## UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

# EFEITOS ANTIMICROBIANOS, ANTIÁCIDOS E REMOVEDORES DE BIOFILME DE ALGUMAS ESPÉCIES VEGETAIS AMAZÔNICAS SOBRE O *STREPTOCOCCUS MUTANS*

RENILTO FROTA CORRÊA

MANAUS

2007

### UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

# EFEITOS ANTIMICROBIANOS, ANTIÁCIDOS E REMOVEDORES DE BIOFILME DE ALGUMAS ESPÉCIES VEGETAIS AMAZÔNICAS SOBRE O STREPTOCOCCUS MUTANS

#### RENILTO FROTA CORRÊA

ORIENTADOR: PROF<sup>a</sup>.DR<sup>a</sup>. Maria Lúcia Belém Pinheiro CO-ORIENTADOR: PROF<sup>o</sup>.DR<sup>o</sup>. Luiz Antonio de Oliveira (PhD)

Dissertação apresentada ao Programa Multi- institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, área de concentração em BIOTECNOLOGIA PARA SAÚDE.

**MANAUS** 

2007

#### Corrêa, Renilto Frota

Efeitos antimicrobianos, antiácidos e removedores de biofilme de algumas espécies vegetais amazônicas sobre o *Streptococcus mutans* / Renilto Frota Corrêa. – Manaus, 2007

138p.: il.

Dissertação – UFAM.

1. Streptococcus mutans 2. Cárie dentária 3. Óleos vegetais

4.Extratos vegetais

CDD.ed

Sinopse: O microrganismo *Streptococcus mutans* é a principal bactéria causadora da cárie dentária. A pesquisa foi direcionada a substâncias que evitem a aderência das bactérias nos dentes. Os óleos e extratos para pesquisa foram obtidos de espécies da flora amazônica, como a andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), a copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne), a castanha do Brasil (*Betholletia excelsa* Humb & Bonpl.), a jaca (*Artocarpus integrifolia* L.F.), a tiririca (*Cyperus rotundus* L.), o cipó-cravo (*Tynanthus elegans* Miers), o breu-branco (*Protium heptaphyllum* March), o pau rosa (*Aniba roseodora* Ducke), a sacaca (*Croton Cajucara* Benth) e a laranjinha (*Guatteria citriodora* Ducke). Foram analisadas as características antimicrobianas, antiácidas e removedoras de biofilme das amostras

Palavras-chave: Streptococcus mutans, biofilme, extratos e óleos.

Mesmo vivendo em um país de terceiro mundo, onde a corrupção esta instalada em todos os níveis, como promotora das dificuldades e deficiências nas instituições de pesquisa e ensino. Em uma verdadeira inversão de valores morais e éticos...

...continuar lutando pela justiça social no uso da ciência como instrumento, com responsabilidade e dedicação pelo que existe de melhor no mundo, o amor. Espero no transcorrer da minha vida buscar a sabedoria e principalmente a capacidade de exercê-la. Dessa forma valerá a pena ter vivido se o meu exemplo for motivo de orgulho para os meus filhos.

Renilto Frota Corrêa.

Ao papai Renê Corrêa com muita saudade da sua companhia ao longo da minha caminhada.

A mamãe Rita Frota Corrêa pelo seu intenso amor e dedicação sem fim, nos momentos difíceis por longos anos.

OFEREÇO.

Aos meus filhos, em especial ao Gabriel Paolucci Sales Frota Corrêa, nascido no decorrer dessa pesquisa, vocês são a razão e o estimulo constante para lutar o bom combate...

DEDICO.

A Deus, meu pai celestial pela vida, proteção e por conduzir os meus passos em todos os momentos. Agradeço pelo amor constante.

Ao meu pai René Corrêa *in memorian*, pelo exemplo de dignidade, humildade e honestidade. Minha eterna admiração e reconhecimento. Agradeço pelo amor presente.

A minha mãe Rita Frota Corrêa, pela presença constante, zelo e apoio em todos os momentos. Agradeço pelo seu amor sem fim.

Ao meu filho Gabriel Paolucci Sales Frota Corrêa, agradeço pela sua existência e por todos os seus sorrisos que alegram a minha vida.

A minha amiga e mãe do nosso filho Janaina Paolucci Sales, pelo apoio, incentivo, ajuda e presença ao longo de nossa convivência. Meu profundo agradecimento.

Aos meus amigos e irmãos Herbert e Bill pelo apoio, preocupação e presença nos momentos difíceis e alegres da minha vida. Agradeço eternamente pela nossa amizade.

Aos amigos de mestrado Diego e Jaqueline pela ajuda substancial e constante, dedicação a essa pesquisa. Meu respeito e admiração. Sinceramente agradeço.

Aos colegas e servidores dos laboratórios da UFAM e do INPA meus agradecimentos.

Aos colegas da sala de mestrado em química de produtos naturais Adriane, Alex, Aline, Ana Cristina, Ana Karolina, André, Cleuton, Daniel, Darlene, Daling, Denny, Diego, Dominique, Dorian, Élson, Ecila, Geone, Giese, Izandina, Jaqueline, Junior, Lívia, Lorena, Lyege, Madson, Marcondes, Maria de Fátima, Marycleuma, Najara Orivaldo, Radamés, Suniá, Vera Lúcia, Verônica e Zuanny. Pela convivência saudável e produtiva. Agradeço por permitirem essa experiência.

Ao mateiro e amigo Silo da UFAM pelas horas de coleta, conselhos e observações meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas da botânica pelos conselhos e orientação, agradeço.

A FAPEAM pelo apoio financeiro ao projeto, meu agradecimento.

Aos professores e doutores Ângela Garrido Bittencourt (UEA), Jéferson Andrade Rocha da Silva (UFAM), Maria da Paz Lima (INPA), membros da banca do exame de qualificação pelas sugestões e comentários oportunos, sinceramente agradeço.

Aos professores e doutores Adilson dos Santos Hara (UFAM), Maria da Paz Lima (INPA), Maria Lúcia Belém Pinheiro (UFAM), membros da banca julgadora da defesa de dissertação, pelos conselhos pertinentes para o enriquecimento desse documento, sinceramente agradeço.

Ao meu co-orientador Prof<sup>o</sup>. Dr. Luiz Antonio de Oliveira agradeço por acreditar no projeto com suas orientações, amizade, preocupações, sugestões de valor inestimável pelo rigor científico ao longo de nossa pesquisa.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro agradeço as orientações, conselhos, e paciência que proporcionaram a finalização esse trabalho.

# SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xi
RESUMO	01
ABSTRACT	02
1. INTRODUÇÃO	03
2. OBJETIVOS DO ESTUDO	05
2.1 Objetivo geral	05
2.2 Objetivos específicos	05
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	06
3.1 Biofilme	06
3.2 Epidemiologia da cárie dentária	07
3.2.1 Etiologia da cárie dentária	11
3.2.2 Os microrganismos formadores da cárie dentária	11
3.3 O microrganismo cariogênico: Streptococcus mutans	12
3.3.1 O biofilme e a importância do <i>Streptococcus mutans</i>	17
3.3.2 Fatores de Virulência do <i>Streptococcus mutans</i>	19
3.3.3 Colonização por Streptococcus mutans	21
3.4 Aderência "in vitro"	23
3.4.1 A importância do isolamento das culturas microbiológicas	24
3.5 A origem do conhecimento tradicional relacionado à etnobotânica	25
3.5.1 As espécies vegetais da Amazônia	26
3.5.1.1 ANDIROBA - Carapa guianensis	26
3.5.1.2 BREU-BRANCO – Protium heptaphyllum	31
3.5.1.3 CASTANHA DO BRASIL - Betholletia excelsa	35
3.5.1.4 CIPÓ CRAVO - Tynanthus elegans	38
3.5.1.5 COPAÍBA - Copaifera multijuga	40
3.5.1.6 JACA - Artocarpus integrifolia	45
3.5.1.7 LARANJINHA – Guatteria citriodora	48
3.5.1.8 PAU ROSA - Aniba roseodora ducke	49
3.5.1.9 SACACA – Croton Cajucara Benth	54
3.5.1.10 TIRIRICA - Cyperus rotundus	57
3.6 Óleos e extratos.	60

4 MATERIAL E MÉTODOS	62
4.1 Coleta do material botânico.	62
4.2 Secagem e moagem	63
4.3 Extração dos óleos e extratos.	63
4.3.1 Óleos voláteis: tiririca ( <i>Cyperus rotundus</i> ), cipó-cravo ( <i>Tynanthus elegans</i> ), e breu-branco ( <i>Protium heptaphyllum</i> ), pau rosa ( <i>Aniba roseodora ducke</i> ), sacaca	
(Croton Cajucara Benth), e laranjinha (Guatteria citriodora)	63
4.3.2 Óleo-resina: copaíba ( <i>Copaifera multijuga</i> )	63
excelsa) e jaca (Artocarpus integrifolia)	64
4.3.4 Extratos hexânico, clorofórmico e etanólico: andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> ), tiririca ( <i>Cyperus rotundus</i> ), jaca ( <i>Artocarpus integrifolia</i> ) e cipó cravo ( <i>Tynanthus</i>	. <b>.</b>
elegans)	65
4.4 Preparo do meio de cultura de Streptococcus mutans	65
4.5 Procedimento de análise	66
4.5.1 Propriedade antimicrobiana.	67
4.5.2 Propriedade removedora do biofilme.	68
4.5.3 Propriedade antiácida	71
5. RESULTADOS E DISCUSÃO	74
5.1 Análise da atividade antimicrobiana	74
5.2 Análise qualitativa da atividade removedora do biofilme	88
5.2.1 Análise semi-quantitativa da atividade removedora do biofilme	90
5.3 Análise da atividade antiácida.	92
6 CONCLUSÕES	96
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
APÊNDICE	127
APÊNDICE 1 Tabela com a avaliação do halo de inibição	128
APÊNDICE 2 Tabela com a mobilidade das moléculas bioativas no halo de crescimento	131
APÊNDICE 3 Análise de variância (ANOVA) da presença de halo de inibição e	
de halo de crescimento	133
APÊNDICE 4 Termo de autorização da doação de dentes descartados	135
APÊNDICE 5 Parecer do comitê de ética	137

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Interação de glicoproteínas derivadas do hospedeiro com a superfície carregada do esmalte		
Figura 2	A - Streptococcus sobrinus - Dextrana contendo no esqueleto α (1,6)- glicose e cadeia lateral típica de dextranas insolúveis. B - Streptococcus		
S			
	mutans - Dextrana com cadeias laterias de α (1,3)-glicose. A extensão		
	das ligações α (1,3) determina a solubilidade da dextrana		
Figura 3	Placa bacteriana		
Figura 4	Árvore de andiroba (A) e amêndoas de andiroba (B)		
Figura 5	Estruturas químicas de Carapa guianensis Aubl.		
Figura 6	Árvore e caule com resina de breu branco.		
Figura 7	Componentes majoritários do <i>P. heptaphyllum</i> March		
Figura 8	Sementes e árvore da castanheira do Brasil		
Figura 9	Componentes majoritários da <i>B. excelsa</i> Humb. & Bonpl		
Figura 10	Folhas (A) e caules de cipó cravo (B)		
Figura 11	A= Eugenol, B= Ácido tânico		
Figura 12	Árvore de copaíba (A) e Extração racional do óleo de copaíba (B)		
Figura 13	Componentes majoritários de C. multijuga		
Figura 14	Fruto da jaqueira, árvore e galhos		
Figura 15	Galhos e frutos de laranjinha		
Figura 16	Árvore de pau rosa		
Figura 17	Componente principal da <i>Aniba roseodora</i> Ducke		
Figura 18	Estrutura do acetato de linalila		
Figura 19	Árvore de sacaca		
Figura 20	Constituinte ativo do Croton Cajucara Benth, o ácido acetil		
	aleuritórico.		
Figura 21	Tiririca (Cyperus rotundus).		
Figura 22	Constituintes ativos do <i>Cyperus rotundus</i>		
Figura 23	Sistema de Clevenger		
Figura 24	Aparelho de Soxlet		
Figura 25	Mariote e rotavapor		
Figura 26	Formação do biofilme no teste qualitativo		
Figura 27	Variação de acidez		
Figura 28	Curva de Stephan		
Figura 29	S. mutans resistente ao óleo de andiroba. Placa com ausência de halo de inibição em 48 horas		
Figura 30	S. mutans tolerante ao óleo de breu branco. Placa com presença de halo		
<del></del>	de inibição em 48 horas.		
Figura 31	S. mutans sensível ao óleo de copaíba. Placa com presença de halo de		

	inibição em 72 horas	82	
Figura 32	Óleo de jaca com halo de crescimento em 72 horas		
Figura 33	S. mutans sensível ao óleo de laranjinha. Placa com presença de halo de inibição em 72 horas, com ausência de crescimento bacteriano em toda		
	a placa	84	
Figura 34	34 S. mutans muito sensível ao óleo de tiririca. Placa com presença de halo		
	de inibição em 72 horas	86	
Figura 35	Teste de remoção do biofilme com óleo de tiririca	89	
Figura 36	Análise da remoção do biofilme para teste semi-quantitativo, seta	92	
J	demonstrando a turbidez após 5 min de contato com a amostra		
Figura 37	Avaliação da média de Potencial de hidrogênio (pH) das amostras	94	

# ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I	Associação entre as bactérias e os tipos de cárie dentária			
Tabela 2	Descrição dos constituintes e propriedades relatadas de <i>Carapa</i> guianensis Aubl			
Tabela 3	Descrição dos constituintes e propriedades relatadas do <i>P. heptaphyllum</i> March			
Tabela 4	Descrição dos constituintes e propriedades relatadas da <i>B. excelsa</i> Humb. & Bonpl			
Tabela 5	Descrição dos constituintes e propriedades relatadas de <i>Tynanthus elegans</i>			
Tabela 6	Descrição dos constituintes e propriedades relatadas de <i>C. multijuga</i> Hatne			
Tabela 7	Descrição dos constituintes e propriedades relatadas de <i>Artocarpus integrifólia</i>			
Tabela 8	Descrição dos constituintes e propriedades relatadas de <i>Aniba roseodora</i>			
Tabela 9	Descrição dos constituintes e propriedades relatadas de <i>Croton Cajucara</i> Benth			
Гabela 10	Descrição dos constituintes e propriedades relatadas de Cyperus rotundus			
Γabela 11	Atividades de coleta do material botânico.			
Γabela 12	Óleos e extratos das espécies vegetais utilizadas no estudo de atividade antimicrobiana, antiaderente e antiácida			
Гabela 13	Halos de inibição e crescimento bacteriano formados nos tempos de 24, 48 e 72 horas			
Γabela 14	Quantificação através de espectrometria de UV-Vis, de células removidas pelos óleos e extratos vegetais			

#### RESUMO

Streptococcus mutans é a bactéria principal implicada na cariogenicidade e na formação da placa dental conhecida como biofilme. Cáries dentais são causadas pela colonização e acumulação de microorganismos orais e a aderência é o primeiro passo no processo de colonização. Linhagens de Streptococcus mutans fermentam carboidrato dietéticos. principalmente sacarose, aderem à superfície de esmalte por ligações hidrofóbicas de produtos derivados deste metabolismo e promovem aderência firme e agregação celular de bactérias na superfície do dente. Ácidos produzidos no processo são críticos no desenvolvimento de cáries dentais. Apesar da existência de vários agentes anti-placas disponíveis no mercado a procura por um agente eficiente ainda continua. Produtos naturais têm sido usados na medicina folclórica como medicamentos e mostrado ser uma boa alternativa para prevenção de cáries. O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito inibitório dos extratos e óleos de algumas espécies da Amazônia, em relação à atividade microbiana, aderência, e acidogenicidade de Streptococcus mutans. As espécies selecionadas foram andiroba (Carapa guianensis Aubl.), copaíba (Copaifera multijuga Hayne), castanha do brasil (Betholletia excelsa Humb & Bonpl.), jaca (Artocarpus integrifolia L.F.), tiririca (Cyperus rotundus L.), cipó-cravo (Tynanthus elegans Miers), breubranco (Protium heptaphyllum Mart.), pau-rosa (Aniba roseodora Ducke), sacaca (Croton Cajucara Benth) e laranjinha (Guatteria citriodora Ducke). Óleos essenciais de breu-branco, breu-branco mais linalol de pau-rosa, copaíba, laranjinha, pau-rosa, sacaca e tiririca junto com extrato clorofórmio de tiririca, cipó-cravo e extratos hexânicos de tiririca apresentaram halo de inibição e mostraram atividade de antibacteriana. Entre os óleos e extratos estudados, o óleo essencial de laranjinha comprovou atividade de antibacteriana mais forte. Nos testes de remoção de biofilme os melhores resultados foram apresentados pelos óleos essenciais de tiririca e breu branco e extrato etanólico de tiririca. A investigação de propriedades antiácidas demonstrou que a mistura de extrato clorofórmico de andiroba com o controle constituído por meio de cultura líquido e propilenoglicol apresentou pH 7,5, desfavorável para crescimento de bactéria. Em conclusão, as espécies estudadas apresentaram potencial biotecnológico para desenvolvimento de produtos com atividade removedora de biofilme e agentes de anticáries.

Palavras-chave: Streptococcus mutans, Biofilme, Extratos e Óleos.

#### ABSTRACT

Streptococcus mutans is the principal bacteria implicated in the cariogenicity and dental plaque formation known as biofilm. Dental caries are caused by the colonization and accumulation of oral microorganisms, and adherence is the first step in the colonization process. Strains of Streptococcus mutans ferment dietary carbohydrates, mainly sucrose, adhere to the dental enamel surface by hydrophobic bonds of products deriving from this metabolism, promoting firm adherence and cellular aggregation of bacteria to the tooth surface. Acids produced in the process are critical in the development of dental caries. Despite several antiplaque agents being available in the market, the search for an efetive agent still continues. Natural products have been used in folk medicine and shown to be a good alternative for caries prevention. The objective of the present study was to investigate the inhibitory effect of the crude extracts and oils from some Amazonian vegetal species on adherence, microbial activity and acidogenecity of Streptococcus mutans. The selected species were andiroba (Carapa guianensis Aubl.), copaíba (Copaifera multijuga Hayne), castanha do brasil (Betholletia excelsa Humb & Bonpl.), jaca (Artocarpus integrifolia L.F.), tiririca (Cyperus rotundus L.), cipó-cravo (Tynanthus elegans Miers), breu-branco (Protium heptaphyllum March), pau-rosa (Aniba roseodora Ducke), sacaca (Croton Cajucara Benth) and Iaranjinha (Guatteria citriodora Ducke). Essential oils of breu-branco, breu-branco plus linalool from pau-rosa, copaíba, laranjinha, pau-rosa, sacaca and tiririca along with tiririca chloroform extract, cipó-cravo and tiririca hexane extracts presented an inhibition halo, showing antibacterial activity. Among the oils and extracts studied, laranjinha essential oil evidenced stronger antibacterial activity. On the plaque remotion tests, the best results were presented by tiririca and breu branco essential oils and tiririca ethanol extract. The investigation of antiacid properties showed that the mixture of andiroba chloroform extract with the control constituted by culture liquid medium and propyleneglycol presented pH 7.5, unfavorable to bacteria growth. In conclusion, the species studied presented potential for further development of biotechnological antiplaque and anticaries agents.

**Key words**: Streptococcus mutans, Biofilm, Extracts and Oils.

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de espécies vegetais para tratamento e cura de doenças remonta ao início da civilização, desde que o homem aprendeu a manusear e modificar os produtos naturais para o próprio benefício. Esta prática milenar ultrapassou todas as barreiras e obstáculos durante o processo evolutivo e chegou até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população mundial, como fonte eficaz de recurso terapêutico (DI STASI, 1996).

As espécies vegetais têm contribuído de forma significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos. Vários desses metabólitos constituem-se em modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos (procaína, cloroquina e tropicamida) ou de fármacos imprescindíveis (vimblastina, vincristina e podofilotoxina e os análogos etoposídeo e teniposídeo, taxol, camptotecina e derivados) (PINTO e EPIFÂNIO, 2002).

A bactéria *Streptococcus mutans* é a mais importante na formação da cárie dentária, com seus polissacarídeos extracelulares de reserva (levano e dextrano) e aderente (mutano), promove a aderência inicial das bactérias ao dente e mantem a nutrição desses microrganismos compondo o biofilme (conjunto de bactérias que potencializam o processo carioso). Esse processo se tornou objeto de intensos estudos por todo o mundo. Contudo, as pesquisas buscavam no passado, a erradicação dessa bactéria, sem levar em consideração o possível desequilíbrio entre os microrganismos existentes no ambiente bucal, visto que as bactérias comensais e odontopatogênicas interagem entre si, o meio salivar, a dieta alimentar e a predisposição do hospedeiro. Dessa forma, a patologia cariosa nos dentes humanos pode ser definida como uma doença multifatorial, microbiana, infecciosa, transmissível, sacarolítica, que converte a sacarose e demais carboidratos em ácidos láticos e outros ácidos orgânicos, os quais atacam o esmalte dos dentes.

Atualmente, com a mudança do paradigma de erradicar para inativar, criou-se uma nova era de pesquisas, voltadas para os princípios bioativos capazes de promover à remoção do biofilme dental, e por sua vez inativar a ação cariogênica dos microrganismos a ela vinculados.

Nesse contexto, surge a Amazônia brasileira como a maior floresta tropical do mundo, com sua vasta biodiversidade vegetal, capaz de fornecer substâncias potencialmente viáveis para solucionar em definitivo a problematização supracitada. Paradoxalmente, poucas são as pesquisas realizadas com esta contextualização, sendo este estudo pioneiro na busca de alternativas de tratamento e controle da cárie dentária. As populações que vivem próximas da floresta conhecem muitas espécies úteis, porém esse conhecimento, em geral, é restrito e pouco divulgado. Desta forma, muitas espécies são, e talvez continuem para sempre, desconhecidas devido à diminuição das florestas e a descaracterização das populações tradicionais (RIBEIRO *et al*, 1999).

As espécies selecionadas são: a andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne), castanha do brasil (*Bertholletia excelsa* Humb & Bonpl.), jaca (*Artocarpus integrifolia* L.F.), tiririca (*Cyperus rotundus* L.), cipó-cravo (*Tynanthus elegans* Miers), breubranco (*Protium heptaphyllum* March), pau rosa (*Aniba roseodora* Ducke), sacaca (*Croton cajucara* Benth) e a laranjinha (*Guatteria citriodora* Ducke). Essas espécies são amplamente utilizadas pelos povos amazônicos, sendo suas propriedades farmacológicas e aspectos químicos, na grande maioria descrita. O presente estudo propõe acrescentar mais propriedades às espécies vegetais analisadas, especificamente no campo da odontologia visando, no futuro, a possibilidade da produção biotecnológica de um dentifrício que desestabilize a aderência e a manutenção da *Streptococcus mutans* no biofilme, evitando assim a cárie dentária.

#### 2 OBJETIVOS

#### 2.1 Objetivo geral

Analisar as propriedades antimicrobianas, removedoras de biofilme e antiácidas dos óleos e extratos, obtidos de vegetais encontrados na Amazônia brasileira, sobre a bactéria *Streptococcus mutans*.

#### 2.2 Objetivos específicos

- •Avaliar a propriedade antimicrobiana das amostras estudadas, em relação à *Streptococcus mutans*, principal bactéria responsável pela cárie dentária.
- •Verificar a propriedade removedora de biofilme produzido pela bactéria *Streptococcus mutans*, das amostras analisadas, eliminando ou reduzindo o risco de cárie dentária.
- •Constatar a propriedade antiácida das amostras pesquisadas como inibidor de ácido lático, principal ácido produzido pela *Streptococcus mutans* na lesão cariosa.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Biofilme

Segundo Leite *et al* (2001), o termo biofilme é empregado para designar comunidades de microrganismos (bactérias e/ou fungos) aderidas sobre uma superfície e sob a ação contínua de um fluxo. A formação do biofilme dental é a etapa inicial no desenvolvimento da cárie dentária, assim como infecções periodontais, e ocorre em duas fases distintas. Durante a primeira fase, bactérias que possuem carga negativa podem alcançar, por energia cinética, uma superfície natural que possui carga positiva (Figura 1). Na segunda fase, o biofilme acumula bactérias por co-agregação com a mesma espécie ou com outras espécies utilizando mecanismos e estruturas como glicocálice (camada externa à parede bacteriana, amorfa de polissacarídeos), adesinas (estruturas de aderência da superfície bacteriana), e pili (estruturas funcionais para troca do material genético entre as bactérias, assim como as adesinas), além da produção de matriz polissacarídica extracelular (JORGE, 1998; KOLENBRANDER, 2000).

O ciclo de desenvolvimento do biofilme pode ser resumido em quatro fases: a iniciação, a maturação, a manutenção e a dissolução. A plasticidade fenotípica permite que as bactérias se adaptem às alterações impostas pelo ambiente ao qual estão submetidas. A transição entre um estado e outro é feita de maneira controlada e é altamente complexa sob o ponto de vista fisiológico, bioquímico e molecular (O' TOOLE *et al*, 2000).

Os biofilmes podem ser formados por uma única ou por diferentes espécies de microrganismos. No seu processo de formação, uma comunidade microbiana multi-espécie, com um patógeno predominante, interage com o hospedeiro, dividindo espaço e recursos disponíveis com outros organismos oportunistas. O biofilme garante a vida da colônia em ambientes não estáveis, com fluxo constante de líquidos. Pode-se atribuir ao biofilme uma série de vantagens para a colônia, como melhor comunicação entre células, em função da solução de continuidade entre elas, facilitando as atividades bioquímicas, melhor proliferação, defesa coletiva contra fatores antagônicos, com acesso a nichos e recursos que não poderiam ser utilizados por células isoladas (LEITE *et al*, 2001).

A formação do biofilme na superfície dental é fenômeno complexo, e possivelmente a chave para o esclarecimento das patologias bucais de origem bacteriana. O entendimento preciso da formação e virulência desse biofilme em função do tempo, fatores imunológicos, fatores microbianos, entre outros, têm sido pesquisados por muitos autores, e vêm sendo gradativamente esclarecidos (MONTANARO *et al*, 2004).

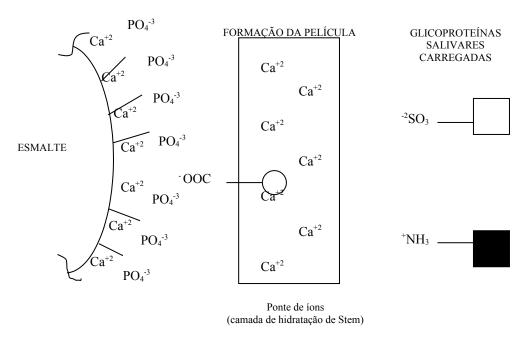


Figura 1. Interação de glicoproteínas derivadas do hospedeiro com a superfície carregada do esmalte. Acredita-se que essas interações eletrostáticas ocorram através de pontes de íons de cálcio encontradas na "camada de hidratação de Stern".

FONTE: NISENGARD & NEWMAN (1997)

#### 3.2 Epidemiologia da cárie dentária

Os estreptococos do grupo mutans têm sido encontrados em praticamente todos os indivíduos independente da prevalência de cárie (CARLSSON *et al*, 1985). Porém, a simples detecção desses microrganismos na saliva ou placa dental não justifica o desenvolvimento de cáries, devendo-se levar em consideração, a concepção da natureza multifatorial da cárie como doença, a qual está sujeita às próprias condições sócio-econômicas, culturais e ambientais de uma população. Dos fatores fundamentais para a ocorrência da cárie destacam-se a dieta com alto teor

de sacarose e a qualidade e frequência de higiene bucal (MATTOS-GRANER *et al*, 2001; BRATTHALL, 1992).

A cárie dentária é uma patologia microbiana, infecciosa, transmissível e sacarolítica, dos tecidos calcificados dos dentes, mais especificamente do esmalte dentário. Essa doença caracteriza-se pela desmineralização da estrutura inorgânica e destruição da substância orgânica do elemento dentário. De todas as patologias bucais conhecidas, a cárie dentária destaca-se em primeiro plano, como a doença mais antiga estudada pela odontologia moderna (SHAFER *et al*, 1983).

Segundo Loesche (1986) a cárie dentária é uma das doenças infecciosas, transmissíveis, mais prevalentes em humanos e uma das mais dispendiosas, quanto ao tratamento sintomático restaurador. Além disso, o tratamento da lesão de cárie é ineficaz para o controle e eliminação da doença. A lesão cariosa é a manifestação de um processo patológico que ocorre em consequência de uma interação entre bactérias presentes na cavidade bucal, superfícies dentais e constituintes da dieta, especialmente a sacarose. Com relação à microbiota bucal, a colonização precoce dos dentes por *S. mutans*, é fator de risco conhecido e que predispõe a cárie na dentição decídua (MATTOS-GRANER *et al*, 2000).

A definição de cárie dentária como uma doença microbiana, infecto-contagiosa da civilização moderna, deve-se à comparação com os grupos humanos pré-históricos que dificilmente apresentavam essa patologia destrutiva dos tecidos mineralizados do elemento dentário. Segundo Lenhossek (1919), em seus estudos antropológicos, os crânios dolicocéfalos humanos do período pré-neolítico (12.000 a.C.) não apresentavam cáries dentárias; porém, os crânios braquicéfalos do período neolítico (12.000 a 3.000 a.C.) mostravam dentes cariados. Nestes casos estudados, a maioria compreendia pessoas idosas com dentes desgastados pela impacção alimentar, comprometendo as áreas cervicais. O estudo de Mellanby (1934) apresenta uma revisão da literatura sobre a cárie nas raças primitivas existentes e a incidência era invariavelmente menor, quando comparada ao homem moderno.

A aquisição dos microrganismos cariogênicos ocorre geralmente nos primeiros anos de vida, persistindo por toda existência do indivíduo, mesmo com o tratamento da área lesionada. É considerada uma doença cosmopolita, afetando os habitantes de todas as áreas geográficas do planeta, sem distinção de sexo, raças, níveis sócio-econômicos e faixas etárias. Contudo, existem

indivíduos resistentes à cárie dentária, denominados isentos de cárie, não havendo explicação plausível para este fenômeno (LOESCHE, 1977).

A presença da cárie dentária nas sociedades modernas tem sido objeto de extensos estudos em todo o mundo, por sua distribuição cosmopolita. Com a existência de uma vasta literatura sobre epidemiologia da cárie dentária, em distintas áreas geográficas envolvendo diferentes raças, etnias e faixas etárias, fica evidente a influência da civilização moderna e sua dieta, com a incidência e prevalência da cárie em humanos (SHAFER *et al*, 1983).

Prince (1936) relatou que os esquimós do Alasca vivendo em isolamento, apresentavam uma incidência de cárie de aproximadamente 0,1%, enquanto os esquimós vivendo em áreas com acesso aos alimentos industrializados apresentavam uma incidência de 13% dos dentes examinados. Como destaque nesta pesquisa, os esquimós que tinham uma dieta rica em óleos de peixes e carne de baleia apresentavam baixos índices de cárie, em relação aqueles com acesso a alimentos contendo sacarose, confirmando uma relação direta entre dieta e composição bacteriológica da placa (VAN HOUTE, 1981).

Mellanby (1923) demonstrou um efeito comparável da dieta sobre a cárie, em estudos realizados em nativos do Sul da Rodésia. Cerca de 5% dos adultos que consumiam alimentos europeus por apenas curto período de tempo tinham evidências de cárie dentária. Por outro lado, cerca de 20% dos adolescentes que haviam ingerido esses alimentos por um período de tempo ligeiramente maior apresentava maiores lesões do tipo cárie. Das crianças que haviam estado em contato com hábitos e alimentos europeus, na maior parte de suas vidas, 50% possuíam dentes cariados. Resultados semelhantes foram relatados em estudos feitos em nativos como os maoris da Nova Zelândia, por Pickerill (1913), beduínos árabes do deserto, por Clawson (1936), e samoanos do Hawai, por Restarski (1941).

Há percepção de que tribos primitivas isoladas são praticamente isentas de cárie, podendo, no entanto existir certa resistência dependendo da raça a esta doença. Contudo, o hábito alimentar torna-se relevante, a partir do momento em que a incidência de cárie dentária aumenta com a troca ou adição de alimentos ditos civilizados, geralmente ricos em carboidratos, dentre eles a sacarose (SHAFER *et al*, 1983).

Historicamente, o homem primitivo raramente apresentava essa moléstia, devido ao seu hábito alimentar rico em fibras e proteínas. Estudos científicos comprovaram a relação da cárie

dentária com as dietas humanas, ricas em carboidratos, sendo o mais cariogênico a sacarose (MELLANBY, 1934). A partir desse fato, a cárie dentária passou a ser considerada uma doença da civilização moderna. Com a industrialização dos alimentos ricos em sacarose, aumentaram a proliferação e manutenção da cárie dentária, aliada aos outros co-fatores como: predisposição do hospedeiro e presença dos agentes cariogênicos (SHAFER *et al*, 1983).

Grande avanço para a compreensão desse estudo se deu a partir do século XIX, com a descrição da placa dental (placa bacteriana ou placa microbiana), como uma estrutura aderente de significativa importância no início do processo carioso (BLACK, 1899). O pré-requisito fundamental para desencadear esse processo é a formação da película adquirida, composta por mucina (glicoproteína salivar), a qual é produzida após escovação (BIBBY, 1931), podendo ser simultaneamente colonizada por bactérias, como *Lactobacillus sp* associadas ou não a espécies de fungos geralmente do gênero *Actinomyces sp* (ALALUUSUA *et al*, 1989), além da *Streptococcus mutans* contidas na saliva (BUISCHI *et al*, 1989).

As pesquisas focalizaram seus esforços no sentido de erradicar a principal bactéria, a *Streptococcus mutans*. Contudo, ficava sempre a reflexão se este seria o melhor caminho, visto que esse microrganismo compõe, juntamente com a microbiota aeróbica, uma relação de comensalismo na cavidade bucal, e sua eliminação poderia causar mais transtornos e novas patologias bucais (SHAFER *et al*, 1983).

Atualmente, com a mudança do paradigma de erradicar para inativar, cria-se uma nova era de pesquisas, voltadas para os princípios bioativos capazes de promover a antiaderência do biofilme.

A Amazônia brasileira destaca-se como a maior floresta tropical do mundo, com sua biodiversidade vegetal capaz de fornecer substâncias viáveis e biotecnologicamente compatíveis, para solucionar a problematização supracitada. Poucas são as pesquisas realizadas, principalmente na área da odontologia, visto que os índices de CPOD (indicam dentes cariados, perdidos, e obturados) são de aproximadamente 3,66 na região amazônica, isso demonstra que essa região encontra-se acima do estabelecido pela OMS (Organização Mundial de Saúde) cujo valor é de 2,5 para população na faixa etária de 18 anos (YURTSEVER *et a.*, 2004).

#### 3.2.1 Etiologia da cárie dentária

A complexidade do tema aliada às complicações multifatoriais indiretas como predisposição do hospedeiro, o pH salivar e o tipo de dieta, são responsáveis por mascarar ou induzir as causas diretas, como a formação do biofilme. Na tentativa de responder consensualmente à origem da cárie dentária, anos de pesquisa produziram teorias clássicas como a teoria proteolítica de Heider e Wedl (1869) apud Shafer *et al* (1983 p. 384-385), a teoria acidogênica de Leber e Rottenstein (1873) ou teoria químico-parasitária de Miller (1905) apud Shafer *et al* (1983 p. 370-381), e a teoria da proteólise-quelação proposta por Schatz *et al* (1975).

Dentre as 200 a 300 espécies bacterianas presentes na cavidade bucal, apenas um pequeno número, entre elas os *Streptococcus mutans* e *Lactobacilus sp*, pode causar cárie, sustentando a teoria da placa específica (LOESCHE, 1986).

Mecanismos envolvidos na formação da placa bacteriana cariogênica, entre eles as características fenotípicas dos *Streptococcus mutans* estão relacionadas à sua virulência e a relação entre a microbiota, a saliva, a dieta e o dente (TANZER, 1989).

O consumo excessivo de carboidratos propicia meio adequado à proliferação desses microrganismos produtores de ácidos que levam à desmineralização do esmalte. Assim, a progressão da cárie depende do hospedeiro suscetível, microbiota patogênica e dieta rica em carboidratos, interagindo em condições críticas num determinado período de tempo (YAZAKI *et al*, 1999; PETTI e HAUSEN, 2000).

#### 3.2.2 Os microrganismos formadores da cárie dentária

A importância dos microrganismos no processo de formação e consolidação da cárie na cavidade bucal foi considerada em vários trabalhos. Destaca-se o relevante estudo de Clarke (1924) ao descrever uma nova espécie de bactéria, a *Streptococcus mutans*, isolada a partir das lesões de cárie dos pacientes ingleses. O interesse por esse estreptococo permaneceu latente até a década de 1960. As pesquisas estavam voltadas para a espécie *Lactobacilus acidophilus*, que foi encontrado com muita freqüência em humanos suscetíveis à cárie (WEYNE, 1989).

Segundo Bunting *et al* (1926), esse microrganismo foi considerado etiologicamente importante, pois em seus estudos foi relatada a ausência desta bactéria em pessoas imunes à cárie e em contrapartida, sua freqüente presença em bocas de pessoas com suscetibilidade à cárie dentária. Outros autores, como Jay e Voorhees (1927), Arnoud e McClure (1941), Becks *et al*, (1944), corroboraram com estas descobertas envolvendo o *L. acidophilus*.

As pesquisas bacteriológicas facilitam a compreensão das funções dos microrganismos, isolados ou interagidos na etiologia da cárie. A inter-relação da microbiota bucal e a dieta do indivíduo demonstram o desenvolvimento do processo carioso em todas as fases da dentição humana. Embora haja discordância em relação à especificidade de cada microrganismo, sejam bactérias como *Lactobacilus acidophilus*, *Streptococcus mutans*, fungos como *Actinomyces sp.* e outros. Todos estes fatores diretos são indispensáveis na formação e consolidação da lesão cariosa no elemento dentário (SHAFER *et al*, 1983).

A existência de fatores secundários (saliva, flúor e higiene bucal) tem grande influência no desenvolvimento da cárie dentária, funcionando como moduladora dos fatores primários anteriormente descritos (AFONSKY, 1961).

O processo bioquímico de formação dos ácidos a partir da degradação dos carboidratos, principalmente da sacarose, ainda não foi definido com exatidão. No metabolismo bacteriano, as ações enzimáticas sobre os açúcares produzem principalmente ácido lático, butírico e outros. Para Shafer *et al* (1983), "o mito de que a saliva ácida causa a cárie dentária deve ser repelido, pois leva o paciente há pensar que pouco pode ser feito para prevenir a cárie dentária".

#### 3.3 O microrganismo cariogênico: Streptococcus mutans

Segundo Tortora *et al* (2004), as bactérias orais são sacarolíticas, convertendo a sacarose e demais carboidratos em ácido lático e outros ácidos orgânicos, os quais atacam o esmalte dos dentes. A população microbiana sobre e em torno dos dentes é muito complexa; mais de 300 espécies foram descritas.

A bactéria cariogênica mais importante, responsável pela formação da cárie, é a Streptococcus mutans. Caracterizada como um estreptococo gram-positivo, não hemolítico, não agrupado sorologicamente, capaz de produzir um polissacarídeo aderente de moléculas de glicose denominado de dextrana extracelular (Figura 2), que adere firmemente à superfície lisa do esmalte dental. Algumas outras espécies de estreptococos também são cariogênicas; contudo, desempenham papéis de menor relevância na iniciação do processo carioso (TRABULSI *et al*, 2002).

A inicialização da cárie dentária depende da fixação do *S. mutans*, ou outro estreptococo ao esmalte dental. Vale ressaltar que estas bactérias não aderem a um dente limpo, mas dentro de minutos o dente recém-escovado é revestido com uma película de mucina, glico-protéina salivar. Em algumas horas, as bactérias cariogênicas se estabelecem nesta película e começam a produzir um polissacarídeo aderente de moléculas de glicose, denominada dextrana (GIBBSONS & NYGAARD, 1968). Contudo, a interferência de algum desses mecanismos pode prevenir a formação da cárie dentária (CIARDI *et al*, 1981).

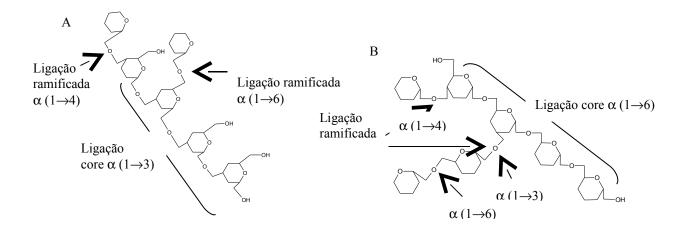


Figura 2. A - *Streptococcus sanguis* - Dextrana contendo no esqueleto  $\alpha$  (1,6)-glicose e cadeia lateral típica de dextranas insolúveis. B - *Streptococcus mutans* - Dextrana com cadeias laterias de  $\alpha$  (1,3)-glicose. A extensão das ligações  $\alpha$  (1,3) determina a solubilidade da dextrana.

FONTE: NISENGARD & NEWMAN, 1997

Durante a produção de dextrana, as bactérias primeiramente hidrolisam a sacarose em seus componentes monossacarídeos, frutose e glicose. Enzimas como a glicosiltransferase convertem as moléculas de glicose em dextrana. A frutose residual é o açúcar primário fermentado em ácido lático. O acúmulo de bactérias e dextrana aderido ao elemento dentário compõem a placa bacteriana (NEWBRUN *et al*, 1977) (Figura 3).

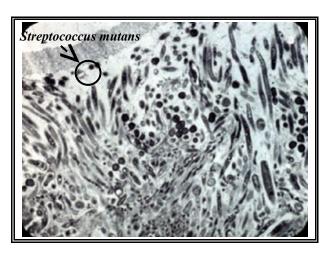


Figura 3. Placa bacteriana ou biofilme. Em destaque a *Streptococcus mutans*. FONTE: Disponível em: < http://www.usc.edu/hsc/dental/opath/Cards/EnamelCaries.html>. Acesso em: 25 março de 2005

O *Streptococcus mutans*, através de sua ação sacarolítica, produz ácido lático de forma pontual na placa, iniciando o processo de desmineralização, resultando fundamentalmente na solubilização da hidroxiapatita  $C_{10}(PO_4)_6X_2$  (Unidade molecular formadora do esmalte dental), quando a acidez salivar reduz os valores abaixo do crítico situado, em torno de pH 5,2 (CURY, 1981; ROSEN *et al*, 1989).

Mediante este quadro, é estabelecido o parâmetro inicial para o surgimento da cárie incipiente, clinicamente observada na forma de mancha branca do esmalte dentário. A partir deste momento, a patologia cárie dentária está instalada, causando progressiva perda dos cristais de hidroxiapatita, em função dos produtos do metabolismo bacteriano, a presença do biofilme e formação dos polissacarídeos extracelulares de fundamental importância para desagregação destes constituintes do esmalte dentário (MATSUMOTO *et al*, 1999; DUARTE *et al*, 2003).

A alta cariogenicidade do biofilme formado na presença de sacarose é principalmente explicada pela alta concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis, mutano e dextrano, mas a baixa concentração inorgânica e a composição protéica também podem influenciar o processo (CURY *et al*, 2000).

Os estreptococos do grupo viridans incluem várias espécies de estreptococos α-hemolíticos e não hemolíticos, a maioria dos quais é parte da microbiota normal do trato respiratório superior, genital e orofaringe. Os estreptococos viridans podem ser divididos em grupo mutans (os isolados de origem humana *S. mutans* e *S. sobrinus*, mais algumas espécies de

origem animal como *S. cricetus*, *S. rattus* e *S. macacae*), grupo salivarius (S. *salivarius* e *S. vestibularis*), grupo mitis (*S. mitis* e *S. oralis*) e grupo sanguis (S. *sanguis*, *S. gordonii*, *S. parasanguis* e *S. crista*) (FRANDSEN *et al*, 1991). A identificação por análise de DNA de quatro grupos geneticamente distintos resultou na reclassificação do grupo mutans, a cada grupo foi dado um nome de espécie individual: *S. mutans*, *S. cricetus*, *S. rattus e S. sobrinus*. (SLOTS & TAUBMAN, 1999). O estudo de Newbrun (1983) demonstrou a localização das bactérias no dente e o tipo de cárie promovido por sua significância, em destaque a presença do *Streptococcus mutans* (Tabela 1).

Tabela 1. Associação entre as bactérias e os tipos de cárie dentária.

TIPOS DE CÁRIE	ORGANISMOS ISOLADOS	SIGNIFICADO	
		POSSÍVEL NAS CÁRIES	
Sulcos e fissuras	Streptococcus mutans	Altamente significante	
	S. sanguis	Levemente significante	
	S. mitis	Não significante	
	Lactobacillus sp	Altamente significante	
	Actinomyces sp	Pode ser significante	
Superficie lisa	Streptococcus mutans	Altamente significante	
	S. salivarius	Pequena significância	
Cáries de dentina	Lactobacillus sp	Altamente significante	
	Actinomyces viscosus	Significante	
	A. naeslundii	Altamente significante	
	Streptococcus mutans	Pode ser significante	
	Bacilos filamentosos	Significante	
Cáries de raízes	A. viscosus	Altamente significante	
	A. naeslundii	Altamente significante	
	Streptococcus mutans	Alguma significância	
	S. sanguis	Significado não claro	
	S. salivarius	Significado não claro	
	Bacilos filamentosos	Altamente significante	

FONTE: NEWBRUN (1983)

Os estreptococos do grupo mutans foram isolados no início do século XX, em crianças inglesas, e descritos como estreptococos "mutantes". Visto que apresentavam morfologia celular mais achatada que outros estreptococos, na cavidade bucal emergiram como importantes agentes patogênicos predominantemente associados com o início e a patogenia da cárie dental (MATTOS-GRANER, 1999).

As espécies *S. mutans*, *S. sobrinus* e outros membros de estreptococos bucais do grupo mutans são capazes de produzir enzimas denominadas glicosiltransferases, que hidrolizam a

sacarose da dieta em glicose e frutose, e unem os resíduos de glicose entre si por meio de ligações glicosídicas α-1,6 e α- 1,4 para formar glicanos insolúveis. Esses glicanos conferem aos microrganismos a capacidade de aderir às superfícies lisas dos dentes e formar a matriz do biofilme dental. A aderência específica de *S. mutans* e de outros microrganismos aos glicanos aderentes e insolúveis e a subseqüente formação de ácidos, promovem a desmineralização do esmalte dentário e o início das lesões de cárie (LOESCHE, 1986; GRÖNROOS, 2000).

Outros estreptococos bucais, incluindo *S. sanguis*, *S. salivarius* e possivelmente *S. gordonii*, também podem sintetizar esses polissacarídeos, mas apenas os estreptococos do grupo mutans apresentam aumento de colonização induzido pela sacarose. Além disso, *S. mutans* também produzem maior quantidade de ácidos a partir de carboidratos, do que outras bactérias bucais, porque são capazes de fermentar grande variedade de açúcares e são mais resistentes aos ácidos do que outros estreptococos bucais. Esses microrganismos também sintetizam polissacarídeos intracelulares que podem ser metabolizados para produzir ácidos na ausência de carboidratos fermentáveis exógenos (GRÖNROOS, 2000).

Os estreptococos do grupo mutans foram originalmente descritos como uma única espécie: *S. mutans*, dividida em oito subgrupos designados de *a* a *h* em função da especificidade sorológica dos antígenos de carboidratos da parede celular. Mais tarde, esses vários sorotipos foram classificados em categorias de espécies independentes: *S. mutans* (que inclui os sorotipos *c*, *e* e *f*) e *S. sobrinus* (sorotipos *d* e *g*), membros do grupo mutans, que predominam no homem (BENTLEY *et al*, 1991).

As células de *S. mutans* são Gram positivas, têm morfologia ovalada, medem cerca de 0,5 a 0,75 mm de diâmetro, agrupam-se em pares ou em cadeias, requerem meios nutricionalmente ricos para seu crescimento, são anaeróbios facultativos e sua temperatura ótima de crescimento é de 37 °C. Em meio de cultura Ágar Mitis Salivarius, formam colônias pequenas, fortemente aderidas ao meio de cultura, e com bordas irregulares. Com adição de sacarose ao ágar, muitas linhagens de *S. mutans* produzem colônias de cerca de 1 mm de diâmetro. Quando cultivados em ágar sangue em microaerofilia por 48 horas, as colônias de *S. mutans* apresentam-se brancas ou cinzas, circulares ou irregulares com 0,5 a 1,0 mm de diâmetro, tendendo aderir na superfície do ágar. O meio de cultura mais freqüentemente utilizado para o isolamento primário de *S. mutans* é

o Ágar Mitis Salivarius com adição de sacarose, bacitracina e telurito de potássio (GOLD *et al*, 1973).

A identificação de *S. mutans* é baseada na sua morfologia colonial, seletividade ao meio de cultura, coloração de Gram, morfologia à microscopia ótica e características de crescimento específicas quanto ao padrão enzimático e assimilação de açúcares (GRÖNROOS, 2000; KONEMAN *et al*, 2001).

Também podem ser utilizados outros métodos de identificação como anticorpos monoclonais, análise de DNA através da detecção de genes específicos como o gene B glicosiltransferase (gtfB), gene frutosiltransferase (ftf), gene dextranase (dexA) (BARBIERI, 2005).

#### 3.3.1 O biofilme e a importância do Streptococcus mutans

A presença de ácidos distribuídos na forma difusa, na cavidade bucal é irrelevante na formação do biofilme, e o seu respectivo mecanismo retentivo em um ponto específico do elemento dentário. Contudo, por longos períodos de exposição aos ácidos, somente a ação tópica leva à destruição dos tecidos mineralizados dos dentes. Logo, a compreensão da estrutura da placa dental desvenda as atuações localizadas dos ácidos, demonstrando seu relevante papel na formação da cárie e destruição do esmalte dentário (BLACK, 1899). A placa é um biofilme de composição diversa e o seu significado microbiológico está começando a ser desvendado (MARSH, 1999).

A placa dental também é conhecida como placa microbiana ou placa bacteriana; foi demonstrada por Williams (1897), sendo uma estrutura de significativa contribuição no início da cárie dental. A certeza da participação de microrganismos no desenvolvimento da cárie vem sendo descrita há mais de dois séculos. Com base em estudos subsequentes, observou-se que existem microrganismos específicos relacionados à cárie, fazendo com que a placa bacteriana, de natureza cariogênica, seja constituída de uma microbiota anaeróbica, Gram positiva, sacarolítica, representada basicamente pelos *Streptococcus mutans*, principalmente nos estádios iniciais da doença.

Como confirmado por Loesche (1977), os *S. mutans* são microrganismos altamente cariogênicos e a sua colonização se faz presente nas fases precoces da vida, logo após a erupção dos dentes. O *S. mutans* tem predileção por colonizar dentes cuja anatomia é rica em áreas retentivas (WEYNE, 1989). Crianças de tenra idade não abrigam esses microrganismos até algum tempo após a erupção dentária, pois eles requerem a presença de uma superfície dura e nãodescamante para colonizar.

Os lactobacilos, por sua vez, também integram o grupo dos microrganismos cariogênicos, mas segundo Weyne (1989), esses microrganismos só estão presentes em estádios mais avançados, onde as lesões da cárie se traduzem clinicamente com cavitações.

Alaluusua *et al* (1989), sugeriram que os *S. mutans* estão associados à iniciação da cárie, enquanto que os lactobacilos, à sua progressão. Esses microrganismos, quando presentes em número elevado, indicam um alto risco/atividade de cárie. Segundo Buischi *et al* (1989), usar o teste bacteriológico como um indicador da atividade cariogênica de uma população constitui uma ferramenta importante para o controle da cárie dentária.

Keys (1960) pela primeira vez, levantou a possibilidade de infecção interindividual da microbiota cariogênica, ao constatar num estudo experimental realizado em *hamsters*, que filhotes cárie-resistentes poderiam ser contaminados quando engaiolados com animais cárie-ativos, ou com fezes ou materiais das placas destes animais.

Além do exposto acima, a transmissão desses microrganismos também pode se dar de forma indireta, por meio de alimentos ou objetos contaminados. Segundo Köhler e Brathall (1978), os *S. mutans* podem sobreviver de maneira viável nos objetos expostos ao meio ambiente por sete horas e serem transmitidos através destes, como por exemplo, colheres de sopa de metal, maçanetas de porta, relógios, anéis etc. No mesmo ano, Svanberg (1978) realizou um estudo mostrando que escovas e pastas dentais podem apresentar-se altamente infectadas pelo *S. mutans* após o seu uso e assim permanecer por algum tempo, podendo então, servir de meio de contaminação interindividual.

#### 3.3.2 Fatores de Virulência do Streptococcus mutans

O termo virulência é descrito como a capacidade de um microrganismo causar doenças em um hospedeiro. A relação entre hospedeiro e microrganismo é dinâmica, dependente de suas características individuais e do inter-relacionamento com fatores externos. A virulência de uma bactéria consiste em propriedades que promovem sua entrada, colonização e crescimento no hospedeiro. Dentre os estreptococos do grupo mutans, o *Streptococcus mutans* é considerado de maior relevância devido aos seus fatores de virulência, sendo descritos como agente etiológico da cárie dental (HAMADA e SLADE, 1980; LOESCHE, 1986).

Gibbons (1984) relatou que o potencial cariogênico de *S. mutans* é principalmente dependente das suas altas propriedades acidogênicas e da habilidade de se acumular nos dentes, principalmente devido à síntese de glucanos extracelulares a partir da sacarose. A produção de ácidos e a capacidade de metabolização de substratos em meio ácido, foram os primeiros fatores de virulência atribuídos a microrganismos específicos relacionados à etiologia da cárie (LOESCHE, 1986; KÖHLER *et al*, 1995).

Alguns estudos demonstraram que existem diferenças na capacidade de produção de ácidos entre as diferentes espécies de estreptococos do grupo mutans. De Soet *et al* (1991), observaram que *S. sobrinus* eram mais acidogênicos do que *S. mutans* em animais gnobióticos. Köhler *et al* (1995), detectaram diferenças na produção de ácidos entre linhagens de *S. mutans* isoladas de humanos, embora tenham observado grandes variações na acidogenicidade entre linhagens de *S. mutans* isoladas de diferentes indivíduos. Os autores não foram capazes de associar o potencial acidogênico com o número de lesões de cárie presente nos indivíduos colonizados por estes microrganismos.

Van Houte *et al* (1996), avaliaram o pH final do meio de cultura rico em sacarose, após cultivo de amostras de placa bacteriana de superfícies dentárias com diferentes condições clínicas (lesões de cárie de raiz, superfícies radiculares hígidas, lesões de manchas brancas em esmalte, lesões coronárias de cárie ativa e superfícies coronárias hígidas) e observaram que quando *S. mutans* estava presente em maior concentração na placa, foram detectados os menores valores de pH, em torno de 4,2 coincidindo com as amostras de placa, das superfícies dentárias com lesões,

sugerindo que a cariogenicidade da placa é dependente do aumento na proporção de organismos acidogênicos e acidúricos.

Além da tolerância aos ácidos e produção de ácidos, os *S. mutans* ainda possuem como mecanismos de virulência, a capacidade de sobrevivência no biofilme dental devido à alta capacidade de adaptação ao ambiente, presença de adesinas na superfície celular, produção de glicosiltransferases, mutacina e polissacarídeos extracelulares. Em adição a esses fatores, outras propriedades podem influenciar a virulência de *S. mutans*, entre elas a atividade proteolítica, capaz de degradar colágeno dos substratos (HOMER *et al*, 1990; HARRINGTON e RUSSEL, 1994; JACKSON *et al*, 1997).

Enzimas associadas à célula do microrganismo utilizam sacarose como substrato, separando-a em glicose e frutose, e por fermentação clássica produzem energia e grande quantidade de ácido lático. Algumas moléculas de glicose provenientes da sacarose são convertidas em polissacarídeo intracelular de alto peso molecular (amilopectina ou glicogênio), este processo proporciona armazenamento de material para o metabolismo energético quando nenhum substrato exógeno for encontrado. Além disso, os *S. mutans* podem produzir hidrolases glicosídicas que extraem hidratos de carbono da saliva para utilização como fonte de energia (GRÖNROOS, 2000).

Mattos-Graner *et al* (2000) avaliaram algumas características fenotípicas de virulência de *S. mutans* isolados de crianças com e sem atividade de cárie e observaram uma relação positiva entre a produção de glicanos insolúveis e a capacidade de adesão ao vidro, sugerindo que linhagens de crianças com alta atividade de cárie podem colonizar mais eficientemente, induzindo mais facilmente à cárie dental.

Segundo Alaluusua *et al* (1996), a maior diversidade genética de estreptococos do grupo mutans observada em crianças com cárie de mamadeira, deve-se às condições propícias do ambiente para o estabelecimento de múltiplos genótipos. Entretanto, contrário a esta posição, Kreulen *et al* (1997), verificaram que crianças com lesões de cárie rampante apresentavam apenas um clone de *S. mutans* enquanto os respectivos irmãos, sem lesões de cárie, apresentavam de 2 a 5 clones, sugerindo que clones específicos de *S. mutans* são selecionados em cavidades orais com atividade de cárie.

Avaliando a diversidade clonal de isolados de *S. mutans* em indivíduos livres de cárie e cárie-ativos, Napimoga (2004) concluiu que indivíduos cárie ativos albergam um maior número de genótipos de *S. mutans* com alta capacidade de sintetizar glicanos insolúveis, quando comparado com genótipos isolados de indivíduos livres de cárie.

#### 3.3.3 Colonização por Streptococcus mutans

Em geral, a aquisição de microrganismos pelo corpo humano ocorre por contato direto entre um hospedeiro e outro, ou através de objetos inanimados, como chupetas e brinquedos. A saliva é a principal via de transmissão de *S. mutans* (KÖHLER e BRATTHALL, 1979), e a mãe é considerada a mais importante fonte de infecção para as crianças (LI e CAUFIELD, 1995; KLEIN *et al*, 2004), embora outros estudos tenham sugerido haver outras formas de aquisição (MATTOS-GRANER *et al*, 2001).

Os processos iniciais de colonização da cavidade bucal incluem a introdução de diversas populações microbianas. Bactérias do gênero *Streptococcus* do grupo viridans (*S. mitis*, *S. oralis* e *S. salivarius*) podem ser considerados alguns dos pioneiros neste processo, porém alguns organismos variam de acordo com as condições endógenas do hospedeiro (LI e CAULFIELD, 1995).

A levedura *C. albicans*, por exemplo, em alguns portadores, assim como *S. mitis*, *S. oralis* e *S. salivarius* colonizam diferentes superfícies epiteliais da cavidade bucal. O surgimento de novos nichos favorece a colonização por novos microrganismos (DUCHIN e VAN HOUTE, 1978; CASTRO *et al*, 2000).

A colonização inicial por *S. mutans* na superfície dental envolve interações entre a superfície da bactéria e receptores da película adquirida, este mecanismo é considerado sacarose-independente. A adesão de células bacterianas à superfície dos dentes é de fundamental importância para o início da lesão cariosa, resultando em dois estágios, o da aderência reversível da célula bacteriana à película adquirida presente na superfície do esmalte dentário, e o estágio seguinte é caracterizado pela acumulação de *S. mutans* através do seu crescimento e produção de glicanos extracelulares (GIBBONS & NYGAARD, 1968). Em seguida, com a entrada da sacarose, a célula bacteriana ativa as enzimas glicosiltransferases que sintetizam glicanos

extracelulares, principais responsáveis por essa adesão e também pela coesão intercelular, intensificando as ligações e o acúmulo das bactérias resultando numa massa microbiana tenaz, configurada como placa bacteriana (NEWBRUN *et al*, 1977).

A colonização dos dentes, possivelmente ocorre em duas fases distintas, aparentemente independentes. A fase primária ou inicial de colonização é dependente da interação específica de proteínas da película adquirida do esmalte, com moléculas de superfície da célula bacteriana denominada adesinas. A segunda fase de colonização é denominada fase de acúmulo e propicia o aumento do número de células bacterianas na placa dental, importante para a produção de ácidos, que favorece os processos de desmineralização dental. O acúmulo de *S. mutans* nas superfícies dentárias envolve diferentes processos de interação, coaderência e coagregação com outros microrganismos bucais (KOLENBRANDER e LONDON, 1993).

Caulfield *et al* (1993), em estudo longitudinal de 46 crianças desde o nascimento até cinco anos de idade, detectaram *S. mutans* em 21% das crianças aos 19 meses de idade e em 62% das crianças aos 31 meses de idade. Entre as crianças não infectadas até os 31 meses de idade todas se mantiveram livres de *S. mutans* até aos 5 anos de idade. Estes autores sugeriram que o período crítico para a implantação de *S. mutans* na cavidade bucal corresponderia ao intervalo entre 19 e 31 meses de idade, o qual foi denominado de "janela de infectividade", que coincide com a erupção dos molares decíduos.

A detecção de *S. mutans* na saliva de indivíduos dentados é bastante elevada. Koga – Ito *et al* (2003), analisando uma população de crianças respiradoras bucais encontraram uma prevalência de 75% a mais da população bacteriana de *S. mutans*, em relação às crianças respiradoras nasais. Napimoga (2004), analisando a clonalidade de *S. mutans* em par mãe/filho, encontrou prevalência de 80% nas amostras salivares das crianças e 100% nas amostras salivares das mães. Azevedo *et al* (1998), avaliando as espécies de estreptococos do grupo mutans isolados de amostras salivares de par mãe/filho, detectou 94% de *S. mutans* nas crianças e 100% nas mães.

#### 3.4 Aderência "in vitro" de Streptococcus mutans

Na tentativa de elucidar os fenômenos de interações microbianas, co-agregação, aderência e metabolismo dos diferentes microrganismos bucais, muitos modelos "*in vitro*" têm sido desenvolvidos, embora nesse tipo de estudo existam vantagens e desvantagens. Dependendo do tipo de análise a ser realizada, os fatores inerentes a microbiota bucal necessitam ser minimizados para a análise mais detalhada de cada fenômeno.

Esses modelos incluem como corpos de prova, cortes dentais, fragmentos de dentina, vidro, entre outros. Os modelos utilizados para ensaio de aderência são freqüentemente analisados através de Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.), Cintilografia, ELISA com utilização de anticorpo específico para a bactéria em estudo e contagem de Unidades Formadoras de Colônia (U.F.C.) (GAINES *et al*, 2003).

Eick *et al* (2004), em estudo de aderência "*in vitro*" analisaram a capacidade de aderência de *S. mutans* em diferentes materiais restauradores, com análise do experimento por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.) e contagem de Unidades Formadoras de Colônias (U. F. C.).

Aldsworth e Macfarlane (2001) desenvolveram um sistema de aderência "in vitro" em membranas de ultrafiltração para a investigação de formação de placa bacteriana formada por bactérias bucais no estudo de desenvolvimento de lesões de cárie de raiz.

De acordo com os trabalhos relatados, há evidências que *S. mutans* interage "*in vitro*" pelos seus mecanismos de aderência e co-agregação, porém para que essas evidências sejam comprovadas no meio bucal, há necessidade de mais pesquisas, pois como foram observados, muitos fatores devem ser considerados nessa interação (BARBIERI, 2005).

Estudos têm demonstrado a ação de uma série de produtos químicos, agentes biológicos e substâncias naturais antiplaca e anticárie na restrição *in vivo* da formação do biofilme e cárie, os quais agem principalmente sobre a formação dos polissacarídeos extracelulares (CURY, 1981; ROSEN *et al*, 1989; MATSUMOTO *et al*, 1999; DUARTE *et al*, 2003). O ácido tânico, encontrado em vários tipos de chá e outras bebidas como o café, é estudado como um importante inibidor de crescimento bacteriano e da ação da enzima glicosiltransferase (STRALFORS, 1967; PAOLINO *et al*, 1980; KASHKET *et al*, 1985 A). É também capaz de formar um complexo

estável com proteínas ricas em prolina presentes na saliva (HAGERMAN & BUTLER, 1981), as quais estão diretamente envolvidas com a adsorção de bactérias bucais à película adquirida. Essa capacidade de unir as proteínas pode interferir com os receptores da superfície celular dos microrganismos envolvidos na adesão bacteriana (OTAKE *et al*, 1991).

Elvin-Lewis *et al*, (1980) observaram que o flúor e o ácido tânico presentes em algumas variedades de chá afetaram o crescimento, aderência e a produção de polissacarídeos extracelulares por *S. mutans*. Experimentos em laboratório demonstraram que extratos de cacau, chá e café inibiram a enzima glicosiltransferase de vários estreptococos orais, sendo que os extratos de cacau e café não perderam essa habilidade mesmo após a retirada do ácido tânico presente em seus extratos (KASHKET *et al*, 1985 A; KASHKET *et al*, 1985 B).

Prabu et al (2006) ao estudar o potencial antiplaca do flavonóide guaijaverin de Psidium guajava destacam que Streptococcus mutans adere à superfície do esmalte do dente por interações de ligações hidrofóbicas. Agentes terapêuticos que ajudam a evitar formação de ligações hidrofóbicas deveriam ajudar a reduzir a incidência de cáries. Adicionalmente, observam que a hidrofobicidade de S.mutans está principalmente associada a proteínas da superfície das células (McBRIDE et al, 1984), sendo possível que os componentes ativos dos extratos desta planta liguem-se às proteínas da superfície das células, diminuindo a hidrofobicidade. A pesquisa de Prabu et al (2006), baseada em hidrofobicidade descreveu em duas linhagens diferentes de S.mutans características suficientes para classificá-las como hidrofóbicas e hidrofílicas, ampliando a gama de alternativas para explicação dos mecanismos de ação dos agentes terapêuticos.

#### 3.4.1 A importância do isolamento das culturas microbiológicas

O meio de cultura é uma mistura de nutrientes necessários ao crescimento microbiano. Basicamente, deve conter a fonte de energia e todos os elementos imprescindíveis à vida das células em isolamento (TRABULSI *et al*, 2002).

Uma população microbiana com crescimento ativo, instalada em um meio nutritivo, constitui uma cultura. Na natureza, os microrganismos raramente estão isolados; geralmente as espécies estão misturadas e se desenvolvem em conjunto, se as condições são favoráveis. A

cultura de uma única espécie é denominada de cultura pura. Todos os trabalhos de laboratórios são baseados na utilização de cultura pura, pois são as únicas que permitem estudos precisos, morfológicos e fisiológicos (LARPENT, 1975).

Todos os micróbios saprófitos ou patogênicos do homem e dos animais necessitam de carbono, oxigênio, hidrogênio, nitrogênio enxofre e fósforo para se multiplicar. Certos microrganismos exigem substâncias especiais descritas na literatura como fatores de crescimento, pois estas são importantes para a reprodução do microrganismo e manutenção de sua vida "in vitro". Logo, o meio de cultura ideal deve fornecer igualmente estes fatores (NEIDHARDT et al, 1990).

O meio de cultura não deve conter nenhuma substância inibidora parcial ou total da multiplicação e viabilidade. Enfim, o meio favorável deve preencher todas as condições para reprodução, as quais variam dependendo da espécie bacteriana. Os fatores fundamentais como pH, isotonicidade e temperatura de incubação, determinam o sucesso da cultura microbiológica (LARPENT, 1975).

#### 3.5 A origem do conhecimento tradicional relacionado à etnobotânica

As sociedades humanas, independentes da região geográfica, raça ou etnia, acumulam ao longo do tempo informações pertinentes ao ambiente, em seu habitat natural, criando um acervo de conhecimento relativo ao mundo vegetal, aos quais estas sociedades estão em contato direto.

O interesse despertado pelo uso e o que outros povos fazem dos elementos do seu ambiente vem desde a antiguidade, buscando geralmente, preencher fins utilitaristas. Os primeiros estudiosos que aportaram no Novo Mundo a partir do século XVII, além de deixarem descrições da flora e da fauna americanas, proporcionaram relatos de sua utilização pelos ameríndios. A primeira história natural brasileira, elaborada por Wilhem Pies e Georg Marcgraf, integrantes da comitiva de Maurício de Nassau, incluía um herbário de plantas medicinais (História *Naturalis Brasiliae apud* MASP, 1994).

O termo etnobotânica foi empregado pela primeira vez em 1895 por Harshberger, o qual, embora não o tenha definido, apontou maneiras pelas quais ele poderia servir à investigação científica (SCHULTES, 1962).

Parafraseando a definição de Posey (1986) a etnobotânica é, "a disciplina que se ocupa do estudo do conhecimento e das conceituações desenvolvidas por qualquer sociedade a respeito do mundo vegetal, esse estudo engloba tanto a maneira como um grupo social classifica as plantas, como os usos que dá a elas". Dessa forma segundo este autor, inúmeras espécies vegetais foram incorporadas à prática da medicina tradicional, única e exclusivamente pelo acaso. A caracterização e o uso empírico de espécies vegetais, seguidos de avaliação dos sinais e sintomas que apareceriam após seu consumo, mesmo que rústica e grosseira. A seleção era feita pela qualidade de respostas, se determinada espécie lhe seria útil ou não. O método usado é o mesmo da tentativa e erro, ainda muito comum e útil em pesquisas de diversas áreas do conhecimento científico, que serve para mostrar a forte ligação entre o conhecimento popular e o científico.

## 3.5.1 As espécies vegetais da Amazônia

## 3.5.1.1 ANDIROBA - Carapa guianensis Aubl.

A Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) da família Meliaceae, é encontrada em toda a América tropical. No Brasil, ocorre em toda a Bacia Amazônica e na costa Atlântica (LORENZI, 1992). Conhecida dos indígenas, dos caboclos e dos madeireiros, pela utilização do bagaço da castanha, quando queimado, a qual solta uma fumaça com poder de repelir mosquitos. O óleo de andiroba extraído das amêndoas (Figura 4) está sendo industrializado na forma de velas, vendidas no mercado como repelente natural, atóxico e inodoro, usado também na manufatura de sabão e sabonetes medicinais. A madeira é de excelente qualidade, comparável ao mogno, de cor avermelhada; tem sabor amargo e é oleaginosa, sendo praticamente inatacável por cupins e fungos. Os nomes populares mais freqüentes são: andiroba, carapa, andirova, caoba, cedromacho, fiqueroa, tangaré, andiroba-branca, andiroba do igapó, andiroba vermelha, angirova, comaçari, mandiroba, yandiroba, carapá, carapinha, gendiroba, jandiroba, penaiba, purga de Santo Inácio, abomidan, caraba (CORRÊA, 1926).

A semente seca de andiroba pesa em média 20 a 30 gramas e sua umidade é de 45%. A semente inteira contém, em média, 43% de óleo e na massa sem casca 56% (PESCE, 1934). O óleo extraído das sementes é utilizado popularmente no tratamento de inflamações da garganta e também empregado no tratamento de cortes ou feridas e picadas de insetos (VASQUEZ, 1990). É descrita como antidiarréica, vermífuga, tônica e febrífuga (SCHULTES e RAFFAYF, 1990), útil externamente para impigens, exantemas e outras doenças de pele (CORRÊA, 1926).



Figura 4. Árvore e amêndoas de andiroba. FONTE: Estação experimental de hortaliças do INPA

#### Descrição Botânica

Esta planta é uma árvore grande, de até 30m de altura, de copa globosa densa e com tronco de 50-120 cm de diâmetro. Folhas verde-escuras, compostas pinadas e alternas. Apresenta inflorescência em panículas axilares, com flores glabras, discretas, pequenas, perfumadas e de cor creme. Os frutos são cápsulas lenhosas, globosos angulados, deiscentes, contendo de 5 a 10 sementes com casca coriácea, polpa branca, tenra, amarga e com 70% de um óleo espesso, de cor amarelo-escuro. A reprodução desta planta é por sementes, de fácil propagação e de crescimento rápido. Ela floresce de setembro a dezembro e frutifica de fevereiro a julho (LORENZI & MATOS, 2002; LOUREIRO & SILVA, 1968).

#### Componentes Químicos

Os componentes do óleo das sementes da andiroba são representados em maior quantidade por estearinas, ácidos graxos oléico e mirístico, e em menor quantidade por outros ácidos (LORENZI & MATOS, 2002).

No extrato hexânico do óleo das sementes de andiroba foi verificada a presença de taninos (apresentam atividade antifúngica e antibacteriana), carboidratos, alcalóides e glicosídeos (MATTHIAS & JOHNS, 1993).

No extrato metanólico extraído das sementes de andiroba e submetido à cromatografía gasosa foi descrita a presença de limonóides, também conhecidas como meliacinas ou tetranortriterpenóides, que apresentam atividades fago inibitórias e propriedades inseticidas (CONNOLLY *et al*, 1966; OLLIS *et al*, 1970; LUCAS, 1993).

Óleos essenciais obtidos por hidrodestilação das flores de *Carapa guianensis* Aubl. revelaram a presença de sesquiterpenos, biciclogermacreno e germacreno B (ANDRADE *et al*, 2001).

Estudos realizados mostram que nas folhas da *Carapa guianensis* Aubl. estão presentes os ésteres graxos saturados (ésteres de ácidos e álcoois de cadeias longas) que formam uma das principais classes na composição das ceras epicuticulares, a qual é composta principalmente por derivados de ácido palmítico e os terpenóides que constituem uma das mais diversificadas classes de compostos químicos caracterizadas em extratos vegetais (SIQUEIRA *et al*, 2003).

A casca da semente é adstringente e encerra o limonóide carapina (andirobina), derivado do ácido palmítico (CORRÊA, 1984; SIQUEIRA *et al*, 2003), bem como os taninos descritos como inibidores de enzimas como as glicosiltransferases de *Streptococcus mutans* descrito por Hattori *et al* (1990) e Ooshima *et al* (1993) (Figura 5).

Na literatura, existem alguns componentes ativos encontrados no óleo vegetal de andiroba como, carapinas e epoxiazadiradionas (ALBUQUERQUE, 1989).

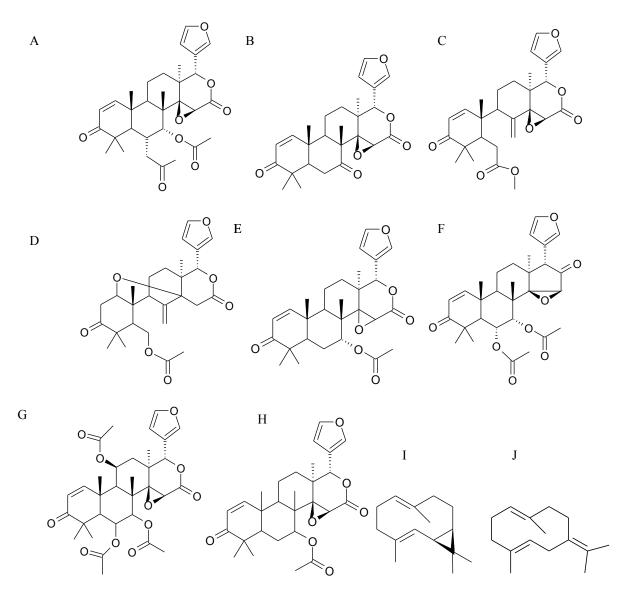


Figura 5. Estruturas dos limonóides e sesquiterpenos de *Carapa guianensis* Aubl:  $A = 6\alpha$ -acetoxigedunina, B = 7-desacetoxi-7-oxo-gedunina, C = andirobina, D = angolensato de metila, E = gedunina,  $E = 6\alpha$ -acetoxi-epoxiazadiradiona, E = angolensato de metila, E =

#### Propriedades Terapêuticas

Os constituintes e as propriedades da *Carapa guianensis* Aubl. foram relatados por vários autores (Tabela 2). É empregada como anti-séptico, antiinflamatório, emoliente, purgativo, antireumático, cicatrizante, em fricções nas distensões musculares e moléstias da pele, para picadas de insetos, "repelente de insetos", sendo muito usada na medicina veterinária (CORRÊA, 1984).

Estudos mostraram que o tratamento oral com óleo de andiroba produziu efeito analgésico e inibiu a resposta inflamatória em camundongos e o extrato aquoso da casca de andiroba reduziu o número de contorções abdominais induzidas com ácido (MITSUGUI *et al*, 2002).

Uma variedade de limonóides apresentou uma atividade citotóxica em culturas "*in vitro*" de neuroblastoma (rato) e osteosarcoma humano (COHEN *et al*, 1996).

Tabela 2. Descrição dos constituintes e propriedades relatadas de Carapa guianensis Aubl.

		_	1 0
Constituintes químicos	Parte da planta	Propriedade farmacológica	Referência
Ácidos capróico, mirístico, palmítico, palmítico, palmitoléico, margárico, esteárico, oléico, araquídico, behênico, tricosanóico, lignocérico, pentacosanóico, cerótico, 10-undecenóico, heneicosanóico.	Sementes	Não citado	LAGO, 1980; PEREIRA <i>et al</i> , 1998, CARVALHO, 2004.
Escopoletina	Caule	Não citado	QI et al, 2004
Cleomiscosina B	Caule	Não citado	QI et al, 2003
β-sitosterol	Sementes	Não citado	BANERJI e NIGAM, 1984; LAGO, 1980
Campesterol, estigmasterol	Sementes	Não citado	LAGO, 1980
Naringenina, 1-galato de (-) epicatequina-3-O-(3", 5"-di-O-metila), catequina, sciadopitisina	Caules	Não citado	QI et al, 2004; QI et al, 2003
Estearinas	Semente	Não citado	LORENZI & MATOS, 2002
17-β-hidroxiazadiradiona, gedunina, 6-α-cetoxigedunina, 7 deacetoxi-7-oxogedunina, 1, 2 dihidro-3β-hidroxi-7-deacetoxi-7-oxogedunina, angolensata metil e xilocensina k	Sementes (extrato metanólico) e caule	Inseticida, atividade fagoinibitórias, citotóxica em culturas "in vitro" de neuroblastoma (rato) e osteosarcoma humano. Atividade contra alguns tipos de câncer, efeito diurético, diminuição da força da contração cardíaca, proteção contra lesões gástricas, antifúngicos, bactericidas e antivirais	CONNOLLY et al, 1966; OLLIS et al, 1970; CHAMPAGNE apud ARNASON, 1989, p. 95-109; CHAMPAGNE et al, 1992; COHEN et al, 1996; JOLAD, et al, 1977; PETIT et al, 1983, CHAMPAGNE et al, 1992
Carapina	Semente	Adstringente	CORRÊA,1984 SIQUEIRA <i>et al</i> , 2003
Biciclogermacreno e germacreno B	Flores	Não citado	ANDRADE et al, 2001
Germacreno D, α-humuleno	Folhas	Não citado	ANDRADE et al, 2001

#### Continuação da Tabela 2.

Constituintes químicos	Parte da planta	Propriedade farmacológica	Referência
6α-hidroxigedunina, epoxiazadiradiona, angolensato de metila, 6α-acetoxi-epoxiazadiradiona, 7-desacetoxi-7-oxogedunina, andirobina, gedunina, 6α-acetoxigedunina	Sementes	Não citado	LAVIE et al, 1972 CONNOLLY et al, 1967, PEREIRA 1998, OLLIS et al, 1970, OLLIS et al, 1964
11β-acetoxigedunina, 6α, 11β-diacetoxigedunina, 6α-acetoxi-epoxiazadiradiona, 7-desacetoxi-7-oxogedunina, andirobina, 6α, 7α-diidroxigedunina, 6α, 7α, 11β-triidroxigedunina, 6α, 11β-diacetoxi-7α-hidroxigedunina.	Caule	Não citado	CONNOLLY <i>et al</i> , 1966, MARCELLE e MOOTOO, 1979, BANERJI e NIGAM, 1984
Taninos	Sementes (extrato hexânico)	Inibidores de enzimas como glicosiltransferases, antifúngico e bactericida	HATTORI <i>et al</i> , 1990 e OOSHIMA <i>et al</i> , 1993; MATHIAS & JOHNS, 1993
Carboidratos, alcalóides e glicosídeos	Sementes (extrato hexânico)	Antifúngica e antibacteriana	MATTHIAS & JOHNS, 1993
Carapinas e epoxiazadiradionas	Sementes	Não citado	ALBUQUERQUE, 1989

#### 3.5.1.2 BREU-BRANCO – Protium heptaphyllum March.

O gênero *Protium* é amplamente difundido nas regiões tropicais, compreendendo cerca de 146 espécies, das quais, provavelmente, mais de 70% ocorrem na Amazônia legal (KHALID, 1983).

A espécie *Protium heptaphyllum* March pertence à família Burseraceae, sendo conhecida como breu-branco, habita as matas de terra firme, em solo argiloso da região Amazônica, Bahia, Minas Gerais e Goiás. Encontrada também no Suriname, Colômbia, Venezuela e Paraguai. O gênero *Protium* é representado em todas as matas do país, desde o norte até o extremo sul, reunindo desde espécies arbustivas, pouco expressivas como produtoras de madeira, até as arbóreas, com algumas espécies produtoras de madeiras com expressão comercial internacional,

como as de *P. decandrum* March. e *P. sagotianum* March, comuns nas Guianas e no Brasil (LORENZI, 1992).

As árvores e arbustos possuem na casca, proeminentes dutos-resinas verticais esquizógenos que produzem óleo essencial e óleo resina. Estas substâncias as responsáveis por muitas das propriedades utilizadas na medicina popular e indicadas na literatura para essas plantas (COSTA, 1975).

Principais usos: acabamentos internos, móveis populares, marcenaria, construção em geral, carpintaria, caixotaria, carvão, entalhes, esquadrias, lambris, cabos de vassoura. Em algumas espécies o óleo resina pode ser utilizado como combustível. Nomes vulgares: breu, breuzinho, breu branco verdadeiro, cicantaá-inua, almecegueira, breu branco do campo, pau de mosquito e breu preto (LORENZI, 1992) (Figura 6).

#### Descrição Botânica

As características gerais dessa planta compreendem: árvore pequena, com aproximadamente 10 m de altura e tronco espesso com 50-60 cm de diâmetro na base e casca vermelho-escura. A casca, da maioria das espécies, é rica em resina aromática geralmente utilizada para fins medicinais, como incenso de igreja ou ainda como material para calafetar barcos. A espécie *P. heptaphyllum* (breu - branco) produz a resina conhecida no comércio como: resina de almécega, "aimam" ou "almíscar" (LORENZI, 1992).





Figura 6. Árvore e caule com resina de breu branco.

FONTE: Reserva Ducke - INPA.

#### Componentes químicos

A hidrodestilação de 50 gramas de resina forneceu 11 % de óleo essencial. Os constituintes majoritários identificados foram:  $\alpha$ -terpinoleno (28,50%) (Figura 7D), limoneno (16,90%) (Figura 7A),  $\alpha$ -felandreno (16,70%) (Figura 7C) e  $\alpha$ -pineno (10,50%) (Figura 7B) (LORENZI, 1992). Da resina, além do óleo essencial, cujo teor é de 11%, foram isolados o monoterpeno triidroxilado, os triterpenos  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e breina (Figura 7E) (LORENZI, 1992), posteriormente Silva (1995) isolou da resina  $\alpha$ -amirenona,  $\alpha$ -cimeno,  $\alpha$ -terpinoleno, apiol, limoneno,  $\alpha$ -pineno e  $\alpha$ -cubeleno.

Lorenzi (1992) descreveu dos frutos verdes, (-) catequina (Figura 7G); dos frutos maduros e folhas, os flavonóides quercetina e quercetina-3-O-ramnosil (Figura 7F), respectivamente. As substâncias isoladas da folha por Zoghbi (1995) foram limoneno,  $\alpha$ -copaeno, cariofileno, humuleno,  $\gamma$ -elemento e  $\delta$ -cadineno. A análise por CG/EM do óleo essencial obtido das folhas permitiu a identificação dos seguintes constituintes: mirceno,  $\gamma$ -terpineno, limoneno, estragol,  $\tau$ -anetol,  $\delta$ -elemento,  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -copaeno, cariofileno, humuleno,  $\gamma$ -elemento e  $\delta$ -cadineno (CRAVEIRO *et al*, 1981). Do caule foi identificado escopoletina (LORENZI, 1992).

## Propriedades Terapêuticas

Os constituintes e as propriedades do *Protium heptaphyllum* March. foram relatados por vários autores (Tabela 3). As cascas e as folhas de *P. heptaphyllum* são indicadas contra úlceras gangrenosas em geral, sonífera, anti-diarréico, contra úlcera gangrenosa, inflamações em geral, interagia, afecção dos olhos, antimicrobiana, hérnia (CORRÊA, 1934; COSTA, 1996). O óleo essencial dos galhos e a resina da espécie apresentou atividade anti-inflamatória descrita por Siani *et al*, (1999).

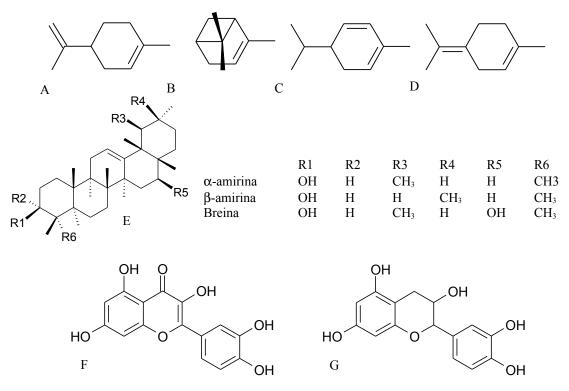


Figura 7. Componentes majoritários do *P. heptaphyllum* March., Monoterpenos: A = limoneno; B =  $\alpha$ -pineno; C =  $\alpha$ -felandreno; D =  $\alpha$ -terpinoleno, Triterpenos: E =  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, breina; F = quercetina, G = catequina

Tabela 3. Descrição dos constituintes e propriedades relatadas de *Protium heptaphyllum*.

Composto	Parte da planta	Propriedade farmacológica	Referência
$\alpha$ -terpinoleno, limoneno, $\alpha$ -felandreno e $\alpha$ -pineno	Caule	Não citado	LORENZI, 1992
(-) catequina	Frutos verdes	Antioxidante	LORENZI, 1992; FRANKEL <i>et al</i> , 1995
Quercetina	Frutos maduros	Antioxidante	LORENZI, 1992; MILLER, 1995
Quercetina-3-O-ramnosil	Folhas	Não citado	LORENZI, 1992
Escopoletina	Caule	Não citado	LORENZI, 1992
Mirceno, $\gamma$ -terpineno, limoneno, estragol, $\tau$ -anetol, $\delta$ -elemento, $\alpha$ -cubebeno, $\alpha$ -copaeno, cariofileno, humuleno, $\gamma$ -elemento e $\delta$ -cadineno.	Folhas	Não citado	CRAVEIRO <i>et al</i> , 1981 ZOGHBI, 1995
$\alpha$ -amirenona (óleo resina); p-cimeno; $\alpha$ -terpinoleno; apiol; limoneno; $\alpha$ -pineno e $\alpha$ -cubeleno e breina (óleo essencial).	Caule	Não citado	SILVA, 1995 LORENZI, 1992
α-amirina	Caule	Hepatoprotetor, antinoceptivo, antiinflamatório	SILVA, 1995 LORENZI, 1992; OTUKI <i>et al</i> , 2005; OLIVEIRA <i>et al</i> , 2005
β-amirina	Caule	Hepatoprotetor, antinoceptivo	SILVA, 1995; OTUKI <i>et al</i> , 2005; OLIVEIRA <i>et al</i> , 2005

#### Continuação da Tabela 3.

	Composto	Parte da	Propriedade	Referência
		planta	farmacológica	
Miristicina		Caule	Inseticida e sinérgico	SILVA, 1995
			sintético	
Apiol		Caule	Inseticida e sinérgico	SILVA, 1995
			sintético	

### 3.5.1.3 CASTANHA DO BRASIL - Bertholletia excelsa Humb. & Bonpl.

A *Bertholletia excelsa* H. B., denominada castanha-do-pará é tipicamente nativa da região amazônica e popularmente constitui uma fonte econômica devido ao valor alimentício de suas sementes (BALBACH, 1987; PRANCE & MORI, 1975). Pertence à família Lecythidaceae, é constituída por 24 gêneros e 450 espécies, cujos representantes são árvores e arbustos tipicamente tropicais (HEUGNAUER, 1996; CRONQUIST, 1981). Planta característica da mata de terra firme, não inundável (PRANCE & MORI, 1975), vulgarmente conhecida como castanha-do-pará ou castanha-do-brasil, é encontrada em muitos estados do Brasil, Peru, Colômbia, Venezuela e Equador. Evidências recentes mostraram que as árvores podem atingir mais de mil anos de idade (CAMPOS, 2000; RIBEIRO *et al*, 1999).

#### Descrição Botânica

É uma árvore de grande porte de 30-50 m excepcionalmente 60 m, com tronco retilíneo de 100-180 cm de diâmetro. Folhas simples glabras, de 25-35 cm de comprimento (LORENZI, 1992). Os frutos, ou ouriços, são de paredes espessas e coloração castanha, são globosos e achatados, com 10 a 15 cm de diâmetro, pesam cerca de 900 g, mas podem atingir dois quilogramas. Seus frutos amadurecem no período de dezembro a março. Cada fruto contém de 8 a 24 sementes envoltas em tegumento duro, lenhoso, rugoso, com arestas bem dispostas pronunciadas e dispostas, geralmente, em três séries superpostas. Tem casca escura e marcada por fendas longitudinais e flores vistosas e amarelas. Floresce durante os meses de novembro a fevereiro (COMPTON'S, 1997). Sua madeira é moderadamente pesada (densidade 0,75 g/cm³),

macia ao corte, superfície sem brilho e lisa ao tato, de boa resistência ao ataque de microrganismos xilófagos (LORENZI, 1992) (Figura 8).



Figura 8. Sementes e árvore da castanheira do Brasil.

Fonte: Retirado do Minicampus da Universidade Federal do Amazonas e disponível em <a href="http://www.clubedasemente.org.br/castanha.html">http://www.clubedasemente.org.br/castanha.html</a>>.\_Acesso em: 20 de fevereiro de 2005

#### Componentes Químicos

Os trabalhos relacionados com estudos químicos de espécies da família Lecythidaceae conduziram à identificação de triterpenos pentacíclicos, saponinas, derivados fenólicos e alcalóides do tipo indolo [2,1-b] quinazolínicos (CARVALHO *et al*, 1998).

Souza (1963) cita como resultado das primeiras análises químicas realizadas na amêndoa da castanheira, a presença de alto teor de gordura (óleo), proteína e baixa taxa de carboidratos. As pesquisas realizadas na Universidade de Zurick demonstraram que as sementes são ricas em vitaminas A e B, em conseqüência de sua reserva de calorias. Verificou-se a presença de ácidos graxos insaturados que têm grande participação em vários processos fisiológicos e bioquímicos de formação de tecido epitelial (TESKE & TRENTINI, 1995).

O estudo fitoquímico de *Bertholletia excelsa* conduziu a identificação de metabólitos secundários de classe dos triterpenos, esteróides, além de compostos fenólicos. Foram identificados os triterpenos: ácido betulínico, betulinato de metila, ácido siaresinólico, α-amirina e β-amirina; os esteróides: β-sitosterol, estigmasterol; α-tocoferol (vitamina E); os ésteres de ácidos graxos: ácido palmítico e ácido octadecadienóico; os fenólicos: ácido gálico e 3α-*O*-raminosil-metóxi-5-hidroxibenzóico (CAMPOS, 2000).

Campos *et al* (1999) relatam no estudo químico dos extratos em hexano (EH) e acetato de etila (AE) das cascas de *B. excelsa* Humb. & Bonpl, que no extrato (EH), foi isolado o ácido betulínico e foram identificadas por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrofotômetro de Massa (CG/EM) as substâncias: α,β amirina, β-sitosterol (Figura 9A), estigmasterol (Figura 9B), α-tocoferol (Figura 9D) em adição ao ácido palmítico e 9,12 - octadecadienóico na forma de ésteres. No extrato AE, foram isolados os ácidos siaresinólico e betulínico (Figura 9E), além dos esteróides.

Segundo a literatura o ácido gálico (Figura 9C), obtido das sementes de *B. excelsa* Humb. & Bonpl, apresenta atividades antibacteriana, antiviral e antifúngica, além de mostrar ação antiinflamatória e antitumoral (HARBORNE & BAXTER, 1993).

Figura 9. Componentes majoritários de *B. excelsa* Humb. & Bonpl.,  $A = \beta$ -sisterol, B = estigmasterol, C = Acido gálico,  $D = \alpha$ -tocoferol, E = Acido betulínico.

É relatado também que polifenóis ligam-se através de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas com colágeno formando uma película que protege a pele reduzindo a perda de água e proteína, propiciando menor formação de fibrose resultando ainda uma ação antiinflamatória.

Este fato sugere que o ácido gálico e seus derivados descritos, podem estar associados à preservação do colágeno (HASLAM, 1996).

## Propriedades Terapêuticas

Os constituintes e as propriedades de *Bertholettia excelsa* foram relatados por vários autores (Tabela 4). Na região Norte, o chá ou sumo da casca são usados na medicina popular contra as moléstias crônicas do figado, malária, como abortivo e a água do ouriço para curar hepatite (PRANCE & MORI, 1975; BALBACH, 1987). Existem ocorrências de remédios indígenas usando raízes, casca, folhas, frutos e sementes (RIBEIRO *et al*, 1999).

Tabela 4. Descrição dos constituintes e propriedades relatadas de *Bertholettia excelsa*.

Composto	Parte da planta	Propriedade farmacológica	Referência
Ácido betulínico	Casca (extratos hexânico e acetato de etila)	Contra células de melanoma e mecanismo de ação contra a replicação de HIV	CAMPOS et al, 1999; PISHA et al, 1995; EVERS et al, 1996; SOLER et al, 1996
Betulinato de metila, Acidos siaresinólico,palmítico, octadecadienóico,3-α-O-raminosilmetoxi-5-hidroxibenzóico	Casca (acetato de etila)	Não citado	CAMPOS, 2000
α-amirina, β-amirina, β-sitosterol, estigmasterol, α-tocoferol	Casca (hexânico)	Não citado	CAMPOS, 2000
Ácido gálico	Sementes	Antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiinflamatória e antitumoral	HARBORNE & BAXTER, 1993

# 3.5.1.4 CIPÓ CRAVO - Tynanthus elegans Miers

O Cipó Cravo (*Tynanthus elegans* Miers) pertence à família Bignoniaceae, é uma videira que cresce até 80 m no comprimento, nativa da Amazônia e de outras partes da América do Sul tropical (Figura 10). Os nomes populares mais freqüentes são: huasca de clavo, videira do cravoda-índia, cravo-da-índia branco, clavohuasca, cravo do cipó e trindade do cipó (WOODRUFF, 1995).





Figura 10. Folhas (A) e caules de cipó cravo (B).

FONTE: Disponível em: < http://www.rain-tree.com/plants.htm >. Acesso em: 15 de março de 2005

#### Descrição Botânica

É uma trepadeira de folhas curto-pecioladas e 3-folioladas; folíolos lanceolados, acuminados, tomentosos, discolores na parte inferior; flores de coloração brancas ou amarelo-pálido, pequenas, dispostas em panículas; o fruto é uma cápsula amarelo-ferrugínea, com comprimento de até 20 mm (CORRÊA, 1984).

### Componentes Químicos

Segundo Woodruff (1995) foram encontrados alcalóides, eugenol, taninos, tinantina e ácido tânico (Figura 11) em folhas e no caule.

#### Propriedades Terapêuticas

Os constituintes e as propriedades de *Tynanthus elegans* foram relatados por Woodruff (1995), a qual possui aroma forte e semelhante ao do cravo; a casca da raiz é estimulante e afrodisíaca; é usada como analgésico, anti-reumática, digestivo e fortificante (Tabela 5).

Figura 11. A= Eugenol, B= Ácido tânico.

Tabela 5. Descrição dos constituintes e propriedades relatadas de *Tynanthus elegans*.

Composto	Parte da planta	Propriedade farmacológica	Referência
Eugenol	Folha e caule	Não citado	Woodruff, 1995
Tinantina	Folha e caule	Não citado	Woodruff, 1995
Acido tânico	Folha e caule	Não citado	Woodruff, 1995

## 3.5.1.5 COPAÍBA - Copaifera multijuga Hayne

A Copaíba é encontrada principalmente no sul da floresta tropical, particularmente no Brasil. Existem vários tipos de *Copaífera* e entre elas predomina na região Amazônica, a *Copaífera multijuga* Hayne, da família Leguminosae (divisão Caesalpiniacea). Essa árvore fornece madeira de cerne vermelho-escuro, tecido compacto e poros pouco visíveis. É extraído de dentro do tronco da árvore, com o auxílio de um instrumento chamado "trado" que perfura o tronco. Após o processo de retirada do óleo, fecha-se o orifício usando um pedaço de madeira, permitindo que ela continue produzindo esse importante óleo resina. Apresenta os seguintes nomes populares: copaíba, copaúva, jatobá mirim, cupaúba, cupiuba, óleo branco, pau de óleo e palo de bálsamo (CORRÊA, 1984).

Nos estudos realizados com *C. multijuga*, com retiradas periódicas de óleo de copaíba, foram obtidas maiores quantidades de óleo na estação chuvosa, em árvores localizadas em terreno argiloso (ALENCAR, 1982).

Concentrados de sesquiterpenos de copaíba podem chegar a custar até 600 vezes mais que o óleo "in natura". No entanto, a extração de óleo-resina de copaíba possui algumas características originárias de seu manejo, que definem as possibilidades de suas aplicações industriais, estabelecendo um padrão de qualidade para o mercado. Uma delas refere-se a mistura de óleos de espécies e locais diferentes, o que dificulta o seu emprego na indústria farmacêutica, uma vez que a composição química, coloração e viscosidade do óleo-resina de copaíba variam entre espécies e regiões (BARRETO JR. et al, 2005).

#### Descrição Botânica

A espécie de *Copaifera multijuga* Hayne é uma árvore emergente com folhas pinatifidas compostas de folíolos elépticos com 6 a 10 jugos, alternos, oblongo-lanceolados, acuminados, coriáceos, densamente reticulado-nervados, glabros e com pontuações visíveis a transparência. Possui um tronco circular, sapopemas pequenas. Ritidoma marrom avermelhado com estrias verticais, reticulares e a sua casca possui coloração avermelhada. As flores são sésseis, de cálice vermelho-ferrrugíneo e glabro exteriormente e denso-branco-piloso interiormente. O fruto é em forma de vagem de cor vermelho, monosperma, quase orbicular, apiculada, com 3 cm de tamanho. A face é abaxial com pêlos na veia central. A semente é ovóide ou quase globulosa, com arilo amarelo-alaranjado. Fornece madeira muito aromática, de coloração branca acinzentada com ondeados castanhos, mole, e do seu âmago extrai-se abundante óleo de copaíba bastante fluido e claro, o qual é aproveitado na iluminação doméstica pelos seringueiros sertanejos (Figura 12) (CORRÊA, 1984; RIBEIRO, 1999).

As árvores grandes têm crescimento lento e podem alcançar altura de 25 a 40 metros e viver até 400 anos. A floração ocorre entre outubro e julho e sua frutificação nos meses entre junho e outubro (SILVA, 1977).



Figura 12. Árvore de copaíba (A) e Extração racional do óleo de copaíba (B). FONTE: Disponível em: <www.clubedasemente.org.br/copaiba.html>Acesso em: 20 de fevereiro de 2005

## Componentes Químicos

A designação correta para o óleo de copaíba é de óleo-resina, visto que se trata de um exsudato constituído de ácidos resinosos e compostos voláteis (VEIGA JR. & PINTO, 2002). O óleo-resina de copaíba é constituído de misturas de sesquiterpenos e diterpenos. Os sequisterpenos são responsáveis pelo aroma e também pela atividade antiinflamatória do óleo-resina (BARRETO JR. *et al*, 2005), fato este que tem despertado o interesse das indústrias de cosmética e farmacêutica.

A composição química dos óleos de copaíba encontra-se definida em vários trabalhos, onde foram utilizadas técnicas mais antigas, bem como metodologias modernas de isolamento e de identificação, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (BRAGA, 1995) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com colunas cromatográficas de fase estacionária quiral (ciclodextrina permetilada) (TAKEOKA *et al*, 1990).

O óleo resina de *C. multijuga* Hayne, é constituído por uma mistura de óleo essencial composto de sesquiterpenos como: α-copaeno (Figura 13 D), trans-β-cariofileno, trans-α-bergamoteno (Figura 13 H), δ-carineno, β-cariofileno óxido (Figura 13 G), e ácidos diterpênicos como o copálico (Figura 13 B) e o 3-acetoxicopálico (VEIGA JR *et al*, 1995; CASCON & GILBERT, 2000).

O óleo obtido da espécie em estudo, mostrou variação na composição de óleos coletados de uma mesma árvore, em períodos diversos do ano (verão-inverno). As substâncias detectadas foram basicamente as mesmas, mas suas concentrações variaram (VEIGA JR, 1997).

Estudos de atividade antiinflamatória foram realizados e evidenciaram modificações nos perfis das atividades dos óleos. Essas variações podem dificultar a generalização da dosagem de uso dos fitoterápicos formulados à base de óleos de copaíba, poucos constituintes ativos foram identificados e testados isoladamente, como o β-bisabolol (Figura 13A) com propriedade antiinflamatória (SHIMIZU *et al*, 1990) e o β-cariofileno (Figura 13 C) com atividade bactericida (KANG *et al*, 1992), antitumoral (ZHENG *et al*, 1992) e também antiinflamatória (SHIMIZU *et al*, 1990).

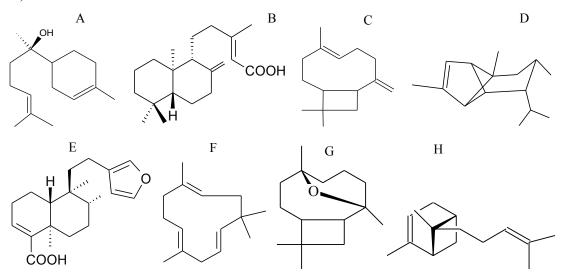


Figura 13. Componentes majoritários de *C. multijuga* Hayne. A =  $\beta$ -bisabolol, B = ácido copálico, C =  $\beta$ -cariofileno, D =  $\alpha$ -copaeno, E = ácido hardwíckico, F =  $\alpha$ -humuleno, G = óxido de cariofileno, H =  $\alpha$ -bergamoteno

#### Propriedades Terapêuticas

Os constituintes e as propriedades da *Copaifera multijuga* Hayne foram relatados por vários autores (Tabela 6). As utilizações da medicina popular para o óleo resina de copaíba são muitas e indicam uma grande variedade de propriedades farmacológicas.

Os índios o utilizavam principalmente como cicatrizante e no umbigo de recém-nascidos para evitar o mal-dos-sete-dias e os guerreiros quando voltavam das lutas passavam no corpo o

óleo e deitavam sobre esteiras suspensas e aquecidas para cura de enfermidades (SALVADOR, 1975).

O óleo-resina de copaíba é empregado como: cicatrizante de feridas e úlceras, antiinflamatório, antitetânico, catarros vesical e pulmonar, cistites crônicas, úlceras de estômago, disenteria, bronquites rebeldes e quaisquer dermatoses. É muito utilizado como anti-séptico das vias urinaria e também puro ou associado com outros princípios ativos na formulação de cosméticos como cremes, loções, óleos, sabonetes, desodorantes e espuma de banho. O óleo essencial obtido do bálsamo da Copaíba é um excelente fixador de perfume (CORRÊA, 1984).

O óleo resina é utilizado puro ou associado com outros princípios ativos na formulação de cosméticos como cremes, loções, óleos, sabonetes, desodorantes e espuma de banho (DEUSSEN, 1939).

Tabela 6. Descrição dos constituintes e propriedades relatadas de *Copaifera multijuga* Hayne.

Composto	Parte da planta	Propriedade farmacológica	Referência
β-bisabolol	Caule	Anti-inflamatório e analgésico	ZEKOVIC <i>et al</i> , 1994; SHIMIZU <i>et al</i> , 1990
β-cariofileno	Caule	Bactericida, antitumoral anti- inflamatório	KANG <i>et al</i> , 1992; ZHENG <i>et al</i> , 1992; SHIMIZU <i>et al</i> , 1990
β-cariofileno, $α$ -humuleno e $α$ - copaeno e $α$ -multigenol	Caule	Não citado	MAIA et al, 2000; DELLE MONACHE et al, 1971
α-copaeno, Trans-α-cariofileno, carineno, óxido de cariofileno, β-bisabolol, β-cariofileno, ácidos copálico e 3-acetoxicopálico (óleo essencial)	Caule	Não citado	VEIGA JR <i>et al</i> , 1995; CASCON & GILBERT, 2000
N-metil-trans-4-hidroxi-L prolina	Folhas	Não citado	LANGENHEIN et al, 1987
α-cubebeno, α-copaeno, cipereno, β-copaeno, cariofileno, β-humuleno, muuroleno, β-selineno, δ-cadineno e γ-cadineno	Folhas	Não citado	LANGENHEIM e NASCIMENTO, 1986
Ácidos hardwíckiico	Caule	Antimicrobiana	DELLE MONACHE <i>et al</i> , 1969; McCHESNEY <i>et al</i> , 1991
7-hidroxi- hardwickiico	Caule	Não citado	DELLE MONACHE <i>et al</i> , 1969

Dentre as propriedades medicinais do óleo-resina de copaíba as mais estudadas são a antiinflamatória e a antitumoral (MACIEL *et al*, 2002; VEIGA JR. & PINTO, 2002). Além do uso medicinal, outras aplicações do óleo-resina são descritos na literatura como fixadores de perfumes, fabricação de xampus, sabonetes, tintas e vernizes (FERREIRA & BRAZ, 2001; VEIGA JR. & PINTO, 2002).

Uma das áreas em que se vem pesquisando intensamente a utilização do óleo de copaíba atualmente é a odontológica (PINHEIRO, 1993; BOMBONATTI *et al*, 1996; COSTA *et al*, 1996).

Bandeira *et al*, 1999 A e B, realizou estudos aplicados a odontologia utilizando o óleo essencial separado do óleo resina de *Copaifera multijuga* Hayne, associado ao hidróxido de cálcio como veículo. Foi analisada a compatibilidade, as atividades bactericida e bacteriostática, em molares de ratos. As duas frações obtiveram resultados satisfatórios de biocompatibilidade, a mistura de hidróxido de cálcio com o óleo essencial de *Copaifera multijuga* Hayne, demonstrou um melhor desempenho histopatológico, em relação ao hidróxido de cálcio misturado ao óleo resina de copaíba, bem como quando comparado ao polietilenoglicol como controle, utilizado tradicionalmente.

Os estudos da propriedade antibacteriana mostraram atividades bactericida e bacteriostática dos óleos de *Copaifera multijuga* Hayne, frente à *Streptococcus mutans*, sendo que, o óleo essencial apresentou melhor ação bactericida que bacteriostática e o óleo resina apresentou apenas atividade bacteriostática (BANDEIRA *et al*, 1999 C).

#### 3.5.1.6 JACA - Artocarpus integrifolia L.f

A espécie *Artocarpus integrifolia* L.f pertence à família Moraceae, trata-se de uma árvore conhecida como jaqueira, originária na Índia e de outros países da Ásia, foi aclimatada no Brasil, onde medra em abundância. O seu fruto é de grande utilidade na alimentação e suas sementes são muito apreciadas; essas são grossas, numerosas e feculentas, podendo ser consumidas ao natural ou no preparo de doces, compotas ou geléias (Figura 14). Essas, quando assadas ou cozidas, substituem as castanhas e é utilizada na fabricação de farinha para purês e bolos. É cultivado em

pomares domésticos de todo o país. Os nomes mais populares são: jaca da Bahia, jaqueira, jacquier, jackfruit ou jaca fruit (inglês) (BALBACH, 1985).





Figura 14. Fruto da jaqueira, árvore e galhos - Minicampus da Universidade Federal do Amazonas.

FONTE: Retirado de Minicampus da Universidade Federal do Amazonas e disponível em <a href="https://www.plantamed.com.br">www.plantamed.com.br</a> Acesso em: 20 de fevereiro de 2005

#### Descrição Botânica

É uma árvore de porte ereto, atinge 20 a 25 m de altura, tronco com diâmetro acima de 1 m, tem copa densa e irregular com folhas verde-escuras coriáceas e brilhantes. As flores, sem pétalas, agrupam-se em inflorescências masculinas e femininas localizadas no tronco e ramos mais grossos. O fruto composto é formado pela reunião de frutos simples, soldados em torno de um eixo central; é um sincarpo, com formações globosas, ovais ou alongadas, com comprimento em torno de 70 cm e peso de até 40 Kg. Quando maduro, a sua casca tem cor amarelo-acastanhada com aroma peculiar e forte. As sementes numerosas, até 500 unidades por fruto, são envolvidas individualmente por uma polpa (bago) amarela, visguenta, aromática, sabor doce, de consistência mole à dura (BALBACH, 1985).

## Componentes Químicos

Constituintes químicos: carboidratos, fibras, vitaminas do complexo B e lectinas. A composição da polpa do fruto, por 100 gramas, consiste em 84% de água, 18,9 g de carboidratos, 1,9 g de proteína, 0,1 g de gordura, 1,1 g de fibra, 20 mg de cálcio, 30 mg de fósforo, 0,5 mg de

ferro, 540 U.I. de Vitamina A, 30 U.I. de tiamina; As sementes contêm 6,6% de proteínas e 25,8% de carboidratos (BALBACH, 1985).

## Propriedades Terapêuticas

Os constituintes e as propriedades da *Artocarpus integrifolia* L.f. foram relatados por vários autores (Tabela 7). É empregada como antiasmática, antidiarréica, antitussígena, cicatrizante, diurética. No dicionário de Botânica Brasileira, o autor Almeida Pinto (1985), diz que a jaca encerra uma excelente propriedade de combater a tosse de qualquer natureza (*apud* BALBACH, 1985).

O Doutor Eduardo de Magalhães, no seu interessante tratado de higiene alimentar afirma que "se não fosse nossa proverbial indiferença ou desleixo a jaca teria freqüente emprego em xarope, tomado simplesmente às colheres, ou como adoçante das porções expectorantes. Afirmase que os caroços combatem os embaraços dos intestinos. As raízes possuem propriedades antiasmáticas, a casca das raízes tem aplicação contra diarréia" (MAGALHÃES, 1984 *apud* BALBACH, 1985).

Tabela 7. Descrição dos constituintes e propriedades relatadas de *Artocarpus integrifolia* L.f.

Composto	Parte da planta	Propriedade farmacológica	Referência
Carboidratos	Polpa do fruto e sementes	Não citado	BALBACH, 1985
Fibras, vitamina A, tiamina, gordura, cálcio, fósforo, ferro	Polpa do fruto	Não citado	BALBACH, 1985
Proteína	Sementes	Não citado	BALBACH, 1985
Flavonóides	Caule	Anti-rotavírus	GONÇALVES, 2005; BAE <i>et al</i> , 2000.
Terpenos e compostos nitrogenados	Caule	Não citado	GONÇALVES, 2005

Os estudos de Bae *et al* (2000) demonstraram que os flavonóides encontrados nos extratos vegetais apresentaram inibição da propagação rota-vírus, protegendo as culturas de células contra a invasão viral. Segundo Gonçalves (2005) dos extratos vegetais do caule de *Artocarpus integrifolia* L.f., foram detectados por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), flavonóides,

48

terpenos e compostos nitrogenados. Contudo, os alcalóides não foram detectados nos extratos

ativos.

3.5.1.7 LARANJINHA – Guatteria citriodora Ducke

A Guatteria citriodora Ducke pertence à família da Annonaceae. Essa espécie permanece

desconhecida, em relação a sua utilização e composição química, atualmente encontra-se em

estudo no Departamento de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do Amazonas

(UFAM).

Descrição Botânica

O gênero Guatteria tem um tronco muito reto, monopodial (35 cm), geralmente cilíndrico

e colunar de casca fina, lisa, e de coloração cinzenta-branca. A árvore não mostra nenhuma

ramificação exceto no ápice, os galhos são finos e horizontais. Os quais se inclinam em seus

extremos pelo peso da folhagem. A copa de forma relativamente pequena, estreita, e piramidal.

Sua folhagem nova é adicionada às copas em maio e junho e as flores são produzidas na região

axilar das folhas, única ou em pares, e quando abertas são de coloração amarelada com diâmetro

de 3 cm e ligeiramente aromáticas. Não possui nenhuma estação de floração definitiva para esta

espécie, ocorrendo várias vezes durante o ano. As frutas são de forma globular (6 cm) e as bagas

são pequenas de tonicidade marrom escuro, contendo um cerne-colorido, com semente ovóide.

As frutas são vistas nos dosséis durante todo o ano (STILES & SKUTCH, 1989) (Figura 15).

Componentes Químicos

Não foram relatados estudos fitoquímicos dessa espécie.

#### Propriedades Terapêuticas

As espécies do gênero *Guateria* popularmente são utilizadas como antiparasitária *Guatteria amplifoliam*, anti-térmica e vermífuga *Guaterria boliviana*, inseticida e antiparasitária *Guatteria foliosa*. As propriedades terapêuticas comprovadas cientificamente são antimalárica para *Guatteria amplifoliam*, antiparasitária e antiviral para *Guatteria foliosa* descrita por Paredes *et al* (2001) e antiparasitária para *Guaterria boliviana* relatada por Mahiou *et al* (2000).





Figura 15. Galho com frutos e folha de laranjinha.

FONTE: Reserva Ducke - INPA

#### 3.5.1.8 PAU ROSA - Aniba roseodora Ducke

A espécie *Aniba roseodora* Ducke, conhecida popularmente como pau-rosa e rosewood, é uma espécie florestal nativa da região Amazônica cuja primeira ocorrência no Brasil foi constatada na comunidade de Juriti Velho, estado do Pará em 1925 (SIANI *et al*, 2000).

A Aniba roseodora Ducke pertence à família Lauraceae. No Brasil, consideram alguns grupos roseodora como um sinônimo de Duckei enquanto outros levam a visão inversa. A opinião terceira diz que as diferenças morfológicas que existem dentro do gênero são insuficientes para justificar a separação em duas espécies. Várias outras espécies de pau rosa são encontradas, mas não são exploradas, porque a quantidade de óleo é menor e a composição/aroma é pobre. A utilização mais conhecida e de grande valor econômico, da biomassa das árvores de pau-rosa (Aniba roseodora Ducke) é a produção de óleo, do qual é extraído o linalol, essência largamente empregada como fixador de perfumes pela indústria de

perfumaria nacional e internacional. Tradicionalmente, o processo de produção do óleo de paurosa consiste no abate das árvores na floresta, que são cortadas em pequenos cavacos e trituradas para a destilação, em usinas móveis, próximas à área explorada. Sabe-se que uma tonelada de madeira produz apenas 9 kg de óleo, sendo necessárias 20 toneladas de cavacos para produzir um barril de 180 kg de óleo (PINTO & RAMALHO, 1970).

A ameaça de extinção da espécie conduziu a controles crescentes regulamentados e vigiados por órgãos governamentais no Brasil, conscientizando e orientando tecnicamente na extração do óleo, utilizando os galhos e folhas ao invés de sacrificar a árvore. Os estudos para preservar a espécie buscam em outras plantas teores comerciais de linalol, bem como o reflorestamento desenvolvendo o cultivo como uns dos meios de alcançar produção de óleo sustentável (CHAAR, 2000).

#### Descrição Botânica

O pau-rosa é uma árvore que chega até 30 m de altura e possui uma madeira pesada (0,80 a 0,90 g/cm³), com cerne amarelado e ligeiros reflexos róseos, alburno amarelado, textura média, superfície lustosa, lisa ao tato, cheiro aromático ativo, gosto picante, adstringente (Disponível em: <www. loksmart.com>. Acesso em: 16 de março de 2006). Suas folhas são estreitas com 4 a 6 cm de largura, têm margens recurvadas ou planas, base aguda e ápice acuminado, pouco arqueadas para cima, nervuras secundárias divergentes da nervura primária em ângulo de 45º a 60º. A espécie apresenta mudança foliar anualmente, sempre durante o período seco, o que não acontece para as fases de floração e frutificação (GOTTLIEB *et al*, 1965; CUNHA, 2002) (Figura 16).

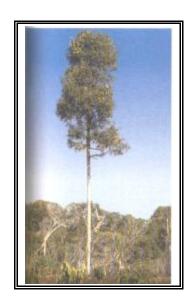


Figura 16. Árvore de pau rosa

FONTE: Disponível em: <www.floresta.ufpr.br/~paisagem/curiosidades/aromaseperfumes.htm>. Acesso em: 15 de março de 2005

Os frutos possuem cúpula bastante espessa em forma de funil e são de cor violácea contrastando com o verde das folhas (ARAÚJO *et al*, 1971). Florescência e, panículas multiflorais, sendo a época de floração abril e maio, flores ferrugíneas e com pedicelos pouco evidentes (Disponível em: <www.loksmart.com>. Acesso em: 16 de março de 2006).

#### Componentes Químicos

Os constituintes e as propriedades da *Aniba roseadora* Ducke foram relatados por vários autores (Tabela 8). A constituição do óleo essencial obtido de galhos e folhas é de origem terpênica, com presença de α-terpineol e linalol, esta em predominância (ALENCAR & FERNANDES, 1978). Os principais componentes identificados por Zoghbi *et al*, (1996) dos galhos e folhas foram α-pineno, limoneno (Figura 17C), mirceno (Figura 17B), 1,8 cineol (Figura 17E), linalol, α-terpineol, sesquiterpenos, linalil, acetato e geraniol (Figura 17F). Posteriormente Cunha (2002) isolou dos galhos e folhas linalol (Figura 17A), cineol, p-metil-acetofenona, tetrahidro-p-metil-acetofenona e α-selineno.

Composto	Parte d		Propriedade farmacológica	Referência
α-terpineol	Galho folhas	e	Não citado	CUNHA, 2002; ZOGHBI <i>et al</i> , 1996
Linalol	Galho folhas	e	Não citado	CUNHA, 2002; ZOGHBI <i>et al</i> , 1996
1,8 cineol	Galho folhas	e	Não citado	CUNHA, 2002; ZOGHBI <i>et al</i> , 1996
p-metil-acetofenona, tetrahidro-p-metil- acetofenona, α-selineno	Galho folhas	e	Não citado	CUNHA, 2002
α-pineno, limoneno, mirceno, linalil, acetato e geraniol	Galho folhas	e	Não citado	ZOGHBI et al, 1996
4-metoxi-6-(3'piridil)-α- pirona (anibina)	Casca		Cura de língua preta (doença de cães comparável à pelagra humana) e indispensável ao metabolismo humano	GOTTLIEB, 1957
2,6-hidroxi-4-metoxi- benzofenona (cotoina)	Casca		Antidiarréico e antissudorífero	GOTTLIEB, 1957

Tabela 8. Descrição dos constituintes e propriedades relatadas de *Aniba roseodora*.

O pau rosa é uma fonte fornecedora do óleo essencial com alto teor de linalol (Figura 17). O linalol (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol) é um dos álcoois de monoterpenos utilizados na indústria cosmética, como fixador em perfumes caros, embora antigamente, utilizava-se como fragrância e em sabonetes, e recentemente seu óleo é aplicado na aromaterapia. O óleo de pau rosa possui um aroma característico doce e agradável (OHASHI *et al*, 1997).

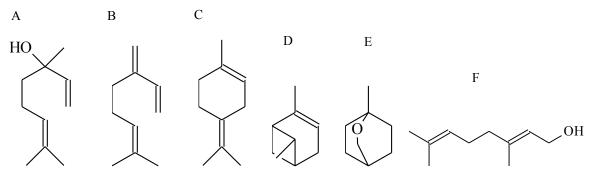


Figura 17. Componentes da *Aniba roseodora* Ducke obtidos de galhos e folhas: A = linalol, B = mirceno, C = limoneno, D =  $\alpha$ -pineno, E = 1,8 cineol e F = geraniol.

#### Propriedades Terapêuticas

O pau rosa é normalmente usado por populações locais na Amazônia para o tratamento de doenças reumáticas e de outras naturezas. Entre as propriedades farmacológicas é usado como analgésicos, bactericidas, sedativos, expectorantes, reumáticos e estomáquicos na composição de diversos medicamentos (VIEIRA, 1970; CHAAR, 2000).

O óleo é usado como afrodisíaco, antidepressivo, auxiliar no equilíbrio emocional, renovador celular, no tratamento de acne, como minimizador de rugas e linhas de expressão. Testes vêm sendo realizados a fim de investigar possíveis atividades bactericidas, acaricidas e fungicidas. Suas propriedades anticonvulsivas estão sendo analisadas pela Ciência Médica, bem como as de regeneração de tecidos, antidepressivos, tônicos e calmantes. É também utilizado como anti-séptico, desodorante, perfumes, sabonetes, condimentos, calmante, analgésico, antimicrobiano, acaricida, bactericida, doenças reumáticas, expectorantes, estomáquicos, sedativos (VIEIRA, 1970; CHAAR, 2000; CUNHA, 2002).

O componente principal do óleo de pau rosa é o linalol e sua modificação química promovida industrialmente torna possível a obtenção do produto derivado, conhecido como acetato de linalila (Figura 18), muito utilizado na indústria de perfumaria como fixador.

Figura 18. Estrutura do acetato de linalila

#### 3.5.1.9 SACACA - Croton cajucara Benth

A espécie *Croton cajucara* Benth, vulgarmente conhecida como sacaca, casca-sacaca, muira-sacaca pertence à família Euphorbiaceae a qual possui espécies de grande utilidade na Amazônia (SOUSA, 2003).

A sacaca é uma planta medicinal aromática, encontrada na Amazônia Oriental e no leste da Amazônia Ocidental, sendo cultivada em toda a Amazônia. No Estado do Pará encontra-se no estuário do Rio Amazonas, ao longo das margens do rio Trombetas, em torno da cidade de Óbidos. Essa espécie é encontrada na várzea, considerada como planta daninha em lotes abandonados de pequenos produtores estabelecidos em áreas de várzea alta. É planta rústica e cresce facilmente em campos abandonados. Apresenta-se como uma espécie potencialmente substituta do pau-rosa, especialmente para extração do linalol (ARAÚJO *et al*, 1971).

## Descrição Botânica

É uma árvore de 6 a 10 m de altura e com folhas elipsóides de 7 a 16 cm de comprimento por 3,5 a 5 cm de largura com pontas agudas, são lisas na superfície superior e pubescentes na inferior. A inflorescência é racemosa, contendo 1 a 3 flores masculinas e possuindo pequenas brácteas, que envolvem cada flor feminina. O cálice das flores femininas é cônico e o das flores masculinas arredondados. O androceu possui 15 estames com antenas globosas e o gineceu é bisseccionado na ponta. A madeira é macia, leve e de cor amarelada. É uma planta arbustiva, aromática e medicinal, de casca pulverulenta; folhas alternadas, lanceoladas, olentes, flores unissexuais, em racemos terminais (SOUSA, 2003) (Figura 19).



Figura 19. Árvore de sacaca FONTE: Minicampus da UFAM

## Componentes Químicos

Os constituintes e as propriedades de *Croton cajucara* foram relatados por vários autores (Tabela 9). A sacaca produz em suas folhas linalol (ARAÚJO *et al*, 1971), um isolado aromático com potencial econômico de interesse para as indústrias de perfumaria, cosméticos e produtos de limpeza. Além do linalol, produz pineno, sabineno, estragol, linearisina e magno florina (VIEIRA, 1991), princípios ativos destinados às indústrias de produtos farmacêuticos. Recentemente, foi observado que o óleo essencial da casca de sacaca apresentava propriedades antiinflamatórias (BIGHETTI *et al*, 1999).

Tabela 9. Descrição dos constituintes e propriedades relatadas de Croton cajucara.

Composto	Parte da planta	Propriedade	Referência
		farmacológica	
Linalol	Folhas (óleo essencial)	Não citado	ARAUJO et al, 1971;
			VIEIRA, 1991
Pineno, Sabineno, Estragol, Linearisina,	Folhas (óleo essencial)	Não citado	VIEIRA, 1991
Magno florina			
Trans-desidrocrotonina; trans-crotonina;	Casca (óleo essencial)	Antiinflamatório	BIGUETTI et al, 1999;
cis-cajucarina B; cajucarina A e			SOUZA, 2003;
cajucarinolida; trans-calucarina, sacarina			MACIEL, 1998 e 2003
e ácido acetil aleuritólico			

A composição química do óleo essencial da casca de sacaca, entretanto, é distinta daquela do óleo essencial obtido das folhas (LOPES *et al*, 2000) e das partes aéreas (LEMOS *et al*, 1999). O óleo essencial da casca é rico em sesquiterpenos e o das folhas, em linalol (SOUSA, 2003).

Planta rica em diterpenos do tipo clerodano: *trans*-desidrocrotonina (DCTN); *trans*-crotonina (CTN); *cis*-cajucarina B; cajucarina A e cajucarinolida. Em adição aos clerodanos inéditos temos *trans*-calucarina, sacacarina e o triterpeno ácido acetil aleuritólico (AAA) (Figura 18) (MACIEL, 1998 e 2003) (Figura 20).

## Propriedades Terapêuticas

Possuem ação antiinflamatória (inflamações em geral) antinociceptiva, hipoglicemiante (tratamento da diabete), antiespasmódica (cura de diarréia), antiulcerogênica, antitumoral, antiestrogênica e efeito hopolipidêmico (redução dos índices elevados de colesterol). Na medicina popular, o chá das folhas e da casca serve para conter distúrbios hepáticos, renais e reduz o colesterol (ARAÚJO *et al*, 1971; VIEIRA, 1991).

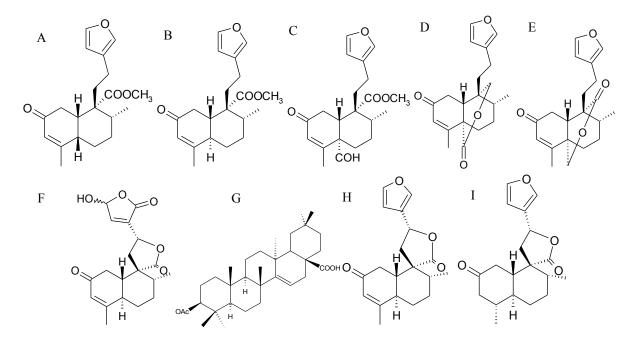


Figura 20. Constituintes químicos de *Croton Cajucara* Benth, A = *Cis*-cajucarina B, B = *Trans*-cajucarina B, C = Cajucarina A, D = sacacarina, E = isosacacarina, F = cajucarinolida, G = ácido acetil aleuritólico, H = DCTN, I = CTN.

### 3.5.1.10 TIRIRICA - Cyperus rotundus L.

Pertence a família das Cyperaceae, com cerca de 90 gêneros e 4000 espécies, das quais 845 ocorrem nos Neotrópicos (BACCHI, 1989). O gênero *Cyperus* compreende cerca de 600 espécies, incluindo ervas daninhas comuns, encontradas em planaltos e campos de regiões tropicais e temperadas (KISMANN, 1991).

A *Cyperus rotundus* é considerada a mais importante planta invasora do mundo, devido sua ampla distribuição, capacidade de competição e agressividade, bem como pela dificuldade de controle e erradicação. É uma herbácea perene, a qual se multiplica por sementes e vegetativamente, a partir de rizomas, bulbos basais e tubérculos subterrâneos (Figura 21). É considerada uma das espécies botânicas de maior amplitude de distribuição geográfica, está presente em praticamente todos os países de clima tropical ou subtropical e até mesmo, em regiões de clima temperado. No Brasil, é registrada em toda a extensão territorial. Tem grande capacidade de reprodução, podendo produzir cerca de 40 toneladas de massa verde por hectare. As raízes são fibrosas e finas, chegando a 1 m de profundidade e suportando períodos secos consideravelmente prolongados (KISSMANN, 1991).



Figura 21. A= Tiririca (*Cyperus rotundus* L.), seta demonstrando os tubérculos. B= Tiririca, seta indicando inflorescência.

FONTE: Estação experimental de hortalicas do INPA.

#### Descrição Botânica

É uma planta perene, herbácea, ereta, de caule triangular, com tubérculos, de 20-40 cm de altura. A capacidade de sobrevivência em condições adversas é enorme desenvolvendo-se numa

grande variedade de ambientes e solos com as mais diferentes texturas, num amplo espectro de pH com variados graus de fertilidade. Em temperaturas baixas, o desenvolvimento e a multiplicação dos tubérculos dá-se com lentidão, pois o congelamento do solo mata os tubérculos (KISMANN, 1991).

## Componentes Químicos

Os constituintes e as propriedades da *Cyperus rotundus* foram relatados por vários autores (Tabela 10). Os estudos fitoquímicos realizados com a espécie *Cyperus rotundus*, indicam que a mesma é constituída principalmente por terpenos, quinonas e flavonóides (ALLAN *et al*, 1969). O óleo essencial e os extratos obtidos a partir dos tubérculos de *Cyperus rotundus* L. têm sido submetidos a numerosos estudos, resultando na identificação de muitos terpenóides (OHIRA *et al*, 1998). Thebtaranonth *et al* (1995), ao investigarem o extrato hexânico bruto de *Cyperus rotundus* L., identificaram o endoperóxido 10,12-peroxycalameno.

Tabela 10. Descrição dos constituintes e propriedades relatadas de Cyperus rotundus

Composto	Parte da planta	Propriedade farmacológica	Referência
10-12-peroxycalameno (extrato hexânico)	Tubérculo	Forte atividade antimalarial	THEBTARANONTH <i>et al</i> , 1995
4,7-dimetil-1-tetralenol (extrato hexânico)	Tubérculo	Moderada atividade antimalarial	THEBTARANONTH et al, 1995
α-copaeno, cipereno, β-selineno, α-selineno, α-ciperona, campesterol, estigmasterol, sitosterol, hexadecanoato de metila (extrato hexânico)	Tubérculo	Não citado	SANTOS, 2003
Ciproteno, cipera-2,4-dieno, α-copaeno, cipereno, α-selineno, rotundeno, valenceno, γ-gurjuneno, $trans$ -calameno, δ-cadineno, γ-calacoreno, epi-α-selineno, α-muuroleno, γ-muuroleno, cadaleno, ciperol, isociperol, α-ciperona, α-pineno, β-pineno, mirtenol, seichelleno, β-selineno, espatulenol, epoxicariofileno, óxido de α-cedreno (oleo essencial)	Tubérculo	Não citado	JOULAIN E KONIG, 1998; HIKINO et al, 1967; HOWE E MCQUILLIN, 1955; HAAKSMA et al, 1992; ADAMS, 1995; SANTOS, 2003

A análise do óleo essencial de *Cyperus rotundus* por Cromatografía Gasosa (CG) e Cromatografía Gasosa de Alta Resolução acoplada ao Espectrofotômetro de Massa (CGAR-EM) possibilitou a identificação do ciproteno, cipera-2,4-dieno, α-copaeno, cipereno (Figura 20G), α-selineno, rotundeno, valenceno, γ-gurjuneno, *trans*-calameno, δ-cadineno, γ-calacoreno, epi-α-selineno, α-muuroleno, γ-muuroleno, cadaleno (JOULAIN e KONIG, 1998), ciperol, isociperol (HIKINO *et al*, 1967) e α-ciperona (HOWE e McQUILLIN, 1955; HAAKSMA *et al*, 1992).

Segundo Santos (2003), o óleo essencial dos tubérculos do espécime *Cyperus rotundus*, aclimatado no Amazonas, apresenta 15,51% de monoterpenos, 25,85% de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e 20,68% de sesquiterpenos oxigenados. Os principais componentes identificados foram cipereno (17,41%) (Figura 22G), α-ciperona (Figura 22F) (15,84%), epoxicariofíleno (8,08%) (Figura 22L) e β-selineno (7,09%)% (Figura 22D), enquanto que α-cedreno-óxido (2,66%) (Figura 22E), e espatulenol (2,42%) foram detectados em menor quantidade. No total foram identificados 12 compostos, que corresponderam a 62,04% da composição do óleo. Os estudos de Santos (2003) revelaram a presença dos sesquiterpenos α-copaeno, cipereno, α-selineno, β-selineno, α-ciperona, dos esteróides, campesterol, estigmasterol, sitosterol, e do éster hexadecanoato de metila, do extrato hexânico do mesmo espécime.

#### Propriedades Terapêuticas

A *Cyperus rotundus* é usada como remédio na medicina popular em diversas regiões do mundo, incluindo Ásia, África, América do Norte e do Sul (DANASSANAYAKE & FOSBERG, 1995). Seus tubérculos são usados na medicina popular desde a Idade da Pedra, pois apresentam compostos terpênicos, aos quais são atribuídas propriedades terapêuticas (KISMANN, 1991).

Segundo Marimoto (1998), espécies do gênero *Cyperus* apresentam efeitos medicinais como emoliente, analgésico e antelmíntico. Na china é utilizada com analgésico, bactericida, afrodisíaco, impotência sexual e antidepressivo (DANASSANAYAKE & FOSBERG, 1995). Possui forte efeito antimalárico (THEBTARANONTH *et al*, 1995).

Figura 22. Constituintes ativos do *Cyperus rotundus* L.: A = Ciperaquinona; B = Scabequinona; C = Remirol, D =  $\beta$ -selineno, E = Óxido de  $\alpha$ -cedreno, F =  $\alpha$ -ciperona, G = Cipereno, H = Campesterol, I = sitotesrol, J = Hexadecanoato de metila, L = Óxido de cariofileno.

# 3.6 Óleos e extratos

Foram avaliados, de acordo com a parte da planta estudada, óleos voláteis, óleo-resina, óleos fixos e extratos em ordem crescente de polaridade (hexânico, clorofórmico e etanólico).

A International Standard Organization (ISO) define óleos essencial, como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água. Desta forma, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamadas de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Sua principal característica é a volatilidade com aroma agradável e intenso na grande maioria, por esse motivo são denominados de essenciais (SIMÕES, 2003).

O óleo resina é uma solução natural de ácidos diterpênicos em um óleo essencial composto principalmente de sesquiterpenos (CASCON *et al*, 2000).

Os óleos fixos são definidos como uma mistura de substâncias lipídicas, obtidas geralmente de sementes ou diretamente do caule das plantas. Como características são densos, não voláteis, líquidos e hidrofóbicos, constituídos basicamente por triglicerídeos (MORETTO, 1989; SIMÕES, 2003).

.

# 4. MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1 Coleta do material botânico

A primeira etapa da investigação fitoquímica consistiu na coleta do material vegetal. Assim, foi preparada uma exsicata para a identificação botânica de cada espécie, onde a seleção do material foi feita de forma cuidadosa, evitando coletar partes dos vegetais afetados por doenças, parasitas e também materiais estranhos, tais como outras plantas ou mesmo partes da própria planta de insignificante interesse para a investigação (Tabela 11). Nas exsicatas há informações sobre o registro do tipo de solo, diâmetro a altura do peito do caule (D.A.P.). No local de coleta, a hora e a data são importantes observações, visto que, o ambiente, a hora do dia e a época do ano exercem grande influência sobre a produção e o acúmulo dos produtos vegetais.

Tabela 11 - Atividades de coleta do material botânico.

Espécie botânica	Parte da planta	Local de coleta	Número da exsicata*			
Cyperus rotundus L.	Tubérculos	Estação Experimental de Hortaliças do INPA, Manaus.	HUAM 7579			
Tynanthus elegans Miers	Caule	Reserva Ducke do INPA	Não fértil			
Copaifera multijuga Hayne	Caule	Reserva Ducke do INPA	Não fértil			
Carapa guianensis Aubl.	Sementes	Campus do INPA Aleixo, Manaus	HUAM 7577			
Bertholletia excelsa Humb & Bonpl.	Sementes	Campus da UFAM, Manaus.	HUAM 7578			
Artocarpus integrifolia L.F.	Sementes	Campus do INPA V-8, Manaus.	HUAM 7580			
Protium heptaphyllum March	Caule	Reserva Ducke do INPA	Não fértil			
Aniba roseodora Ducke	Folhas	Reserva Ducke do INPA	HUAM 5982			
Croton cajucara Benth	Folhas	Reserva Ducke do INPA	Não fértil			
Guatteria citriodora Ducke	Folhas	Reserva Ducke do INPA HUAM 7346				

<sup>\*</sup>HUAM – Herbário da Universidade Federal do Amazonas

#### 4.2 Secagem e moagem

A secagem foi realizada em estufa de ar circulante a 50 °C, com duração média de 4 dias, dependendo da amostra. Procedeu-se a moagem por um moinho, modelo Willey de quadro facas com peneira fina e crivos de aproximadamente 1 mm de diâmetro.

## 4.3 Extração dos óleos e extratos

4.3.1 Óleos voláteis das espécies: tiririca (Cyperus rotundus L.), breu-branco (Protium heptaphyllum March.), pau rosa (Aniba roseodora Ducke.), sacaca (Croton cajucara Benth.), e laranjinha (Guatteria citriodora Ducke).

Os óleos voláteis foram obtidos através de processo de hidrodestilação, no sistema Clevenger (Figura 23) por 2 a 3 horas, mantendo-se a temperatura de 100 °C. Posteriormente foram secos usando Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Os óleos foram armazenados em frascos de vidro escuro, mantidos sob refrigeração para evitar perda dos constituintes voláteis e então submetidos aos ensaios biológicos.

# 4.3.2 Óleo-resina: copaíba (Copaifera multijuga Hayne).

O óleo de copaíba foi coletado diretamente da árvore, através de uma incisão com uma ferramenta em forma de parafuso (trado) até atingir o cerne do caule, inserindo-se um pequeno cano de PVC de ½ polegada conectado a uma mangueira plástica flexível de mesmo diâmetro, facilitando a coleta do óleo. Foram retirados 100 mL, e posteriormente o cano foi vedado para uso em novas extrações.

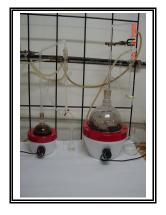


Figura 23. Sistema de Clevenger.

FONTE: Laboratório de Química de Produtos Naturais - UFAM

# 4.3.3 Óleos fixos: andiroba (Carapa guianensis Aubl.), castanha do brasil (Bertholletia excelsa Humb.& Bonpl.) e jaca (Artocarpus integrifolia L.F.).

No processo de extração desses óleos as sementes foram coletadas e posteriormente secas, separando-se em seguida as cascas (tegumento) das amêndoas (endosperma e embrião) em seu interior. Das amêndoas foi obtido o óleo, através de extração contínua em Soxhlet (Figura 24), por um período de 24 horas, utilizando como solvente, o hexano p.a. Após esta fase, os extratos foram submetidos ao rotavapor, à pressão reduzida, para eliminação total do solvente e obtenção dos extratos de cada semente.



Figura 24. Aparelho de *Soxhlet*.

FONTE: Laboratório de Química de Produtos Naturais - UFAM

4.3.4 Extratos hexânico, clorofórmico e etanólico: andiroba (Carapa guianensis Aubl.), tiririca (Cyperus rotundus L.), jaca (Artocarpus integrifolia L.F.) e cipó cravo (Tynanthus elegans Miers.).

Os materiais vegetais coletados foram separados por sua especificidade. Da andiroba retirou-se a casca das sementes, da tiririca os tubérculos, da jaca as cascas das sementes e do cipó cravo o seu caule. Após secagem e moagem, foram inseridas em frascos mariotes individualizados por espécie, para posteriores imersões em solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio e etanol 95%), durante seis dias (para cada solvente utilizado), e sua renovação a cada dois dias. Os extratos com solvente foram concentrados em rotavapor, sob pressão reduzida, até eliminação total dos solventes e obtenção dos extratos (Figura 25).





Figura 25. Mariote e Rotavopor

FONTE: Laboratório de Química de Produtos Naturais - UFAM

## 4.4 Preparo do meio de cultura de Streptococcus mutans

Para o crescimento do *Streptococcus mutans*, classificado como tipo γ (gama) ou inerte, não produtor de halo de hemólise, utilizou-se o meio de cultura utilizado pela Fundação André Tosello, onde a bactéria de referência ATCC 25175 foi adquirida, composto de TSA (Tripticase Soyo Ágar), ou seja, 7,5 g de peptona de soja com 7,5 g ágar em 500 mL de água destilada (MANUAL DIFCO, 1984). Esta mistura foi esterilizada em autoclave, e posteriormente distribuída assepticamente, na câmara de fluxo laminar, em placas de petri estéreis e em tubos de ensaio para cultivo e manutenção das culturas. Para comprovar e controlar a esterilidade das placas conservou-se o meio de cultura puro, não semeado, durante 24 horas na estufa a 37 °C evitando contaminação do meio.

Para obtenção do meio líquido, foram misturados 7,5 g de peptona de soja com 5 g de sacarose PA em 500 mL de água destilada, sendo submetido à esterilização em autoclave. Posteriormente as culturas foram distribuídas em cinco frascos erlenmeyers de 250 mL cada, submetidos a um aparelho agitador para crescimento das culturas por 72 horas.

No processo de diluição em ágar semeia-se, em meio sólido as bactérias, colocando-se uma amostra da droga sobre ele, isto é, no disco de papel de filtro, num pequeno cilindro ou numa cavidade feita no ágar. Após o crescimento da camada bacteriana, poderá haver uma zona clara ao redor da droga para um determinado agente. O diâmetro dessa zona fornece uma indicação e grau de sensibilidade do microrganismo. Esse diâmetro também é influenciado pela velocidade de crescimento do germe e pela densidade do inóculo, uma vez que é o reflexo de uma competição entre a multiplicação do microrganismo e a difusão da droga (DAVIS *et al*, 1973).

#### 4.5 Procedimento de análise

O procedimento químico para a produção das amostras iniciou-se com a coleta das espécies botânicas, seguida de secagem e moagem, para a obtenção dos materiais de 10 espécies, entre óleos e extratos vegetais, totalizando 22 amostras padronizadas para teste. Esses protocolos foram efetuados no laboratório de química de produtos naturais do Departamento de Química da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

A análise microbiológica utilizada foi o método comparativo entre as amostras, com uma cultura de *Streptococcus mutans* de referência, buscando avaliar a presença de propriedades antimicrobianas, antiaderentes e antiácidas das amostras de óleos e extratos, no meio de cultura contendo esse microrganismo, responsável pela formação do biofilme bacteriano em contato com o esmalte dentário humano. As análises foram realizadas no laboratório de microbiologia da Coordenação de Pesquisas em Ciências Agronômicas (CPCA) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA).

# 4.5.1 Propriedade antimicrobiana

A propriedade antimicrobiana consistiu na análise das atividades bactericida e/ou bacteriostática, *in vitro*, das amostras sobre o *S. mutans*. Do meio líquido com as colônias em crescimento retirou-se uma alíquota de 10 mL e foi adicionada aos 500 mL do meio de cultura TSA, fundido a uma temperatura de 50 °C, sendo posteriormente distribuído sobre placas de petri. Após o resfriamento completo, adicionou-se sobre este conjunto, as amostras dos óleos e extratos vegetais embebidos em discos de papel de filtro de aproximadamente 5 mm de diâmetro. Foram adicionados sobre a cultura, cinco discos de papel impregnados individualmente por amostra em cada placa de petri, técnica de difusão em disco de Kirby Bauer (1966). Esse procedimento foi realizado em triplicata, sendo obtido o total de 15 discos por amostra.

Na análise qualitativa se determina a bactéria sensível quando o halo de inibição (halo mais disco) for superior a 15 mm de diâmetro, bactéria resistente quando for inferior a 10 mm de diâmetro e bactéria moderadamente sensível quando oscilar entre 10 e 15 mm de diâmetro (IRIARTE, 1975).

Na análise dos dados os valores de halo de inibição foram transformados em halo verdadeiro, sendo subtraído dos valores aferidos, 5,5 mm referente de diâmetro do disco. No presente estudo a bactéria será considerada resistente quando não apresentar halo de inibição, quando os valores forem superiores a 1,50 mm de diâmetro a bactéria é sensível e quando oscilar entre 0,01 à 1,50 mm de diâmetro a bactéria é tolerante.

Para a confirmação dos resultados obtidos pela análise qualitativa, foi proposta a avaliação quantitativa em relação à atividade antimicrobiana. Foram aferidos os valores do diâmetro do disco com amostra e dos halos de inibição ou crescimento formados nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Para a análise de variância (ANOVA) da presença de halo de inibição ou halo de crescimento, os dados foram transformados em  $\sqrt{x+0.5}$ , onde x representa o valor da amostra, segundo Banzatto e Kronka (1992).

Os valores relacionados foram medidos em mm de halo de inibição verdadeiro, calculado pela diferença entre o halo total e o diâmetro do disco, ou seja, a medida da difusão das moléculas bioativas no meio de cultura com a bactéria. Seguindo o mesmo procedimento, foi aferido o halo de crescimento verdadeiro.

Com o objetivo de identificar a significância estatística, das diferentes comparações foi realizada a análise dos dados pelo modelo em parcela subdividida, onde as parcelas são formadas pelos óleos e extratos e as subparcelas pelos tempos de cultivo (24, 48 e 72 horas), considerando um intervalo de confiança de 95% (p = 0,05). As comparações múltiplas foram processadas através dos contrastes ortogonais do teste F de acordo com Hinkelmann e Kempthorne (1994).

#### 4.5.2 Propriedade removedora do biofilme

Os ensaios para remoção do biofilme necessitam de protocolos distintos em função do tempo e do crescimento exponencial (fase Log) do microrganismo em estudo.

Para os ensaios qualitativos de remoção do biofilme foi estabelecido um teste visual por amostra com o seguinte protocolo: na formação do biofilme utilizou-se um tubo de ensaio com tampa, onde foi adicionado um fragmento de dente humano de aproximadamente 0,25 cm² em 1 mL de meio líquido com a bactéria, ficando em temperatura ambiente 72 horas em mesa agitadora de movimento circular (Figura 26).

O fragmento dentário foi retirado do tubo de ensaio e depositado em placa de petri. Para verificação do biofilme formado utilizou-se uma gota evidenciadora de bactérias à base de eritrosina, com a finalidade de corar as bactérias formadoras do biofilme, sobre o fragmento. Constatada a presença do biofilme, acrescentou-se posteriormente uma gota da amostra sobre o fragmento dentário. Após 5 minutos de contato, verificou-se se a amostra desagregou o biofilme formado e corado.

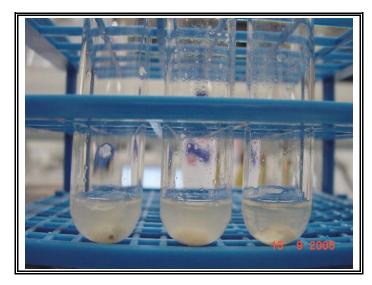


Figura 26. Formação do biofilme no teste qualitativo. FONTE: Laboratório de Microbiologia da Coordenação de Pesquisas em Ciências Agronômicas (CPCA) - INPA

As amostras estudadas obedeceram ao critério da solubilidade, sendo separadas em líquidas e diluídas para adicioná-las sobre o fragmento dentário previamente corado. Para obtenção das amostras diluídas acrescentou-se propilenoglicol na proporção de 0,1 g de amostra para 100 µL de propilenoglicol. Como controle para as amostras líquidas, acrescentou-se uma gota de água destilada sobre o fragmento corado. No controle das amostras diluídas acrescentou-se uma gota do propilenoglicol no fragmento corado, com a finalidade de comparação com as demais amostras. As amostras com resultados visualmente positivos foram quantificadas.

Para os ensaios quantitativos de remoção do biofilme foi estabelecido por amostra o seguinte protocolo: inicialmente preparado 300 mL de meio de cultura líquido, contendo peptona de soja e sacarose diluídas em água destilada, para esterilização em autoclave e posterior resfriamento. O meio foi inoculado por colônias de *Streptococcus mutans*, e mantido em temperatura ambiente por 3 dias na mesa agitadora com movimento circular.

A cultura foi homogeneizada e distribuída em 39 frascos de 50 mL com tampa, em alíquotas de 6 mL/frasco, contendo um dente previamente esterilizado e mantido por mais quatro dias nas mesmas condições (PELINO, 1998; YOSHIYASU, 2001). Os dentes possuíam o volume de 1,0 mL; 0,8 mL; 0,6 mL e 0,4 mL. As triplicatas mantiveram em média volume de 0,8 mL/amostra.

A média de células viáveis ou unidades formadoras de colônias (UFC) proposta por Gaines *et al* (2003) e Eick *et al* (2004), nos tempos de 24 e 48 horas foi estimada através de visualização em placa de Petri, das colônias presentes em solução de inoculo, como descrito a seguir.

Uma alíquota de 1 mL do meio líquido com bactérias foi solubilizada em 9 ml de propilenogicol (solução a 10%), procedendo-se em seguida a leitura da absorvância, em triplicata, no espectrofotômetro UV-Vis (Modelo Spectronic Biomat 3 - *Thermo Electron Corporation*), a 620 *nm* (Hansen *et al* (2006); Qi *et al* (2005); Takarada *et al* 2004; Merrit *et al* (2003)). Tendo em vista as dificuldades de quantificação nesta concentração devido a presença de excesso de unidades formadoras de colônias (UFC), foram realizadas sucessivas diluições do inóculo em propilenoglicol, a 1%, 0,1%, 0,01% e 0,001%. A contagem das células foi viabilizada na quinta diluição, observando-se 64 células/mL. Devido o limite de detecção do aparelho para leitura de absorvância a partir da terceira diluição, optou-se por calcular o número de células viáveis ou unidades formadoras de colônias (UFC) para a primeira diluição (solução a 10%), correspondendo a 64x10<sup>5</sup> células /mL, cujo valor médio de absorvância foi igual a 0,081. Esta solução (inóculo+solvente propilenoglicol) foi usada como padrão para avaliação semi-quantitativa do número de células removidas das unidades dentárias pelas amostras em estudo, com base na proporcionalidade entre absorvância e concentração de analitos, em acordo com a Lei de Beer-Lambert (Oliveira *et al*, 2004).

O controle estimado para a análise foi o propilenoglicol, o qual desagregou 1,5 x 10<sup>5</sup> UFC's/mL células em cinco minutos de contato com o dente. Com esse dado foi possível a comparação com as amostras, bem como substâncias de relevante uso na odontologia a clorexidine e o eugenol.

As amostras foram diluídas em propilenoglicol, substância inerte, nas proporções de 2,7 mL de diluente para 0,3 mL de amostra, em tubos de 10 mL repetidos em triplicata. Cada amostra foi lida no espectrofotômetro de ultravioleta com comprimento de onda ( $\lambda$ ) 620  $\eta$ m, separadamente, tendo como branco a mistura propilenoglicol mais amostra. Os dentes imersos em 6,0 mL de meio líquido por um período de 7 dias e distribuídos individualmente nas triplicatas, de modo que o somatório de seus volumes fosse em média 2,4 mL. Em seguida, os dentes retirados do inóculo foram submersos nas amostras por cinco minutos, e as amostras

diluídas com bactérias desagregadas do biofilme foram submetidas a uma nova leitura no espectrofotômetro de ultravioleta, sendo os valores comparados com os obtidos no meio líquido inicial.

## 4.5.3 Propriedade antiácida

A ação antiácida dos óleos e extratos vegetais sobre a cultura de *Streptococcus mutans* seguiu o seguinte protocolo: Os ensaios para obtenção do pH (Potencial de Hidrogênio) das amostras estudadas, obedeceram ao critério da solubilidade. Assim, foram separadas as amostras líquidas das diluídas em relação ao meio de cultura líquido contendo a bactéria *Streptococcus mutans*, procedendo a um controle por grupo.

Nas amostras líquidas foram adicionados em cada ensaio, as seguintes proporções 700  $\mu$ L da amostra em 700  $\mu$ L de meio líquido com a bactéria em um tubo eppendorf de 1500  $\mu$ L, tendo como controle 1400  $\mu$ L de meio líquido com a bactéria em um tubo eppendorf de 1500  $\mu$ L.

Para diluição das amostras foi acrescentado o propilenoglicol como diluente em cada ensaio na proporção de 0,1 g da amostra em 700  $\mu$ L de propilenoglicol e adicionada a 700  $\mu$ L de meio líquido com a bactéria em um tubo eppendorf de 1500  $\mu$ L. O controle foi mantido à relação de 700  $\mu$ L de propilenoglicol em 700  $\mu$ L de meio com a bactéria em um tubo eppendorf de 1500  $\mu$ L.

A importância da análise de pH descrita por Bradshaw *et al* (1997), demonstraram que os valores superiores a pH 5,5, estabilizam o crescimento bacteriano na saliva em seres humanos, das bactérias comensais e odontopatogênicas, sendo essas condições consideradas de baixo risco de cárie dentária.

Essa estabilização é rompida quando o valor de pH reduz de pH 5,5 para pH 5,0, onde as bactérias odontopatogênicas são estimuladas ao crescimento, enquanto as bactérias comensais permanecem estáveis, sendo consideradas de médio risco de cárie.

Contudo quando os valores do pH são menores que pH 5,0 observa-se a redução das colônias das bactérias comensais as espensas do crescimento das bactérias odontopatogênicas,

justificando com essas condições a consideração de alto risco de cárie dentária em humanos (Figura 27) (BRADSHAW *et al*, 1997).

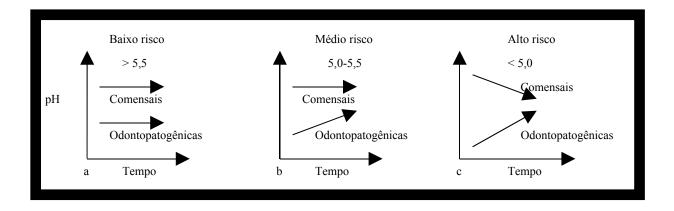


Figura 27. Variação de acidez FONTE: Bradshaw *et al* (1998)

Para melhor compreensão, o mecanismo bioquímico influenciado pelo pH na saliva humana, foi descrito por Jenkins (1978), através da curva de Stephan (Figura 25). Essa análise foi deduzida após a ingestão de alimentos ricos em sacarose. No estudo desse autor observou-se que o pH salivar foi reduzido a valores próximos ao pH 5,0, nos primeiros cinco minutos, permanecendo com esse valor de pH por 10 minutos. Nesse período o esmalte dentário libera para a saliva íons Ca<sup>+2</sup> e o PO<sub>4</sub>-3 induzidos pelos valores ácidos de pH, descritos como fase de desmineralização do dente (CURY, 1981; ROSEN *et al*, 1989).

Após os dez primeiros minutos a saliva apresenta propriedade tampão, a qual eleva os valores de pH próximo a neutralidade do pH 7,0, esse processo leva trinta minutos para neutralização e foi descrito por Jenkins (1978), como fase de remineralização, pois os íons Ca<sup>+2</sup> e o PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> retornam ao esmalte dentário humano, estabilizando o estado bioquímico original dos cristais de hidroxiapatita que compõem a estrutura do esmalte dos dentes, a partir do pH 5,5 elevando-se a neutralidade próximo do pH 7,0 (Figura 28).

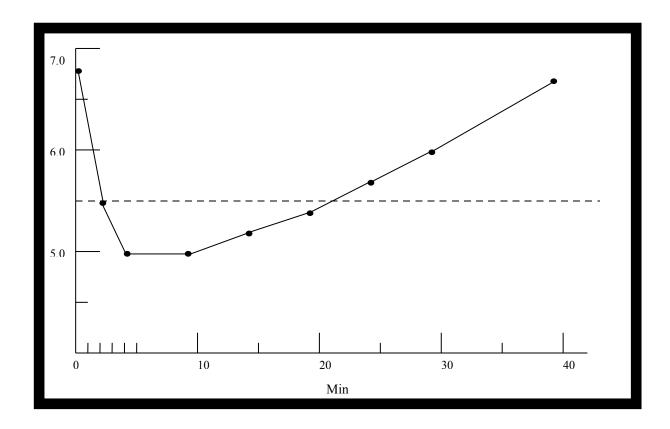


Figura 28. Curva de Stephan FONTE: Jenkins, (1978).

# 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia empregada permitiu a análise das propriedades antimicrobianas, removedoras de biofilme e antiácidas das amostras vegetais (Tabela 12).

Os óleos essenciais de breu branco, breu branco mais linalol de pau rosa; o óleo resina de copaíba; os óleos essenciais de laranjinha, pau rosa, sacaca e tiririca, bem como o extrato clorofórmico de tiririca, o extrato hexânico de cipó cravo e o extrato hexânico de tiririca, apresentaram halo de inibição, demonstrando atividade antimicrobiana nesse estudo.

O óleo essencial de laranjinha destacou-se entre as amostras estudadas, pois revelou inibição completa. A sua característica volátil demonstrou fácil difusão molecular em meio de cultura sólido na placa de petri, eliminando por completo o *Streptococcus mutans* contido no meio.

Na análise mais relevante da pesquisa, a atividade antiaderente, as amostras que apresentaram destaque foram os óleos essenciais de tiririca e breu branco, e o extrato etanólico de tiririca.

A verificação da atividade antiácida demonstrou que a amostra de extrato clorofórmico de andiroba e o controle formado pela cultura em meio líquido mais propilenoglicol apresentaram pH 7,5, impossibilitando o crescimento bacteriano.

# 5.1. Análise da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi analisada pela ação de uma substância ou um conjunto de substâncias adicionadas em discos de papel de filtro, técnica de difusão em disco de Kirby Bauer (1966). Os discos foram distribuídos em placa de petri com meio de cultura e *Streptococcus mutans*. As amostras positivas promoveram a inibição do crescimento da bactéria pelo contato, formando um halo de inibição pela difusão molecular ao redor do disco impregnado com os óleos e extratos.

Tabela 12 – Óleos e extratos das espécies vegetais utilizadas no estudo de atividade antimicrobiana, antiaderente e antiácida.

Material vegetal	Componentes	Propriedade antimicrobiana (1)	Propriedade antiaderente (2)	Propriedade antiácida (3)
Branco	Controle	-	1	5,40/7,55*
Andiroba	Óleo fixo	1	2	4,55
	Extrato etanólico	1	1	5,90
	Extrato clorofórmico	1	1	7,55*
	Extrato hexânico	1	1	5,65*
Breu branco	Óleo essencial	2	3	5,10
Breu branco + linalol de pau rosa	Óleo	2	1	5,60
Castanha do brasil	Óleo fixo	1	1	5,50
Cipó cravo	Extrato etanólico	1	2	5,80*
Cipo ciuvo	Extrato	1	1	5,45*
	clorofórmico	2	2	< == 1
G 11	Extrato hexânico	2	2	6,75*
Copaíba	Óleo resina	1	2	4,05
Jaca	Óleo fixo	1	1	6,75*
	Extrato etanólico  Extrato	1	1	5,60* 6,90*
	clorofórmico  Extrato hexânico	1	1	6,65*
Laranjinha	Óleo essencial	3	2	5,60
Pau rosa	Óleo essencial	2	2	5,10
Sacaca	Óleo essencial	2	1	
Tiririca	Óleo essencial	2	3	6,55
ПППСа		1	3	5,20 5,85*
	Extrato etanólico Extrato clorofórmico	1	2	5,85* 5,10*
	Extrato hexânico	2	2	6,90*

<sup>(1) – 1-</sup> Ausência de halo de inibição, 2- Presença de halo de inibição, 3- Inibição completa na placa de petri.

<sup>(2) – 1-</sup> Presença de biofilme, 2- desagregação parcial do biofilme, 3- desagregação total do biofilme.

<sup>(3) –</sup> Sem asterisco amostras líquidas, com asterisco (\*) amostras diluídas.

Os extratos são obtidos a partir dos solventes P. A. (Pró análise), como hexano, clorofórmio e etanol em ordem crescente de polaridade. Assim, no extrato hexânico encontram-se moléculas com menor polaridade, no extrato clorofórmico moléculas de média polaridade e no extrato etanólico moléculas de maior polaridade.

Durante o experimento obteve-se um dado diferenciado entre algumas amostras, pois estas apresentaram halo de crescimento de bactéria.

Sempre que se realiza um antibiograma de acordo com a técnica descrita e utilizando disco com uma concentração e posição adequada, é possível avaliar o grau de sensibilidade segundo as características dos halos de inibição, nos seguintes termos: sensível, moderadamente sensível e resistente (IRIARTE, 1975).

Observaram-se efeitos diferenciados estatisticamente quanto aos óleos e extratos sobre o crescimento de *Streptococcus mutans* nas placas de petri. O óleo essencial de laranjinha foi o que apresentou maior inibição do crescimento da *S. mutans*, com o diâmetro de halo de inibição equivalendo ao diâmetro da placa. A análise de variância detectou diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F (Tabela 13).

No presente estudo, a bactéria foi considerada resistente quando não apresentou halo de inibição; quando os valores foram superiores a 1,50 mm de diâmetro a bactéria foi considerada sensível e foi considerada moderadamente sensível (tolerante) quando os valores oscilaram entre 0,01 e 1,50 mm de diâmetro.

A amostra de óleo fixo de andiroba apresentou ausência de halo de inibição, nos tempos de 24, 48 e 72 horas (Figura 29), sendo constatado no tempo de 72 horas, a presença de halo de crescimento bacteriano com média de 0,40 mm de diâmetro (Tabela 13), ou seja, a bactéria *Streptococcus mutans* é resistente ao óleo.

O extrato clorofórmico de andiroba apresentou ausência de halo de inibição, nos tempos de 24 e 48 horas, sendo constatada a presença de halo de inibição no tempo de 72 horas com média de 0,37 mm de diâmetro (Tabela 13), ou seja, a bactéria *Streptococcus mutans* mostrou-se tolerante a esse extrato.

Tabela 13 – Halos de inibição e crescimento bacteriano formados nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Material analisado (óleos e extratos)	Média de halo de inibição (mm)					Média de halo de crescimento (mm)						
	24 hc	24 horas 48 horas 72 horas		24 1	noras	48 horas 72		72 l	noras			
Óleo fixo de andiroba							0	aB	0	aВ	0,40	aC
Extrato etanólico de andiroba							1,57	aA	2,31	aA	4,34	aA
Extrato clorofórmico de andiroba	0	aB	0	aB	0,37	aВ						
Extrato hexânico de andiroba							0	aB	3,66	aA	1,23	aBC
Óleo essencial de breu branco	0	аВ	1,48	aВ	0,72	аВ						
Óleo essencial de breu branco+ linalol	0,98	aВ	1,29	aВ	1,13	aВ						
Óleo fixo de castanha do brasil	0	aB	0	aB	0	aВ						
Extrato etanólico de cipó cravo	0	aВ	0	aВ	0	aВ						
Extrato clorofórmico de cipó cravo	0	aВ	0	aВ	0	aВ						
Extrato hexânico de cipó cravo	0	aВ	1,14	aВ	0,98	aВ						
Óleo resina de copaíba	0	aВ	0	aВ	3,01	aB						
Óleo fixo de jaca							0,90	aA	2,26	aA	2,32	aВ
Extrato etanólico de jaca	0	аВ	0	aВ	0	aВ						
Extrato clorofórmico de jaca							0,80	aAB	1,43	aA	1,11	aBC
Extrato hexânico de jaca	0	aВ	0	aВ	0	aB						
Óleo essencial de laranjinha	86,18*	aA	86,18*	aA	31,09	bA						
Óleo essencial de pau rosa	2,98	аВ	3,07	aВ	3,04	aВ						
Óleo essencial de sacaca	0	aВ	0	aВ	0,09	aВ						
Óleo essencial de tiririca	2,58	аВ	2,31	aВ	1,94	аВ						
Extrato etanólico de tiririca	0	aВ	0	aВ	0	aB						
Extrato clorofórmico de tiririca	0	aВ	0	aВ	0	aВ						
Extrato hexânico de tiririca	1,50	aВ	0	aВ	0	aВ						

Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na vertical não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukev.

<sup>\*-</sup> Indica inibição total de crescimento da bactéria, com os 86,18 mm representando o diâmetro da placa de petri inteira.



Figura 29. S. mutans resistente ao óleo fixo de andiroba. Placa com ausência de halo de inibição em 48 horas

O extrato etanólico de andiroba apresentou ausência de halo de inibição, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, sendo constatado nesses tempos, a presença de halo de crescimento bacteriano respectivamente com média de 1,57 mm, 2,31 mm e 4,34 mm de diâmetro (Tabela 13).

A amostra de extrato hexânico de andiroba apresentou ausência de halo de inibição, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, sendo constatado nos tempos de 48 e 72 horas a presença de halo de crescimento bacteriano respectivamente com média de 3,66 mm e 1,23 mm de diâmetro descrito na Tabela 13.

Nas amostras de óleo fixo e extratos hexânico e etanólico de andiroba, obtidos da casca das sementes, foi observado o estimulo ao crescimento da *S. mutans*, pois ocorreu o aparecimento de halo de crescimento bacteriano. As amostras obtidas a partir da casca de semente possuem como moléculas majoritárias os limonóides "carapina" ou "andirobina", derivados do ácido palmítico, ácido mirístico, ácido oléico, ácido linoléico descritos por Corrêa (1984) e Siqueira *et al* (2003), bem como os taninos descritos como inibidores de enzimas, como as glicosiltransferases de *Streptococcus mutans* por Hattori *et al* (1990) e Ooshima *et al* (1993).

No presente estudo era de se esperar a atividade antimicrobiana do óleo fixo e dos extratos de andiroba. Os resultados demonstraram que o extrato clorofórmico, que apresenta moléculas de média polaridade, apresentaram halo de inibição, confirmando os resultados obtidos em estudos anteriores com amostras da casca de semente (HATTORI *et al*, 1990 e OOSHIMA *et al*, 1993).

O óleo fixo e os extratos etanólico e hexânico de andiroba não apresentaram halo de inibição e sim, estimularam o crescimento bacteriano. Esses resultados não corroboram com a literatura pesquisada sobre casca de semente de andiroba.

O extrato etanólico de andiroba manteve a curva ascendente de crescimento bacteriano até 72 horas, indicando que possui moléculas nutricionais estimulando o crescimento e o desenvolvimento bacteriano. Contudo no extrato hexânico de andiroba, essas moléculas podem ter apresentado menor concentração, promovendo o crescimento do halo em 48 horas e a redução do halo em 72 horas, justificando o declínio da curva de crescimento por fatores nutricionais.

O óleo essencial de breu branco apresentou ausência de halo de inibição, no tempo de 24 horas, e manifestou inibição nos tempos de 48 e 72 horas (Figura 30) respectivamente com média de 1,48 mm e 0,72 mm de diâmetro (Tabela 13), ou seja, a bactéria *Streptococcus mutans* mostrou-se tolerante ao óleo essencial nos dois tempos avaliados.

O óleo essencial de breu branco apresenta como constituintes majoritários, o  $\alpha$ -terpinoleno (28,50%), limoneno (16,90%),  $\alpha$ -felandreno (16,70%) e  $\alpha$ -pineno (10,50%). Da resina, foram isolados o monoterpeno triidroxilado 1, os triterpenos  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e breina (LORENZI, 1992), sendo o terpinoleno a molécula descrita em maior concentração e com atividade antimicrobiana (COSTA, 1996).

Era de se esperar nessa pesquisa, que o óleo essencial de breu branco apresentasse atividade antimicrobiana, o qual manifestou tal propriedade em 48 horas, sendo reduzido o halo de inibição em 72 horas. É possível que as moléculas que desencadeiam o efeito antimicrobiano sobre a *Streptococcus mutans* apresentem menor peso molecular facilitando a volatilidade da amostra, onde o fator tempo permite a perda de seus constituintes.

A amostra de óleo essencial de breu branco com linalol de pau rosa apresentou presença de halo de inibição nos tempos de 24, 48 e 72 horas respectivamente com média de 0,98 mm,

1,29 mm e 1,13 mm de diâmetro (Tabela 13), ou seja, a bactéria *Streptococcus mutans* mostrouse tolerante a essa mistura.



Figura 30. *S. mutans* tolerante ao óleo essencial de breu branco. Placa com presença de halo de inibição em 48 horas. Seta indicando halo de inibição.

O linalol de pau rosa possui característica fixadora de monoterpenos e sesquiterpenos, predominante nas moléculas majoritárias contidas no óleo de *Aniba roseodora* Ducke. Entre estas, o linalol obtido de folhas de pau rosa, descrito por Zoghbi *et al* (1996), é um dos álcoois fixadores de terpenos aromáticos observado por Oashi *et al* (1997).

A atividade antimicrobiana da mistura de óleo essencial de breu branco com linalol de pau rosa era esperada pelo presente estudo, a qual se apresentou em todos os tempos avaliados, com uma discreta redução, por volatilidade de seus constituintes, do halo de inibição em 72 horas. Contudo o resultado corrobora com pesquisas anteriores, destacando-se a capacidade fixadora do linalol obtido de folhas de pau rosa, por sinergismo molecular, de monoterpenos contidos no óleo essencial breu branco obtido do caule, a qual justifica a atividade antimicrobiana sobre a *Streptococcus mutans*. Assim, essa característica foi potencializada com a mistura quando comparada ao óleo essencial extraído do caule de *Protium heptaphyllum* March.

O óleo fixo de castanha do brasil apresentou ausência de halo de inibição, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, ou seja, a bactéria *Streptococcus mutans* mostrou-se resistente ao óleo. O óleo fixo de castanha do brasil obtido das sementes possui dentre os seus constituintes o ácido gálico, que apresenta atividades antibacterial descrito por Harborne e Baxter (1993). Era de esperar, portanto, alguma atividade antimicrobiana, o que não se observou no presente estudo.

Os extratos etanólico e clorofórmico de cipó cravo obtidos do caule apresentaram ausência de halo de inibição nos tempos de 24, 48 e 72 horas. A amostra de extrato hexânico de cipó cravo apresentou no tempo de 24 horas, ausência de halo de inibição, sendo constatada a presença de halo de inibição nos tempos de 48 e 72 horas respectivamente com média de 1,14 mm e 0,98 mm de diâmetro (Tabela 13), sendo a bactéria *Streptococcus mutans* considerada tolerante a esse extrato.

Os extratos do cipó cravo obtidos do caule apresentam como moléculas majoritárias eugenol, tinantina e ácido tânico descritos por Woodruff (1995), bem como os taninos justificando ação bactericida segundo Scalbert (1991) e Chung *et al* (1998). Era naturalmente de se esperar a ação antimicrobiana desses extratos. Contudo, somente o extrato hexânico de cipó cravo apresentou essa característica no tempo de 48 horas, sendo reduzida à inibição em 72 horas, sugerindo a presença de moléculas de menor polaridade e volatilidade sobre a bactéria *Streptococcus mutans*.

O óleo resina de copaíba apresentou ausência de halo de inibição, nos tempos de 24 e 48 horas, sendo constatada a presença de halo de inibição no tempo de 72 horas com média de 3,01 mm de diâmetro (Tabela 13), sendo a bactéria *Streptococcus mutans* sensível ao óleo (Figura 31).

As amostras de óleo resina de copaíba obtido do caule apresentam como moléculas majoritárias, os sesquiterpenos como  $\alpha$ -copaeno, trans- $\beta$ -cariofíleno, trans- $\alpha$ -bergamoteno,  $\delta$ -cariofíleno óxido e ácidos diterpênicos como o copálico e o 3- acetoxicopálico descritos por Veiga Jr *et al* (1995), Cascon e Gilbert, (2000), bem como o  $\beta$ -bisabolol com propriedade antiinflamatória relatada por Shimizu *et al* (1990) e o  $\beta$ -cariofíleno com atividade bactericida pesquisada por Kang *et al* (1992), antitumoral verificada por Zheng *et al* (1992) e também antiinflamatória observada por Shimizu *et al* (1990).



Figura 31. *S. mutans* sensível ao óleo resina de copaíba. Placa com presença de halo de inibição em 72 horas. Seta indicando halo de inibição.

Naturalmente era de se esperar a propriedade antimicrobiana desse óleo, o que foi observado após 72 horas, devido ao tempo de difusão molecular no meio de cultura sólido e à ação das moléculas contra a bactéria *S. mutans*.

A amostra de óleo fixo de semente da jaca apresentou ausência de halo de inibição, nos tempos de 24, 48 e 72, horas, sendo constatada nesses tempos, a presença de halo de crescimento bacteriano (Figura 32) respectivamente com média de 0,90 mm, 2,26 mm e 2,32 mm de diâmetro (Tabela 13).

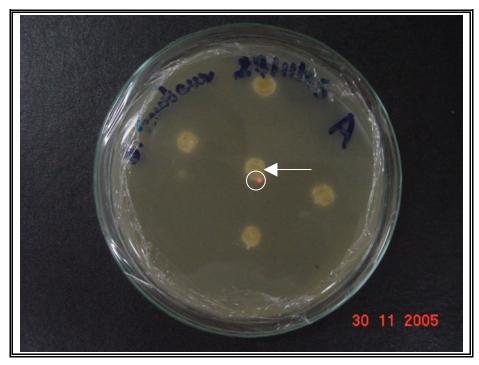


Figura 32. Óleo fixo de jaca com halo de crescimento em 72 horas. Circulo indicando área do disco, seta indicando área de crescimento.

O extrato clorofórmico de jaca obtido das cascas de semente apresentou ausência de halo de inibição, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, sendo constatada nesses tempos, a presença de halo de crescimento bacteriano respectivamente com média de 0,80 mm, 1,43 mm e 1,11 mm de diâmetro (Tabela 13). Os extratos etanólico e hexânico de jaca obtido das cascas de semente apresentaram nos tempos de 24, 48 e 72 horas ausência de halo de inibição. O óleo fixo e os extratos de sementes de jaca possuem como seus constituintes químicos majoritários, os carboidratos, as fibras, as vitaminas do complexo B e as lectinas (BALBACH, 1985). As lectinas obtidas de sementes de jaca possuem a capacidade de aglutinar células, conhecida como fitoaglutinina segundo Simões *et al* (1999).

Do óleo fixo e o extrato clorofórmico de sementes de jaca era de se esperar a propriedade antimicrobiana por aglutinação de bactérias por intermédio das lectinas. Contudo, os resultados mostraram que as moléculas majoritárias como carboidratos e vitaminas do complexo B são moléculas nutricionais estimulando o crescimento bacteriano. Obteve-se crescimento até 48 horas, com redução do halo em 72 horas talvez por carência nutricional, determinada pelo declívio da curva natural de crescimento bacteriano.

O óleo essencial de semente de laranjinha apresentou presença de halo de inibição, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, com médias respectivamente de 86,18 mm, 86,18 mm e 31,09 mm de diâmetro (Tabela 13), ou seja, a bactéria *Streptococcus mutans* mostrou-se altamente sensível ao óleo (Figura 33). O halo de inibição de 86,18 mm representa todo o diâmetro da placa de petri, indicando com isso, que esse extrato inibiu o crescimento da bactéria em toda a placa. Esta característica pode ser justificada por sua boa capacidade de difusão molecular volátil em meio de cultura, demonstrando ser altamente tóxica devido à eliminação completa do *Streptococcus mutans* em meio de cultura, necessitando assim, avaliação posterior do teor de toxicidade. A ação antimicrobiana do óleo essencial da laranjinha foi surpreendente, visto que as plantas desse gênero apresentam atividade antiparasitária e vermífuga. Foi a amostra de maior difusão molecular em meio sólido, apresentando inibição completa na placa de petri, possibilitado até 72 horas. Conferindo assim, a melhor propriedade antimicrobiana sobre o *S. mutans* analisado nesse estudo.



Figura 33. *S. mutans* sensível ao óleo essencial de laranjinha. Placa com presença de halo de inibição em 72 horas, com ausência de crescimento bacteriano em toda a placa.

O óleo essencial de pau rosa obtido de folhas apresentou presença de halo de inibição, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente com médias de 2,98 mm, 3,07 mm e 3,04 mm de

diâmetro (Tabela 13), ou seja, a bactéria *Streptococcus mutans* mostrou-se sensível ao óleo. O óleo essencial de pau rosa obtido de galhos e folhas possui como moléculas majoritárias α-pineno, limoneno, mirceno, 1,8 cineol, linalol, alfa-terpineol, sesquiterpenos, linalil, acetato e geraniol (ZOGHBI *et al*, 1996). Segundo Chaar (2000) o linalol obtido de galhos e folhas apresentou propriedade antibacteriana. O resultado esperado com o óleo essencial de pau rosa obtido de folhas, com sua ação bactericida, encontra resposta na literatura e esse estudo confirmou sua atividade antimicrobiana sobre o *S. mutans* em todos os tempos analisados. Contudo, houve uma sutil redução do halo de inibição em 72 horas, sugerindo a presença de moléculas voláteis e sua respectiva redução de concentração em relação ao tempo.

O óleo essencial das folhas de sacaca apresentou ausência de halo de inibição, nos tempos de 24 e 48 horas, sendo constatada a presença de halo de inibição em 72 horas com média de 0,09 mm de diâmetro (Tabela 13), ou seja, a bactéria *Streptococcus mutans* mostrando-se tolerante ao óleo (IRIARTE, 1975). O óleo essencial de sacaca obtido de folhas possui como moléculas majoritárias, apresentam o linalol descrito por Zoghbi *et al* (1996), que apresentam ação antiinflamatória e antinociceptiva (inflamações em geral) e bactericida; pineno, sabineno, estragol, linearisina, magno florina (VIEIRA, 1991).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial obtido de folhas de sacaca era esperada. No entanto, apresentou o menor halo de inibição sobre o *S. mutans* nessa pesquisa. Pelos resultados obtidos a partir de 72 horas, é possível que os compostos antimicrobianos apresentem dificuldade de difusão em meio sólido, que impossibilitaram o distanciamento da amostra em relação ao disco.

O óleo essencial dos tubérculos de tiririca apresentou presença de halo de inibição bacteriano, nos tempos de 24, 48 e 72 horas (Figura 34), respectivamente com médias de 2,58 mm, 2,31 mm e 1,94 mm de diâmetro (Tabela 13), ou seja, a bactéria *Streptococcus mutans* mostrou-se sensível ao óleo, segundo os critérios de Iriarte (1975).

O extrato hexânico de tiririca apresentou no tempo de 24 horas, presença de halo de inibição bacteriano com média de 1,50 mm de diâmetro (Tabela 13), ou seja, a bactéria *Streptococcus mutans* mostrou-se tolerante ao óleo, segundo Iriarte (1975).



Figura 34. *S. mutans* sensível ao óleo essencial de tiririca. Placa com presença de halo de inibição em 72 horas. Seta indicando halo de inibição.

Como moléculas majoritárias, o óleo essencial e os extratos de tiririca obtidos dos tubérculos possuem o ciproteno, cipera-2,4-dieno,  $\alpha$ -copaeno, cipereno,  $\alpha$ -selineno, rotundeno, valenceno,  $\gamma$ -gurjuneno, *trans*-calameno,  $\delta$ -cadineno,  $\gamma$ -calacoreno, epi- $\alpha$ -selineno,  $\alpha$ -muuroleno,  $\gamma$ -muuroleno e o cadaleno (JOULAIN e KONIG, 1998), ciperol, isociperol (HIKINO *et al*, 1967) e  $\alpha$ -ciperona por (HOWE e MCQUILLIN, 1955); (HAAKSMA *et al*, 1992), apresentando características antimicrobianas descritas por Robbers *et al* (1997).

Estudos simples sobre o efeito de um agente antimicrobiano no crescimento bacteriano em culturas, podem fornecer vários tipos de informação de valor para a compreensão e orientação de seu emprego terapêutico. Nestas se incluem a sensibilidade do microrganismo, a cinética de inibição e a presença ou ausência de lise e a atividade bactericida (DAVIS *et al*, 1973).

Deve-se levar em consideração dois fatores importantes, que são a toxidez e a velocidade de difusão das amostras no meio de cultura, que é inversamente proporcional ao peso molecular das substâncias.

As amostras em que ocorreu redução do diâmetro do halo de inibição em relação ao tempo demonstram volatilidade, permitindo assim, a redução de seu efeito antimicrobiano. Contudo, pode-se acrescentar uma substância fixadora inerte que mantenha essas características por mais tempo, como demonstrado pela mistura de óleo essencial de breu branco com o linalol de pau rosa.

Nas amostras que apresentaram halo de crescimento, a bactéria, além de resistente aos seus constituintes majoritários, foi estimulada pelos constituintes nutricionais, ocorrendo um maior crescimento sobre o disco de papel onde se encontrava o material estudado.

A amostra do óleo essencial de laranjinha obtido das folhas apresentou excelente propriedade antimicrobiana sobre a *S. mutans*, por sua capacidade difusiva em meio sólido de ação contra a bactéria. Contudo, necessita ser estudada para isolar e descrever seus constituintes, para posteriormente amenizar sua toxidade, viabilizando seu potencial biotecnológico na elaboração de um produto.

Os fatores tempo e a forma de armazenagem das amostras é muito importante, pois se verifica no presente estudo, que algumas apresentam como constituintes majoritários, moléculas voláteis, as quais, durante o período de incubação, demonstraram redução do halo de inibição, justificando a perda das moléculas que desencadeiam a propriedade antimicrobiana sobre o *S. mutans*.

A importância dos mecanismos de ação antibacteriana é destacada na literatura descrita por Trabulsi *et al* (2002), seja pelo bloqueio do metabolismo bacteriano no citoplasma, com a entrada de moléculas que provocam essa ação no microrganismo, ou pela restrição e impedimento da entrada das moléculas imprescindíveis para o metabolismo bacteriano. Através do posicionamento nos receptores e canais existentes na membrana plasmática desses microrganismos, conferindo a essas moléculas, a propriedade antimicrobiana por sinergismo quando comparada a outras moléculas semelhantes em estrutura e função utilizadas normalmente pelas bactérias.

#### 5.2 Análise qualitativa da atividade removedora de biofilme

Para que ocorra a ação dos ácidos na superfície do esmalte dentário é necessário que as bactérias estejam aderidas à superfície do dente. O *Streptococcus mutans* é o responsável pela produção de mutano, polissacarídeo extracelular, cuja finalidade é causar a aderência na formação do biofilme.

Barbieri (2005), estudando a aderência *in vitro* do *Streptococcus mutans*, observou que houve certa uniformidade no padrão de aderência das amostras até 24 horas de incubação, e que após este período, houve um acentuado aumento na aderência. Entre os diferentes sorotipos de *Streptococcus mutans*, principalmente com relação à expressão de aderência, existem variações entre isolados de espécies diferentes e até da mesma espécie (MATTOS-GRANER, 1999).

Os óleos em geral apresentam múltiplas propriedades, contudo esse estudo avaliou a propriedade de antiaderência ou removedora, a qual foi testada sobre o *Streptococcus mutans* aderido na forma de biofilme *in vitro*. No primeiro momento foi realizado um teste visual, a fim de constatar a desagregação das bactérias em contato direto com os fragmentos dentários. As amostras dos óleos que não apresentaram a capacidade de dissolução do biofilme aderido ao fragmento dentário foram o extrato etanólico da casca de semente de andiroba, o extrato hexânico da casca de semente de andiroba, o óleo essencial do caule de breu branco com linalol de paurosa, o óleo fixo da semente de castanha do brasil, o extrato clorofórmico do caule de cipó cravo, o extrato etanólico do caule de cipó cravo, o extrato etanólico da casca de semente de jaca, o extrato etanólico da casca de semente de jaca, o extrato etanólico da casca de semente de jaca, o extrato etanólico da casca de semente de jaca, o extrato etanólico da casca de semente de jaca, o extrato etanólico da casca de semente de jaca, o extrato etanólico da casca de semente de jaca e o óleo essencial da semente de sacaca.

As amostras que apresentaram a capacidade de remoção do biofilme foram: óleo fixo da casca de semente de andiroba, óleo essencial do caule de breu branco, extrato hexânico do caule de cipó cravo, óleo resina do caule de copaíba, óleo fixo da casca de semente de jaca, óleo essencial das folhas de laranjinha, óleo essencial das folhas de pau rosa, extrato clorofórmico dos tubérculos de tiririca, extrato etanólico dos tubérculos de tiririca, extrato hexânico dos tubérculos de tiririca e óleo essencial dos tubérculos de tiririca (Figura 35).

A observação das diferentes amostras de óleos e extratos sugere mecanismos diferenciados de dissolução do biofilme, devido às forças intermoleculares presente nos

constituintes dos óleos e extratos e no biofilme, reduzindo sua hidrofobicidade (Prabu *et al*, 2006) ou através de uma interação hidrofóbica entre moléculas constituintes dos óleos e extratos (p.ex. moléculas apolares como hidroarbonetos sesquiterpênicos) com a própria superfície do esmalte dentário em competição com o biofilme. São necessários estudos experimentais posteriores, para elucidação dos mecanismos envolvidos neste processo.

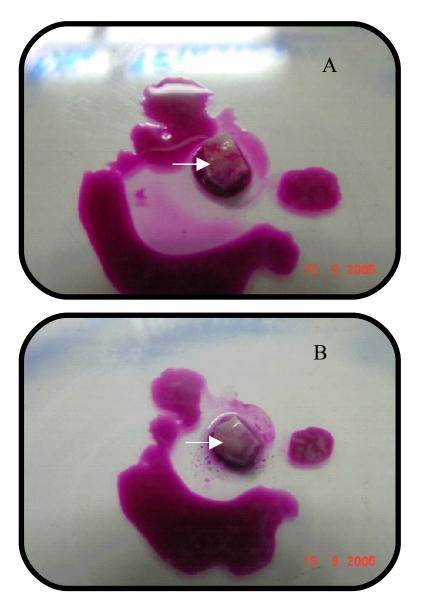


Figura 35. Teste de remoção do biofilme com óleo essencial de tiririca. A: Fragmento dentário com biofilme formado, seta indicando área com biofilme evidenciado. B: Fragmento dentário após 5 min de aplicação de óleo de tiririca, seta indicando área de remoção do biofilme.

#### 5.2.1 Análise semi-quantitativa da atividade removedora do biofilme

Os resultados da análise semi-quantitativa da atividade removedora do biofilme, produzido por *Streptococcus mutans*, evidenciada pelos extratos e óleos testados são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Quantificação através de espectrometria de UV-Vis, de células removidas pelos óleos e extratos vegetais.

Material analisado (óleos e extratos)	Absorvância - 620 ηm		620 ηm	Média da Absorvância	Estimativa de células x			
	Α	В	С		10 <sup>5</sup> / mL			
Óleo fixo de andiroba	0,481	0,452	0,454	0,462	36,5			
Óleo essencial de breu branco	1,243	1,248	1,024	1,172	92,6			
Extrato hexânico de cipó cravo	0,792	0,787	0,475	0,685	54,1			
Óleo resina de copaíba	0,191	0,075	0,076	0,114	9,0			
Óleo fixo de jaca	0,099	0,109	0,103	0,104	8,2			
Óleo essencial de laranjinha	0,093	0,126	0,123	0,114	9,0			
Óleo essencial de pau rosa	0,060	0,060	0,010	0,043	3,4			
Óleo essencial de tiririca	1,255	1,256	1,405	1,305	103,1			
Extrato clorofórmico de tiririca	0,023	0,033	0,033	0,030	2,4			
Extrato etanólico de tiririca	0,707	0,978	0,979	0,888	70,2			
Extrato hexânico de tiririca	0,122	0,116	0,062	0,100	7,9			
Clorexidine	0,038	0,038	0,035	0,037	2,9			
Eugenol	0,019	0,019	0,020	0,019	1,5			
Controle – Propilenoglicol	0,019	0,019	0,019	0,019	1,5			
Padrão - Propilenoglicol mais inócuo	0,077	0,084	0,082	0,081	6,4			

O óleo essencial do tubérculo de tiririca manifestou 68,7 vezes mais atividade quando comparada com o controle e eugenol. Se comparado com a clorexidine, sua atividade foi 35,3 vezes maior. O extrato etanólico de titirica, de alta polaridade, apresentou 46,8 vezes mais atividade comparada ao controle e eugenol, em relação à clorexidine sua atividade foi 24,0 vezes maior. A fração apolar formada pelo extrato hexânico de tiririca, demonstrou 5,3 vezes maior

atividade que o controle e eugenol. Quando comparado à clorexidine, apresentou 2,7 vezes mais atividade e a fração de menor eficiência foi o extrato clorofórmico de tiririca, com média polaridade, a qual apresentou 1,6 vezes maior atividade comparada com o controle e eugenol. Contudo, se comparado à clorexidine, esta demonstrou 1,2 vezes mais atividade do que o extrato.

O óleo essencial do caule de breu branco apresentou 61,7 vezes mais atividade em relação ao controle e o eugenol. Quando comparado à clorexidine apresentou 31,7 mais atividade. O extrato hexânico de cipó cravo manifestou 36,1 vezes mais atividade do que o controle e eugenol. Se comparado à clorexidine apresentou 18,5 vezes maior atividade. O óleo fixo das cascas semente de andiroba demonstrou 24,3 vezes mais atividade que o controle e eugenol. Em relação à clorexidine apresentou 12,5 vezes mais atividade. O óleo resina do caule de copaíba apresentou 6,0 vezes mais atividade comparada ao controle e eugenol. Comprado à clorexidine apresentou 3,1 vezes mais atividade. Contudo, segundo Bandeira *et al* (1999) a parte essencial do óleo resina do caule de copaíba apresenta melhor ação bactericida do que a ação bacteriostática, quando comparada à parte resinosa. O óleo essencial das folhas de laranjinha apresentou 6,0 vezes mais atividade do que o controle e eugenol. Em relação à clorexidine apresentou 3,1 vezes maior atividade. O óleo fixo da casca de semente de jaca apresentou 5,5 vezes mais atividade que o controle e eugenol. Comparado à clorexidine que apresentou 2,8 vezes mais atividade. O óleo essencial das folhas de pau rosa apresentou 2,3 vezes mais atividade do que o controle e eugenol. Quando comparado à clorexidine apresentou 1,2 vezes mais atividade.

A clorexidine, quando comparada ao controle, apresentou 1,9 vezes mais atividade. O eugenol demonstrou igual atividade comparada ao controle.

A análise demonstrou melhor atividade removedora de biofilme nos óleos e extratos contendo moléculas polares, como o extrato etanólico dos tubérculos de tiririca, o qual se observa boa atividade para esse estudo (Figura 36).

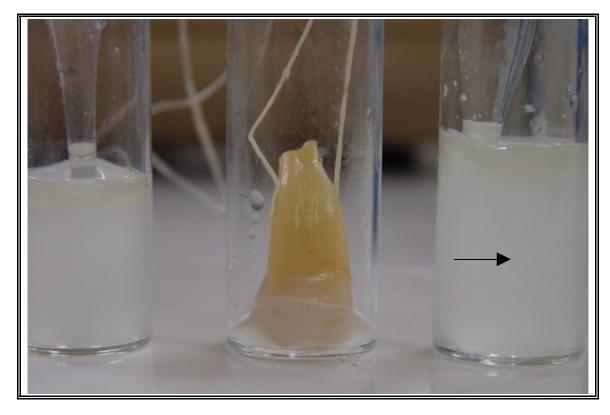


Figura 36. Análise da remoção do biofilme para teste semi-quantitativo, seta demonstrando a turbidez após 5 min de contato com a amostra.

#### 5.3 Análise da atividade antiácida

No intuito de comprovar qual das substâncias apresentava características antiácidas, as análises tiveram como parâmetro de comparação as amostras controles, formadas por meio líquido com bactérias. No caso de amostras diluídas, o controle usado foi o meio líquido com bactérias, adicionado aos extratos diluídos com propilenoglicol (Figura 37).

Os valores de pH em torno da neutralidade são os mais adequados para a absorção de alimentos para a grande maioria das bactérias. Existem, no entanto, grupos adaptados a ambientes ácidos e alcalinos (TRABULSI *et al*, 2002).

Os extratos etanólico da casca de semente de jaca e extrato clorofórmico do caule de cipó cravo, assim como os óleos fixos da semente de castanha do brasil e óleo essencial das folhas de laranjinha apresentaram pH igual ao controle com valor estável de 5,5 em média.

Os extratos etanólico e hexânico das cascas de sementes de andiroba, o extrato etanólico dos tubérculos de tiririca e o extrato etanólico do caule de cipó cravo, bem como o óleo essencial do caule de breu branco mais linalol de pau rosa, apresentaram valores de pH entre 5,5 e 6,0 em média.

O extrato hexânico dos tubérculos de tiririca, os extratos clorofórmico e hexânico das cascas de semente de jaca, o extrato hexânico do caule de cipó cravo, como os óleos essencial das folhas de sacaca e óleo fixo das sementes de jaca permaneceram com valores de pH entre 6,0 e 7,0 em média.

O extrato clorofórmico dos tubérculos de tiririca, o óleo essencial do caule de breu branco, o óleo essencial das folhas de pau rosa, e o óleo essencial dos tubérculos de tiririca mantiveram seus valores de pH 5,0 em média.

O óleo fixo das cascas de semente de andiroba apresentou pH de 4,5 em média, favorecendo o crescimento bacteriano. O óleo resina do caule de copaíba demonstrou o menor valor de pH de 4,0 em média, sendo, portanto de maior estímulo para o crescimento bacteriano.

No presente estudo verificou-se que o controle estabelecido somente com meio líquido contendo a bactéria apresentou pH 5,5. No entanto, o controle contendo meio líquido adicionado com propilenoglicol apresentou pH 7,5, alcalinizando o meio. O mesmo foi observado no extrato clorofórmico das cascas de semente de andiroba, o qual apresentou propriedade antiácida inibindo o crescimento bacteriano do *S. mutans* com pH 7,5 alcalino.

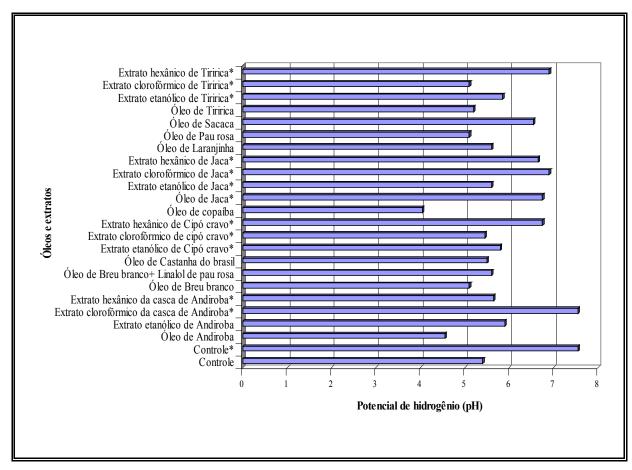


Figura 37. Avaliação da média de pH da amostras \*amostras diluídas em propilenoglicol.

A bactéria *S. mutans* necessita de um meio ideal para sua reprodução onde o pH seja ácido, preferencialmente menor que 5,5. Na variação de acidez descrita por Bradshaw *et al* (1997), verifica-se que as bactérias odontopatogênicas permanecem com seu crescimento estável em pH acima de 5,5, pois a saliva possui propriedade tampão que estabiliza o pH mantendo-o entorno da neutralidade no valor 7,0. Contudo, entre 5,5 e 5,0 as bactérias odontopatogênicas desencadeiam o seu crescimento acentuando quando o pH cai para valores menores que 5,0.

A curva de Stephan descrita por Jenkins (1978) analisa a influência do pH no processo de desmineralização com perda de Ca<sup>+2</sup> e PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> do esmalte dentário. Ocorrendo quando o pH da saliva é menor que 5,5 nos primeiros 10 minutos após a ingestão de alimentos ricos em sacarose, e a remineralização onde o pH retorna a sua condição de neutralidade após, 20 minutos e o esmalte dentário incorpora de volta os íons Ca<sup>+2</sup> e PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>.

No entanto para que haja crescimento bacteriano é necessária uma análise multifatorial levando em consideração a nutrição, o pH, o microrganismo e a predisposição do hospedeiro. Os valores de pH facilitam a percepção do meio mais ou menos adequado para a proliferação do crescimento de bactérias odontopatogênicas, como o *S. mutans* em meio salivar.

#### 6 CONCLUSÕES

Nas avaliações das propriedades antimicrobianas, o *Streptococcus mutans* apresentou sensibilidade ao óleo essencial do caule de *Protium heptaphyllum* March, ao óleo essencial do caule de *Protium heptaphyllum* March com o óleo essencial das folhas de *Aniba roseodora* Ducke, ao óleo resina do caule de *Copaifera multijuga* Hayne, ao óleo essencial das folhas de *Guatteria citriodora* Ducke, ao óleo essencial das folhas de *Aniba roseodora* Ducke, ao óleo essencial das folhas de *Croton cajucara* Benth e ao óleo essencial dos tubérculos de *Cyperus rotundus* L., bem como o extrato clorofórmico da casca de semente de *Carapa guinensis* Aubl, o extrato hexânico do caule de *Tynanthus elegans* Miers e o extrato hexânico dos tubérculos de *Cyperus rotundus* L. O *Streptococcus mutans* foi mais sensível ao óleo essencial das folhas de *Guatteria citriodora* Ducke, apresentando inibição total da placa de Petri com meio sólido.

O óleo fixo das sementes e o extrato clorofórmico das cascas de semente de *Artocarpus integrifolia* L.F., o óleo fixo das cascas de semente e os extratos hexânico e etanólico das cascas de sementes de *Carapa guinensis* Aubl., estimulam o crescimento reprodutivo de colônias de *Streptococcus mutans*.

O óleo essencial dos tubérculos de *Cyperus rotundus* L.; o óleo essencial do caule de *Protium heptaphyllum* March; o extrato hexânico do caule de *Tynanthus elegans* Miers; o óleo fixo das cascas de semente de *Carapa guianensis* Aubl.; o extrato etanólico dos tubérculos de *Cyperus rotundus* L.; o óleo resina do caule de *Copaifera multijuga* Hayne; o óleo essencial das folhas de *Guatteria citriodora* Ducke; o óleo fixo das cascas de semente de *Artocarpus integrifolia* L.F.; o extrato hexânico dos tubérculos de *Cyperus rotundus* L; o óleo essencial das folhas de *Aniba roseodora* Ducke e o extrato clorofórmico dos tubérculos *Cyperus rotundus* L.; apresentaram em ordem decrescente, a propriedade removedora de biofilme após contato por 5 minutos com as amostras.

A análise da propriedade antiácida, demonstrou que o extrato clorofórmico das cascas de semente de *Carapa guinensis* Aubl e o controle formado pela cultura em meio líquido mais propilenoglicol apresentaram pH 7,5, dificultando o crescimento bacteriano.

São necessários estudos mais específicos em relação às atividades antimicrobianas das amostras consideradas significativas, inclusive a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), verificação de sua toxicidade em seres humanos e validação química e biológica das análises. Do mesmo modo são necessários estudos experimentais posteriores, para elucidação dos mecanismos envolvidos no processo de antiaderência das amostras mais ativas.

As espécies escolhidas para as pesquisas desenvolvidas neste trabalho apresentam potencial biotecnológico para elaboração de produtos fitoterápicos de baixo custo, pois as plantas são adaptadas ao clima amazônico, rústicas e de fácil cultivo e manejo, viabilizando a obtenção dos seus óleos e extratos para elaboração e comercialização no mercado de produtos odontológicos a fim de combater ou controlar a *Streptococcus mutans* e a cárie dentária.

#### 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, 1995. 469 p.
- AFONSKY, D. Saliva and Its Relation to Oral Health. A Survey of the Literature. Montmery, Ala.: University of Alabama Press, 1961. p. xxii-xxiv.
- ALALUUSUA, S.; MATTÖ, J.; GRÖNROOS, L.; INNILA, S.; TORKKO, H.; ASIKAINEM, S.; JOUSIMIES-SOMER, H.; SAARELA, M. Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries, 1996. Archives of Oral Biology, v. 41, p.167-73.
- <u>ALALUUSUA, S.</u>; <u>NYSTROM, M.</u>; <u>GRONROOS, L.</u>; <u>PECK, L</u>. Caries-related microbiological findings in a group of teenagers and their parents. *Caries Res.*, 1989. v. 23, p. 49-54.
- ALBUQUERQUE, J. M. Plantas Medicinais de Uso Popular. Brasília: Editora MEC, 1989.
- ALDSWORTH, T.G.; MACFARLANE, T.W. A novel "in vitro" model system to grow films of oral bacteria for study of human tooth root surface caries. Journal of Applied Microbiology, v. 91, p. 139-146, 2001.
- ALENCAR, J. C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne Leguminosae, na Amazônia Central. 2 Produção de óleo resina. Acta Amazônica, v. 12 n. 1, p. 75-89, 1982.
- ALENCAR, J. C.; FERNANDES, N. P. Desenvolvimento de árvores nativas em ensaios de espécies, 1 Pau-rosa (*Aniba Duckei* K.), 1978. Acta Amazônica 8 (4): 523-541.

- ALLAN R. D.; CORREL, R. L.; WELLS, R. J. Two new phenolic ketones from *Remirea maritima* (Cyperaceae) Tetrahedron Letters, 1969. 53. p. 4673-4674.
- ANDRADE, E. H.; ZOGHBI, M. D.; MAIA, J. G. Volatiles from the leaves and flowers of *Carapa guianensis* Aubl. Journal of Essential Oil Research. v. 13, pages 436-438, nov./dez., 2001.
- ARAÚJO, V. C.; CORRÊA, G. C.; MAIA, J. M. S.; MARX, M.C.; MAGALHÃES, M. T.; SILVA, M. L.; O. R. GOTTLIEB. 1971. Óleos essenciais da Amazônia contendo linalol. Acta Amazônica, v. 1, n. 3, p. 45-47.
- ARNOLD, F. A., Jr.; McCLURE, F. J. A study of the relationship of oral *Lactobacillus acidophilus* and saliva chemistry of dental caries, 1941. Public Health Rep., v. 56, 1495 p.
- AZEVEDO, R.V.P. NELSON FILHO, P.; ASSED, S.; ITO, I. Y. Streptococci of the *mutans* group: Isolation, Identification, and prevalence of species in the saliva of mother-child pairs. Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo,1998. v. 12, n. 1, p. 47-50.
- BACCHI, O. Plantas invasoras de culturas, 1989. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. 840 p.
- BAE, E.A.; HAN, M.J.; LEE, M. AND KIM, D.H. In vitro inhibitory effect of some flavonoids on rotavirus infectivity, Biological and Pharmaceutical Bulletin, v. **23**, 2000, p. 1122–1124.
- BALBACH, A. As frutas na medicina doméstica Ed. EDEL, 21ª ed. Itaquaquecetuba São Paulo, 1985. p. 201-203.
- BALBACH, A. Sistemas de Angiosperma do Brasil, 1987. Editora da Universidade de São Paulo. 255 p.

- BANDEIRA, M. F. C. L.; OLIVEIRA, M. R. B.; BENATTI NETO, C.; LIA, R. C. C. . Estudo comparativo da compatibilidade biológica em molares de rato do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba), associados ao hidróxido de cálcio. JBC Jornal Brasileiro de Clínica Estética Em Odontologia, Curitiba, v. 3, n. 16, p. 42-49, 1999.
- BANDEIRA, M. F. C. L.; OLIVEIRA, M. R. B.; PIZZOLITTO, A. C.; BENATTI NETO, C.; JORGE NETO, J. . Estudo farmacológico preliminar de *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba). JBC Jornal Brasileiro de Clínica Estética Em Odontologia, Curitiba, v. 3, n. 16, p. 39-41, 1999.
- BANDEIRA, M. F. C. L.; OLIVEIRA, M. R. B.; PIZZOLITTO, A. C.; BENATTI NETO, C. Estudo preliminar da atividade antibacteriana do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba), associados ao óxido de zinco e ao hidróxido de cálcio. JBC Jornal Brasileiro de Clínica Estética Em Odontologia, Curitiba, v. 3, n. 17, p. 46-51, 1999.
- BANERJI, B.; NIGAM, S. K. Wood constituents of Meliaceae: a review. Fitoterapia, v. 55, n. 1, p. 3-36, 1984.
- BANZATTO, D. A., KRONKA, S. N. Experimentação Agrícola, 1992. Jaboticabal: FUNEP. 247p
- BARBIERI, Dicler de Sant'anna Vitor. Análise da aderência "in vitro" de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na superfície dentária. 2005. 92f. Dissertação (Mestrado em microbiologia) Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- BARRETO JR, A. G.; BISCACIA JR., E. C.; VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C.; CARVALHAES, S. F.; MACIEL, M. A. Cromato de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de copaíba (*Copaíba multijuga*) e da sacaca (*Croton cajucara*), 2005. Química Nova, 28(4).
- BAUER, W.; KIRBY, W.M.; SHEERRIS, J.C.; TURCCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology, v. 45, p. 493-496, 1966.

- BECKS, H., JENSEN, A. L.; MILLARR, C. B.Rampant dental caries: prevention and prognosis; a five year clinical survey, 1944 J. Am. Dent. Assoc., v. 31, 1189 p.
- BENTLEY, R. W.; LEIGH, J. A.; COLLINS, M. D. Intrageneric structure of Streptococcus based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences, 1991. International Journal of Systematic Bacteriology. 41 v, n. 4, p. 487-494.
- BIBBY, B. G.; Hine, M. K.; Clough, O. W. A study of a pigmented dental plaque, 1931 J. Dent. Res., v. 11, 855 p.
- BIGHETTI, E. J.; HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; BRITO, A. R. Anti-inflammatory and anticorceptive effects in rodenty of the essential oils of *Croton cajucara* Benth, 1999. Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 51, p. 1447-1453.
- BLACK, G. V. Susceptibility and immunity to dental caries, 1899. Dent. Cosmos, 41 v., 826 p.
- BOMBONATTI, P. E.; SCARANELO, R. M. Classificação das ligas para fundição com alto conteúdo de cobre de uso odontológico, em conseqüência da capacidade de sofrerem brunidura. Rev. Odontol. UNESP. v. 25, n. 1, p. 27-35, jan.-jun, 1996.
- BRAGA, W. Caracterização química dos constituintes do óleo extraído de *Copaifera cearensis*. Dissertação de Mestrado, Editora UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 1995.
- BRADSHAW, D.J.; HOMER, K. A.; MARSH, P.D.; BEIGHTON, D. Effects of conditioning films on oral microbial development, 1997. Biofouling, v. 11, p. 217-226.
- BRATTHALL, D. Caries, views and perspectives, 1992. Scandinavian Journal of Dental Research, v. 100, p. 47-51.

- BUISCHI, L. Salivary Streptococcus mutans and caries prevalence in Brazilian schoolchildren, 1989. Comm. Dent. Oral Epid., v.17, n. 1, p. 28-30.
- BUNTING, R. W., NICKERSON, G., HARD, D. G. Further studies of the relation of bacillus acidophilus to dental caries, 1926. Dent. Cosmos, v. 68, 931 p.
- CAMPOS, Francinete Ramos. Estudo fitoquímico e biológico da casca do caule de *Bertholletia excelsa* H. B. K. 2000. 135f. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) Instituto de Ciências exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- CAMPOS, F. R.; ROSAS, S. V.; NASCIMENTO, S. K. R.; JANUÁRIO, A. H.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; CORDEIRO, M. DOS S.C. IV Jornada Paulista de Plantas Medicinais, 1999, Estudo fitoquímico de *Bertholletia excelsa* (Lecythidaceae). Painel 7.34.
- CARLSSON, P.; OLSSON, B.; BRATTHALL, D. The relationship between the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique, 1985. Archives of Oral Biology, v. 30, p. 265-268.
- CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. São Paulo Ed. Tecmedd, 2004, p. 165-180.
- CARVALHO, M. G.; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, L. F.; BEZERRA, F. B. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Mier (Lecythidaceae), 1998. Química Nova, v. 21, n. 6, p. 740-743.
- CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. Phytochemistry, 2000. v. 55, p. 773-778.

- CASTRO, A. M.; MOCHIDOME, F. I.; WANDERLEY, R. L.; NOVAES, M. S. P. *Streptococcus mutans* na cavidade bucal de bebês e sua relação com a cárie dentária. 2000. Revista do CRO-MG, v. 6, n. 1, p. 24-27.
- CAULFIELD, P. W.; CUTTER, G.R.; DASANAYAKE, A. P. Inicial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity, 1993. Journal of Dental Research, v. 72, n. 1, p. 37-45.
- CHAAR, J. S. Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans, 2000. Tese de Doutorado da Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, SP. 125 p.
- CHAMPAGNE, D. E.; KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G.E & TOWERS, G. H. N. Biological activity of limonoids from the Rutales. 1992. Phytochemistry, v. 31, n. 2, p. 337-394.
- CHAMPAGNE, D. E.; ISMAN, M.; TOWERS, G.H.N. Insecticidal activity of phytochemical and extracts of the Meliaceae. In: ARNASON, J.T.; PHILOGENE, B.J.R.; MORAND, P. (Ed.) Insecticides of plant origin. Washington: The American Chemical Society, 1989, cap. 8, p. 95-109.
- CHUNG, K.-T.; LU, Z.; CHOU, M. W. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. Food and Chemical Toxicology, v. 36, p. 1053-1060, 1998.
- CIARDI, J. E.; ROSENTHAL, A. B.; BOWEN, W.H. Rapid quantitative determination of the effect of antiplaque agents and antisera on the growth, acid production, and adherence of *Streptococcus mutans*, 1981, J. Dent Res. v. 60, p. 756-62.
- CLARKE, J. K. On the bacterial factor in the etiology of dental caries, 1924. Br. J. Exp. Path., 5 v., 141 p.

- CLAWSON, M. D. The Shammar Bedouin dental survey, 1936. Dent. Mag. Oral Topcs, v. 53, 117 p.
- COHEN, E.; QUISTAD, G. B.; CASIDA, J. H. Citoxicity of Nibolide, epoxyazadiradione and other Liminoids from neem insecticide. Life Sci. 1996, v. 58, n. 13, p. 1075-1081.
- COMPTON'S ENCYCLOPEDIA INTERACTIVE CD-ROM. Versão 5.1 COMPTON'S Home Library, 1997. Softkey International Inc.
- CONNOLLY, J. D.; MCCRINDLE, R.; OVERTON, K. H.; FEENEY, J. Heartwood constituents of *Carapa guianensis* Aubl. Tetrahedron, v. 22, p. 891-896, England, 1966.
- CONNOLLY, J. D.; MCCRINDLE, R.; OVERTON, K. H.; WARNOCK, W. D. C. Tetranortriterpenoids-III: 6-hidroxy-and 6-acetoxy-methyl angolensate from the heartwood of Khaya grandifoliola. Tetrahedron, v. 23, p. 4035-4039, 1967.
- CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, 1934. Imprensa Nacional. Rio de Janeiro. v. 1, p. 82-329.
- CORRÊA, M. P. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil-Árvores Brasileiras, 1984. Rio de Janeiro, v. I e II.
- CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil. Brasília: Instituto brasileiro de desenvolvimento florestal, Ministério da Agricultura. v. 1, p. 113-114, 1926.
- COSTA, A. F. Fármacos resinosos, 1975. In: Farmacognosia. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. v. 1, p. 773-871.
- COSTA, C. A. S.; HEBLING, J.; LIA, R. C. C.; GONZAGA, H. F. S.; VARGAS, P. A.; Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre. Estudo preliminar da compatibilidade biológica do cimento de

óxido de zinco e copaíba: avaliação histológica de implantes subcutâneos em ratos. v. 37, n. 1, p. 24-26, jul. 1996.

COSTA, Túlio de Orleans Gadelha. Contribuição ao estudo fitoquímico do gênero *Protium: P. hebetatum* (Burseraceae). 1996. 96f. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) – Instituto de Ciências exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. Óleos essenciais de plantas do Nordeste, 1981. Edições UFC, Fortaleza. p. 27-28

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants, 1981. Columbia University Press New York. 1262 p.

CUNHA, Lígia Negreiros. Influência sazonal no teor de linalol da espécie *Aniba Duckei* Kostermans plantada em ambiente natural. 2002. 133f. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) - Instituto de Ciências exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

CURY, J. A.; REBELLO, M.; A. A. D, B. C.; Derbyshire M. T. V. C.; TABCHOURY, C. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in presence of sucrose or glucose and fructose. Caries Research, 2000, v. 35, p. 491-497.

CURY J. A. Concentração de fluoreto em chás brasileiros e seu significado na prevenção de cárie, 1981. Rev. Gaúcha Odontol. v. 29, p. 136-138.

DANASSANAYAKE, M.; FOSBERG, F. R. A revised handboock of the flora of Ceylon, 1995. part. V. Balkeme, Rotterdam. 181 p.

DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H. N.; GINBERG, H. S.; WOOD, W. B. Microbiology. 2ª ed. São Paulo: Edart, 1973. p 9-54.

- DE SOET, J. J. VAN LOVEREN, C.; LAMMENS, A. J.; PAVICIC, M. J. A. M. P.; HOMBURG, C. H. E.; TEN CATE, J. M.; DE GRAAFF, J. Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*, 1991. Caries Research, v. 25, n. 2, p.116-122.
- DELLE MONACHE, F; D'ALBUQUERQUE, I. L., CORIO, E. Diterpenes from *Copaifera multijuga* Hayne. Nota I. Annales de Chimie, v. 59, p. 539-551, 1969.
- DELLE MONACHE, G; D'ALBUQUERQUE, I. L.; MONACHE, F. D.; MARINI-BETTÓLO, G. B. M.; NANO, G. M.  $\alpha$ -Multigenol, A new sesquiterpenic alcohol with caryophyllane carbon skeleton. Tethahedron Letters, v. 30, p. 659-660, 1971.
  - DEUSSEN, E. Copaiba balsam. Scientia Pharmaceutica. 1939, v. 10, p. 69-71.
- DI STASI, L. C. Plantas Medicinais: arte e ciência. Um Guia de Estudo Interdisciplinar, 1996. Ed. UNESP, São Paulo, 229 p.
- DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. Bio Pharm Bull, 2003, v. 26, n. 4, p. 527-31.
- DUCHIN, S.; VAN HOUTE, J. Colonization of teeth in humans by *Streptococcus mutans* as related to its concentration in saliva and host age, 1978. Infection and Immunity, v. 20, p. 120-125.
- EICK, S.; GROCKMANN, B.; BRANDL, B.; PFISTER, W. Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow system, 2004. Journal of Oral Rehabilitation, v. 31, p. 278-285.
- ELVIN-LEWIS M, VITALE M, KOPJAS J. Anticariogenic potential of commercial teas. J Prev Dent, v. 6, p. 273-284, 1980.

- EVERS, M., C. POUJADE, F. SOLER, Y. RIBEILL, C. JAMES, Y. LELIEVRE, J. C. GUEGUEN, D. REISDORF, I. MORIZE, R. PAUWELS, *et al.* Betulinic acid derivatives: a new class of human immunodeficiency virus type 1 specific inhibitors with a new mode of action. J. Med. Chem. v. 39, p. 1056, 1996.
- FERREIRA, L. A.; BRAZ, E. M. Avaliação do potencial de extração e comercialização do óleo-resina de copaíba (*Copaifera spp.*), 2001. The New York Botanical Garden/Universidade Federal do Acre.
- FRANDSEN, E.V.; PEDRAZZOLI, V.; KILIAN, M. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx, 1991. Oral Microbiology and Immunology, v. 6, n. 3, p. 129-133.
- FRANKEL E. N.; WATERHOUSE A. L.; TEISSEDRE, P. L. Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and Their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins. J Agric Food Chem, 1995, v.43, p.890-894.
- GAINES, S.; JAMES, T. C.; FOLAN, M.; BAIRD, A. W.; O'FARRELLY, C. 2003. A novel spectrofluorometric microassay for *Streptococcus mutans* adherence to hydroxylapatite. Journal of Microbiological Methods, v. 54, n. 3, p. 315-323.
- GIBBONS, R. J.; NYGAARD, M. Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque-forming streptococci. Archs Oral Biol, v. 13, p. 62-1249, 1968.
- GIBBONS, R. J. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. Journal of Dental Research, v. 63, p. 378-385, 1984.
- GOLD, O. G.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*, 1973, Archives of Oral Biology, v. 18, n. 11, p.1357-1364.
- GONÇALVES, J. L. S.; LOPES, R. C.; OLIVEIRA, D. B.; COSTA, S. S.; MIRANDA, M. M. F. S.; ROMANOS, M. T. V.; SANTOS, N. S. O.; WIGG, M. D. In vitro anti-rotavirus

activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. Journal of Ethnopharmacology. v. 99, n. 3, 2005, p. 403-407.

GOTTLIEB, O. R. Aniba duckei, potencial resource. Revista de Química Industrial, Rio de Janeiro, v. 26, n. 307, p. 15-19, 1957.

GOTTLIEB, O. R.; FINEBERG, M.; GUIMARÃES, M. L.; MAGALHÃES, M. T.; MARAVALHAS, M. Associação Brasileira de Pesquisas sobre Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais, Belém, v. 11, p. 1-13, 1965.

GRÖNROOS, L. Quantitative and Qualitative Characterization of Mutans Streptococci in Saliva and in the Dentition. Helsinki, 2000. 80f. Dissertação Acadêmica. Department of Pedodontics and Orthodontics, Institute of Dentistry, University of Helsinki and Department of Oral and Maxillofacial Diseases, Helsinki University Central Hospital.

HAAKSMA, A. A.; JANSEN, B. J. M.; GROOT, A. DE. Tetrahedron, Lewis acid Catalysed Diels-Alder Reactions of S-(+)-Carvone with Silyloxy Dienes. Total Synthesis of (+)-α-cyperone. v. 48, p. 3121-3130. 1992.

HAGERMAN A. E, BUTLER L.G. The specificity of proanthocyanidinprotein interactions. J. Biol. Chem., 1981, 256, p. 4494-4497.

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*, 1980. Microbiological Reviews, v. 44, p. 331-384.

HANSEN, C. J.; BURNELL, K. K.; BROGDEN, K. A. Antimicrobial activity of substance P and Neuropeptide Y against laboratory strains of bacteria and oral microorganisms, 2006. Journal of Neuroimmunology, v. 177. p. 215-218.

HARBORNE, J.B., BAXTER, H. Phytochemical Dictionary a Handbook of bioactive compounds from plants. 1993. Taylor & Francis Washigton, DC., p. 791

- HARRINGTON, D.J., RUSSELL, R. R. Identification and characterization of two extra cellular proteases of *Streptococcus mutans*, 1994. FEMS Microbiology Letters, v.121, p. 237-241.
- HASLAM, E. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action Journal Natural Products, v. 59, p. 205-215, 1996.
- HATTORI, M.; KUSUMOTO, L. T.; NAMBA, T.; ISHIGAMI, T.; HARA, Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyl transferase from *Streptococcus mutans*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v. 38, p. 717-720, 1990.
- HEIDER, M.; WEDL, C. Atlas to the pathology of the Teeth. Leipzig, Arthur Felix. 1869. In: SHAFER, W. G.; HINE, M. K.; LEVY, B. M. Tratado de patologia bucal, 1983, 4<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 384-385.
- HEUGNAUER, R. Chemotaxonomie der pflanzen eine ubersicht über die verbreitung und die systematische bedeutung der pflanzenstoffe. Dicotyledoneae: Daphniphyllaceae-Lytraceae, 1996. Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgard. v. IV, p.551
- HIKINO, H.; TAKEMOTO, T. Structure and absolute configuration of cypero and isocyperol, 1967. Chemical e Pharmaceutical Bulletin. p. 1929-1933.
- HINKELMANN, K., KEMPTHORNE, O. Design and analysis of experiments. Nova York: John Wiley, Introdution to Experimental Design. John Wiley & Sons, v. 1, p. 495, 1994.
- HOMER, K. A.; WHILEY, R. A.; BEIGHTON, D. Proteolytic activity of oral streptococci, 1990. FEMS Microbiology Letters, v. 55, p. 257-260.
- HOWE, R.; MCQUILLIN, F. J. The structure of ciperadione, 1955. Parte IV. The synthesis of natural (+)- $\alpha$ -ciperona, its enantiomorph and epimer. Journal of chemical society. p. 2423-2428.

- IRIARTE, Eliseo Gastón y Sanchiz. Microbiologia: técnicos, controles y análisis clínicos. Barcelona, Esp: Augusta, 1975.
- JACKSON, R. J.; LIM, D. V.; DAO, M. L. Identification and analysis of a collagenolytic activity in *Streptococcus mutans*, 1997. Current Microbiology, v. 34, p. 49-54.
- JAY, P.; VOORHEES, R. S. B. acidophilus and dental caries. Dent. Cosmos, v. 69, p.977, 1927.
- JENKINS G. N. The physiology and biochemistry of the mouth. 4<sup>a</sup> ed. Oxford, England: Blackwell, p. 302, 1978.
- JOLAD, S. D.; WIEDHORF, R. M. & COLE, J. R. Citotoxic agents from *Bursera klugii* (Burseraceae). I, isolation of sapelins A e B. J. Pharm. Sci., v. 66, n. 6, p. 889-890, 1977.
- JORGE, A. O. C. Microbiologia bucal, 1998. 2ª ed., São Paulo: Livraria Editora Santos, p. 104.
- JOULAIN, D.; KONIG, W. A. The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. E. B. Verlog. Hamburg, p. 281, 1998.
- KANG, R.; HELMS, R.; STOUT, M. J.; JABER, H.; CHEN, Z.; NAKATSU, T. Antimicrobial Activity of the Volatile Constituents of *Perilla frutescens* and its synergistic Effects with Polygodial.1992. J. Agric. Food Chem., v. 40, p. 2328.
- KASHKET S, PAOLINO VJ, LEWIS D, VANHOUTE J. Glucosyltransferase inhibition by tannin-like constituents of beverages. J. Dent. Res., 1985 A, v.64, n. 1, p.212.
- KASHKET S, PAOLINO VJ, LEWIS DA, VANHOUTE J. In vitro inhibition of glucosyltransferase from the dental plaque bacterium *Streptococcus mutans* by commons beverages and food extracts. Archs. Oral. Biol., 1985 B, v. 30, n. 11/12, p.821-826.

- KEYS, P.H. The infections and transmissible nature of experimental dental caries, 1960. Arch. Oral Biol, v. 1, p. 304-320.
- KHALID, S. A. Chemistry of the Burseraceae, 1983. In: WATERMAN, P. G.; GRUNDON, M. F. (Eds). Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales, Academic Press, London, p. 281-299.
- KISMANN, K. G. Plantas infestantes e nocivas. BASF-Brasileira S/A. São Paulo. p. 608. 1991.
- KLEIN, M. I.; PEREIRA, A. C.; FLORIO, F. M. Longitudinal Study of Transmission, Diversity, and Stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, 2004. Genotypes in Brazilian Nursery Children. Journal of Clinical Microbiology, v. 42, n. 10, p. 4620–4626.
- KOGA-ITO, C. Y.; UNTERKIRCHER, C. S.; WATANABE, H.; MARTINS, C. A. P. VIDOTTO, V.; JORGE, A. O. C. Caries Risk Tests and Salivary Levels of Immunoglobulins to *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in Mouthbreathing Syndrome Patients. Caries Research, v. 37, p. 38-43, 2003.
- KÖHLER, B.; BIRKHED, D.; OLSSON, S. Acid production by human strais of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, 1995. Caries Research, v. 29, n. 5, p.402-406.
- KÖHLER, B.; BRATHALL, D. Intrafamilial levels of *Streptococcus mutans* and some aspects of the bacterial transmission, 1978. Scan. J. Dent. Res., v. 86, p. 35-41.
- KÖHLER, B; BRATTHALL, D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva, 1979. Journal of Clinical Microbiology, v. 9, p.584-588.
- KOLENBRANDER, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions and genetic systems, 2000. Annual Review of Microbiology, v. 54, p.413-37.

- KOLENBRANDER, P. E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence, 1993. Journal of Bacteriology, v. 175, n. 11, p.3247-3252.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA; SCHRECKENBERGER, P. C. Diagnóstico microbiológico-texto e atlas colorido. 5ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI-Editora Médica e Científica, 2001. p. 1465.
- KREULEN, C. M., DE SOET, H. J., HOGEVEEN, R. & VEERKAMP, J. S. *Streptococcus mutans* in children using nursing bottles. ASDC Journal of Dentistry for Children, v. 64, p.107-111, 1997.
- LAGO, R. C. A.; SIQUEIRA, F. A. R. Chemical composition of paroacaxi and andiroba fatty oils. Boletim Técnico do Centro de Tecnologia Agrícola e Alimentar, v.14, p. 1-16, 1980.
- LANGENHEIM, J. H., FIGLIUOLO, R.; NAYLOR, S. WANG, J. Unusual nonprotein imino acid and its relationship to phenolic and nitrogenous compounds in *Copaifera*. Phytochemisty, v. 26, p. 3255-3257, 1987.
- LANGENHEIM, J. H., CONVIS, C. L., MACEDO, C. A., STUBBLEBINE, W. H. *Hymenaea* and *Copaifera* leaf sesquiterpenes in relation to lepidopteran herbivory in southeastern Brazil. Biochemical Systematics and Ecology, v. 14, p. 41-49, 1986.
- LARPENT, J. P. LARPENT-GOURGAUD, M. Estudo sobre o crescimento bacteriano. In: Microbiologia Prática. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 1975. cap. 3, p. 69-71.
- LAVIE, D.; LEVY, E. C.; ZELNIK, R. The constituents of *Carapa guianensis* AUbl. And their biogenetic relationship. Bioorganic Chemistry, v. 2, n. 1, p. 59-64, 1972.
- LEBER, T.; ROTTENSTEIN, J. B. Investigations on Caries of the Teeth, 1873. Translated by T. H. Chandler. Philadelphia, Lindsay and Blakiston, 94 p.

LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F.; KITAJIMA, E. W.; ISHIDA, M. L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v. 9, p.1-41, 2001.

LEMOS, T. L. G.; MACHADO, M. I. L.; MENEZES, J. E. S. A.; SOUSA, C. R. Essential oil of *Croton cajucara* Benth. Journal of Essential Oil Research, v. 11, n. 4, p. 411-412, 1999.

LENHOSSEK, M. V. Die Zahn-caries einst und jetz, 1919. Arch. Antropol. p. 17-44.

LI, Y.; CAULFIELD, P. W. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers, 1995. Journal of Dental Research., v. 74, p. 681-685.

LOESCHE, W. J. Chemotherapy of dental plaque infections, 1977. Oral Sci. Rev., v. 9. p. 65-107.

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

LOKSMART. 2006. Disponível em: <a href="http://www.loksmart.com">http://www.loksmart.com</a>. cgi-bin/go/t=lnkt:1>. Acesso em: 16 de março 2006.

LOPES, D.; BIZZO, H. R.; SA SOBRINHO, A. F.; PEREIRA, M. V. G. Linalol rich essential oil from leaves of *Croton cajucara* Benth, 2000. Journal of Essencial Oil Research, v. 12, n. 6, p. 705-708.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, 1992. Ed. Plantarum. Nova Odessa-SP. p. 352

- LORENZI, H.; MATOS, F. J.A. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. São Paulo: Nova Odessa, 2002, 428 p.
- LOUREIRO, A. A.; SILVA, M. F. 1968. Catálogo de madeiras da Amazônia. Belém, Pará. SUDAM, v. 2,1968, p. 433.
- LUCAS, Ana Cyra dos Santos. Contribuição ao Estudo Químico de Plantas da Amazônia: *Carapa guianensis* Aubl. e *C.procera* D. C. (Meliaceae). 1993. 91f. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) Instituto de Ciências exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; BRABO, S. N.; SILVA, M. N. Terpenoids from *Croton cajucara*. Phytochemistry, 1998, v. 49, n. 3, p. 823-828.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; KAISER, C. R. NMR and structure review of some natural furoclerodanes. Magnetic Resonance in Chemistry. 2003, v. 41, cap 4, p. 278-282.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares, 2002. Química Nova, v. 25 n. 3, p. 429-438.
- MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Guatteria boliviana* (Annonaceae), 2000. Phytochemistry, v. 54, n. 7, p. 709-716.
- MAIA, J. G. S., ZOGHBI, M. G. B., ANDRADE, E.H. A. Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2000. p. 73-74.
- MANUAL DIFCO, Meios de cultura desidratados e nativos para microbiologia, Difco laboratories, Detroit Michigan 48232 USA, 1984, p 1025.

MARCELLE, G. B.; MOOTOO, B. S. The mass spectra of meliacins from *Carapa guianensis*. Revista Latinoamericana de Química, v.10, p. 71-75, 1979.

MARIMOTO, M.; FUJII, Y.; KOMAI, K. Antifeedants in Cyperaceae: coumaran and quinones from *Cyperus* spp. Phytochemistry. p. 51, n. 5, p. 605-608, 1998.

MARSH, P. D. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. Dent Clin North Am 1999, v. 43, n. 4, 1999.

MASP. O Brasil dos viajantes, 1994. Catálogo da exposição realizada de 20 de outubro a 18 de dezembro de 1994. São Paulo: s.n., 67p.

MATSUMOTO M, MINAMI T, SASAKI H, SOBUE S, HAMADA S, OOSHIMA T. Inhibitory effects of oolong tea extract on caries-inducing properties of mutans streptococci. Caries Res, 1999, v. 33, n. 6, p. 441-445.

MATTHIAS, L. A.; JOHNS, E. A. Tapping an Amazônian plethora: Four medicinal planats of Marajó Island, Pará (Brazil). Journal of Ethnopharmacology v. 40, p. 53-75, 1993.

MATTOS-GRANER, R. O., JIN, S., KING, W. F., CHEN, T., SMITH, D. J. & DUNCAN, M. J. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene end coding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. Infection and Immunity, v. 69, p.6931-6941, 2001.

MATTOS-GRANER, R. O., SMITH, D. J., KING, W. F. & MAYER, M. P. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12 to 30-months-old children, 2000. Journal of Dental Research, v. 79, p.1371-1377.

MATTOS-GRANER, R. O. Relação entre os níveis bucais de estreptococos do grupo mutans, alguns de seus fatores de virulência e a incidência de cárie dental em crianças de 12 a 30 meses de idade, 1999. São Paulo, Tese de doutorado, Universidade de São Paulo.

McBRIDE, B.C.; SONG, M.; KRASSE, B.; OLSSON, J. Biochemical and immunological differences between hydrophobic and hydrophilic strain of *Streptocccus mutans*. Infect Immun, 1984, v. 44, p. 68-75.

McCHESNEY, J. D.; CLARK, A. M.; SILVEIRA, E. R. Journal of Natural Products. 1991, v. 61, p. 85-87.

MELLANBY, M. Effect of diet on the resistance of teeth to caries. Proc. R. Soc. Med., v. 16, p. 3-74, 1934.

MELLANBY, M. The relaton of caries to the structure of the teeth, 1923. Br. Dent. J., p. 1-44.

MERRITT J.; QI F.; GOODMAN S. D.; ANDERSON M. H.; SHI W. Mutation of *lux*S affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*, Infection and immunity. 2003, American Socirty for Microbiology, v. 71, n. 4, p. 1972-1979.

MILLER, W. D. New theories concerning decay of teeth, 1905. Dent. Cosmos, v. 47, 1293 p. In: SHAFER, W. G.; HINE, M. K.; LEVY, B. M. Tratado de patologia bucal, 1983. 4<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, p. 379-381.

MILLER, N. J. Rice-Evans, C. A. Antioxidant activity of resveratrol in red wine. Clin. Chem., v. 41, p. 1789, 1995.

MITSUGUI, C. S.; SANTOS, A. L. DOS; COSTA, E. A.; CASTRO, M. S. DE A.; LIMÃOS, E. A.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Estudo da atividade antinociceptiva do extrato aquoso de *Carapa guianesis* Aubl. (Andiroba). XXXIV Congresso de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Águas de Lindóia. UNIFESP 2002.

MONTANARO, L.; CAMPOCCIA, D.; RIZZI, S.; DONATI, M. E.; BRESCHI, L.; PRATI, C.; ARCIOLA, C. R. Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials, Biomaterials, 2004, v. 25, p. 4457-4463.

MORETTO, E.; FETT, R. Óleos e gorduras vegetais: processamento e análise, 1989. Florianópolis: Ed. UFSC, 2ª edição, p. 19-22.

NAPIMOGA, M. H. Avaliação do padrão de clonalidade e virulência de *S. mutans* isolados de indivíduos livres de cárie e cárie-ativos, 2004, 62f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Piracicaba, SP.

NEIDHARDT, F. C.; INGRAHAM, J. L.; SCHAECHTER, M. S. Physiology of the bacterial cell, 1990, 1st Ed., Sinauer Associates, Inc. p. 506.

NEWBRUN, E. Cariology, 2<sup>a</sup> ed, London, Williams and Williams, 1983, p 52.

NEWBRUN, E.; FINZEN, F.; SHARMA, M. Inhibition of adherence of *Streptococcus mutans* to glass surfaces, 1977, Caries Res, v. 11, p. 153-159.

NISENGARD, Russell J. & NEWMAN, Michael G. Microbiologia Oral e Imunologia. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1997, p. 110-308.

OHASHI, S. T.; ROSA, L. S.; SANTANA, J. A. Brazilian rosewood oil: sustainable production and oil quality management, 1997. Perfumer & Flavorist, v. 22, n. 2, p. 1-5.

OHIRA, S.; HASEGAWA, T.; HAYASHI, K.-I.; HOSHINO, T.; TAKAOKA, D.; NOZAKI, H.. Sesquiterpenoides from *Cyperus rotundusI*. Phytochemistry. 1998, v. 47, p. 1577-1581.

OLIVEIRA, F. A.; CHAVES, M. H; ALMEIDA, F. R. C.; LIMA JR, R. C. P.; SILVA, R. M.; MAIA, J. L.; BRITO, G. A. A. C.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Protective effect of α- and β-amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. Trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. Journal of Ethnopharmacology 2005, v. 98, p. 103-108.

- OLIVEIRA, F. C. C.; SOUZA, A. T. P. C. DE; DIAS, J. A.; DIAS, S. C. L.; RUBIM, J. C. A escolha da faixa espectral no uso combinado de métodos espectroscópicos e quimiométricos. São Paulo, Química Nova, v. 27, n. 2, Março/Abril 2004.
- OLLIS, W. D.; WARD, A. D.; ZEINIK, R. Andirobin. 1964, Tetrahedron Lett, v. 37, p. 2607-2614.
- OLLIS W. D.; WARD, A. D.; OLIVEIRA, H.M.; ZELNIK, R. Andirobin. 1970, Tetrahedron, v. 26, p. 1637-1645.
- OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; IZUMATANI, A.; SOBUE, S.; FIJIWARA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with *Streptococcus mutans*. Caries Research. v. 27, p. 124-129, 1993.
- OTAKE S, MAKIMURA M, KUROKI T, NISHIHARA Y, HIRASAWA M. Anticaries effects of polyphenolic compunds from japanese green tea. Caries Res 1991; v.25, p.438-43.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development, 2000. Annual Review of Microbiology, v. 54, p. 49-79.
- OTUKI, M. F., FERREIRA, J., LIMA, F. V., MEYRE-SILVA, C., MALHEIROS, A., MULLER, L. A. CANI, G. S., SANTOS, A. R. S., YUNES, R. A., CALIXTO, J. B. Antinociceptive Properties of Mixture of  $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -amyrin Triterpenes: Evidence for Participation of Protein Kinase C and Protein Kinase A Pathways. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. v. 313, p. 310-318, 2005.
- PAOLINO, V. J.; KASHKET, S.; SPARAGNA, C. A. Inhibition of dextran synthesis by tannic acid. J. Dent. Res., 1980, v. 59, n. 1, p. 389.
- PAREDES, A.; HASEGAWA, M.; PRIETO, F.; MENDEZ, J.; RODRIGUEZ-ORTEGA, M.; RODRIGUE-ORTEGA, M. Biological activity of *Guatteria cardoniana* fractions. Journal of Ethnopharmacology, v. 78, p. 129-132, 2001.

- PATITUCCI, M. L., VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C.; ZOGHBI, M. G. B.; SILVA, J. R. A. Utilização de Cromatografia Gasosa de Alta Resolução na Detecção de Classe de Terpenos em Extratos Brutos Vegetais. 1995. Química Nova, v.18, p. 262-266.
- PELINO, J. E. P.; Estudo *in vitro* do efeito do laser de Nd: YAG sobre o esmalte dental humano: Análise por Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita. São José dos Campos-SP, 1998. 155p.
- PEREIRA, J. F. G. Estudo químico e biológico de *Carapa guianensis* Aubl. 1998. 262 p. Dissertação (Mestrado) Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
  - PESCE, C. Plantas oleaginosas da Amazônia. O campo. p. 33-35, jun. 1934.
- PETIT, G. R.; BARTON, D. H. R.; HERALD, C. L.; POLONSKY, J.; SCHIMIDT, J. M.; CONNOLY, J. D. Evaluation of limonoids against the murine P338 lymphocytic leukemia cell line. Journal Natural Product. v. 46, p. 641, 1983.
- PETTI, S.; HAUSEN, H. W. Caries prediction by multiple salivary mutans streptococcal counts in caries-free children with different levels of fluoride exposure, oral hygiene and sucrose intake, Caries Research, v. 34, p. 380-387, 2000.
- PICKERILL, H. P.; Champtaloup, S. T. The bacteriology of the mouth in Maori children, being part of an investigation into the cause of immunity to dental disease in the Maori of the Uriwera country, 1913. New Zealand. Brit. Med. J., v. 2, 1482 p.
- PINHEIRO, José Thadeu. Avaliação comparativa das infiltrações apicais através do 131Na nas obturações de canais radiculares com cimento à base de óleo-resina de copaíba: Estudo in vitro. 1993, 77f. Tese de Doutorado, Camarajibe: Fundação Universidade de Pernambuco, Fundação de Odontologia de Pernambuco.

- PINTO, C. A.; EPIFÂNIO, R DE A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas, 2002. Química Nova, v. 25, p. 45-61.
- PINTO, C. B. C.; RAMALHO, S. S. Pau rosa. Análise conjuntural, 1970. Ministério do Interior Basa Depto. Estudos Econômicos Documento, 9 p.
- PISHA, E, CHAI, H, LEE, I.S.; CHAGWEDERA, T.E.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; BEECHER, C.W.; FONG, H.H.; KINGHORN, A.D.; BROWN, D.M.; WANI, M.C.; WALL, M.E.; HIEKEN, T.J.; DAS GUPTA, T.K.; PEZZTO, J.M. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. 1995, Nat Méd., v. 1, p. 1046–1051.
- POSEY, D. A. Introdução-Etnobiologia: teoria e prática, 1986. In: RIBEIRO,B. G. (Coord.) Suma Etnológica Brasileira- 1. Etnobiologia. Petrópolis: Vozes, Finep, 302 p.
- PRABU, G. R.; GNANAMANI, A.; Sadulla, S. Guaijaverin-plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*, 2006. Journal of Applied Microbiology, v. 101, p. 487-495.
  - PRANCE, G. T.; MORI, S. A. Árvores de Manaus, 1975. Manaus, INPA, 17 ed. 312 p.
- PRINCE, W.A. Eskimo and Indian field studies in Alaska and Canada, 1936. J.Am. Dent. Assoc., p. 23-417.
- QI, S. H.; WU, D. G.; MA, Y. B..; LUO, X. D. A Novel Flavane from *Carapa guianensis*. Acta Botânica Sinica, v. 45, n. 9, p. 1129-1133, 2003.
- QI, S. H.; WU, D. G.; MA, Y. B..; LUO, X. D. Constituents of *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae). Pharmazie, v. 59, n. 6, p. 488-490, 2004.

- QI F., KENT J., LÉVESQUE C. M., KAY O., MAIR O., MAIR R. W., SHI W., CVITKOVITCH D. G., GOODMAN S. D. Peptide pheromone induced cell death of *Streptococcus mutans*, FEMS Microbiology Letters, 2005, v. 251, p. 321-326.
- RESTARSKI, J. S. Incidence of dental caries among pureblooded Samoans, 1941. U. S. Naval Med. Bull, v. 41, 1713 p.
- RIBEIRO J. E. L. S.; HOPKIINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terrafirme na Amazônia Central, 1999. DFID (Departament for Internacional Development), INPA-Manaus, p. 816.
- ROBBERS, J.; SPEEDIE, M.; TYLER, V. E. Farmagnosia e Farmacobiotecnologia. 1997. Editora Premier. p. 580.
- ROSEN S, ELVIN-LEWIS M, BECK FM, BECK EX. Anticariogenic effects of tea in rats. 1989, J. Dent. Res., v. 63, n. 1, p. 658-660.
- SALVADOR, V. História do Brasil, 1500-1627, 6ª. edição, Edições Melhoramentos, São Paulo, 1975.
- SANTOS, Ana Lúcia Mendes dos. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Cyperus rotundus* L. 2003. 121f. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) Instituto de Ciências exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. 1991, Phytochemistry, v. 30, cap. 12, p. 3875-3883.
- SCHATZ, A.; KARLSON, K. E.; MARTIN, J. J.; SCHATZ, V. The proteoysis-chelation theory: application to caries and erosion. Ann. Dent. v. 6, p. 37-49, 1975.

- SCHULTES, R. E. The role of the ethnobotanist in the search for new medicinal plants. 1962. Ethnobotany, Medicinal Plants. Lloydia, v. 25, p. 257-262.
- SCHULTES, R. E.; RAFFAUF, R. F. The Healing Forest. Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazônia. 1990, Dioscorides Press, Portland, Oregon, 484 p.
- SHAFER, W. G.; HINE, M. K.; LEVY, B. M. Tratado de patologia bucal, 1983. 4ª. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 376-442.
- SHIMIZU, M.; SHOGAWA, H.; MATSUZAWA, T.; YONEZAWAS, S.; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; SUZUKI, S.; YOSHIZAKI, M.; MORITA, N. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drogas. IV. Constituents and anti-inflammatory effect of Paraguayan crud drug "alhucema" (*Lavandula latifolia* Vill.). Chem. Pharm. Bull., Tokyo, v. 38, n. 8, 2283-2284, aug. 1990.
- SIANI, A. C; SAMPAIO, A.L.F.; SOUZA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos Essenciais: Potencial antiinflamatório. 2000, Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento, v.16, p.38-43.
- SIANI, A. C.; RAMOS, M.F.S.; MENEZES-DE-LIMA JR., O.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; FERNADEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R.O.A.; ROSAS, E.C.; SUSUNAGA, G.S.; GUIMARÃES, A. C.; ZOGHBI, M.G.B.; HENRIQUES, M. G. M. O. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. Journal of Ethnopharmacology, v. 66, p. 57–69, 1999.
- SILVA, Jefferson Rocha de Andrade. Óleo-Resinas de dez Espécies do Gênero *Protium*. 1995. 131f. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais), Instituto de Ciências exatas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
  - SILVA, M. F. da. Nomes vulgares de plantas amazônicas, 1977. Belém, INPA, p. 72-73.

- SIMÕES, S.; SLEPUSHKIN, V.; PIRES, P.; GASPAR, R.; LIMA, M. P.; DUZGUNES N. Mechanisms of gene transfer mediated by lipoplexes associated with targeting ligands or pH-sensitive peptideos. Gene Ther., v. 6, p. 1798-1807, 1999.
- SIMÕES, C. M. O.; SCKENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P DE; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento, 2003. 5ª. Ed. Porto Alegre-Florianópolis: Editora da UFRGS, Editora da UFSC, 1044 p.
- SIQUEIRA, D. S.; PEREIRA, A. S.; AQUINO, F. R.; CABRAL, J, A.; FERREIRA, C. A. C.; SIMONEIT, B. R. T.; ELIAS, V. O. Determination of high molecular mass compounds from Amazonian plant's leaves. Química Nova, v. 26, n. 5, São Paulo Set./Out. 2003.
- SLOTS J, TAUBMAN M.A. Contemporary Oral Microbiology. Moseby Year Book. St.Louis, 1999, p. 395.
- SOLER, F.; POUJADE, C. L.; EVERS, M.; CARRY, J. C.; HE'NIN, Y.; BOUSSEAU, A.; RUDI PAUWELS, H.; CLERCQ, E. DE; MAYAUX, J. F.; PECQ, J. B. LE; DEREU, N. Betulinic Acid Derivatives: A New Class of Specific Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry. 1996. J. Med. Chem, v. 39, p. 1069-1083.
- SOUSA, Jasiel Nunes. Produção de biomassa e rendimento de óleo essencial de sacaca (*Croton cajucara* Benth.), em função da adubação, poda e densidade de plantio. 2003. 33 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
  - SOUZA, A. H. Castanha do Pará. Estudo botânico, químico e tecnológico, 1963. 69 p.
- STILES, F. G. & A. F. SKUTCH. A guide to the birds of Costa Rica. 1989, Cornell University Press, Ithaca, NY.
- STRALFORS A. Effect on hamster caries by purine derivatives vanillin and some tannincontaining materials. Archs Oral Biol 1967, v.12, p.321-32.

SVANBERG, M. Contamination of toothpaste and toothbrush by *Streptococcus mutans*, 1978. Scand. J. Dent. Res., v. 86, p. 412-414.

TAKARADA K., KIMIZUKA R., TAKAHASHI N., HONMA K., OKADA K., KATO T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. Oral Microbiology Immunology, 2004, v. 19, p. 61-64.

TAKEOKA, G.; FLATH, R. A.; MON, T. R.; BUTTERY, R. G.; TERANISHI, R.; Further applications of permethilated  $\beta$ -cyclodextrin capillary gas chromatographic columns. J. High Resol. Chromatogr., v.13, p. 202, 1990.

TANZER, J. M. On changing the cariogenic chemistry of coronal plaque. 1989, J. Dent. Res. v. 68, p. 1576-1587.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. Compêndio de fitoterapia, 1995. Ed. Herbarium Lab. Botânico. 2ª edição. Curitiba: PR.

THEBTARANONTH, C.; THEBTARANONTH, Y.; WANAUPPATHAMBUL, S.; YUTHAVONG, Y. Antimalarial sesquiterpenes from tubers of *Cyperus rotundus*. Phytochemistry, v. 40, p. 125-128, 1995.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. 8<sup>a</sup> ed. Porto Alegre, Brasil: ARTMED, 2004, 920 p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. Microbiologia. 3ª ed., São Paulo, Atheneu, 2002, p.131-141.

VAN HOUTE, J.; LOPMAN, J.; KENT, R. The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces, 1996. Journal of Dental Research, v. 75, n. 4, p.1008-1014.

VAN HOUTE, J.; Relationship of levels of the bacterium Streptococcus mutans in saliva of children and their parents, 1981. Arch. Oral Biol., v. 26, p. 381-386.

VASQUEZ, M. R. Useful Plants of Amazonian Peru. 1990, Second Draft. Filed with USDA's National Agricultural Library.

VEIGA JR., Valdir Florêncio da. Controle de qualidade de óleos de copaíba por cromatografia gasosa de alta resolução. 1997. 148 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. O gênero *Copaifera* L, 2002. Química Nova, v. 25, n. 2, p. 273-286.

VIEIRA, A. N. Aspectos silviculturais do pau-rosa (*Aniba Duckei* Kostermans) estudos sobre método de propagação, 1970. Boletim INPA – Pesquisas Florestais. Manaus, p. 14.

VIEIRA, L. S. Fitoterapia da Amazônia: Manual de Plantas Medicinais (a Farmácia de Deus), 1991. 2ª. Ed. São Paulo. Agronomia Ceres, p. 347.

WEYNE, S. Dentística – Procedimentos preventivos e restauradores, 1989. Cap. 1, p. 1-42.

WILLIAMS, J. L. A Contribution of the study of pathology of enamel. 1897, Dent. Cosmos, v. 39, pp. 169, 269, 353.

WOODRUFF, Tim. RHP Etnobotanical Dictionary, 1995.

YAZAKI, S. C.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C.; UNTERKIRCHER, C. S. IgA anti-*Streptococcus mutans* em crianças com e sem cárie dentária, 1999. Revista Odontológica da Universidade de São Paulo, v. 13, n. 3, p. 211-217.

- YOSHIYASU, R. Y. A. Um estudo *in vitro* sobre os efeitos da irradiação pelo laser de Er: YAG combinado com flúor na resistência ácida do esmalte de dentes submetidos a aparelho ortodôntico fixo. 2001. 69f. Dissertação de mestrado. IPEN. Universidade de São Paulo.
- YURTSEVER, F. V.; GEMENTE, G.; REBELO, J. M. V.; MELLO, J. A. N. Avaliação de índices de CPOD e classificação dos dentes parciais dos estudantes de 18 anos da rede pública de Manaus AM, 2004. Centro Universitário Nilton Lins, Manaus-AM. Supplement (Proceding of the 21<sup>nd</sup>Annual SBPqO Meeting). Braz. oral Rev., v.18, p. 94.
- ZEKOVIC, Z.; PEKIC, B.; LEPOJEVIC, Z.; PETROVIC, L. Chromatography in Our Investigations of Camomile (*Matricaria chamomilla* L.). Chromatographia, v. 39, n. 9/10, p. 587, 1994.
- ZHENG, G.-Q.; KENNEY, P. M.; LAM K. T. L. Sesquiterpenes from Clove (Eugenia caryophyllata) as Potential Anticarcinogenic Agents. Journal Natural Product, v. 55, n. 7, p. 999-1003,1992.
- ZOGHBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A. & LUZ, A. I. R. 1996. Óleos Essenciais do Gênero *Croton*. XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Santa Catarina.
- ZOGHBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S.; LUZ, A. I. R. Volatile Constituents from Leaves and Stems of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March., Journal of Essential Oil Research, v. 7, n. 5, p. 541-543, 1995.

Tabela com a avaliação do halo de inibição

Tabela A1 - Avaliação do halo de inibição verdadeiro (halo-disco) em mm.

Tempo	Material vegetal	A						В					C					
em horas		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		
24	Extrato clorofórmico de andiroba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	Óleo essencial de breu branco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	Óleo essencial de breu branco + linalol	0	2,15	1,5	1,23	0	0,47	0,9	0	0,82	0,94	1,72	1,97	0	1,97	1,11	0,9853	
24	Óleo fixo de castanha do brasil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	Extrato clorofórmico de cipó cravo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	Extrato etanólico de cipó cravo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	Extrato hexânico e cipó cravo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	Óleo resina de copaíba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	Extrato etanólico de jaca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	Extrato hexânico de jaca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	Óleo essencial de laranjinha	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	
24	Óleo essencial de pau rosa	2,36	2,11	2,49	1,88	2,48	6,45	6,81	3,73	5,02	6,19	0,53	1,41	1,02	0,97	1,22	2,9780	
24	Óleo essencial de sacaca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	Óleo essencial de tiririca	2,68	2,42	2,77	2,05	2,93	3,49	2,25	3,26	2,39	2,7	2,22	2,51	2,56	1,84	2,67	2,5826	
24	Extrato clorofórmico de tiririca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	Extrato etanólico de tiririca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	Extrato hexânico de tiririca	1,46	0,77	0,84	0,39	0,79	2,99	1,82	2,77	2,98	0,48	1,47	1,36	2,36	1,26	0,79	1,502	
48	Extrato clorofórmico da casca de andiroba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
48	Óleo essencial de breu branco	0,97	0,99	1,8	2,56	1,13	0,76	1,03	0,64	1	1,48	1,17	1,53	1,7	3,58	1,86	1,48	
48	Óleo essencial de breu branco + linalol	0,71	0,97	3,09	1,72	0,57	0,75	1,24	0,88	1,54	1,41	1,81	1,21	1,5	1,57	0,46	1,2953	
48	Óleo fixo de castanha do brasil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
48	Extrato clorofórmico de cipó cravo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
48	Extrato etanólico de cipó cravo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
48	Extrato hexânico e cipó cravo	1,27	1,37	1,35	1,07	1	0,95	0,68	1,28	1,17	1,03	1,11	1,35	1,37	1,01	1,05	1,1373	
48	Óleo resina de copaíba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
48	Extrato etanólico de jaca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
48	Extrato hexânico de jaca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Mathematical Mat																		
Althor   A	48	Óleo essencial de laranjinha	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18
Note   Color   Color	48	Óleo essencial de pau rosa	2,51	1,84	1,64	1,36	1,71	5,46	6,44	3,81	5,77	7,75	1,01	2,15	0,95	1,76	1,96	3,0746
Extrato etanólico de tirírica 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	48	Óleo essencial de sacaca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Extrato cloroformico de tiririca 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	48	Óleo essencial de tiririca	3,48	2,58	2,75	1,63	2,54	3,38	2,17	2,06	2,34	2	1,77	2,22	1,53	2,65	1,57	2,3113
Extrato examico de tiririca 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	48	Extrato etanólico de tiririca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Extrato clorofórmico da casea de andiroba	48	Extrato clorofórmico de tiririca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72         Óleo essencial de breu branco         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         1,58         2,16         4,36         2,74         0,7226           72         Óleo essencial de breu branco + linalol         0         2,91         3,65         0	48	Extrato hexânico de tiririca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72         Óleo essencial de breu branco + linalol         0         2,91         3,65         0         0         0         0         0         2,58         3,4         1,61         1,5         1,24         1,126           72         Óleo fixo de castanha do brasil         0	72	Extrato clorofórmico da casca de andiroba	0	1,16	0	1,04	1,21	0	0,82	0,46	0,94	0	0	0	0	0	0	0,3753
72         Óleo fixo de castanha do brasil         0         <	72	Óleo essencial de breu branco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,58	2,16	4,36	2,74	0,7226
Extrato clorofórmico de cipó cravo 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	72	Óleo essencial de breu branco + linalol	0	2,91	3,65	0	0	0	0	0	0	0	2,58	3,4	1,61	1,5	1,24	1,126
Extrato etanólico de cipó cravo 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	72	Óleo fixo de castanha do brasil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Extrato hexânico e cipó cravo	72	Extrato clorofórmico de cipó cravo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72         Óleo resina de copaíba         0         0         0         0         6,28         6,17         5,9         5,12         6,6         5,19         0         0         5,13         4,84         3,0153           72         Extrato etanólico de jaca         0	72	Extrato etanólico de cipó cravo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Extrato etanólico de jaca  0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	72	Extrato hexânico e cipó cravo	1,18	0,64	1,54	1,01	0,53	0,76	0,85	0,66	0,85	1	1,14	1,35	0,75	1,45	1,08	0,986
Extrato hexânico de jaca 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	72	Óleo resina de copaíba	0	0	0	0	0	6,28	6,17	5,9	5,12	6,6	5,19	0	0	5,13	4,84	3,0153
72         Óleo essencial de laranjinha         6,25         4,93         2,2         3,19         2,02         2,67         3,13         2,96         3,79         4,22         86,18         86,18         86,18         86,18         86,18         86,18         31,084           72         Óleo essencial de pau rosa         3,2         2,5         2,88         3,15         3,96         4,78         5,66         3,85         4,74         6,66         1,27         1,48         1,48         0         0         3,0406           72         Óleo essencial de sacaca         0         0         0         0         1,29         0         0         0         0         0         0         0,086           72         Óleo essencial de tiririca         2,89         2,02         2,92         1,58         2,38         3,92         2,12         4,01         3,47         3,82         0         0         0         0         0         1,942           72         Extrato etanólico de tiririca         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0	72	Extrato etanólico de jaca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72         Óleo essencial de pau rosa         3,2         2,5         2,88         3,15         3,96         4,78         5,66         3,85         4,74         6,66         1,27         1,48         1,48         0         0         3,0406           72         Óleo essencial de sacaca         0	72	Extrato hexânico de jaca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72         Óleo essencial de sacaca         0         0         0         0         0         1,29         0	72	Óleo essencial de laranjinha	6,25	4,93	2,2	3,19	2,02	2,67	3,13	2,96	3,79	4,22	86,18	86,18	86,18	86,18	86,18	31,084
72         Óleo essencial de tiririca         2,89         2,02         2,92         1,58         2,38         3,92         2,12         4,01         3,47         3,82         0         0         0         0         0         1,942           72         Extrato etanólico de tiririca         0	72	Óleo essencial de pau rosa	3,2	2,5	2,88	3,15	3,96	4,78	5,66	3,85	4,74	6,66	1,27	1,48	1,48	0	0	3,0406
72       Extrato etanólico de tiririca       0       <	72	Óleo essencial de sacaca	0	0	0	0	0	1,29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,086
72 Extrato clorofórmico de tiririca 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	72	Óleo essencial de tiririca	2,89	2,02	2,92	1,58	2,38	3,92	2,12	4,01	3,47	3,82	0	0	0	0	0	1,942
	72	Extrato etanólico de tiririca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72 Extrato hexânico de tiririca 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	72	Extrato clorofórmico de tiririca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	Extrato hexânico de tiririca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Placas de petri - A, B, C; repetições em placa - 1, 2, 3, 4, 5

Tabela com a mobilidade das moléculas bioativas no halo de crescimento

Tabela A2 – Mobilidade das moléculas bioativas no halo de crescimento verdadeiro (halo-disco) em mm.

Tempo	Material vegeta			A					В					С			Média
em horas		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
24	Óleo fixo de andiroba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	Extrato etanólico de andiroba	1,54	1,15	1,51	0,79	1,82	0,34	1,63	2,06	1,45	3,35	2,76	0,9	0,26	1,23	2,75	1,5693
24	Extrato hexânico da casca de andiroba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	Óleo fixo de jaca	0	1	2,25	0,29	0	1,99	1,96	1,42	0,41	0	1,29	1,85	1,01	0	0	0,898
24	Extrato clorofórmico de jaca	1,13	1,03	1,11	0	1,25	0	1,45	1,22	0,79	2,23	0	0	0,55	0,79	0,45	0,8
48	Óleo fixo de andiroba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	Extrato etanólico de andiroba	1,98	1,08	2,12	2,12	1,78	1,26	3,05	2,1	2,12	4,11	4,37	1,38	0,98	1,52	4,74	2,314
48	Extrato hexânico da casca de andiroba	1,19	1,12	0,91	1,48	2,18	1,31	1,39	0,8	0,54	1,23	2,16	2,82	1,27	1,32	0,99	3,6633
48	Óleo fixo de jaca	0,99	1,59	2,21	1,03	0,58	3	5,08	5,48	6,88	0,26	1,6	3,2	1,35	0	0,61	2,2573
48	Extrato clorofórmico de jaca	0,96	1,15	1,22	1,52	1,39	1,27	1,7	0,98	1,76	3,31	0,95	1,41	1	1,41	1,36	1,426
72	Óleo fixo de andiroba	1,1	0,72	1,24	1,35	1,59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4
72	Extrato etanólico de andiroba	7,49	3,05	5,28	1,97	7,3	0,71	3,19	2,66	1,9	4,21	7,25	1,46	1,36	2,78	8,56	4,3446
72	Extrato hexânico da casca de andiroba	0,84	0,97	1,18	1,06	1,42	0,49	1,52	1,14	0,75	0	2,54	2,99	1,4	1,3	0,91	1,234
72	Óleo fixo de jaca	0,67	1,43	1,72	3,05	1,84	3,25	3,98	4,76	6,44	1,3	2	2,53	1,6	0	0,17	2,316
72	Extrato clorofórmico de jaca	1,06	1,37	1,37	1,53	1,23	1,44	1,18	0,55	0,89	2,3	0	0,79	0,58	0,27	2,03	1,109

Placas de petri - A, B, C; repetições em placa - 1, 2, 3, 4, 5.

Análise de variância (ANOVA) da presença de halo de inibição e de halo de crescimento

Tabela A3 – Análise de variância (ANOVA) em parcela subdividida da presença de halo de inibição.

Fator de Variação (F.V.)	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
Blocos	2	2,829	1,414		
Material analisado (óleos e extratos)	16	2004,559	125,284	54,07**	0,000
Resíduos a	32	74,137	2,3167	2,44 <sup>NS</sup>	
Tempos (24, 48 e 72 horas)	2	9,396	4,698	4,07**	0,094
Interação	32	250,508	7,828	4,07	0,000
Resíduo b	68	130,499	1,919		
Total	152	2471,931			
Transformação	$\sqrt{x+0.5}$				
Média Geral	122,3811				
CV (%) óleos e extratos	50,3945				
CV (%) tempo	45,8659				

NS: Não significativo estatisticamente

Tabela A4 – Análise de variância (Anova em parcela subdividida) da presença de halo de crescimento.

Fator de Variação (F.V.)	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
Blocos	2	0,351	0,175		
Material analisado (óleos e extratos)	4	23,721	5,930	11,50**	0,002
Resíduos a	8	4,123	0,515	22,60**	
Tempos (24, 48 e 72 horas)	2	6,940	3,470	2,66*	0,000
Interação	8	3,277	0,409	2,00	0,035
Resíduo b	20	3,071	0,153		
Total	44	41,486			
Transformação	$\sqrt{x+0.5}$				
Média Geral	2,850778				
CV (%) óleos e extratos	25,1854				
CV (%) tempo	13,7458		-		

NS: Não significativo estatisticamente

<sup>\*:</sup> Significante ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

<sup>\*\*:</sup> Significante ao nível de 1 % de probabilidade pelo teste F.

<sup>\*:</sup> Significante ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

<sup>\*\*:</sup> Significante ao nível de 1 % de probabilidade pelo teste F.

Termo de autorização da doação de dentes descartados

Parecer do comitê de ética