e cateteres também são alvos de colonização e formação de biofilme por *Candida*, principalmente em pacientes imunodeprimidos (KOJIC; DAROVICHE, 2004).

Ademais disso, o aumento das infecções por *Candida* está associado a vários fatores, dentre eles destacam-se os relacionados ao hospedeiro como: imunodepressão, tempo de internação, o uso de dispositivos invasivos, antibioticoterapia etc. Entre os fatores relacionados ao microrganismo estão os fatores de virulência, como produção de enzimas proteolíticas, dimorfismo celular (formação de pseudo-hifas) e formação do biofilme, que contribuem para a resistência aos antifúngicos (KOJIC; DAROVICHE, 2004).

Vários fatores intrínsecos que predispõem à candidíase devem ser levados em consideração, como por exemplo, a prematuridade, a velhice, a obesidade, a AIDS, doenças crônicas e doenças degenerativas. Já os fatores extrínsecos que podem desencadear o seu aparecimento são o uso de antibióticos, corticóides, agentes antineoplásicos, as cirurgias e a contínua exposição a agentes físicos e /ou químicos (COURA, 2005; PEREIRA et al., 2010; ZIRKEL et al., 2012).

2.3 Tratamento e Resistência Bacteriana

As bactérias são os agentes patogênicos mais prevalentes em doenças endógenas da cavidade bucal (BAMMANN; ESTRELA, 1999). Os antibióticos são utilizados na prática odontológica para o tratamento das infecções odontogênicas

em pacientes com risco de desenvolver endocardite bacteriana ou outras complicações relacionadas a procedimentos odontológicos (FONTOURA; MEDEIROS, 1999).

Os antibióticos podem ser bactericidas, aqueles que matam as bactérias, ou bacteriostáticos, aqueles que inibem o seu crescimento e a sua multiplicação. Eles ainda podem ser classificados como sendo de amplo espectro, quando possuem ação sobre os microrganismos Gram positivos e Gram negativos, ou sendo de pequeno espectro, quando atuam em um número reduzido de espécies (SIQUEIRA JUNIOR, 2004).

A resistência bacteriana, que pode ser natural (intrínseca), fisiológica (biofilmes) ou adquirida (mutação e transferência genética), deve ser estudada profundamente para que possamos evitar a sua ocorrência freqüente. A resistência natural ou intrínseca faz parte das características primitivas dos microrganismos, sendo que algumas bactérias possuem estruturas ou mecanismos que impedem determinados antimicrobianos de agir. Assim, antimicrobianos que inibem a síntese da parede celular são ineficazes em microrganismos desprovidos de parede (TAVARES, 1996; FUCHS; WANNMACHER, 2010).

A resistência fisiológica ocorre em condições especiais de crescimento bacteriano, e os biofilmes constituem o exemplo mais típico. O biofilme dificulta a penetração de antimicrobianos, originando ambiente propício para trocas genéticas entre os microrganismos. As bactérias podem produzir biofilmes em superfícies inanimadas, como cateteres e outros dispositivos, bem como em órteses e próteses, e em superfície orgânicas (película dental, lentes de contato, trato respiratório de pacientes com fibrose cística e outras) (FUCHS; WANNMACHER, 2010).

A resistência adquirida decorre do desenvolvimento de novos mecanismos de defesa devido à exposição continuada a antimicrobianos e pode ser por mutação ou transferência horizontal de material genético. A resistência induzida por mutação ou síntese de novo material nucléico, com potencial de transferência entre diferentes cepas bacterianas, tem reduzido acentuadamente a eficácia dos antimicrobianos (TAVARES, 1996; FUCHS; WANNMACHER, 2010).

Assim, a aquisição de resistência aos antimicrobianos trata-se de um fenômeno genético, relacionado com alteração de genes contidos nos microrganismos, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas (TENOVER, 2006). Por isso, o uso indiscriminado de antibióticos,

terapêutica ou profilaticamente, em humanos e não humanos tem favorecido cada vez mais a seletividade e predominância de cepas bacterianas mais resistentes (DEL FIOLE et al., 2010).

Para diminuir essa incidência, alguns produtos naturais podem ser utilizados como agentes antimicrobianos. Essa tendência tem se tornado mundial e o uso de plantas medicinais têm sido extensivamente investigado como fonte de agentes medicinais em diversas clínicas para o combate de microorganismos resistentes a antibióticos. (ALVES et al., 2009; BOERA et al., 2005; KUET, 2010; PAREKH; CHANDA, 2007).

2.4 Tratamento e Resistência Antifúngica

Os antifúngicos disponíveis no mercado estão incluídos em cinco classes: os polienos, fluoropirimidinas, azóis, equinocandinas e alilaminas. Eles possuem várias desvantagens, como reduzido espectro de ação, toxicidade, falta da sensibilidade ao fungo e ação bacteriostática que culmina com a resistência aos antifúngicos de uso clínico (CHEN; SORRELL, 2007).

Atualmente, no tratamento de infecções por *Candida* três classes de agentes antifúngicos são utilizados. No grupo dos azólicos temos o fluconazol, itraconazol e o cetoconazol, nos derivados azólicos encontramos o voriconazol e o posaconazol e no grupo dos poliênicos, a nistatina e a anfotericina B (AVRELLA; GOULART, 2008).

O mecanismo de ação dos azóis e polienos é por meio da inibição da 14- α -demetilase, enzima fundamental na biossíntese do ergosterol (membrana celular) e está relacionado ao efeito tóxico, por apresentarem pouca seletividade da membrana fúngica, com ação na membrana celular do hospedeiro (CHEN; SORRELL, 2007).

Uma das alternativas para o tratamento de *Candida* resistente aos azóis são as equinocandinas, agente antifúngico, que inibe a síntese da β -(1,3)-D-glucana com atividade na parede celular do fungo, afetando o crescimento e a divisão celular (CHEN; SORRELL, 2007).

O número reduzido de classes de antifúngicos disponíveis, a resistência fúngica e os efeitos tóxicos dos tratamentos têm estimulado a pesquisa de possíveis drogas que podem ser encontradas em plantas medicinais (ABAD; ANSUATEGUI; BERMEJO, 2007).

2.5 Tratamentos Alternativos

2.5.1 Antissépticos Bucais

O uso de enxaguatórios bucais contendo princípios ativos com ação antibiótica tem sido sugerido como um preventivo da cárie, atuando na redução da formação do biofilme dental (FOSTER; PAN; KOLENBRANDER, 2004)

Na formulação destes enxaguatórios é encontrada a Clorexidina que, apesar de ser indicada para o controle do biofilme dental, apresenta alguns efeitos colaterais (BASTOS et al., 2004). A Clorexidina é um agente antimicrobiano de amplo espectro, com ação mais potente em microorganismos gram-positivos do que em microorganismos gram-negativos. Quando utilizada em baixas concentrações, resulta no aparecimento de distúrbios celulares, enzimáticos e na ação de receptores celulares. Quando utilizada em altas concentrações possui ação bactericida, causando precipitação citoplasmática ou coagulação (FARIA et al., 2007).

A Clorexidina possui sabor desagradável, que acarreta a alteração do paladar e a produção de coloração marrom nos dentes. Por esses motivos, o seu uso prolongado é desaconselhável. Entretanto, ela apresenta baixíssima toxicidade a células de mamíferos, tendo baixa absorção pelo trato gastrointestinal (ELEY, 1999). O digluconato de Clorexidina é utilizado nas formulações dos enxaguantes bucais nas concentrações de 0,12% e 0,20% para redução da formação do biofilme bucal (BASTOS et al., 2004; FARIA et al., 2007).

Outras substâncias adicionadas à composição dos enxaguatórios bucais são o triclosan, um composto fenólico, o Xilitol e os óleos essenciais de timol, mentol e eucaliptol.

Os óleos essenciais também são usados como flavorizantes, desinfetantes e antifúngicos sendo que a atividade antimicrobiana destes óleos está relacionada com a presença dos agentes fenólicos (GEBRAN; GEBERT, 2002).

Assim, com a finalidade de ampliar as opções de enxaguatórios bucais, houve um aumento no desenvolvimento de pesquisas direcionadas aos efeitos antimicrobianos encontrados em extratos de plantas (CORDEIRO et al., 2006).

A utilização de produtos fitoterápicos, economicamente mais viáveis, tem se mostrado uma alternativa interessante, contribuindo para melhorar o acesso da população aos cuidados com a prevenção e tratamento de doenças bucais (CORDEIRO et al., 2006b). Programas de fitoterapia estão sendo implantados em unidades básicas de saúde de vários estados brasileiros, a fim de contribuir com a assistência a atenção primária à saúde, suprimindo carências medicamentosas nas comunidades, inclusive para tratamentos de patologias bucais (SANTOS et al., 2009; BORBA; MACEDO, 2006; SILVA et al., 2006).

2.5.2 Plantas Medicinais

A utilização de plantas medicinais é passada de geração a geração em todo o mundo e, nos últimos anos, com o desenvolvimento de uma consciência ecológica cresceu o interesse para os estudos dos princípios ativos destas plantas, bem como, a produção de fitoterápicos (TRINDADE; SARTÓRIO; REZENDE, 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu oficialmente o uso de fitoterápicos em 1978 (ANVISA, 2011) e o tratamento por meio de plantas é denominado Fitoterapia, nome derivado da palavra grega *phthoi* (plantas) e *qerapa* (tratamento). A fitoterapia é considerada pelo Conselho Brasileiro de Fitoterapia (CONBRAFITO) como a utilização de plantas medicinais preparadas de acordo com experiências populares tradicionais ou métodos modernos científicos, nas suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias isoladas (PANIZZA, 2010).

Os compostos químicos encontrados no extrato das plantas são denominados princípios ativos e são os responsáveis por sua atividade terapêutica (TRINDADE; SARTÓRIO; REZENDE, 2008). Esses princípios ativos estão distribuídos em diferentes partes da planta, seja nas raízes, folhas, caules, sementes ou flores, onde podem ser encontradas em diferentes concentrações.

Os compostos responsáveis por uma ação farmacológica são os ácidos orgânicos, alcalóides, antraquinonas, cumarinas, flavonóides, glicosídeos cardiotônicos, mucilagens, óleos essenciais, saponinas, substâncias amargas, taninos e compostos inorgânicos. Os taninos, as cumarinas e os óleos essenciais são responsáveis por uma ação antimicrobiana. Já os flavonóides e as mucilagens possuem o efeito anti-inflamatório, sendo que o efeito analgésico e antiespasmódico

são produzidos pelos alcalóides, mucilagens, flavonóides, cumarinas e saponinas (TRINDADE; SARTÓRIO; REZENDE, 2008).

Os ácidos orgânicos, Cítrico, Málico e Tartárico são abundantes em frutos e bagas, aumentam a secreção salivar e têm a função de limpar a cavidade bucal, diminuindo o número de bactérias causadoras de cáries e infecções bucais e possuem também propriedade laxante e diurética (TRINDADE; SARTÓRIO; REZENDE, 2008).

A incorporação de produtos de origem vegetal aos dentifrícios e enxaguatórios bucais é utilizada como método preventivo da cárie. Plantas com efeito anti-inflamatório e antibacteriano têm demonstrado a capacidade de inibir a adesão de *S. mutans in vitro*. Um exemplo é o chá preto chinês (*Cássia alata*) que apresentou ser um inibidor forte na formação do biofilme (LIMSONG; BENJAVONGKULCHAI; KUVATANASUCHATI, 2004).

Outros produtos de origem vegetal, como malva, própolis e hortelã, têm sido incorporados com sucesso em dentifrícios e enxaguatórios bucais em muitos países. A grande vantagem do uso desses produtos é a escassez de efeitos colaterais, sendo relatada apenas uma pequena ardência na mucosa, quando comparados aos produtos sintéticos. Estudos recentes indicam o extrato de própolis e seus compostos como promissores cariostáticos (LIBERIO et al., 2009; KIM et al., 2011).

O diterpeno casbano isolado da planta *Croton nepetaefolius* demonstrou promissoras atividades antimicrobianas e antibiofilme. Esta é uma planta aromática nativa do Nordeste do Brasil conhecida popularmente como "marmeleiro sabiá", "marmeleiro cravo" ou "marmeleiro de cheiro". O composto diterpeno casbano mostrou efeito antimicrobiano em formas planctônicas e biofilmes de patógenos orais e pode ser considerado como uma molécula promissora para o tratamento de bactérias responsáveis pelo biofilme dentário (CARDOSO SÁ et al., 2012).

Assim, a indicação de fitoterápicos aumenta as opções terapêuticas dos profissionais de saúde, com oferta de medicamentos mais acessíveis e complementares no tratamento humano, com conseqüente valorização das tradições populares (SIMÕES et al., 2002).

2.5.3 *Morinda citrifolia*

Planta da família das Rubiáceas, a *Morinda citrifolia*, também chamada de Noni, é uma planta tropical que cresce amplamente em todo o Pacífico (MACPPHERSON et al., 2007). O noni é uma árvore de 3 a 8 metros de altura, com folhas largas, simples, de cor verde escura, e veias vincadas (Figura 1A e 1B). A planta floresce durante todo o ano e suas flores tubulares são pequenas e brancas (LIMA, 2008).

Suas frutas possuem formato oval, com superfície irregular, atingindo um comprimento de até 12 cm (Figura 1C). O fruto imaturo é duro, com uma cor verde brilhante e, após a maturação, tornam-se macios e de cor amarelado translúcido ou branco (Figura 3D). Por fim, a fruta madura apresenta um cheiro desagradável butirico de queijo e sabor de sabão (DUSSOSSOY et al., 2011).

A *Morinda citrifolia* tem sido usada tradicionalmente em remédios populares por polinésios há mais de 2000 anos e os seus efeitos terapêuticos têm sido descritos no tratamento em uma variedade de enfermidades bacterianas, virais e fúngicas. A forma mais tipicamente consumida é o suco da fruta, mas também pode ser encontrado no mercado o extrato seco da fruta em cápsulas (WANG et al., 2002).

Vários métodos são empregados para preparar o suco de noni, entretanto, o método de extração tradicional é feito por gotejamento e utilizado, após a fermentação do fruto maduro. Já a extração dos sucos não fermentados é obtida pressionando-se os frutos maduros com posterior pasteurização para sua preservação. Já o pó utilizado em cápsulas é obtido pela evaporação do suco e adição de excipientes não-higroscópicos, para evitar aglomeração do extrato seco, que é altamente higroscópico (POTTERAT; HAMBURGER, 2007).

O suco microfiltrado de *M. citrifolia* (*noni*) demonstrou propriedades antioxidantes, *in vitro*, e antiinflamatórias, *in vivo*, e compostos polifenóis como a cumarina, os flavonóides, derivados do ácido fenólico e dois iridóides foram identificados neste estudo e correlacionados aos efeitos da planta. (DUSSOSSOY et al., 2011). Compostos presentes em *M. citrifolia*, tais como L-asperilosídeo, escopoletina e alizarina tem sido relatados como responsáveis pelos seus efeitos antibióticos, antitumorais, antioxidantes e anti-inflamatórios (BEH et al., 2010)



Figura 1 - *Morinda citrifolia*; árvore (A), frutos (B), flor(C) e semente(D).

Fonte: CORREIA (2010), modificado.

De acordo com Heinicke (1985), a fruta noni contém a proxeronina, um precursor natural da Xeronina, substância que após ingestão, é convertida no alcalóide Xeronina através da enzima proxeroninase. Heinicke (1985) afirma que a Xeronina é capaz de modificar a estrutura molecular das proteínas, tendo uma ampla escala de atividades biológicas.

Em um estudo, a atividade antimicrobiana do fruto de *M. citrifolia* foi claramente percebida, quando utilizado na forma de gel como um medicamento intracanal, contra *Enterococcus faecalis*. No entanto, ainda são necessários alguns estudos para determinar qual a concentração ideal de *M. citrifolia* a ser utilizada (BEH et al., 2010).

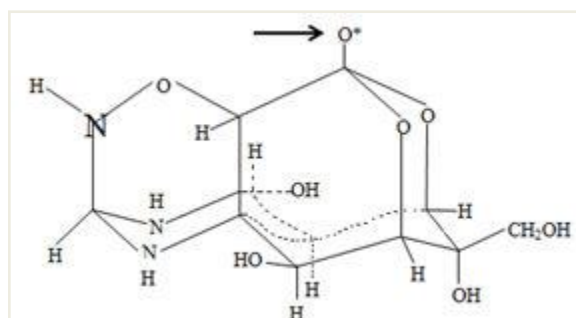


Figura 2 - Estrutura da Xeronina. Fonte: Heinicke, 2001.

O extrato de folhas da *M. citrifolia*, proveniente da Índia, apresentou atividade larvicida contra espécies de mosquitos vetores como o *Anopheles stephensi*, o *Aedes aegypti*, e o *Culex quinquefasciatus* (KOVENDAN et al., 2012), sugerindo que o mesmo pode ser utilizado como auxiliar para programas de controle de vetores.

Este extrato aquoso também demonstrou capacidade de estimulação da formação óssea em tecido periodontal humano, a qual é explicada pela presença de alguns princípios ativos da folha de noni, tais como a vitamina C, os triterpenos e flavonoides (BOONANANTANASARN et al., 2012).

O uso tradicional das diferentes partes do noni é muito amplo. O fruto de noni é usado tradicionalmente em casos de diabetes, febre, leucorréia, asma, depressão, artrite, hipertensão, doenças cardiovasculares, desordens menstruais, distúrbios gastrointestinais e câncer. Também é usada como estimulante da imunidade e como agente antibacteriano, antiviral, antiparasitário e antifúngico (WANG et al., 2002).

Nos últimos anos tem-se multiplicado o número de publicações sobre a composição química e as atividades biológicas do fruto de noni. Desta forma é necessário conhecer melhor os mecanismos de ação farmacológica e estudos clínicos que avaliem sua eficácia e sua segurança (GUPTA; SANTANA, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo desse estudo foi investigar a atividade antimicrobiana, antiaderente e antiacidúrica em cepas padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e a atividade antimicrobiana e antiaderente em cepas de *Candida albicans* utilizando o derivado vegetal de *Morinda citrifolia*.

3.2 Objetivo Específico

- 1 - Preparar o derivado vegetal da planta *Morinda citrifolia*.
2. Avaliar *in vitro* o consumo de carboidratos e acidogenia durante o crescimento de *Streptococcus mutans* na presença do derivado vegetal de *Morinda citrifolia*.
3. Avaliar *in vitro* o consumo de carboidratos durante o crescimento de *Candida albicans* na presença de derivado vegetal de *Morinda citrifolia*.
4. Investigar *in vitro* a atividade do derivado vegetal de *Morinda citrifolia* sobre a formação do biofilme de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo do derivado vegetal

O fruto da *M. citrifolia* (noni) foi coletado na cidade de Araguari-MG (Fazenda Boa Vontade), manual e aleatoriamente, a partir dos indivíduos disponíveis, independentemente do seu tamanho, quando atingido o estágio verde.

Após a coleta, os frutos verdes de *M. citrifolia* (noni) passaram por nova seleção, seguidos da retirada da polpa do fruto por meio de uma peneira. O despulpamento foi um procedimento utilizado para separar da polpa do fruto o material fibroso, as sementes e a casca e que teve por finalidade a obtenção de um produto homogêneo, com partículas de tamanho padronizado. Após a extração, a polpa de noni foi submetida a uma centrifugação, seguida de microfiltração através de filtro estéril de 0.22 µm. A polpa microfiltrada foi armazenada em Eppendorfs (1,0 mL) e congelada a -20°C em freezer até a realização das análises.

4.2 Condições de cultivo de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*

Para a realização dos testes foram empregadas as cepas CEC 1291 de *C. albicans* e ATCC 25175 de *S. mutans*. As cepas CEC 1291 de *C. albicans* e ATCC 25175 de *S. mutans* foram submetidas a dois repiques consecutivos para o restabelecimento do metabolismo normal das células.

4.2.1 *Streptococcus mutans*

A cepa ATCC 25175 de *S. mutans* foi adquirida da Fundação André Toselho, localizada na cidade de Campinas (SP). A bactéria foi armazenada no laboratório de microbiologia da UNIUBE, à temperatura de -20°C em uma solução de 40% de glicerol (v/v). Antes de cada ensaio a cepa de *S. Mutans* foi descongelada em temperatura ambiente e inoculada em meio líquido TSB e incubadas a 37° C, atmosfera microaerofílica 20% CO₂ por 12 horas. Um segundo repique foi realizado a 37° C anaerobicamente (20% CO₂) por mais 12 horas de incubação.

4.2.2 *Candida albicans*

A cepa de *C. albicans* CEC 1291 foi cedida pelo professor Christophe d'Enfert do Unité Biologie et Pathogenicité Fongigues do Instituto Pasteur-França. Antes das análises, a cepa de *C. Albicans* foi descongelada em temperatura ambiente, e 50 µL foram inoculados em tubos de vidro com 5 mL do meio BHI e incubada a 37°C em aerobiose por 48 h. Após a incubação, a cepa da levedura foi novamente inoculada no meio BHI e incubada por mais 16 h a 37°C em aerobiose.

4.2.3 Preparo das células para os ensaios

Após o cultivo para o restabelecimento do metabolismo normal das células, o inóculo foi padronizado de acordo com a turbidez do meio e avaliado em espectrofotômetro (T60UV Spectrophotometer). A turbidez inicial dos microrganismos foi padronizada em uma concentração final de 1×10^6 UFC/mL, concentração ótima para a formação de biofilme segundo Ramage e colaboradores, 2005. A turbidez da cepa de *S. mutans* foi ajustada em uma absorbância (A) de 600 nm ($OD_{600} = 0,5$) e *C. albicans* foi ajustado em uma absorbância de 530 nm ($OD_{530} = 0,680$) antes dos experimentos.

4.3 Formação do biofilme em placa de polietileno

Após o ajuste (10^6 UFC/mL) os microrganismos foram preparados para o crescimento do biofilme em placas de polietileno com 24 poços.

4.3.1 Biofilme de *Streptococcus mutans*

Para a formação do biofilme, 1 mL do meio TSB suplementado com 50 mmol de sacarose foram adicionados aos poços da placa, seguido da inoculação de 50 µL da cepa de *S. mutans* (10^6 UFC/mL). A placa foi incubada a 37°C anaerobicamente por 12 horas.

4.3.2 Biofilme de *Candida albicans*

Para o crescimento do biofilme de *C. albicans*, os poços da placa foram tratados com 250 µL de soro fetal bovino (SFB). A placa foi incubada a 37°C *overnight* em aerobiose. Após incubação da placa com o SFB, 1 mL do meio BHI

suplementado com 1,5% de glicose foram adicionados aos 24 poços da placa, seguido da inoculação de 5 μL de suspensão de levedura (10^6 UFC/mL). A placa foi incubada por 12 horas, a 37° C em aerobiose.

4.4 Análises das atividades metabólicas dos microrganismos

O meio TSB da placa do biofilme de *S. mutans* e o meio BHI da placa do biofilme de *C. albicans* foram desprezados após 12 horas de incubação. Os poços da placa foram lavados cuidadosamente por 03 vezes com solução de PBS (Phosphate Buffered Saline) estéril. Por fim, as placas com o biofilme dos microrganismos foram utilizadas para a análise das atividades metabólicas (acidogenia de *S. mutans* e consumos de glicose de *S. mutans* e *C. albicans*).

4.4.1 Grupos de tratamento do biofilme *Streptococcus mutans*

Após o crescimento do biofilme e lavagem com PBS, os poços da placa de polietileno foram preparados para o tratamento do biofilme. Foram utilizados seis (06) grupos de tratamento para a análise do metabolismo de *S. mutans* (Quadro 1).

A suspensão com os meios de cultura, derivado vegetal e controles foram adicionadas a placa de 24 poços com o biofilme. A placa com o biofilme de *S. mutans* foi incubada em estufa a 37° 20% CO₂ por 4 horas.

Grupos	Quantidade
A – Controle Tratado com Clorexidina^a	950 mL de TSB + 50 μL de Clorexidina
B – Controle sem Tratamento (CTL -)^b	900 mL de TSB + 100 μL de PBS
C – Tratado com Derivado Vegetal DV	990 mL de TSB + 10 μL de DV
D – Tratado com Derivado Vegetal DV	950 mL de TSB + 50 μL de DV
E – Tratado com Derivado Vegetal DV	900 mL de TSB + 100 μL de DV
F – Sem Tratamento	900 mL de TSB + 100 μL de água

Quadro 1 - Protocolo de tratamento do biofilme de *S. mutans*; ^aControle positivo (CTL+); ^bControle negativo (CTL-).

Fonte: Autora do trabalho (2013)

4.4.2 Grupos de tratamento do biofilme de *Candida albicans*

Após o crescimento do biofilme e lavagem com PBS, os poços da placa de polietileno foram preparados para o tratamento do biofilme. Foram utilizados seis (06) grupos de tratamento para a análise do metabolismo de *C. albicans* (Quadro 2). A suspensão com os meios de cultura, derivado vegetal e controles foram adicionadas a placa de 24 poços com o biofilme. A placa com o biofilme de *C. albicans* foi incubada a 37°C em aerobiose por 04 horas.

Grupos	Quantidade
A – Controle Tratado com Clorexidina^a	950 mL de BHI + 50 µL de Clorexidina
B – Controle sem Tratamento (CTL -)^b	900 mL de BHI + 100 µL de PBS
C – Tratado com Derivado Vegetal (DV)	990 mL de BHI + 10 µL de DV
D – Tratado com Derivado Vegetal (DV)	950 mL de BHI + 50 µL de DV
E – Tratado com Derivado Vegetal (DV)	900 mL de BHI + 100 µL de DV
F – Sem Tratamento	900 mL de BHI + 100 µL de água

Quadro 2 - Protocolo de tratamento do biofilme de *C. albicans*; ^aControle positivo (CTL+); ^bControle negativo (CTL-).

Fonte: Autora do trabalho (2013)

4.4.3 Avaliação do pH do biofilme de *Streptococcus mutans* (Acidogenia)

As medidas do pH nos poços da placa foram realizadas com pHmetro (Marte, Modelo MB10) após a incubação de 1h, 2h, 3h e 4 h. A atividade metabólica de *S. mutans* foi avaliada, a cada 1 hora de incubação, através da aferição do pH do meio dos seis grupos de estudo (A, B, C, D e E).

Para análise bioquímica do consumo de carboidrato durante o crescimento da bactéria foi realizada a coleta de 100 µL de alíquotas do meio de cultura. As amostras (alíquotas) foram acondicionadas em Eppendorfs e congeladas a -20° C.

4.4.4 Avaliação do consumo de glicose pelos biofilmes de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*

Os consumos de glicose de *S. mutans* e *C. albicans*, foram avaliados após a formação do biofilme e tratamento com o derivado vegetal e clorexidina. Antes do experimento, as alíquotas foram descongeladas em temperatura ambiente (t.a.) e centrifugadas 3000 RPM (Microcentrifuga NT 805 - Nova Técnica) por 15 minutos. A avaliação quantitativa da glicose no meio de cultivo durante as diferentes fases de crescimento (1h, 2h, 3h e 4 h) foi realizada pelo método enzimático (Kit Biotecnica ref.1000800/p), no comprimento de onda de 505 nm.

O aparelho utilizado para análise foi um espectrofotômetro (T60UV Spectrophotometer). As leituras das amostras foram realizadas em absorbância e convertidas em mg/dL. Foi utilizado padrão de glicose de 100 mg/dL do kit enzimático para as conversões das leituras.

4.5 Determinação da susceptibilidade dos microrganismos – Disco de Difusão

O método de disco-difusão, também conhecido como *teste de Kirby-Bauer* modificado (BAUER *et al.*, 1966) foi utilizado para verificar a atividade inibitória de *M. citrifolia* sobre *C. albicans* e *S. mutans* em meio de Agar sólido.

4.5.1 Grupos de tratamento – Disco de Difusão

Foram preparados 08 grupos de tratamentos para realização da técnica de difusão em Agar (Quadro 3):

Grupos de Tratamento – Teste disco de difusão
1 – Disco Controle sem Tratamento (CTL _)
2 – Disco Tratado com 2 µL de Derivado Vegetal (DV)
3 – Disco Tratado com 4 µL de Tween 0,1%
4 – Disco Controle Tratado com 4 µL de Clorexidina (CTL+)
5 – Disco Tratado com 4 µL de Derivado Vegetal (DV)
6 – Disco Tratado com 8 µL de Derivado Vegetal (DV)
7 – Disco Tratado com 16 µL de Derivado Vegetal (DV)
8 – Disco Tratado com 32 µL de Derivado Vegetal (DV)

Quadro 3 - Protocolo de Tratamento para o Experimento do Disco de Difusão de *S. mutans* e *C. albicans*

Fonte: Autora do trabalho (2013)

4.5.2 Preparação dos discos de difusão

Discos de papel filtro qualitativo com 6 mm de diâmetro foram identificados e 4 μL do reagente tween 0,1% (v/v), veículo usado na impregnação dos discos, foram adicionados em cada disco com o auxílio de uma microponteira. Após a impregnação do tween, os discos de papel foram autoclavados à temperatura de 121°C por 20 minutos. Em seguida diferentes quantidades do derivado vegetal de *M. citrifolia* e dos controles foram adicionados aos discos de antibiograma esterilizados para realização da difusão dos discos em Agar.

A solução de clorexidina (controle positivo), derivado vegetal de *M. citrifolia* e a solução Tween® 0,1% (v/v) foram filtrados em filtro estéril de 0,22 micras antes de serem incorporados aos discos de papel.

4.5.3 Susceptibilidade de *Streptococcus mutans*

A técnica de discos de difusão modificada (BAUER et al., 1966) no meio sólido TSA foi utilizada para avaliar a atividade antibacteriana do extrato de *M. citrifolia*. O microrganismo (10^6 UFC/mL) foi espalhado (“semeado”) uniformemente, em toda a superfície do meio de cultivo sólido TSA com o auxílio de um swab estéril. Os discos impregnados com os testes e controles foram colocados sobre o Agar com o auxílio de uma pinça esterilizada. As placas foram incubadas a 37°C anaerobicamente, por 24 horas. Após incubação as placas foram fotografadas e os halos de inibição medidos com paquímetro. As atividades antimicrobianas foram determinadas com base nos diâmetros médios dos halos de inibição (triplicata).

4.5.4 Susceptibilidade de *Candida albicans*

Para avaliar a atividade antifúngica do extrato de *M. citrifolia* foi utilizada a técnica de difusão em Agar de acordo com a norma M27-2A (CLSI, 2002) no meio de cultura SDB. O microrganismo (10^6 UFC/mL) foi espalhado (“semeado”) uniformemente, em toda a superfície do meio de cultivo sólido SDB com o auxílio de um swab estéril. Os discos impregnados com os testes e controles foram colocados sobre o Agar com o auxílio de uma pinça esterilizada. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, aerobicamente.

Após a incubação, as placas foram fotografadas e os halos de inibição medidos com paquímetro após 24 horas de incubação. As atividades antimicrobianas foram determinadas com base nos diâmetros médios dos halos de inibição (triplicata).

4.6 Efeito sobre a aderência dos microrganismos em lamínulas de vidro

A cultura da cepa ATCC 25175 de *S. Mutans* após ajuste da turbidez ($OD_{600}=0,5$) e a cepa CEC 1291 *C. albicans* ($OD_{530}=0,680$) foram utilizadas para o crescimento do biofilme.

4.6.1 Formação do biofilme de *Candida albicans* em placa de polietileno com lamínulas de vidro

Para analisar o efeito do derivado vegetal de *M. citrifolia* sobre o crescimento do biofilme, 03 grupos de tratamento foram previamente preparados com o derivado vegetal (teste), a clorexidina (controle positivo) e o PBS (controle negativo):

- a) suspensão com 2850 μL do meio BHI inoculado com 100 μL de microrganismo (10^6 UFC/mL) e 150 μL do derivado vegetal (teste);
- b) suspensão com 2850 μL do meio BHI inoculado com 100 μL de bactéria (10^6 UFC/mL) e 150 μL de clorexidina (controle positivo);
- c) suspensão com 2850 μL do meio BHI inoculado com 100 μL de bactéria (10^6 UFC/mL) e 150 μL do PBS (controle negativo).

As suspensões do teste e dos controles foram submetidas a uma agitação vigorosa em tubo de vidro com tampa rosqueada por 60 minutos antes de serem adicionados aos poços da placa de polietileno com as lamínulas circulares para avaliar a atividade de *M. citrifolia* na aderência dos microrganismos. Os tubos foram agitados por 01 minuto a cada 10 minutos.

Para a formação do biofilme de *C. albicans* em placa de polietileno com lamínulas circulares foi adicionado previamente 100 μL de SFB e incubada a 37°C em aerobiose por 24 horas. Após a incubação, 100 μL de suspensão com o meio BHI suplementado com 1,5% de glicose (1M), previamente tratada e agitada, foram

adicionadas às placas de polietileno com lamínulas de vidro. As placas com as lamínulas circulares foram incubadas a 37°C em aerobiose por 03 horas. As lamínulas de vidro foram retiradas a cada 1 hora de incubação e o biofilme cuidadosamente lavado 03 vezes com PBS, corado com cristal violeta, seco em temperatura ambiente. As imagens foram capturadas (40x) em microscópio de luz (ZIESS, Scop. A1, Câmera axiocam Cc1).

4.6.2 Formação do biofilme de *Streptococcus mutans* em placa de polietileno com lamínulas de vidro

Para analisar o efeito do derivado vegetal de *M. citrifolia* sobre o crescimento do biofilme, 03 grupos de tratamento foram previamente preparados com o derivado vegetal (teste), a clorexidina (controle positivo) e o PBS (controle negativo):

- a) suspensão com 2850 μL do meio TSB inoculado com 100 μL de microrganismo (10^6 UFC/mL) e 150 μL do derivado vegetal (teste);
- b) suspensão com 2850 μL do meio TSB inoculado com 100 μL de bactéria (10^6 UFC/mL) e 150 μL de clorexidina (controle positivo);
- c) suspensão com 2850 μL do meio TSB inoculado com 100 μL de bactéria (10^6 UFC/mL) e 150 μL do PBS (controle negativo).

As suspensões do teste e dos controles foram submetidas a uma agitação vigorosa em tubo de vidro com tampa rosqueada por 60 minutos antes de serem adicionados aos poços da placa de polietileno com as lamínulas circulares para avaliar a atividade de *M. citrifolia* na aderência dos microrganismos. Os tubos foram agitados por 01 minuto a cada 10 minutos.

Após a incubação e agitação do grupo de tratamento, 100 μL de suspensão previamente preparada com o meio TSB suplementado 50 mmol de sacarose, foi adicionada às placas de polietileno com lamínulas de vidro. As placas com as lamínulas circulares foram incubadas a 37°C anaerobicamente por 03 horas. As lamínulas de vidro foram retiradas a cada 1 hora de incubação e o biofilme cuidadosamente lavado 03 vezes com PBS, corado com cristal violeta, seco em temperatura ambiente. As imagens foram capturadas (40x) em microscópio de luz (ZIESS, Scop. A1, Câmera AxioCam Cc1).

4.7 Efeito sobre a formação de tubo germinativo de *Candida albicans*

O efeito do derivado vegetal de *M. citrifolia* sobre a formação de tubos germinativos de *C. albicans* foi realizado após o cultivo do fungo em BHI e a padronização da turbidez ($OD_{530} = 0,680$).

4.7.1 Grupos de estudo – Tubo germinativo

Para a formação dos tubos germinativos foram utilizados 03 grupos de tratamento:

- a) grupo 1 (teste): 100 μL de suspensão de levedura (10^6 UFC/mL), 100 μL de SFB e 100 μL de derivado vegetal;
- b) grupo 2 (controle positivo): 100 μL de suspensão de levedura (10^6 UFC/mL), 100 μL de SFB e 100 μL de Fluconazol;
- c) grupo 3 (controle negativo): 100 μL de suspensão de levedura (10^6 UFC/mL), 100 μL de SFB e 100 μL de PBS.

4.7.2 Formação do tubo germinativo

Em uma placa estéril de polietileno com lamínulas circulares foi adicionado 100 μL da suspensão (teste e controles). A placa foi incubada a 37°C em aerobiose durante 3 horas, com agitação suave. Após incubação foi pipetado 20 μL da suspensão em uma lamínula e examinada no microscópio (40x, optovaria 2,5). O efeito do derivado vegetal de *M. citrifolia* sobre a formação do tubo germinativo foi observado através de microscópio óptico (ZIESS. Scop A1).

4.8 Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata de valores provenientes de 3 ensaios independentes e os resultados refletem a média destes valores. O teste T-Student foi usado para avaliar a significância entre os grupos experimentais avaliados. Todas as amostras apresentaram distribuição normal.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do pH do meio de cultivo de *Streptococcus mutans*

O biofilme de *S. mutans* cultivado em placas de polietileno foi tratado com o derivado de *M. Citrifolia* (10, 50 e 100 μL) e clorexidina. O pH do meio de cultura TSB foi mensurado com a utilização de um pHmetro após a inoculação do derivado de *M. citrifolia* nos poços da placa com o biofilme e o meio analisado nos tempos de 1, 2,3 e 4 horas de incubação.

Na Figura 3, pode-se observar que houve uma diminuição nos valores de pH com relação ao tempo (em horas). Nas 4 primeiras horas de crescimento do biofilme de *S. Mutans*, a diminuição do valor de pH está relacionado à fase de crescimento exponencial bacteriana (JEFFERSON, 2004). Quando comparamos com o controle negativo (PBS), todos os volumes testados do derivado vegetal não foram capazes de inibir a acidogenia do *Streptococcus* no biofilme ($p > 0,05$), não havendo diferença estatística entre os tratamentos. Nesta análise foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,0264$), quando comparamos o controle negativo (PBS) com a clorexidina (CTL +).

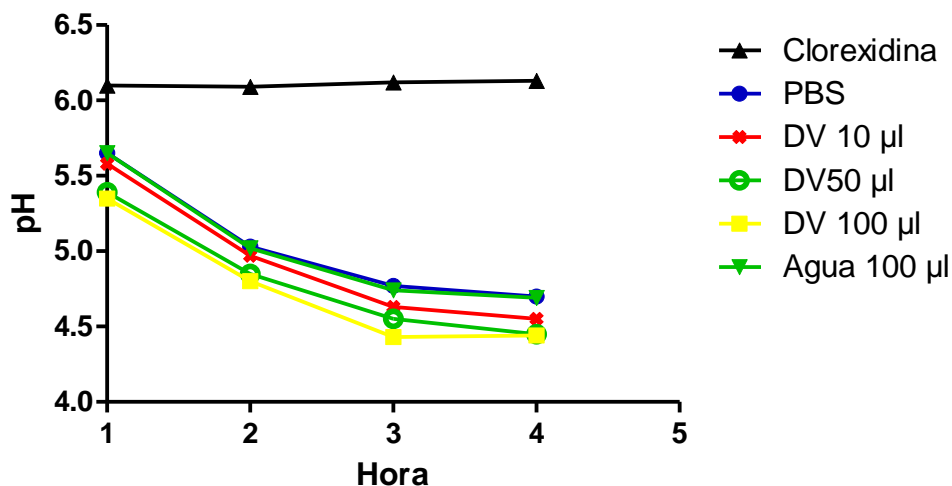


Figura 3 - Gráfico da mensuração do pH do meio TSB. *Streptococcus. Mutans* foi inoculado em meio TSB e tratado com o derivado vegetal (DV) de *Morinda citrifolia* (10, 50 e 100 μL) e água. A clorexidina foi utilizada como controle positivo e o PBS como controle negativo.

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

O consumo de glicose pelo biofilme de *S. mutans* foi analisado em diferentes tempos (1, 2,3 e 4 horas) de incubação com diferentes volumes do derivado vegetal e controles. O grupo PBS (controle negativo) foi comparado com os grupos de tratamento. Podemos observar na Figura 4 que o tratamento do biofilme com 10 μL do extrato de *M. citrifolia* não apresentou ação inibitória do consumo de glicose ($p=0,3710$).

Entretanto, quando foram utilizados 50 e 100 μL no tratamento do biofilme , ambos apresentaram diferença estatística do consumo de glicose quando comparado com o controle negativo, 50 μL ($p=0,043$) e 100 μL ($p=0,0138$). O volume de 100 μL apresentou uma diferença estatística mais significativa , pois conseguiu manter mais constante a concentração de glicose durante 4 horas de incubação. O controle positivo (clorexidina) apresentou diferença estatística (0,012) quando comparado com o controle negativo.

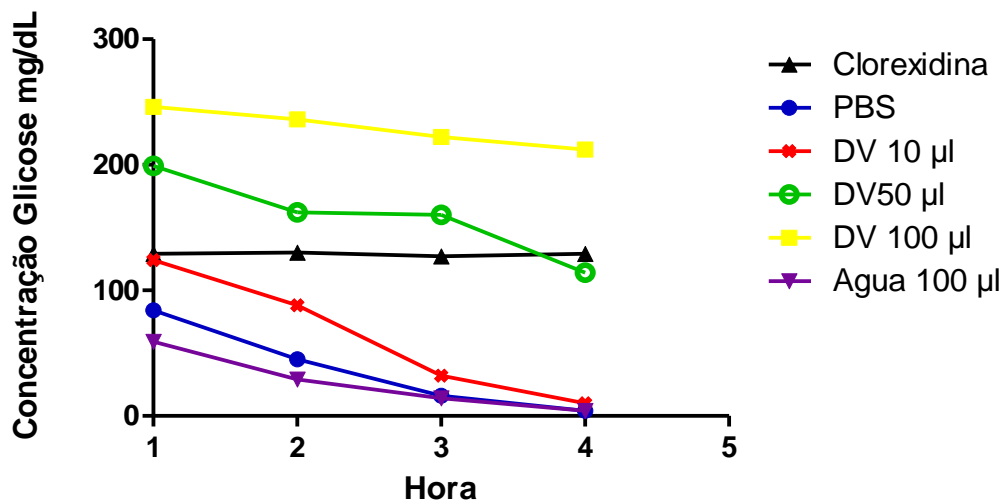


Figura 4 - Consumo de glicose do biofilme de *S. mutans* em diferentes tempos de incubação. O grupo PBS , utilizado como referencial, foi comparado com os grupos clorexidina ($p=0,012$), 10 μL ($p=0,3710$); 50 μL ($p=0,043$); 100 μL ($p=0,0138$) e Controle Negativo ($p=0,4481$).

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

A concentração da glicose do biofilme de *C. albicans* foi analisada em diferentes tempos (1, 2, 3 e 4 horas) de tratamento com diferentes volumes do extrato vegetal de *M. citrifolia* a fim de mensurar o potencial inibitório do derivado vegetal sobre o metabolismo fúngico.

Na Figura 5, observa-se que o volume de 10 μL do derivado vegetal não foi estatisticamente significativo ($p=0,1530$), quando comparado ao controle negativo. Quando foi utilizado 50 μL e 100 μL , ambos foram capazes de diminuir estatisticamente o consumo de glicose quando comparado com o controle negativo 50 μL ($p=0,0492$) e 100 μL ($p=0,0250$).

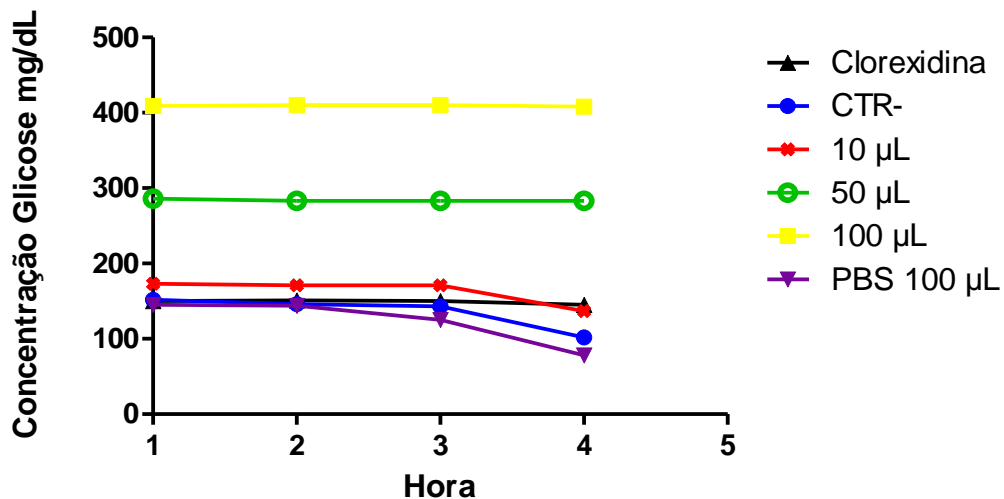


Figura 5 - Consumo de glicose do biofilme de *C.albicans* em diferentes tempos de incubação. O grupo PBS , utilizado como referencial, foi comparado com os grupos clorexidina ($p=0,0157$), 10 μL ($p=0,1530$); 50 μL ($p=0,0492$); 100 μL ($p=0,0250$) e Controle Negativo ($p=0,3473$).

5.4 Determinação da susceptibilidade de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* – Disco de Difusão

Os resultados obtidos da difusão em Agar foram submetidos a análise descritiva e comparativa dos halos de inibição, verificando a atividade antimicrobiana do derivado vegetal de *M. citrifolia* sobre as linhagens padronizadas de *S. mutans* e *C. albicans*, bem como comparando seus resultados com o controle positivo (clorexidina 0,12%).

A fim de analisar a atividade antibacteriana do extrato de *M. citrifolia*, discos de filtro identificados, impregnados com volumes diferentes do derivado vegetal e controles foram incorporados aos meios de cultura sólidos. Como representado na Figura 6, quando o extrato de *M. citrifolia* foi testado em placas contendo *S. mutans*, nenhum dos volumes testados apresentou halos de inibição. Conforme os resultados apresentados na Tabela 4, a clorexidina 0.12%, apresentou ação inibitória com halo médio de inibição de 2 cm no meio de cultura de *S. mutans*.

Entretanto, quando o derivado vegetal de *M. citrifolia* foi testado em placas contendo *C. albicans* não houve formação de halo de inibição nos volumes de 2 e 4 μL de DV. Já quando foi utilizado 8 μL do derivado vegetal houve a formação de um halo médio de 0.88 cm. Na utilização de 16 μL houve a formação de um halo médio de 1.083 e quando foi testado 32 μL do extrato, o halo médio obtido foi de 1.4. Na utilização de 32 μL de extrato desta planta, houve uma ação antifúngica similar quando comparado a Clorexidina (1,33 cm). As medidas dos halos podem ser visualizadas nas Tabelas 1 e 2 e as placas analisadas na Figura 6:

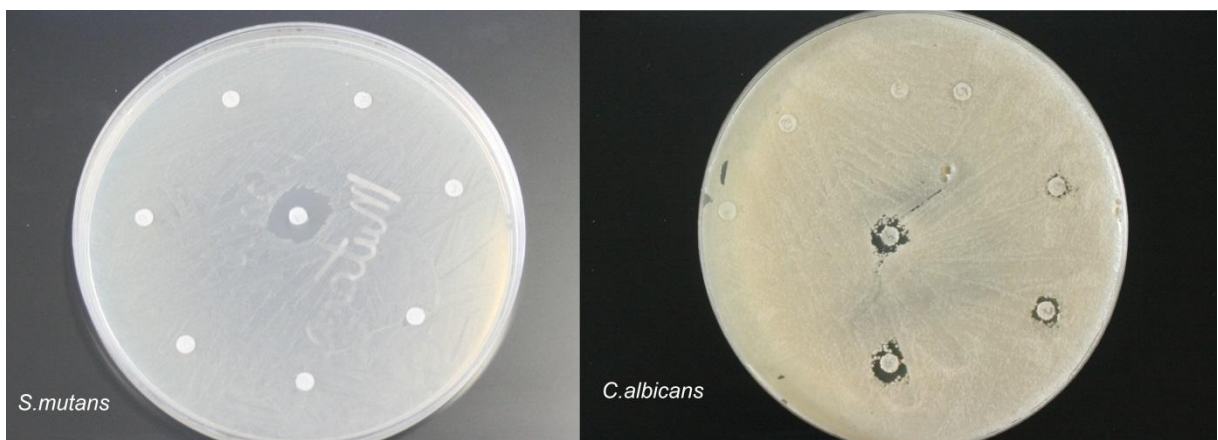


Figura 6 - Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do derivado vegetal de *M. citrifolia* pelo método de disco de difusão em Agar.

Tabela 1 - Ensaio de disco de difusão realizado em cepas de *S. mutans* com diferentes concentrações de *M. citrifolia*.

Grupos de Tratamento	Halos (Triplicata) ^a			Media
1 Disco sem tratamento (CTL -)	0 ®	0 ®	0 ®	0 ®
2 Disco tratado com 2 μL de DV ^b	0 ®	0 ®	0 ®	0 ®
3 Disco tratado com 4 μL de Tween 0, 1%.	0 ®	0 ®	0 ®	0 ®
4 Disco tratado com 4 μL de CTL+ ^c	1.95	2.05	2.00	2.00
5 Disco tratado com 4 μL de DV	0 ®	0 ®	0 ®	0 ®
6 Disco tratado com 8 μL de DV	0 ®	0 ®	0 ®	0 ®
7 Disco tratado com 16 μL de DV	0 ®	0 ®	0 ®	0 ®
8 Disco tratado com 32 μL de DV	0 ®	0 ®	0 ®	0 ®

^aValores dos halos de inibição medidos com paquímetro (centímetros); ^bDV (derivado vegetal); ^cCTL+ (Clorexidina 0,12 %); 0 ® (Resistente)

Fonte: Autora do trabalho (2013)

Tabela 2 - Ensaio de disco de difusão realizado em cepas de *C. albicans* com diferentes concentrações de *M. citrifolia*.

Grupos de Tratamento	Halos (Triplicata) ^a			Media
1 Disco sem tratamento (CTL -)	0 ®	0 ®	0 ®	0 ®
2 Disco tratado com 2 µL de DV ^b	0 ®	0 ®	0 ®	0 ®
3 Disco tratado com 4 µL de Tween 0, 1%.	0 ®	0 ®	0 ®	0 ®
4 Disco tratado com 4 µL de CTL+ ^c	1.40	1.25	1.35	1.33
5 Disco tratado com 4 µL de DV	0 ®	0 ®	0 ®	0 ®
6 Disco tratado com 8 µL de DV	0.85	0.90	0.90	0.88
7 Disco tratado com 16 µL de DV	1.10	1.05	1.10	1.08
8 Disco tratado com 32 µL de DV	1.35	1.40	1.45	1.40

^aValores dos halos de inibição medidos com paquímetro (centímetros); ^bDV (derivado vegetal); ^cCTL+ (Clorexidina 0,12 %); ® (resistente).

Fonte: Autora do trabalho (2013)

5.5 Efeito aderência de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* em lamínulas de vidro

Para avaliar a ação do derivado vegetal de *M. citrifolia* sobre a formação do biofilme de *S. mutans* e *C. albicans*, meios de cultura contendo os respectivos microorganismos foram distribuídos em poços de placa de polietileno contendo lamínulas de vidro.

Para a formação do biofilme de *S. mutans* (10^6 UFC/mL) o meio utilizado foi o TSB suplementado com sacarose e para *C. albicans* (10^6 UFC/mL) o meio BHI suplementado com glicose. As lamínulas dos poços da placa foram examinadas no período de 1, 2 e 3 horas.

Conforme os resultados na figura 7, observa-se que o extrato vegetal foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de biofilme produzido por *C. albicans*, quando comparado ao controle negativo. Após 1 hora de tratamento, *M. citrifolia* conseguiu diminuir a produção de biofilme quando comparado com o controle negativo, sendo que, entretanto, não apresentou uma ação tão eficaz como a da clorexidina. Após 2 e 3 horas de tratamento, o extrato se mostrou mais eficiente nessa redução e a sua ação

pode ser considerada muito similar à que foi encontrada após o tratamento com a clorexidina.

Neste sentido, o extrato vegetal também foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de biofilme produzido por *S. mutans*, quando comparado ao controle negativo. Diferentemente da ação na formação do biofilme de *C. albicans*, o derivado vegetal foi capaz de reduzir a produção de biofilme de *S. mutans* nas primeiras horas de tratamento (1 e 2 horas) e essa redução foi bastante similar a ação da clorexidina, também nesse tempo. Entretanto, na terceira hora, a sua ação não conseguiu ser tão eficiente quanto nas duas primeiras horas, apesar de também ser capaz de inibir a formação do biofilme.

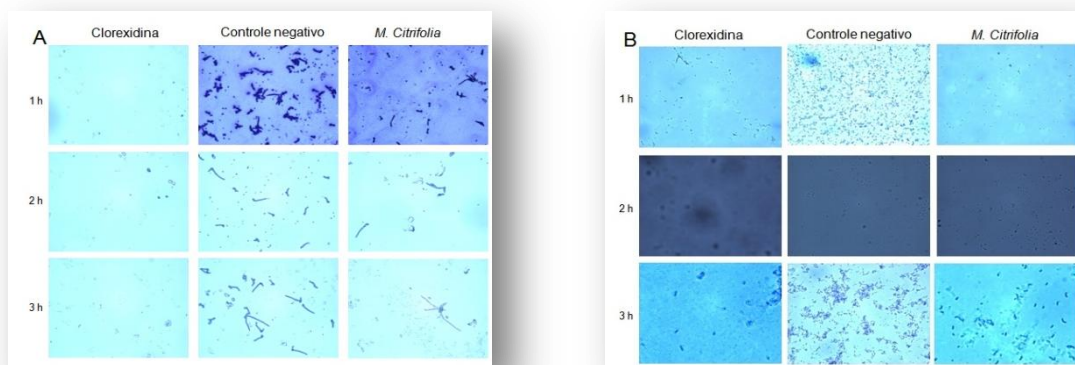


Figura 7 - Microscopia de luz do biofilme de *C. albicans* e *S. mutans* sob a ação de clorexidina e derivado vegetal (DV) de *M. citrifolia* (ZIESS. Scop A1, 40x). Em A, a ação do DV na formação do biofilme de *C. albicans*. Em B, a ação do DV na formação do biofilme de *S. mutans*.
Fonte: Autora do trabalho (2013)

5.6 Efeito sobre a formação de tubo germinativo de *Candida albicans*

A ação do derivado vegetal de *M. citrifolia* na formação do tubo germinativo foi analisado com a incubação adequada de *C. albicans*, do derivado vegetal e do fluconazol. As imagens foram analisadas por microscopia de luz. Na Figura 8, podemos observar que a *M. citrifolia* foi eficaz na inibição da formação do tubo germinativo quando comparado ao controle negativo.

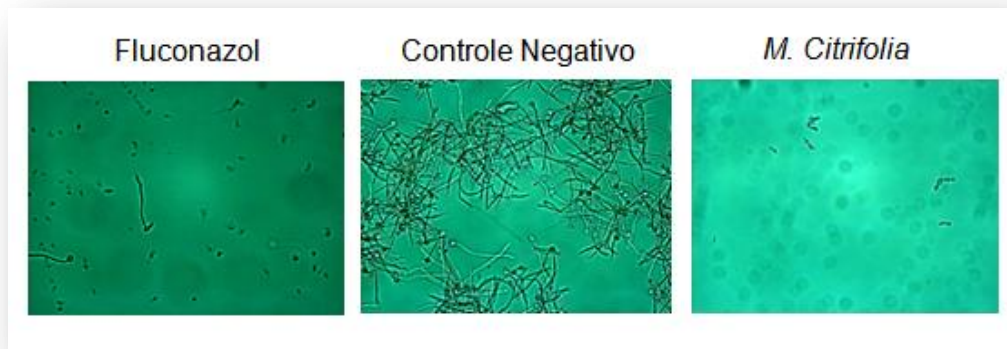


Figura 8 - Microscopia de luz do tubo germinativo de *C. albicans* (ZIESS. Scop A1; 40x, optovaria 2,5)
Fonte: Autora do trabalho (2013)

6 DISCUSSÃO

Este trabalho foi planejado com o propósito de mensurar a possível atividade antifúngica e antibacteriana do derivado vegetal de *M. citrifolia*. A grande vantagem da utilização deste extrato natural é o seu baixo custo, o que pode contribuir para a diminuição do elevado gasto com a saúde pública, assim como dos efeitos colaterais causados por outras drogas já existentes. Neste estudo, de acordo com as técnicas utilizadas e os resultados apresentados não houve eficácia antimicrobiana em alguns dos testes realizados com a cepa de *S. mutans*.

Muitos microrganismos em seus sítios naturais são encontrados no ecossistema, formando o que chamamos de biofilmes, aderidos às superfícies e não agindo como um organismo livre. Esses biofilmes são definidos como uma estrutura microbiana comunitária que adere a superfícies e fica revestida em uma matriz de material exopolissacarídico. Isso tem significado especial, já que a proporção da formação de biofilmes nas infecções em humanos é bem significativa (RAMAGE et. al., 2005).

Sabe-se também que as células bacterianas organizadas em biofilme potencializam seus fatores de virulência ao lidarem com condições estressantes adversas mais facilmente do que se estivessem em formas puramente planctônicas (MARCH, 2005).

O biofilme dentário pode apresentar potencial patogênico, sendo que a cárie e a doença periodontal são as principais enfermidades da cavidade bucal influenciadas pela atividade patológica do biofilme dentário. Nele, podem estar presentes microrganismos que produzem ácidos (fórmico, acético, butírico, láctico e sulfídrico) a partir do metabolismo de açúcares, que provocam desmineralização do dente (LOESCHE, 1986; BOWEN; KOO, 2011) ou, ainda, enzimas e outros produtos potencialmente tóxicos que lesam o epitélio e penetram no tecido conjuntivo (PAULINO et al., 2003).

A acidogenese é uma característica do microrganismo *S. mutans*, com conseqüente diminuição do pH do meio devido ao metabolismo deste microrganismo. As drogas antimicrobianas utilizadas, como a Clorexidina, interferem no metabolismo bacteriano, fato que é comprovado com a manutenção do pH do meio (ELEY, 1999).

Neste contexto, de acordo com os resultados apresentados na Figura 3, não houve eficácia antimicrobiana no teste de acidogenia com a cepa de *S. mutans*, frente à exposição do derivado vegetal. Foi observado que no biofilme tratado com derivado vegetal de *M. citrifolia* houve diminuição do pH do meio de cultura, demonstrando que o derivado da planta nas frações utilizadas não inibiu o crescimento celular.

O biofilme é definido como uma comunidade de células associadas a uma superfície embebida em uma matriz de polissacarídeo extracelular (PEC). O *S. mutans* é um dos principais microrganismos que contribuem para a formação da matriz de polissacarídeo no biofilme dentário, utilizando como principal fonte de carbono a sacarose da dieta para sintetizar glucanos e frutanos (LOESCHE, 1986). Assim, diferentes fontes de carbono ou diferentes meios de cultura proporcionam a avaliação das características do crescimento e o consumo de glicose pelo microorganismo (PAULINO, 2006; SHEMESH; TAM; STEINBERG, 2007).

Sabe-se que carboidratos presentes no meio de cultura, assim como na dieta, permitem a produção de PEC, o que facilita a adesão de *S. mutans*, bem como, a formação de biofilme (YAMASHITA et al., 1993; MUNRO et al., 1995). Esses microrganismos também sintetizam polissacarídeo intracelular (PIC) que podem ser metabolizados para produzir ácidos na ausência de carboidratos fermentáveis exógenos (LEITES, 2005).

No teste que mensura o consumo de glicose do biofilme de *S. mutans*, foi observado que o derivado vegetal de *M. citrifolia* apresentou efeito inibitório sobre o metabolismo de carboidrato. No entanto, de acordo com os resultados apresentados anteriormente, não houve inibição da capacidade acidogênica do biofilme após tratamento com *M. citrifolia*. Assim, a reserva de PIC pode ter proporcionado ao microorganismo material energético e manteve a capacidade acidogênica na ausência do consumo de carboidrato exógeno observado.

Desta forma, a análise do consumo de glicose e da aferição de pH em biofilmes podem ser importantes ferramentas para avaliar a viabilidade das células em biofilme, pois células viáveis têm metabolismo ativo, e consomem carboidratos para o funcionamento dos processos metabólicos e crescimento (JEFFERSON, 2004).

Neste contexto, foi analisado o consumo de glicose de *C. albicans* frente ao tratamento do biofilme com *M. citrifolia*, podendo inferir a possível ação inibitória no

metabolismo de células em biofilme do derivado vegetal nas frações de 50 e 100 μL utilizadas no experimento.

Com a finalidade de estudar a atividade de antimicrobiana de *M. citrifolia*, foi testado *in vitro* diferentes volumes do derivado vegetal pelo método de disco-difusão. De acordo com os resultados apresentados não houve atividade inibitória sobre cepas de *S. mutans* podendo assim inferir que os volumes testados nestes experimentos estavam abaixo da concentração inibitória mínima (CIM). Destaque-se que a concentração mínima inibitória é definida como a mais baixa concentração de antibiótico que impede o crescimento bacteriano visível (TORTORA; FUNKE; CASEC, 2005).

A técnica de difusão em Agar realizada em laboratório para análise da atividade antimicrobiana de *M. citrifolia* não foi suficientemente sensível, sugerindo a realização de um método de diluição em meio líquido, que além de ser um método mais sensível, permite determinar os valores de CIM (SCORZONI et al., 2007).

De acordo com a Figura 6, as cepas de *C. albicans* apresentaram susceptibilidade frente aos derivados vegetais de *M. citrifolia* testados. Fazendo uma relação com o consumo de glicose apresentado anteriormente. A cepa de *C. albicans* mostra-se mais susceptível ao derivado vegetal do que a cepa de *S. mutans*, apresentando susceptibilidade ao derivado vegetal nos volumes de 8, 16, 32 μL que indicam interferência inibitória dose-dependente do derivado vegetal. Na utilização de 32 μL de extrato desta planta, ela teve uma ação antifúngica similar quando comparado a clorexidina.

Estudos científicos sobre as propriedades antifúngicas de *M. citrifolia* são escassos, mas os resultados obtidos neste estudo corroboram com os resultados obtidos por Jainkittivong, Butsarakamruha e Langlais (2009). Utilizando o liofilizado do fruto maduro de *M. citrifolia* foi observado um efeito antifúngico potente da planta sobre *C. albicans*, sendo o seu efeito inibitório variável com a concentração do liofilizado utilizado e o tempo de contato.

A formação de biofilme por bactérias e fungos é um dos principais fatores de virulência para a ocorrência de infecções. Nos resultados apresentados na Figura 7, o derivado vegetal mostrou-se eficiente no combate a cepas de *C. albicans* e *S. mutans*, reduzindo o número de células por campo na visualização microscópica.

Mais uma vez podemos demonstrar a atividade do derivado vegetal de *M. citrifolia* sob *C. albicans*, pois ele conseguiu manter o controle do biofilme durante

todas as horas testadas. Em *S. mutans*, a sua ação inibitória foi diminuindo com o decorrer do tempo. Este resultado também confirma a importância da ação na formação de biofilme de *C. albicans* já que existe uma série de estudos que relatam o desenvolvimento de novas drogas para o combate de *S. mutans* (ALVES et al., 2009; APEL, 2013; CARDOSO SÁ et al., 2012; LIBERIO et al., 2009; KIM et al., 2011; LIMSONG; BENJAVONGKULCHAI; KUVATANASUCHATI, 2004).

Sabe-se que a habilidade de formar biofilmes por espécies do gênero *Candida* está intimamente associada às capacidades de causar infecções, e pode ser considerado um importante fator de virulência, pois biofilmes estão associados à resistência contra o sistema imune do hospedeiro e a antifúngicos (RAMAGE et al., 2005).

A conversão de *Candida* da forma leveduriforme (blastoconídios) para forma filamentosa (hifas e pseudo-hifas) é um passo crucial na formação do biofilme. A conversão da forma leveduriforme permite a penetração e invasão nas células epiteliais humanas. Entre as formas morfogênicas de *C. albicans*, o tubo de germinativo é a estrutura de alongamento inicial formada durante a transição de levedura-hifa. Desta forma, 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; RAMAGE; WICKES; LÓPEZ-RIBOT, 2001).

Assim, estudos realizados em diferentes países têm mostrado diferença na epidemiologia das infecções invasivas por *Candidas* (ANTUNES et al., 2004). Nos últimos 10 anos, alguns estudos têm reportado uma mudança na etiologia das candidíases. Enquanto a *C. albicans* é ainda considerada a espécie mais comum causadora de candidíases, o aumento das taxas de candidíases por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* é mencionado em todo o mundo (ARENDRUP et al., 2010).

Nos resultados apresentados na Figura 8, é possível observar que há a inibição da formação do tubo germinativo nas cepas de *C. albicans*. Assim a capacidade de alterar a formação do tubo germinativo pelo derivado vegetal interfere na redução de virulência dessas células. Corroborando com os resultados obtidos, um estudo realizado in vitro, com o extrato do fruto de *M. citrifolia*, inibiu a conversão de células leveduriformes de *C. albicans* para a forma filamentosa (BANERJEE et al., 2006).

Bernardes e colaboradores, 2011, demonstraram a atividade inibitória do extrato glicólico de folhas frescas de *Aloe vera* sobre o crescimento e formação do tubo germinativo de *C. albicans*. Possivelmente, o efeito antifúngico observado é devido à presença elevada de antraquinonas nas folhas de *A. vera*, que confere ao vegetal atividade antioxidante e antimicrobiana.

Desta forma, estudos anteriores têm demonstrado a atividade antibacteriana de *M. citrifolia* e estes efeitos podem estar relacionados com os metabolitos secundários presentes no fruto da planta como acubina, asperulosido, alizarina, escopoletina e outras antraquinonas (JAINKITTIVONG; BUTSARAKAMRUHA; LANGLAIS, 2009; DUSSOSSOY et al., 2011). Em um estudo fitoquímico realizado com *Morinda angustifolia*, foram isoladas seis estruturas de antraquinonas, similares as isoladas de *M. citrifolia*. Esta espécie da família das rubiáceas apresentou atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*, bem como atividade antifúngica para *C. albicans* (XIANG et al., 2008).

Além disso, iridóides presentes na fruta de *M. citrifolia* parecem ser ativos contra leveduras, bactérias Gram negativas e Gram positivas. O extrato do fruto com 10,4% de iridóides inibiu o crescimento de *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *C. albicans*, sendo verificado maior efeito inibitório sobre *C. albicans* (WEST et al., 2012).

Os resultados dos nossos estudos demonstraram potencial aplicação do fruto de *M. citrifolia* como um agente antifúngico, inibindo a adesividade e interferindo na formação do tubo germinativos de *C. albicans*. Neste sentido, o derivado também apresentou efeito inibitório na aderência de *S. mutans*, interferindo na formação de biofilme.

Não há na literatura pertinente pesquisas que investigaram o efeito antiaderente de *M. citrifolia* sobre microorganismos orais. Dessa maneira a interferência neste mecanismo de adesão pode ser uma estratégia para se obter um controle de biofilme, prevenindo assim afecções bucais como a cárie dental e a doença periodontal.

Atualmente, encontra-se em andamento experimentos para avaliação de estresse térmico através da expressão da proteína HSP 70, análise cromatográfica do derivado vegetal, e microscopia eletrônica de varredura, visando elucidar mais mecanismos de ação desta planta contra microorganismos patogênicos.

7. CONCLUSÃO

Conforme a metodologia proposta neste trabalho foi possível avaliar a atividade do derivado vegetal de *M. citrifolia* como um agente antifúngico. Porém, a atividade antibacteriana do derivado vegetal não foi demonstrada.

A análise da capacidade acidogênica de *S. mutans* nas concentrações testadas, não apresentaram efeito inibitório. Neste sentido pode-se dizer que os volumes de 10, 50 e 100 μL não foram eficazes no tratamento do biofilme de *S. mutans*. Por outro lado, analisando o consumo de glicose, pode-se inferir que houve efeito sobre a atividade metabólica do microrganismo no biofilme para o volume de 100 μL .

Ainda, e observando-se o consumo de glicose do biofilme de *C. albicans* ao longo do experimento, foi possível observar que os volumes testados, 50 e 100 μL , apresentaram efeito antimicrobiano no teste de avaliação do consumo de glicose.

Na avaliação do halo de inibição pela técnica de disco difusão, foi possível perceber que, para a cepa de *S. mutans* em todos os volumes testados, não houve inibição do crescimento da bactéria. Já na placa de Agar de *C. albicans* observou-se halo de inibição nos volumes de 8, 16 e 32 μL do derivado vegetal.

Quanto à ação do derivado vegetal na formação do biofilme de *S. mutans* e *C. albicans*, conforme os resultados apresentados, houve inibição na formação do biofilme, inferindo que o derivado vegetal tem ação sobre a aderência destes microrganismos.

A formação do tubo germinativo também é outro fator importante a ser apresentado, pois foi possível observar a inibição do tubo germinativo, correlacionando com a inibição da formação do biofilme, para o caso da *C. albicans*, podendo inferir a redução da virulência desse fungo.

O resultado deste trabalho sugere que novos estudos com abordagem farmacológica *in vivo* devam ser realizados, visto que *M. citrifolia* apresentou potencial terapêutico antifúngico, podendo constituir-se em uma futura alternativa terapêutica para *C. albicans*.

Neste sentido, a planta também apresentou atividade de inibição da aderência de *S. mutans* na formação do biofilme, podendo vir a ser uma alternativa auxiliar na prevenção de formação de biofilme dental. Porém, estudos são necessários para concluir a atividade antibacteriana de *M. citrifolia* sobre *S. mutans*.

REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural sources. **Arkivoc**, Gainesville, v.7, p.116-145, 2007.
- ALVARES, C. A. et al. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Bras de Patol e Med Labor**, Rio de Janeiro, v.43, n.5, p.319-317, 2007.
- ALVES, P. M. et al. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.**, Uberaba, v.42, n.2, p.222-224, 2009.
- ANTUNES, A. G. V. et al. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, v.45, n.5, p.239-241, 2004.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução-RDCnº 14, de 31 de março de 2010**, 2010. Disponível em: <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/103507-14.html>> Acesso em: 24 set.2013.
- ANVISA. **Formulário de fitoterápicos**: farmacopéia brasileira, 2011, 126 pgs. Disponível em: <<http://migre.me/hm9Dt>>. Acesso em: 23 set. 2013.
- APEL, C. et al. Dental composite materials containing carolacton inhibit biofilm growth of *Streptococcus mutans*. **Dental material**, Dallas, v.29, n.11, p.1188-1199, 2013.
- ARENDRUP, M. C. et al. Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azoles susceptibility. **Journ Clin Microbiol**, Copenhagen, v.43, n.9, p.4434–4440, 2005
- ARENDRUP, M. C. Epidemiology of invasive candidiasis. **Curr Opin Crit Care**, Stanford, v.16, p.445 – 52, 2010.
- ARGIMÓN, S.; CAUFIELD, P. W. Distribution of putative virulence genes in *Streptococcus mutans* strains does not correlate with caries experience. **Journ Clin Microbiol**, Washington, v.49, n.3, p.984-92, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**. Informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação, 2011
- AVRELLA, D; GOULART, S. L. Isolamento de cândida spp da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. **RBAC**, Rio de Janeiro, v.40, n.3, p.205-207, 2008

BAMMANN, L. L.; ESTRELA, C. Aspectos Microbiológicos em Endodontia. In: ESTRELA, C.; FIGUEIREDO, J. A. **Endodontia**: princípios biológicos e mecânicos. São Paulo: Artes Médicas, 1999. p.169-187.

BANAS, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Front Biosci**, NY, v.9, p.1267-1277, 2004.

BANAS, J.A.; Vickerman, M.M. Glucan-binding proteins of the oral streptococcus. **Cri Rev Oral Biol Med**, NY, v.14, n.2, p.89-99, 2003.

BANERJEE, S. et al. An extract of *Morinda citrifolia* interferes with the serum-induced formation of filamentous structures in *Candida albicans* and inhibits germination of *Aspergillus nidulans*. **Am Journ Chin Med**, Singalpole, v.34, p.503-509, 2006.

BASTOS, J. R. M. et al. Chlorhexidine use at dentistry. **Salusvita**, Bauru, v.23, n.1, p.15-24, 2004.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am Journ Clin Pathol.**, Chicago, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BEH, K. et al. 7-Hydroxy-6-methoxy-2H-chromen-2-one. **Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online**, v.66, n.8, p.2138, 2010.

BERNARDES, I. et al. *Aloe vera* extract reduces both growth and germ tube formation by *Candia albicans*. **Mycoses**, v.55, p.257-261, 2012.

BOERA, H. J. et al. Anti-fungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. **Journ of Ethnopharmacol**, v.96, n.3, p.461-469, 2005.

BOONANANTANASARN, K. et al. *Morinda citrifolia* leaves enhance osteogenic differentiation and mineralization of human periodontal ligament cells. **Dental Materials Journ**, v.31, n.5, p. 863–871, 2012.

BORBA, A. M.; MACEDO, M. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. **Acta Bot Bras**, v.20, n.4, p.771-782, 2006.

BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Res**, v.45, p.69-86, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência. **Formulário Terapêutico Nacional 2008**: Rename 2006.

BURNE, R. A. Oral streptococci: products of their environment. **Journ Dent Res**, NY, v.77, n.3, p.445-452, 1998.

BURNET, G. W.; SCHERP, H. W.; SCHUSTER, G. S. **Microbiologia Oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978.

CARDOSO SÁ, N. et al. Antimicrobial and antibiofilm action of Casbane Diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. *Arch Oral Biol*, 2012, v.57, n.5, p.550-5, 2012.

CARRILO-MUNHÔZ, A. J. et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Española de Quimioter*, v.19, n.2, p.130-139, 2006.

CHAN-BLANCO, Y. et al. The noni fruit (*Morinda citrifolia*): a review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. *Journ.Food Campos Anal.*, v.19, p.645-654, 2006.

CHEN, S. C.; SORRELL, T. C. Antifungal agents. *Med Journ Aust.*, v.187, p.404-409, 2007.

CIANCIO, S. Improving oral health: current considerations. *Journ Clin Periodontol*, v.30, n.5, p.54-6, 2003.

CORDEIRO, C. H. G. et al. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. *Bras Cien Farm*, v.42, n.3, São Paulo, 2006b.

CORDEIRO, C. H. G. et al. Avaliação farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em gel dentifrício. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.8, n.4, p.173-182, 2006a.

CORREIA, A. A. S. **Maceração enzimática da polpa de noni (*Morinda citrifolia* L.)**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Ceara. Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos. Fortaleza, 2010.

COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*. v.41, p.435-464, 1987.

COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1159, 2005. 2v.

COYKENDALL, A. L. Classification and identification of the *viridans streptococci*. *Clin Microbiol Rev*, v.2, n.3, p.315-328, 1989.

DEL FIOLE, F.S. et al. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, v. 43, n. 1, p. 68-72, 2010.

DELALOYE, J.; CALANDRA, T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence*, v.5, n.1, p.1-9, 2013.[Epub ahead of print].

DRUCKER, D. B.; MELVILLE, T. H. Computer classification of streptococci mostly of oral origin. *Nature*, v.221, p.664, 1969.

DUSSOSSOY, E. et al., A. Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). *Journ Ethnopharmacol*, v.133, n.1, p.108-115, 2011.

ELEY, B. M. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque – a review. **Brit. Dent. Journ**, v.186, p.286-296, 1999.

FARIA, G et al. Evaluation of Chlorhexidine Toxicity Injected in the Paw of Mice and Added to Cultured L929 Fibroblasts. **Journ.of Endodontics**, v.23, n.6, p.715-722, 2007.

FEJERSKOV, O.,KIDD, E. **Cárie dentária**:a doença e seu tratamento clínico.SANTOS. São Paulo, 2005, p.182-186.

FEJERSKOV, O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.25, n.1, p.5-12, 1997.

FLEMMING, H. C., WINGENDER; A. matriz do biofilme.**Nat Rev Microbiol**, v. 8, p.623-633, 2010

FONTOURA,R.; MEDEIROS,P. J. Antibioticoterapias nas infecções Odontogênicas. **Rev Bras de Odontol**, Rio de Janeiro, v.56, n.5, 1999.

FOSTER, J. S.; PAN, P. C.; KOLENBRANDER, P. E. Effects of antimicrobial agents on oral biofilms in a saliva-conditioned flowcell. **Biofilms**, v.1, p. 5-12, 2004.

FUCHS, F. D., WANNMACHER, L. **Fundamentos da terapêutica racional**. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2010, p.466-469.

FUJIWARA, T. et al. Differential and quantitative analyses of mrna expression of glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* MT8148. **Journ Dent Res**, v.81, p.109-13, 2002.

GEBRAN, M. P.; GEBERT ,A. P. O. O controle químico e mecânico de placa bacteriana. **Ciência e cultura**, v.20, n.3, p.45-58, 2002.

GUPTA, M. P.; SANTANA, A. I. El fruto de noni (*Morinda citrifolia* L.). **Rev de Fitoterap**, v.12, n.1, p.45-52, 2012.

HEINICKE, R. M. The pharmacologically active ingredient of noni. **Pacific Trop Botan Garden Bulletin**, v. 15, n. 1, p. 10-14, 1985.

HEINICKE, R. M. **The Xeronine System**: A new Cellular Mechanism That Explains the Health Promoting Action of Noni and Bromelain. Direct Source Publishing, Orem,Utah,2001.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, vol.97, n.7, p. 1027-1031, 2002.

HUANG, P. et al. Morin Inhibits Sortase A and subsequent biofilm formation in *Streptococcus mutans*. **Curr Microbiol**, Wuhan, China, published online August 2013.

JAINKITTIVONG, A.; BUTSARAKAMRUHA, T.; LANGLAIS, R. P. Antifungal activity of *Morinda citrifolia* fruit extract against *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.108, p.394-8, 2009.

JAWETZ, M. A.; BROOKS, G. F.; BULEL, J. S. ;**Microbiologia médica**. 21 ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1998.

JEFFERSON, K. K.;What drives bacteria to produce a biofilms? **Femes Microbiol. Lett**, v.236, n.2, p.163-73, 2004.

KIM, M. J. et al. Antimicrobial effect of Korean propolis against the mutans streptococcus isolated from Korean. **The Journ of microbiol**, v.49, n.1, p.161-164, 2011.

KLEIN, T. et al. Fitoterápicos : um Mercado promissory.**Rev Cienc Farm Básica Apl**, v.30, n.3, p.241-248, 2009.

KOJIC, E. M.; DAROVICHE, R. O. *Candida* infections of medical devices. **Clin. Microbiol Rev** , v.17, n.2, p.255-67,2004.

KOVENDAN, K. et al. Larvicidal activity of *Morinda citrifolia* L (Noni) (Family: Rubiaceae) leaf extract against *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* , and *Aedes aegypti*. *Parasitol Res*, v.111, n.4, p.1481-90, 2012.

KUETE, V. Potential of Cameroonian Plants and Derived Products against Microbial Infections: A Review. **Planta Med**, v.76, n.14,p.1479-1491, 2010.

LEITES, A. C. B. R., PINTO, M. B.; SOUZA, E. R. Aspectos microbiológicos da cárie dental. **Salusvita**, Bauru, v.25, n.2, p.239-252, 2006.

LIBÉRIO, S. A. et al. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. **Journ Ethnopharmacol**,v.125, n.1, p.1-9, 2009.

LIMA,A., **Índice terapêutico fitoterápico**:ITF. Petrópolis, RJ:Epub, p.228, 2008.

LIMA, J. E. O. Cárie dentária: um novo conceito. **Rev Dental Press Ortodon Ortop Facial**, v.12,n.6,p.119-130, 2007

LIMSONG, J.,BENJAVONGKULCHAI, E., KUVATANASUCHATI, J. Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. **Journ of Ethnopharmacol**, v.92, n.2–3, p.281–28, 2004.

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

- LYNCH, D. J. et al. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. **Fems Microbiol**, v. 268, p.158 -165,2007.
- MACPHERSON, H. et al. The Potential for a new value adding industries for Noni tropical fruit producers. rural industries research and developmenmt corporation. **Australian Government**, Sidney, n. 7, p.132, 2007.
- MARSH, P.D.; Are dental diseases examples of ecolgical catastrophes ? **Microbiol**, 2003;149:279-294, 2003.
- MARSH, P. D., Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv Dent Res** , v.8, p.263–271, 1994.
- MARSH, P. D. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. **Journ Clin Periodontol**, v.32, n.6, p.7-15, 2005.
- MONSAN, P. et al. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journ**, v.11, p.675-685, 2001.
- MUNRO, C. L.; MICHALEK, S. M.; MACRINA, F. L.: Sucrose-derived exopolymers havesite-dependent roles in *Streptococcus mutans*-promoted dental decay. **Fems Microbiol Lett**, 128(3):327–332, 1995.
- MUNRO, C. L.; MICHALEK, S. M.; MACRINA, F. L: Sucrose-derived exopolymers havesite-dependent roles in *Streptococcus mutans*-promoted dental decay. **Fems Microbiol Lett**, v.128,n.3, p.327–332, 1995.
- MURRAY, P.E. et al. Evolution of *Morinda citrifolia* as an endotontic irrigant. **Journ Endo**, v.34, p.66-70, 2008.
- NAYAK, B. S.; SANDIFORD, S.; MAXWELL, A. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf. **Evid-Based Complement and Alternat Medic**, v.6,n.3 ,p 351-356, 2009.
- NEWBRUN, E. **Cariologia**.Editora: Santos .1988 .326pp.
- PALOMBO, E .A. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bactéria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases.**Evid Based Complement Alternat Med**, v.2011, 15 pages, 2011.
- PANIZZA, S. T. **Como prescrever ou recomendar plantas medicinais e fitoterápicos**. São Luiz, MA: Combrafito, 2010.
- PAREKH, J.; CHANDA, S.V. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. **Turk Journ. Biol.**, v. 31, p. 53-58, 2007.
- PAULINO, T. P. Fermentable and nonfermentable sugars: a simple experiment of anaerobic metabolism. **Biochem Mol Biol Educ**, v.31, p.180-184, 2003.

PAULINO, T. P., et al. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol.**, v.50, n.3, p.353-9,2005.

PAULINO, T. P. “**Ação de corantes fotossensíveis em meio homogêneo e micro heterogêneo de lipossomos no controle do crescimento de *Streptococcus mutans***”, 2006. Tese (doutorado em ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2006.

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**, Curitiba, v.16, p.88-93, 2006.

PEREIRA, G. H. et al. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*Candida albicans* species. **Medical mycol**, v.48, p.839-842, 2010.

POTTERAT., L.; HAMBURGER, M. *Morinda citrifolia* (Noni) fruit- phytochemistry, pharmacology, Safety, **Planta Med**, v.73, n.3, p.191-199, 2007.

RAMAGE, G.; WICKES, B. L.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Biofilms of *Candida albicans* and their associated resistance to antifungal agents. **Am Clin Lab**, v. 20, p.42–44, 2001.

RAMAGE, G. et al. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.9, p.2475-2479, 2001

RAMAGE, G. et al. Denture stomatitis: a role for *Candida biofilms* o ralsurg oral med oral pathol. **Oral Radiol Endod**, v.98, n.1, p.53–9, 2004.

RAMAGE, G. et al. *Candida* biofilms: an update. **Eukayotic Cell**, v.4, n.4, p.633-8, 2005.

RAMAGE, G. et al. “Fungal Biofilm Resistance”. **Internation Journ of Microbiol**, vol. 2012, 14 pgs, 2012.

SANTOS, E. B. et al. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Rev Bras de Farmacogn**, v.19, n.1B, p.321-324, 2009.

SCORZONI, L. et al . The use of standart methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. **Braz Journ Microbiol**, v. 38, p. 391-397, 2007a.

SENADHEERA, M. D. A vicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects gtfBCD, gbpB and ftf espresion, biofilms formation, and genetic competence development. **Journ. Bacteriol**, v.187, p. 4064-4076, 2005.

SENEVIRATNE, C. J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L. P. Lifestyle of *Candida*: a mini-review. **Oral Dis**, v.14 n.7, p.582-590, 2008.

- SENEVIRATNE, C. J. et al. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. **Arch Oral Biol**, v.54, n.11, p.1052–60, 2009.
- SHEMESH, M.; TAM, A.; STEINBERG, D. Differential Gene Expression Profiling of *Streptococcus mutans* cultivated under biofilm and planktonic conditions. **Microbiol**, v.153, n.5, p.1307-1317, 2007.
- SILVA, M. I. et al. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Rev Bras Farmacogn**. V.16, n.4, p.455-462, 2006.
- SIMÕES, C. M. O. et al. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 4.ed. Florianópolis: Ed. UFRGS/UFSC, p.183, 2002.
- SIQUEIRA, J. F. **Endodontia: biologia e técnica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.919-934, 2004.
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1996.
- TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am Journ Med**, v.119, n.1, p. S3-S10, 2006.
- TORTAMANO, N.; Antibióticos de uso odontológico. In: **Guia Terapêutico Odontológico**. 12.ed. São Paulo: Santos, 1997. p.24-51.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CASEC, L. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 706p.
- TRINDADE, C.; SARTÓRIO, M. L.; REZENDE, P. **Farmácia Viva: utilização de plantas medicinais**. Viçosa, MG: CPT, 2008. 246p.
- WANG, M. Y. et al. *Morinda citrifolia* (noni): A literature review and recent advances in noni research. **Acta Pharmacol Sinica**, v. 23, p.1127-1141, 2002.
- WEST, J. B. et al. Antimicrobial activity of an iridoid rich extract from *Morinda citrifolia* fruit. **Current Research Journ of Biology Scienc**, v.4, n.1, p.52-54, 2012.
- XIANG, W. et al. Antimicrobial anthraquinones from *Morinda angustifolia*. **Fitoterapia**, v.79, p.501-504, 2008.
- YAMASHITA, Y. et al. Role of the *Streptococcus mutans* gtf genes in caries induction in the specific pathogen-free rat model. **Infect Immun**, v.61, n.9, p.3811–3817, 1993.
- ZAREMBA, M. L. et al. Microorganisms in root carious lesions in adults. **Adv Med Sci**, v.51, n.1, p.237-40, 2006.
- ZIRKEL, J. et al. Epidemiology of *Candida* blood stream infections in patients with hematological malignancies or solid tumors. **Medic Mycol**, v.50, p. 50-55, 2012.