



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
CITOTÓXICA DA BIFLORINA FRENTE A
MICRO-ORGANISMOS ORAIS E A UMA LINHAGEM DE
CÉLULA CANCERÍGENA DA CAVIDADE BUCAL.**

JULIE MARIE MARTINS MONTEIRO

MANAUS-AM

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

JULIE MARIE MARTINS MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
CITOTÓXICA DA BIFLORINA FRENTE A
MICRO-ORGANISMOS ORAIS E A UMA LINHAGEM DE
CÉLULA CANCERÍGENA DA CAVIDADE BUCAL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Karen Regina Carim da Costa Magalhães

MANAUS-AM

2015

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M775a Monteiro, Julie Marie Martins
Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica da Biflorina frente a micro-organismos orais e a uma linhagem de célula cancerígena da cavidade bucal / Julie Marie Martins Monteiro. 2015
59 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Karen Regina Carim da Costa Magalhães
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. atividade antimicrobiana. 2. atividade citotóxica. 3. biflorina. 4. bactérias orais. I. Magalhães, Karen Regina Carim da Costa II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

JULIE MARIE MARTINS MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
CITOTÓXICA DA BIFLORINA FRENTE A
MICRO-ORGANISMOS ORAIS E A UMA LINHAGEM DE
CÉLULA CANCERÍGENA DA CAVIDADE BUCAL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovada em 29 de maio de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Karen Regina Carim da Costa Magalhães, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza, Membro
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof^ª. Dr^ª. Nikeila Chacon de Oliveira Conde, Membro
Universidade Federal do Amazonas

AGRADECIMENTOS

A todos os professores do Programa de pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas pelo compartilhamento de conhecimento e apoio durante essa caminhada.

Ao Farm. Esp. Geraldo Majela Soares, pelo auxílio e atenção, disposição em me ajudar e orientação quando precisei.

A professora Nazaré da Universidade do Estado do Amazonas que esteve disposta em me ajudar.

A Prof. Dra. Antonia Queiroz que mesmo distante sempre esteve a disposição a dar alguma orientação e incentivo.

Ao Prof. Rachid Zacarias que me estimulou a buscar o mestrado, fez eu me interessar por pesquisa desde o meu trabalho de conclusão de curso na graduação.

A Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos que cedeu a biflorina e possibilitou a realização deste estudo.

Aos colegas da turma do mestrado que sempre foram muito queridos e companheiros: Patrícia, João, Nara, Raissa, Cristiano, Antônio, Guilherme, Felipe, Juliana e Rodrigo.

Aos colegas do laboratório, Glauber, Patrícia, Gabrielly, Josélia que me ajudaram a realizar este trabalho, seja com pequenos gestos ou grandes ajudas.

A Profa. Dra. Karen Regina Carim da Costa Magalhães pela orientação.

A minha família, amigos, noivo pelo apoio de sempre.

“O Senhor é o meu pastor; nada me faltará. Ele me faz repousar em pastos verdejantes. Leva-me para junto das águas de descanso; refrigera-me a alma. Guia-me pelas veredas da justiça por amor do seu nome.

Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal nenhum, porque tu estás comigo: a tua vara e o teu cajado me consolam. Preparas-me uma mesa na presença dos meus adversários, unges-me a cabeça com óleo, o meu cálice transborda.

Bondade e misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida, e habitarei na casa do Senhor para todo o sempre”.

RESUMO

MONTEIRO, J. M. M. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DA BIFLORINA SOBRE MICRO-ORGANISMOS DA CAVIDADE BUCAL**. 2015. 59f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Amazonas.

Investigações fitoquímicas levaram ao isolamento e caracterização da Biflorina que dentre os compostos já isolados da *Capraria biflora*, mostrou-se promissora com uma potente atividade antimicrobiana e antitumoral. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana da biflorina sobre micro-organismos da cavidade bucal e atividade citotóxica sobre linhagem de célula cancerígena da cavidade bucal. A triagem da atividade antimicrobiana da biflorina foi realizada através da técnica de difusão em ágar com os micro-organismos *Streptococcus mutans* ATCC25175, *Streptococcus salivarius* ATCC7073, *Streptococcus oralis* ATCC10557 e *Lactobacillus paracasei* ATCC335. A quantificação desta atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Para avaliação da citotoxicidade sobre linhagem cancerígena da cavidade bucal foi utilizada a linhagem celular CAL-27 e o ensaio de Alamar blue. No teste de difusão em ágar, a biflorina apresentou atividade antimicrobiana frente a todos os micro-organismos avaliados. A maior atividade antimicrobiana foi observada nos ensaios com o *Lactobacillus paracasei* e a menor nos ensaios com *Streptococcus salivarius*. Considerando que a biflorina foi ativa frente a todos os micro-organismos testados, determinou-se a concentração inibitória mínima. No teste de microdiluição a biflorina apresentou menor CIM frente ao *Streptococcus mutans* (MIC=0,70 µg/mL) e *Streptococcus salivarius* (MIC 3,125 µg/mL). Enquanto a clorexidina a 2% foi eficaz em sua menor diluição (0,015%) sobre todas as bactérias testadas. No teste de citotoxicidade do Alamar blue, o valor da IC₅₀ da Biflorina sobre a CAL-27 em 72 horas foi de 3.69 (3.17 – 4.30µM/mL) e a Doxorubicina (controle) foi 0.039 (0.036-0.088µg/mL). Os resultados sugerem que a biflorina pode ser incorporada a produtos de uso odontológico e para o tratamento de neoplasias da cavidade oral, porém é necessário dar continuidade aos estudos com esta substância nesta área.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, atividade citotóxica, biflorina, bactérias orais.

ABSTRACT

MONTEIRO, J. M. M. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DA BIFLORINA SOBRE MICRO-ORGANISMOS DA CAVIDADE BUCAL.** 2015. 59f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Amazonas.

Phytochemical investigations led to the isolation and characterization of biflorin that among the compounds already isolated from *Capraria biflora*, showed promise with a powerful antimicrobial and antitumor activity. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of biflorin on the oral cavity microorganisms and cytotoxic activity on cancer cell lineage of the oral cavity. The screening of antimicrobial activity biflorin was performed by diffusion technique in agar with the microorganisms *Streptococcus mutans* ATCC25175, *Streptococcus salivarius* ATCC7073, *Streptococcus oralis* ATCC10557 and *Lactobacillus paracasei* ATCC335. The quantification of the antimicrobial activity was performed by broth microdilution technique to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). To evaluate the cytotoxicity of cancer lineage of the oral cavity was used cell line CAL-27 and the Alamar blue assay. In the agar diffusion test, biflorin presented antimicrobial activity against all evaluated microorganisms. The greatest antimicrobial activity was observed in trials with *Lactobacillus paracasei* and lower in trials with *Streptococcus salivarius*. Whereas biflorin was active against all tested micro-organisms, it determined the minimum inhibitory concentration. In the microdilution test biflorin showed lower MIC against *Streptococcus mutans* (MIC = 0,70µg/mL) and *Streptococcus salivarius* (MIC 3,125 µg/mL). While the 2% chlorhexidine was effective in its lower dilution (0,015%) of all tested bacteria. In Alamar blue cytotoxicity assay, the IC₅₀ value of biflorin on the CAL 27 in 72 hours was 3.69 (3.17 to 4.30µM/mL) and Doxorubicin (control) was 0.039 (0.036-0.088 µM/mL).The results suggest that biflorin can be incorporated in dental applications and products for the treatment of cancers of the oral cavity, but it is necessary to continue the research in this area with this substance.

Keywords: antimicrobial activity, cytotoxicity, biflorin, oral bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura01 -	Esquema de preparo do inóculo para o teste de microdiluição em caldo.....	34
Figura 02 -	Fluxograma microdiluição: distribuição das substâncias nas microplacas....	35
Figura 03 -	Microplaca após 4h de reincubação com a resazurina.....	36
Figura 04 -	Atividade antimicrobiana da biflorina após 24h de incubação em estufa a 37°C frente a <i>Streptococcus salivarius</i>	39
Figura 05 -	Leitor de placa de ELISA e leitura visual da placa após aplicação do Alamar blue.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentração Inibitória Mínima (CIM) da biflorina e de seus produtos de degradação pela luz natural (Adaptado de Aquino, 2003).	28
Tabela 2- Medida dos halos de inibição em mm e classificação da atividade antimicrobiana de acordo com Alves <i>et al.</i> (2000). A1, A2 e A3 representam os ensaios realizados individualmente.	40
Tabela 3- Concentração inibitória mínima (CIM) de Biflorina e Clorexidina frente à <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Streptococcus oralis</i> e <i>Lactobacillus paracasei</i>	41
Tabela 4- Valores do IC ₅₀ da biflorina sobre células gástricas tumorais e não tumorais (Adaptado de Barbosa, 2012).	46

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>C. biflora</i> L.	<i>Capraria biflora</i> L.
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentração Mínima Inibitória
COA	Carcinoma Oral Adenoescamoso
COCE	Carcinoma oral de células escamosas
CO₂	Dióxido de Carbono
DMEM	Dulbeccó's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Fiocruz	Fundação Osvaldo Cruz
GUN	Gengivite Ulcerativa Necrosante
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HPV	Vírus do Papiloma Humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IC₅₀	Índice de Citotoxicidade
INCQS	Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde
pH	Potencial de Hidrogênio
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
UVA	Ultravioleta A

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
>	Maior
®	Marca registrada
μ	Micro
<	Menor
M	Molar
%	Percentual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Microbiota bucal e Biofilme	19
2.2 Controle de biofilme	21
2.3 Plantas medicinais e produção de metabólitos secundários.....	23
2.4 <i>Capraria biflora</i> e Biflorina	26
2.5 Câncer e CAL-27	28
2.6 Ensaio de citotoxicidade com a Biflorina.....	30
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2Objetivos específicos	32
4 METODOLOGIA.....	33
4.1 Substância teste.....	33
4.2 Cepas utilizadas	33
4.3 Testes para verificação da atividade antimicrobiana	33
4.4 Teste de Difusão em Ágar	34
4.5 Método de microdiluição em caldo	35
4.5.1 Preparo do Inóculo	35
4.5.2 Diluição da Biflorina e clorexidina	36
4.5.3 Execução do teste	36
4.5.4 Leitura dos resultados.....	37
4.6 Testes de citotoxicidade.....	38
4.6.1 Linhagens celulares utilizadas.....	38
4.6.2 Manutenção das células neoplásicas	38
5 RESULTADOS	40
5.1 Teste de atividade antimicrobiana	40
5.1.1 Teste de Difusão em Ágar.....	40
5.1.2 Microdiluição em caldo.....	42

5.2 Atividade citotóxica- Teste Alamar blue	43
6 DISCUSSÃO	44
7CONCLUSÃO.....	49
8 REFERÊNCIAS	50

1INTRODUÇÃO

A cavidade bucal, assim como em outros sítios do corpo humano, é colonizada por uma microbiota característica e complexa, compreendendo protozoários, leveduras, micoplasmas, archae e bactérias (JORGE, 2012; AAS *et al*, 2005). Em relação à quantidade, a microbiota bucal só compete com a intestinal, quanto à diversidade de espécies, a primeira consiste na mais complexa do organismo (JORGE, 2012).

Dentre os principais gêneros de micro-organismos presentes na microbiota bucal residente, tem-se cocos Gram-positivos, como, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp., bacilos Gram-positivos, tais como, *Actinomyces* sp., *Lactobacillus* sp.; e fungos, tais como, *Candida* sp. E *Rhodotorula* sp (JORGE, 2012). Estes, desempenham ativo papel no sítio em que se encontram, contribuindo para a manutenção da saúde através (1) do desenvolvimento do sistema imunológico e (2) da exclusão de micro-organismos exógenos (e frequentes patógenos). Este último processo (resistência à colonização) está associado à característica competitiva (em termos de aquisição de nutrientes e ligação a receptores orais) e pela produção de moléculas inibitórias da microbiota residente (MARSH, 2010; JORGE, 2012).

A microbiota comensal desempenha um papel importante na manutenção da saúde oral e sistêmica. Comensais no intestino são conhecidos por serem essenciais para o desenvolvimento das estruturas do intestino e para o desenvolvimento apropriado da imunidade local e sistêmica (WADE, 2013). Entretanto, o biofilme presente nas superfícies da cavidade bucal, seu acúmulo associado a fatores de desequilíbrio da resistência do hospedeiro, são importantes fatores para desencadear processos infecciosos na cavidade bucal, entre outros processos inflamatórios exacerbados pela presença dos micro-organismos (TEIXEIRA; BUENO; CORTÉZ, 2010).

A doença cárie dentária, por exemplo, é vista como consequência de um desequilíbrio da microbiota residente devido ao enriquecimento dentro da comunidade microbiana de bactérias potencial e altamente cariogênicas devido a condições frequentes de baixo pH no biofilme dentário, geralmente como resultado de uma alteração na dieta ou uma redução do fluxo salivar (MARSH, 2010).

O processo de formação de biofilme inicia quando as células microbianas aderem irreversivelmente à superfície, passam pelo processo de divisão celular, formam micro colônias e produzem polímeros extracelulares. Estas substâncias poliméricas extracelulares consistem primariamente em polissacarídeos que podem ser detectados microscopicamente e por análises químicas e são responsáveis por fornecer a matriz e estrutura para o biofilme (DONLAN, 2001).

Dessa maneira, estudos vem sendo realizados, voltados para a redução desse biofilme presente na cavidade bucal, na tentativa de descobrir substâncias que possuam atividade antimicrobiana e que possam agir como coadjuvantes na prevenção das cáries, processos inflamatórios e que possam ser utilizados tanto para prevenção quanto para tratamento de certos acometimentos bucais (SILVA, 2013; FANI; KOHANTEB, 2012; CHELLI-CHENTOUF *et al*, 2012).

Capraria biflora L. (*Scrophulariaceae*) é uma planta medicinal perene distribuída na América do Sul e do Norte, conhecida popularmente como chá-da-terra, chá-do-méxico, chá-da-martinica, chá-de-goteira, entre outros. As folhas têm propriedades analgésicas, antitérmicas, antigripais, são usadas para tratar náuseas, recuperação pós-parto, diarreia, hemorróidas, reumatismo e edema (CORREA, 1984), enquanto que as raízes têm propriedades antibacterianas (SERPA, 1958).

Investigações fitoquímicas levaram ao isolamento e caracterização da Biflorina [6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil) nafta [1,8-bc]-piran-7 ,8-diona], um antibacteriano orto-

naftoquinona (GONCALVES DE LIMA *et al*, 1958; FONSECA *et al*, 2003).Do ponto de vista fitoquímico, a biflorina, entre os compostos já isolados, mostrou-se promissora com uma potente atividade antimicrobiana (AQUINO *et al*, 2006) e antitumoral (VASCONCELLOS *et al*, 2005, 2011).

Dessa maneira, além das doenças que estão associadas ao biofilme, existem as alterações neoplásicas que acometem a cavidade oral e já são consideradas problema de saúde pública mundial. De acordo a última estimativa para o Brasil, no ano de 2014, ocorreriam 11.280 novos casos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,54 casos novos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014).

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer da cavidade oral em homens é o quarto mais frequente nas regiões Sudeste (15,48/ 100 mil) e Nordeste (7,16/ 100 mil). Na região Centro-Oeste é o quinto (8,18/ 100 mil). Nas regiões Sul (15,21/ 100 mil) e Norte (3,21/ 100 mil) ocupa o sexto lugar. Nas mulheres, é o nono mais frequente nas regiões Sudeste (4,88/ 100 mil) e Nordeste (3,72/ 100 mil). Na região Norte (1,60/ 100 mil) ocupa a décima primeira posição. Na região Centro-Oeste (3,30/ 100 mil) é o décimo segundo mais frequente e, na região Sul (3,09/ 100 mil) o décimo quinto (INCA, 2014).

Os principais fatores de risco para o câncer da cavidade oral são: tabagismo, etilismo, infecções por HPV, principalmente pelo tipo 16, e exposição à radiação UVA solar (câncer de lábio). Estudos mostram um risco muito maior de desenvolver câncer na cavidade oral em indivíduos tabagistas e etilistas do que na população em geral, evidenciando a existência de uma sinergia entre o tabagismo e o etilismo. Ressaltam ainda um aumento no risco de acordo com o tempo de exposição, número de cigarros fumados por dia e com a frequência de ingestão de bebidas alcoólicas. A dieta também parece exercer um papel importante na prevenção desse tipo de câncer. Alguns estudos de base hospitalar reportam que o aumento da

ingestão de frutas e vegetais contribui para a diminuição do risco de desenvolver essa neoplasia (INCA, 2014; SCULLY; KIRBY, 2014).

Noventa e cinco por cento dos cânceres de cabeça e pescoço são carcinomas de células escamosas. Carcinoma de língua representa 25% a 50% de todos os casos de carcinoma de células escamosas da cavidade oral, sendo a borda lateral e os dois terços anteriores da língua os locais mais comumente afetados (DANTAS *et al*, 2003; JEMAL *et al*, 2009; TANAKA; TANAKA; TANAKA, 2011). Os estudos *in vitro* com células neoplásicas da cavidade bucal vem sendo realizados utilizando-se linhagens CAL-27 oriundas de carcinoma de células escamosas e que serão testadas também nesta pesquisa (ZHANG *et al*, 2014; HUANG *et al*, 2014).

Estudos são escassos em relação às propriedades antimicrobianas da biflorina, sobre micro-organismos da cavidade bucal, e citotóxicas sobre linhagens de células cancerígenas bucais, pontos que motivaram o desenvolvimento deste estudo.

2REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiota bucal e Biofilme

A cavidade bucal é um sistema de crescimento aberto, onde os nutrientes e os micro-organismos são introduzidos e removidos desse sistema de maneira repetitiva. Somente se estabelecem as espécies que possuem capacidade de aderência às superfícies da cavidade bucal ou que, de alguma outra maneira, fiquem retidas (JORGE, 2012).

Nesse sentido, a cavidade bucal possui vários habitats microbianos distintos, tais como, dentes, sulco gengival, gengiva inserida, língua, bochechas, lábios, palato duro e palato mole (DEWHIRST *et al*, 2010). E em cada local será mantido o crescimento de uma comunidade microbiana característica (JORGE, 2012). Os micro-organismos que colonizam uma área da cavidade bucal tem uma probabilidade significativa de migração pelas superfícies epiteliais adjacentes (DEWHIRST *et al*, 2010).

Segundo Jorge (2012), o potencial patogênico da microbiota bucal pode se desenvolver em três maneiras, (1) os micro-organismos podem proliferar em áreas restritas e causar dano confinado ao local da infecção (doença cárie), (2) os micro-organismos podem disseminar a infecção aos tecidos vizinhos (gengivite ulcerativa necrosante – GUN), (3) os micro-organismos podem causar lesões à distância por bacteremia ou por produtos lançados à circulação linfática ou sanguínea (endocardite bacteriana subaguda).

Alguns micro-organismos da cavidade bucal tem demonstrado causar uma série de doenças infecciosas, incluindo cáries dentárias, periodontite, infecções endodônticas, osteíte alveolar, alveolite e amigdalite, estas doenças estão também associadas a um complexo mecanismo de sobrevivência dos micro-organismos, a formação de biofilme (DEWHIRST *et*

al, 2010). Como exemplo, tem-se o *Streptococcus mutans* que é um agente etiológico importante de cárie dentária, pois é capaz de aderir a superfície e formar biofilme (COLLINS *et al*, 2000; CORBY *et al*, 2007). Para tal, os micro-organismos produzem glicosiltransferases e sintetizam glucano a partir da sucrose com propriedades aderentes e insolúveis a água que permite esta adesão firme a superfície dentária (DOWNES *et al*, 2009).

A colonização do *S. mutans* depende de alguns fatores, tais como, fluxo salivar, capacidade tampão da saliva e a presença de imunoglobulinas salivares (DE OLIVEIRA *et al*, 2013; BARBIERI *et al*, 2007).

Biofilmes orais são definidos como comunidades microbianas tridimensionais que estão aderidas a uma superfície sólida como o esmalte dentário, superfície radicular ou implantes dentários e envoltas por uma matriz extracelular de materiais poliméricos (WOOD *et al*, 2000; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002; REESE; GUGGENHEIM, 2007; JORGE, 2012)

A microbiota bucal se desenvolve na forma de biofilme em todas as superfícies mucosas e dentárias (AAS *et al*, 2005). A colonização das bactérias orais e a formação de biofilme segue um padrão de formação. Logo após a erupção, ou após a escovação, as superfícies dentárias são revestidas por uma película de condicionamento de moléculas (proteínas e glicoproteínas biologicamente ativas), principalmente derivada da saliva (e também a partir do fluido crevicular gengival e das próprias bactérias). Inicialmente somente algumas espécies bacterianas são capazes de associar-se a essa película, também denominada película adquirida. As células são mantidas de maneira reversível próximas a superfície por forças fracas e físico-químicas de longo alcance. Moléculas (adesinas) agem sobre esses colonizadores primários, principalmente estreptococos (por exemplo, *Streptococcus mitis* e *S. oralis*) podem ligar-se a receptores complementares na película adquirida para fazer a ligação irreversível e então essas espécies pioneiras começam a ser multiplicar. O metabolismo dos

primeiros colonizadores modifica o meio ambiente local, que se torna mais anaeróbico depois do consumo de oxigênio. À medida que o biofilme se desenvolve, adesinas na superfície das células de colonizadores secundários mais exigentes, tais como anaeróbios obrigatórios, ligam-se aos receptores das bactérias já ligados por um processo denominado, co-adesão ou co-agregação, e a composição do biofilme se torna mais diversa (sucessão microbiana) (MARSH, 2003; 2010).

A estrutura do biofilme não consiste apenas em uma camada homogênea de substância, pelo contrário, é bastante heterogênea, apresenta “canais” de água que permitem o transporte de oxigênio e nutrientes essenciais para as células em crescimento dentro do biofilme (LEWANDOWSKI, 2000). Células bacterianas agregadas e/ou revestidos por matriz extracelular são insensíveis tanto para estimulação nutricional quanto para ataques. No corpo humano, biofilmes podem desencadear infecções persistentes, como inflamações crônicas (CHEN; WEN, 2011).

2.2 Controle de biofilme

O controle de um biofilme cariogênico pode ser encarado de várias maneiras. Três estratégias têm sido adotadas pela odontologia moderna: Eliminação/redução do biofilme por métodos de higiene bucal; Eliminação/redução de carboidrato fermentável e incorporação do uso de flúor (WOLFF; LARSON, 2009). Estas combinações de estratégias têm sido responsáveis por reduções nas taxas de cárie dentária, mas não suficiente para a eliminação da doença. Estudos apontam que instruções de higiene bucal melhoram de maneira significativa a higiene de pacientes (SMIECH-SŁOMKOWSKA; JABLONSKA-ZROBEK, 2007).

A presença de uma má higiene bucal leva ao acúmulo de bactérias, logo reduzir essa carga microbiana é o primeiro passo para o estabelecimento de uma boa higiene bucal. Isto é geralmente conseguido, além da escovação e uso do fio dental, através do uso de soluções antissépticas. No entanto, a atividade antibacteriana dessas soluções ainda é questionável, especialmente devido à capacidade das bactérias formarem biofilme (MASADEH *et al*, 2013).

Em relação à cárie dentária, a aplicação de métodos diagnósticos mais sensíveis resultou na detecção frequente de estreptococos da espécie mutans no biofilme de sítios saudáveis, mesmo que em número reduzido em alguns momentos. Estes micro-organismos são pouco competitivos com outras bactérias orais em pH neutro e estão presentes, portanto, como uma pequena proporção de toda a comunidade de placa. Nesta situação, com uma dieta convencional, os níveis de tais bactérias potencialmente cariogênicas são clinicamente insignificantes, e os processos de des-remineralização estão em equilíbrio. Contudo, se a frequência de ingestão de carboidratos fermentáveis aumenta, então a placa passa mais tempo abaixo do pH crítico para a desmineralização do esmalte (aproximadamente pH 5,5)(MARSH, 2010).

Na odontologia, o digluconato de clorexidina é a solução antisséptica mais utilizada no controle do biofilme dental e gengivite, considerada o Padrão-ouro (FIGUEIREDO, 2004; ADDY; MORAN, 2000). A mesma é uma bisguanidina catiônica disponível na forma de sais de gluconato, digluconato e sua efetividade está relacionada a sua atração à superfície da célula bacteriana carregada negativamente (CORTELLI *et al*, 2007).

Após a adsorção, a integridade da membrana celular bacteriana é alterada, o que resulta em uma perda reversível de componentes de baixo peso molecular, como o potássio e fósforo das bactérias em baixas concentrações (efeito bacteriostático) ou danos na membrana

celular irreversíveis em altas concentrações (efeito bactericida) (TURESKY, 1977; ROLLA; MELSEN, 1975;) Além disso, possui alta substantividade e seu efeito residual é de aproximadamente 48 horas; após este período a flora bacteriana retorna aos níveis pre-existentes e o biofilme inicia seu curso normal de formação (LOE, 1970).

Apesar da clorexidina ser considerada o padrão-ouro ainda apresenta algumas limitações, tais como, quando associada ou não ao flúor, reduz significativamente a formação de placa bacteriana, mas não é capaz de reduzir os níveis de estreptococos do grupo mutans, a menos que seus níveis iniciais sejam elevados. Produz pigmentação dental e da língua, leve alterações no paladar e aumento da formação de cálculo dentário (ZANELA *et al*, 2002; WU; SAVITT, 2000).

Como aparecimento de cepas resistentes aos antimicrobianos convencionais, é importante a realização de estudos utilizando métodos alternativos para controlar estes micro-organismos. O uso de produtos de origem vegetal tem demonstrado atividade antimicrobiana eficaz, além de biocompatibilidade (DE OLIVEIRA *et al*, 2013).

2.3 Plantas medicinais e produção de metabólitos secundários

Plantas medicinais são aquelas que possuem em sua composição, substâncias químicas, sintetizadas a partir de nutrientes, água e luz. Estas substâncias provocam no organismo humano e animal efeitos terapêuticos ou paliativos promovidos pela ação de princípios ativos como alcalóides, glicosídeos, saponinas, entre outros (FETROW; ÁVILA, 1999).

Nota-se um interesse pelas plantas medicinais, devido à grande procura por terapêuticas complementares (RIBEIRO; LEITE; DANTAS-BARROS, 2005; HARVEY, 2008).

Ao longo dos anos, foi sendo demonstrado que extratos de plantas possuem atividades fisiológicas que contêm vários componentes que apresentam atividades antimicrobianas. Por outro lado, apesar da elevada diversidade de antigos e novos antibióticos sintetizados disponíveis para fins terapêuticos, patógenos bacterianos desenvolveram um mecanismo de resistência, tornando muito difícil a sua erradicação. Portanto, a busca de agentes antibacterianos, tais como compostos de extrato de plantas, ganhou novo impulso (PARK *et al*, 2013).

Os compostos resultantes de reações químicas celulares são denominados metabólitos, sendo divididos em primários, os quais são fundamentais na matéria-viva, responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento dos organismos (DEMAIN, 2000; DEWICK, 2002) e, secundários, aqueles que não são necessários às funções básicas intracelulares, mas que exercem funções específicas de interação organismo e ambiente, podendo ser interpretados como interface química entre o organismo e os outros seres vivos (BRIZUELA *et al*, 1998; KUTCHAN, 2001).

Os metabólitos secundários, por serem então fatores de interação entre organismos, na maioria das vezes apresentam atividades biológicas. Muitos deste compostos são de importância na área farmacêutica, pois representam uma fonte promissora para a descoberta de novas moléculas úteis ao homem (SANTOS, 2003; HAIDA *et al*, 2007), tais como, alcalóides, quinonas, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos terpenóides e poliacetilenos (COWAN, 1990).

Em geral, a atividade antimicrobiana tem sido atribuída a pequenos terpenóides e compostos fenólicos como timol, carvona, carvacrol, mentol e murleno, que também na forma pura exibem atividade antibacteriana ou antifúngica. Apesar dos mecanismos de ação ainda não serem completamente elucidados, estes parecem estar associados ao caráter lipofílico dos

compostos, promovendo um acúmulo nas membranas e perda de energia pelas células. As diferenças relacionadas às técnicas empregadas para investigação da ação de compostos de plantas e uma grande variação encontrada na composição química de algumas preparações vegetais podem resultar em dados de difícil comparação entre as pesquisas. Não existe também um consenso sobre os níveis de inibição aceitáveis para compostos de plantas comparados com antibióticos padrões (DUARTE, 2006).

A identificação de novos compostos presentes nas plantas busca ampliar os recursos tecnológicos nacionais em diversos setores: através da redução de possíveis efeitos indesejados que algumas substâncias químicas sintéticas possam provocar, por meio da diminuição da resistência bacteriana, e minimizando os custos no desenvolvimento de medicamentos (ALVES *et al*, 2001).

Estudos atuais vem mostrando a eficácia de substâncias isoladas de plantas, como o de Park *et al* (2013) no qual o Isotiocianato, uma substância extraída a partir da raiz de rábano, apresentou uma forte atividade antibacteriana, podendo ser utilizado como desinfetante natural sobre micro-organismos orais. Porém os autores sugerem mais testes da atividade antibacteriana dos isotiocianatos sobre outras bactérias bucais incluindo *Actinobactérias* sp., *Espiroquetas* e *Proteobacteria* sp.

Assim como, o estudo de Tomcyk *et al* (2010) com partes aéreas selecionadas das espécies *Potentilla* sp., que mostrou os efeitos inibitórios *in vitro* de extratos aquosos destas espécies contra cepas cariogênicas de *Streptococcus* spp. Os autores verificaram que as amostras testadas inibiram o crescimento de estreptococos orais e que as espécies *Potentilla* estudadas podem ser fonte potencial para a extração de compostos biologicamente ativos estimulando a indústria farmacêutica a desenvolver novos agentes anticárie em uma ampla gama de produtos de cuidados orais.

2.4 *Capraria biflora* e *Biflorina*

Capraria biflora L. é uma espécie pertencente à família Schrophulariaceae, originária das Antilhas e América do Sul, que habita zonas temperadas ou áreas de clima tropical (MATOS, 1988). Possui caule ramoso, ereto, com ramos alternos, cilíndricos, pubescentes e hirsutos que alcança até 150 cm de altura. Suas folhas são alternas, chegando até 8 cm de comprimento, oblongo-lanceoladas-agudas, serradas irregularmente, inteiras na base, cumedas e estreitando-se para o pecíolo, são peninervadas, com nervura média saliente na página inferior. Suas flores são pequenas, brancas, pediceladas, geminadas, axilares e campanuladas. Possui segmentos linear-lanceolados, agudos e ligeiramente ciliado-cerrados. Os frutos possuem formato de uma cápsula ovado-oblonga, glabra, contendo sementes rugosas, escuras e oblongo-cuneadas. Suas raízes são numerosas e longas, tortuosas, apresentando cor parda escura (CORREA, 1984; MATOS, 1988).

No Brasil, é conhecida como chá-da-terra, chá-do-méxico, chá da- martinica, chá-de-goteira, chá-de-pé-da-calçada, chá-do-rio, chá-da-américa, chá-das-antilhas, chá-de-lima, bem como chá-de-marajó, chá-da-balsaminha, chá-do-maranhão, chá-bravo e chá de-preto (MATOS, 1988).

Diversas utilizações populares estão associadas à *C. biflora* L. A espécie poderia substituir o chá-da-índia para o combate de dores no estômago, dispepsia, bem como ser utilizada em associação com outras plantas como febrífuga, diurética, estimulante e digestiva (CORREA, 1984). No Brasil, tem-se relatos da utilização de uma associação de plantas, incluindo *C. biflora* L., como diurética, calmante, bem como para o tratamento de afecções no aparelho urinário (CORDEIRO; ALMEIDA, 1996) enquanto que o infuso feito com suas

folhas e extremidades floridas pode ser utilizado como estomacal, sudorífero, febrífugo e para afecções do trato urinário (LORENZI; MATOS, 2002).

Existem poucos relatos na literatura em relação a efeitos tóxicos quanto à infusão das folhas ou utilização das raízes de *C. biflora* L. Porém, sabe-se que altas doses da infusão de suas folhas podem causar sonolência, rigidez muscular, tontura e vertigem (MATOS, 1988).

A atividade antimicrobiana da *C. biflora* é proveniente de suas raízes e Gonçalves de Lima *et al*(1953) isolaram um princípio ativo o qual foi denominado biflorina.

A biflorina é uma orto- naftoquinona (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)nafta[1,8-bc-piran-7,8-diona) prenilada de origem natural que pode ser facilmente obtida das raízes da *Capraria biflora* L., foi isolada pela primeira vez em 1953 por Gonçalves de Lima *et al*, e seus dados de Ressonância Magnética Nuclear Protônica e Carbono 13 foram registrados pela primeira vez por Fonseca *et al*(2002).

Um das primeiras atividades relatadas sobre a biflorina consiste no seu potencial antimicrobiano frente a bactérias Gram-positivas, álcool-ácido-resistentes e alguns fungos (GONÇALVES DE LIMA *et al*, 1958, 1962; SERPA, 1958)

A atividade da biflorina contra micro-organismos foi testada por Gonçalves de Lima *et al*(1958), que verificaram que a pureza da substância, estava diretamente relacionada com sua atividade. Em 1958, os dois ensaios realizados com diferentes graus de pureza da substância, mostraram que com a biflorina mais pura o valor da Concentração Mínima Inibitória (CMI) era menor.

Estudos realizados por Gonçalves de Lima *et al*(1962) comprovaram experimentalmente a fotossensibilidade da biflorina, verificando sua degradação por exposição à luz natural, posteriormente confirmado com estudos de cultivo *in vitro*. Foi observado que seu produto de degradação continha duas substâncias, uma solúvel e outra insolúvel em éter de petróleo, e que ambas apresentavam atividade antimicrobiana menor em relação a própria biflorina, como mostrado na Tabela 1.

Micro-organismos	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
	Biflorina	Produto solúvel em éter de petróleo	Produto insolúvel em éter de petróleo
<i>Bacillus subtilis</i>	0,8-1,2	50,0	8,0-10,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,2-1,6	50,0	6,0-8,0
<i>Sarcinalutea</i>	0,1-0,2	40,0-50,0	1,0-2,0
<i>Streptococcus hemolyticus</i>	20,0	50,0	50,0
<i>Escherichia coli</i>	20,0	50,0	50,0
<i>Brucella suis</i>	3,2-4,0	20,0-40,0	10,0-20,0
<i>Mycobacterium humanus</i>	20,0	50,0	40,0-50,0
<i>Nocardia asteroides</i>	6,8-8,0	50,0	10,0-20,0
<i>Candida albicans</i>	1,6-3,2	50,0	8,0-10,0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	20,0	50,0	50,0

Tabela 1 -Concentração Inibitória Mínima (CIM) da biflorina e de seus produtos de degradação pela luz natural (Adaptado de Aquino, 2006).

Outros ensaios frente a fungos dermatófitos e leveduras, utilizando principalmente cepas de *Candida albicans*, revelaram uma atividade dose-dependente frente aos micro-organismos sobre os quais ela possui alguma atividade (LYRA JÚNIOR, 1999).

2.5 Câncer e CAL-27

Nas últimas décadas, a biflorina tem mostrado promissora atividade biológica sobre vários organismos. Apenas recentemente, esta quinona começou a desempenhar um importante papel associado ao desenvolvimento e progressão tumoral, onde vários estudos *in vitro* e *in vivo* foram publicados (WISINTAINER *et al*, 2014).

Em estudos *in vitro* com células orais neoplásicas vem sendo utilizada a CAL 27 que apresenta controvérsias na literatura quanto a sua origem. De acordo com Jiang *et al* (2009) essa linhagem celular pertenceria a de carcinoma oral adenoescamoso (COA), no entanto, esta vem sendo usada com frequência no campo de carcinoma oral de células escamosas (COCE). Assim, em seu estudo mostrou que o padrão de crescimento da CAL 27 não parecia ser típico de COCE, e os resultados mostraram que a CAL 27 em xenoenxertos cresceu lentamente *in vivo*, com formação de vesículas em ambas as superfícies e nas zonas mais profundas dos tumores. Os xenoenxertos de CAL 27 foram então diagnosticados como carcinomas adenoescamosos orais (JIANG *et al*, 2009).

Zhang *et al* (2014) e Huang *et al* (2014) consideram em seu estudo a CAL 27 como uma linhagem proveniente de carcinoma oral de células escamosas de língua.

O COCE também denominado carcinoma epidermóide, carcinoma escamocelular e carcinoma espinocelular, é uma neoplasia maligna que se origina no epitélio de revestimento, sendo considerada a neoplasia maligna mais comum nesta região (BRENER *et al*, 2007).

As taxas de incidência e mortalidade para o COCE variam de um país para outro e mesmo dentro de cada país. Essas variações ocorrem, principalmente, pelas diferenças de hábitos, características sócio econômicas, expectativa de vida, fatores ambientais, raça, educação preventiva e qualidade da assistência médica nas diversas regiões. A distribuição das taxas de incidência e de mortalidade de tumores malignos, inclusive o COCE, tem sido, em muitos países, de grande importância para o estabelecimento de diretrizes de políticas públicas em âmbito nacional, estadual e municipal e para o planejamento de ações de prevenção e controle do câncer, além de formas de tratamento ou assistência terapêutica (BRENER *et al*, 2007; ARAUJO FILHO; DE CARLUCCI; SASAKI, 1998).

A abordagem do COCE torna-se complexa, pois, muitas vezes, enfrenta-se o desconhecimento e a falta de recursos dos profissionais de saúde, além de envolver o medo e o preconceito dos pacientes. Essas intercorrências são prejudiciais, atrasando o diagnóstico e o tratamento, e piorando o prognóstico (BRENER *et al*, 2007).

2.6 Ensaios de citotoxicidade com a Biflorina

Vasconcellos *et al* (2007), realizaram um estudo para avaliar a atividade antitumoral *in vivo* da Biflorina através de modelos em camundongos com sarcoma 180 e carcinoma Ehrlich. Os resultados mostraram que a biflorina foi ativa sobre ambos os tumores com um padrão semelhante. Análises histopatológicas dos rins e pulmões mostraram que a biflorina possui efeitos tóxicos fracos e reversíveis. Foi também demonstrado que a biflorina age como um agente imunoadjuvante, aumentando a produção de anticorpos ovalbumina-específicos e induzindo um discreto aumento na polpa branca e ninho de megacariócitos no baço de camundongos tratados, o que pode estar relacionada as suas propriedades antitumorais.

Vasconcellos *et al*(2010) avaliaramos efeitos citotóxicos concentração-dependentes, genotóxicos, antimutagênicos e protetores da biflorina em cepas de *Salmonella tephymurium*, *Saccharomyces cerevisiae*, e células mamárias V79 usando diferentes métodos. No ensaio Salmonella/microsomo a biflorina não foi mutagênica as cadeias TA97a, TA98, TA100 e TA102. Entretanto, a biflorina foi capaz de induzir citotoxicidade em células haplóides de *S. cerevisiae* na fase de crescimento exponencial e estacionária. Em células diploides, a biflorina não induziu significantes efeitos mutagênicos e recombinogênicos na faixa de concentração empregada. Além disso, o pré-tratamento com a biflorina preveniu os eventos mutagênicos e recombinogênicos induzidos pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em *S. cerevisiae*. Nas células mamárias V79, a biflorina foi citotóxica em altas concentrações. Além disso, em baixas concentrações o pré-tratamento com biflorina protege contra danos oxidativos

induzidos por H₂O₂ através da redução dos lipídios e dano do DNA como avaliado pelo ensaio cometa normal e modificado com uso de DNA glicolases. Os resultados sugerem que os efeitos celulares da biflorina são concentração-dependentes. Em baixas concentrações, biflorina possui significantes efeitos protetores, antioxidantes contra a citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e peroxidação lipídica induzida por H₂O₂ em cepas e células mamárias, o que pode ser atribuído às propriedades de limpeza do radical hidroxila. Entretanto, em altas concentrações, a biflorina é citotóxica e genotóxica.

Vasconcellos *et al* (2011), avaliaram a eficácia do tratamento com biflorina tanto *in vitro* quanto *in vivo* em modelos de melanoma. A biflorina exibiu citotoxicidade considerável contra todas as linhas celulares testadas com valores de concentração inibitória média máximas que variam entre 0,58 µg/ml em NCI H23 (adenocarcinoma do pulmão humano) para 14,61 µg/ml em linhas celulares MDA - MB - 231 (cancro da mama humano). Num segundo conjunto de testes utilizando-se células de melanoma B16 como modelo, a biflorina reduziu a viabilidade das células, mas não provocaram qualquer aumento significativo no número de células não viáveis. Além disso, a síntese de DNA foi significativamente inibida. A citometria de fluxo mostrou que a biflorina pode levar a morte por apoptose em células de melanoma, induzindo a fragmentação do DNA e despolarização das mitocôndrias, sem afetar a integridade da membrana. Em camundongos portadores de melanoma B16, a administração de biflorina (25mg/dia) durante 10 dias inibiu o crescimento do tumor, e também aumentou a taxa de sobrevivência média de 33,3 ± 0,9 dias (grupo controle) para 44,5 ± 3,4 dias (grupo tratamento). Os autores sugerem que biflorina pode ser considerada um composto promissor para a concepção de novos fármacos para ser utilizado no tratamento de neoplasias.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar atividade antimicrobiana e citotóxica da biflorina frente a micro-organismos orais e a uma linhagem de célula cancerígena da cavidade bucal.

3.2 Objetivos específicos

- Triar a atividade antimicrobiana da biflorina pelo teste de difusão em ágar sobre os micro-organismos: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis* e *Lactobacillus paracasei*.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da biflorina pela técnica de microdiluição em caldo para os micro-organismos orais em que foi observada atividade antimicrobiana.
- Avaliar a citotoxicidade da biflorina em células neoplásicas da linhagem CAL-27 pelo teste do Alamar blue.

4 METODOLOGIA

4.1 Substância teste

A Biflorina (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil) nafta [1,8-bc]-piran-7,8-diona) foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos do Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas. A substância foi obtida na forma de pó e preparou-se uma solução trabalho em dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec®, RJ, Brasil) na concentração inicial de 1mg/mL que foi armazenada a 4°C em tubo tipo eppendorf.

4.2 Cepas utilizadas

Foram utilizados neste estudo os seguintes micro-organismos da cavidade bucal: *Streptococcus mutans* ATCC25175, *Streptococcus salivarius* ATCC7073, *Streptococcus oralis* ATCC10557 e *Lactobacillus paracasei* ATCC335. As cepas foram disponibilizadas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). A codificação das cepas conserva o registro original. A ativação das mesmas foi realizada conforme as instruções do INCQS e posteriormente o armazenamento foi efetuado a temperatura ambiente.

4.3 Testes para verificação da atividade antimicrobiana

A triagem da atividade antimicrobiana da biflorina foi realizada pela técnica de difusão em ágar (TOBIAS *et al.*, 1985) e a concentração inibitória mínima (CIM) determinada pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2013).

4.4 Teste de Difusão em Ágar

A técnica de Tobias *et al.* (1985) modificada foi empregada neste trabalho. Foi utilizada a solução-trabalho de biflorina na concentração de 1mg/mL. A suspensão do micro-organismo (inóculo) foi preparada em solução fisiológica 0,9% com turbidez equivalente ao tubo 2 da escala de McFarland. As placas foram preparadas pela técnica de semeadura em profundidade, dessa maneira, 500 µl de cada micro-organismo teste foram adicionados a 25 mL de meio Ágar Mueller-Hinton (Himedia[®], Índia). Após solidificação do meio, foram confeccionados cinco orifícios em pontos equidistantes, três para execução do teste em triplicata, um para controle positivo e outro para controle negativo. Os poços superiores foram preenchidos com 20 µL de biflorina, para controle positivo utilizou-se antibiótico Penicilina G e para controle negativo o Dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec[®], RJ, Brasil) na mesma quantidade. As placas foram incubadas em aerobiose e em microaerofilia para *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus paracasei* a 37°C em estufa bacteriológica por 24 horas.

Os halos de inibição foram medidos nos períodos de 24 horas para cada micro-organismo. As leituras foram feitas com olho desarmado, utilizando-se régua milimétrica para determinação do diâmetro do halo de inibição. As medidas foram tomadas tendo dois pontos de referência marcados no menor diâmetro nas extremidades opostas do halo de inibição. Na inexistência de halo de inibição, o micro-organismo foi considerado resistente. O teste foi realizado em triplicata.

O diâmetro dos halos foi classificado de acordo com a metodologia de Alves *et al.* (2000), no qual classifica: zona de inibição inativa: < 9 mm; zona parcialmente ativa: 9-12 mm; zona ativa: entre 13-18 mm; zona muito ativa: >18 mm.

4.5 Método de microdiluição em caldo

A concentração inibitória mínima (CIM) da biflorina foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo realizada de acordo com a padronização publicada no documento M7-A6 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013).

4.5.1 Preparo do Inóculo

A suspensão inicial do inóculo foi preparada em água destilada esterilizada equivalente ao nível de turbidez correspondente a escala #0,5 Mc Farland (PROBAC do Brasil®, SP, Brasil). Em seguida, 10 µL foram pipetados em um tubo de ensaio contendo 9990 µL de Caldo Mueller Hinton (Himedia®, India) completando um volume total de 1mL. Para as placas em que foram testados os *Streptococcus sp* o meio foi suplementado com de sangue de cavalo desfibrinado (2,5%) enquanto para o *Lactobacillus paracasei* utilizou-se sacarose 10% como suplemento (Figura 1).

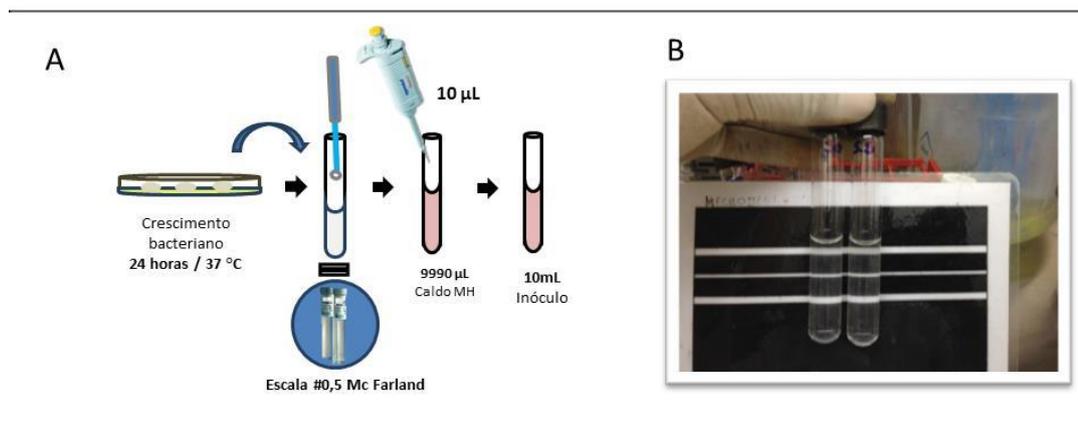


Figura 1 - Esquema de preparo do inóculo para o teste de microdiluição em caldo.

4.5.2 Diluição da Biflorina e clorexidina

A biflorina foi obtida em forma de pó, seu diluente foi o Dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec®, RJ, Brasil). A concentração inicial foi de 100 µg/mL e foram realizadas diluições seriadas para alcançar concentrações de 50 a 0,70 µg/mL. A clorexidina 2% (Maquira®, Paraná, Brasil) foi utilizada como controle positivo e foram realizadas diluições seriadas para alcançar concentrações de 1 a 0,015% (Figura 2).

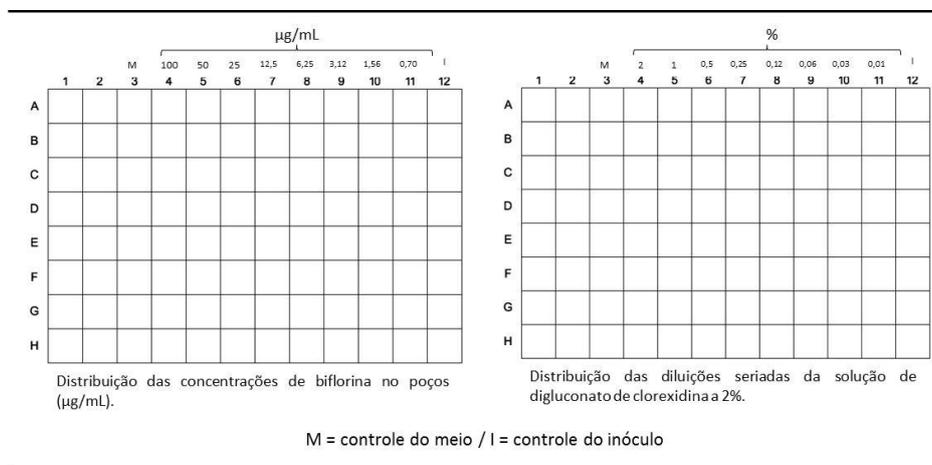


Figura 2- Fluxograma microdiluição: distribuição das substâncias nas microplacas.

4.5.3 Execução do teste

As microplacas de 96 poços foram preenchidas da seguinte forma: 100 µL das concentrações de biflorina foram depositados nos poços das colunas de 4 a 11, da maior para a menor concentração (esquerda para direita), em seguida, 100 µL do inóculo foram depositados nestes poços, totalizando 200 µL em cada poço. Depositaram-se 200 µL do caldo Mueller-Hinton (Himedia®, India) nos poços da coluna 3 para controle do meio e 200 µL do inóculo nos poços da coluna 12 para controle do inóculo. O mesmo protocolo de preenchimento foi utilizado para a clorexidina a 2%, de forma que nos poços das colunas de 4

a 11 foram depositadas as diferentes diluições. A microplacas foram incubadas a 35°C por 48h. Os testes foram realizados em triplicata.

4.5.4 Leitura dos resultados

Foi considerada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da biflorina a menor concentração capaz de inibir qualquer crescimento microbiano visivelmente detectável. Para auxiliar na leitura dos resultados foi empregada a Resazurina 0,04% (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos), onde 15 µL foram adicionados em cada orifício das placas. Após 4h de reincubação a 35°C, a leitura foi realizada. A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) de cor azul é oxidada na presença de células viáveis à resofurina, substância de coloração vermelha, facilitando a verificação da presença de crescimento microbiano(Figura 3) (PALOMINO, 2002).

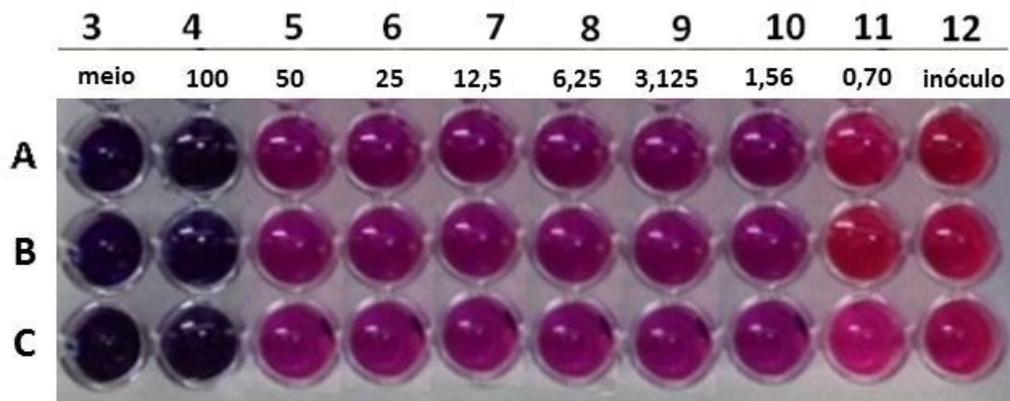


Figura 3 - Microplaca após 4h de reincubação com a resazurina.

4.6 Testes de citotoxicidade

4.6.1 Linhagens celulares utilizadas

Para avaliação da atividade citotóxica foi realizado o ensaio Alamar Blue com linhagens de células neoplásicas de língua (CAL-27).

4.6.2 Manutenção das células neoplásicas

As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL), o meio utilizado foi o DMEM (Dulbezois Modified Eagle Medium/Sigma Aldrich®, Estados Unidos), suplementados com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. O crescimento celular foi acompanhado diariamente com utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre em que o crescimento atingisse confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se a tripsina 0,25% (Cultilab®, SP, Brasil).

O alamar blue, identificado como resazurina (O'BRIEN *et al*, 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como os sais de tetrazólio, o alamar Blue, reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). Este foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos (AHMED *et al*, 1994).

O teste do Alamar Blue foi realizado conforme metodologia descrita por Ahmed *et al*(1994). As células foram transferidas para placas com 96 poços na concentração de 5 x 10⁴ de CAL-27 por poço, em seguida esta placa foi incubada em estufa por 24 horas, a 37 °C a 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram tratadas com concentrações sucessivas de

biflorina (20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,62; 0,31 $\mu\text{M}/\text{mL}$), os ensaios foram realizados em quadruplicatas, no intervalo de tempo de 72 horas. A Doxorrubicina foi usada como controle positivo. O grupo controle recebeu a mesma quantidade de DMSO (diluyente da amostra) da maior concentração de substância. Quatro horas antes do final de cada tempo de tratamento foi acrescentado 10 μL do Alamar blue na concentração de 0,02% e foi realizada a leitura das placas em Leitor de microplaca. Os dados foram analisados no programa Graph Pad prism 5.0 para a determinação de IC₅₀.

5 RESULTADOS

5.1 Teste de atividade antimicrobiana

5.1.1 Teste de Difusão em Ágar

A biflorina apresentou atividade antimicrobiana frente à *Streptococcus mutans* ATCC25175, *Streptococcus salivarius* ATCC7073, *Streptococcus oralis* ATCC10557 e *Lactobacillus paracasei* ATCC335 (Figura 4). O maior halo de inibição (34 mm) foi verificado nos ensaios com o *Lactobacillus paracasei* ATCC335 e o menor (18 mm) nos ensaios com *Streptococcus salivarius* ATCC7073 (Tabela 02). Considerando os critérios de classificação de Alves *et al* (2000), a biflorina foi ativa frente a todos os micro-organismos testados e portanto, foram realizados os ensaios de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

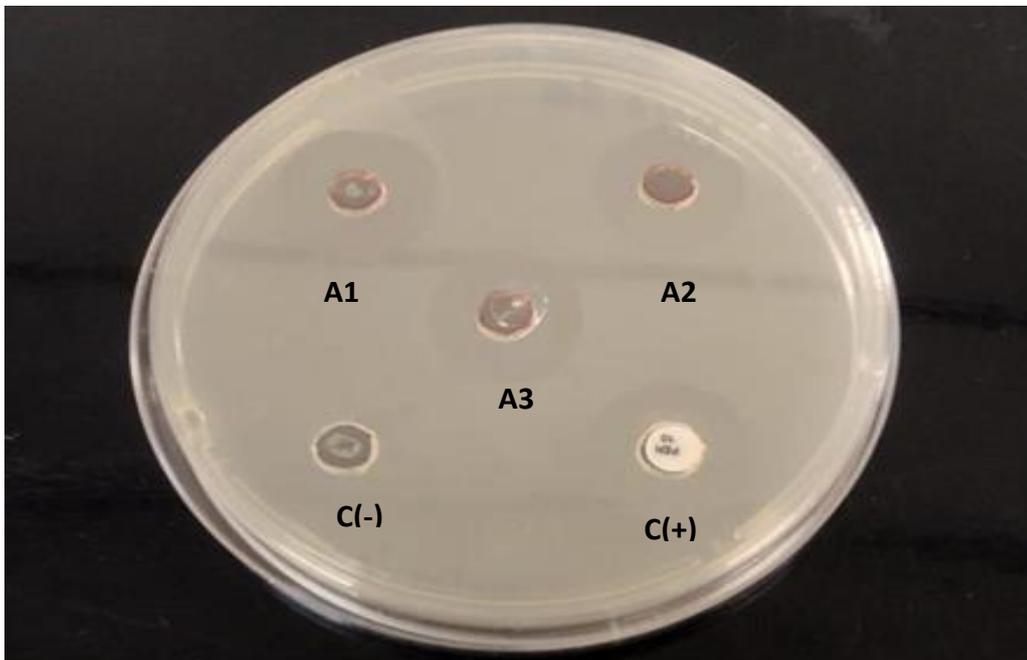


Figura 4 - Atividade antimicrobiana da biflorina após 24h de incubação em estufa a 37°C frente à *Streptococcus salivarius*.

Cepa	Halo de inibição em mm					Controle positivo (Penicilina G)	Classificação da Atividade antimicrobiana (Alves et al., 2000)
	Biflorina (1mg/mL)			Média	Desvio-Padrão		
	A1	A2	A3				
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC25175	15	17	18	17	1,25	35	Ativa
<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC7073	16	15	14	15	0,81	18	Ativa
<i>Streptococcus oralis</i> ATCC10557	18	18	18	18	0	30	Ativa
<i>Lactobacillus paracasei</i> ATCC335	19	20	18	19	0,81	34	Muito ativa

Tabela 2 - Medida dos halos de inibição em mm e classificação da atividade antimicrobiana de acordo com Alves et al. (2000). A1, A2 e A3 representam os ensaios realizados individualmente.

5.1.2 Microdiluição em caldo

A biflorina apresentou melhor atividade antimicrobiana frente ao *S. mutans* (CIM= 0,70 µg/mL) e foi menos ativa frente ao *L. paracasei* (CIM=100 µg/mL). Em relação à clorexidina 2% a menor diluição testada (0,015%) foi capaz de inibir o crescimento de todos os micro-organismos avaliados neste estudo (Tabela 3).

Micro-organismos	CIM Biflorina (µg/mL)	CIM Clorexidina (%)
<i>Streptococcus mutans</i>	0,70	0,015
<i>Streptococcus salivarius</i>	3,125	0,015
<i>Streptococcus oralis</i>	12,5	0,015
<i>Lactobacillus paracasei</i>	100	0,015

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima (CIM) de Biflorina e Clorexidina frente à *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis* e *Lactobacillus paracasei*.

5.2 Atividade citotóxica- Teste Alamar blue

De acordo com os dados obtidos no leitor de ELISA (Beckman Coulter®) e análise visual da placa, a Biflorina na concentração de 20 μM apresentou uma viabilidade de 14,34%.

O valor da IC_{50} da Biflorina sobre a CAL 27 em 72 horas foi de 3,69 $\mu\text{M}/\text{mL}$ (3,17 – 4,30) e para o controle a Doxorrubicina foi 0,039 $\mu\text{M}/\text{mL}$ (0,036-0,088).



Figura 5 -Leitor de placa de ELISA e leitura visual da placa após aplicação do Alamar blue.

6 DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana da biflorina está associada ao mecanismo de ação de compostos naturais e sintéticos que estão na estrutura das quinonas, como o β -lapachol, envolvendo a geração de espécies de oxigênio reativo que tem mostrado ser tóxica ao *Trypanosoma cruzi* e induzir apoptose e/ou interagir com a topoisomerase de células tumorais (FERREIRA *et al*, 2010).

A biflorina possui atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas, tais como, as estudadas nesta pesquisa, concordando com os resultados de Gonçalves de Lima *et al*, em 1961. Algumas espécies, tais como, *Bacillus subtilis* e *Streptococcus hemolyticus* correspondem a algumas das bactérias estudadas, exibindo valores de CIM de 0,8 e 20 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente com a biflorina pura. Entretanto, não são encontrados na literatura mais dados sobre a atividade antimicrobiana da Biflorina desde então.

Em 1961, Gonçalves de Lima *et al* também determinaram que a biflorina sofre degradação pela exposição a luz natural, e que além disso, seus produtos de degradação possuem atividade antimicrobiana menor que a biflorina pura. Dessa forma, este constitui mais um desafio no estudo com esta substância, na tentativa de evitar algum tipo de alteração na sua composição e influência no resultado da pesquisa, e também, na incorporação desta substância em algum produto de uso para a saúde.

Dados utilizando o teste de difusão em ágar com a Biflorina são encontrados no estudo de Lyra Júnior (1999), porém foram realizados com leveduras e fungos dermatófitos, não adequados para efeito de comparação com o presente estudo.

Outros estudos com substâncias isoladas, tais como de Moreira *et al*. (2014) com óleos essenciais isolados das partes aéreas de *Melampodium divaricatum* sobre algumas bactérias de relevância para o presente estudo, utilizaram a microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima. Para o *Streptococcus mutans*, a CIM foi de 20 $\mu\text{g/mL}$, para

Lactobacillus casei 30 µg/mL, para o *Streptococcus salivarius* os valores foram maiores que 400 µg/mL. Enquanto no presente estudos os valores da CIM para estes micro-organismos, foram respectivamente, 0,70 µg/mL, 100 µg/mL e 3,125 µg/mL, dessa maneira, os micro-organismos foram sensíveis em menores concentrações quando comparadas ao estudo de Moreira *et al.* (2014), exceto os valores da CIM para *L. paracasei* em que *Melampodium divaricatum* apresentou CIM superior a da biflorina.

No presente estudo a biflorina mostrou-se mais eficaz sobre o *Streptococcus mutans*, apresentando uma CIM de 0,70 µg/mL. Dessa maneira, a biflorina foi capaz de inibir o crescimento bacteriano em todas as diluições a partir de 100 µg/mL até 0,70 µg/mL, podendo-se estimular posteriores estudos em concentrações menores para determinar se ela ainda permanecerá com sua atividade antimicrobiana. Além disso, o *S. mutans* é uma espécie de grande interesse na odontologia, constitui o principal agente etiológico da cárie dentária e tem desenvolvido vários mecanismos de colonização à superfície dentária e também para tornar-se uma espécie com quantidades significativas em biofilmes cariogênicos (BURNE, 1998). A adesina multi-funcional SpaP, também chamada P1 e PAc1, é considerada um fator primário da adesão inicial de *S. mutans* ao esmalte dentário na ausência de sacarose (BOWEN *et al.*, 1991). *S. mutans* também produz pelo menos três glicosiltransferases (GtfB, -C & -D), que polimerizam o radical glicosil a partir de sacarose e amido, levando a glucanas- α 1,3e - α 1,6, esta molécula que facilita a aderência bacteriana às superfícies dos dentes e ao biofilme (BANAS; VICKERNAN, 2003; BANAS, 2004). GtfBC & D e GbpABC & D, em conjunto com o glucano, constituem a via dependente de sacarose para *S. mutans* para estabelecer na superfície do dente e são fatores centrais na formação do biofilme e desenvolvimento da cárie dentária (TSUMORI; KURAMITSU, 1997). Dessa maneira, este resultado torna-se positivo e estimula uma continuação da pesquisa.

Em relação ao controle utilizado no presente estudo, a clorexidina 2% apresentou CIM de 0,15 mg/mL para todos os micro-organismos testados e apresentou melhor resultado do que todas as concentrações de biflorina testadas. Moreira *et al.* (2014), utilizaram como controle positivo a Clorexidina, e os valores da CIM para o *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus salivarius* foram, respectivamente, 3,69, 0,92 e 7,38 µg/mL. A clorexidina 2% é indicada na odontologia para lavagem de preparos cavitários, como soluções irrigadoras nos tratamentos endodônticos e também para desinfecção de próteses. Sua ação sobre as bactérias da cavidade bucal já é comprovada, e foi confirmada no presente estudo. As limitações e desvantagens da clorexidina que impulsionam a busca de novos agentes terapêuticos são possibilidade pigmentar a língua e os dentes, apresentar custo elevado, ser bactericida em altas concentrações, este último, pelo fato de causar desequilíbrio na microbiota bucal (FIGUEIREDO, 2004; ADDY; MORAN,2000; CORTELLI et al, 2007).

As atividades citotóxicas e antitumorais da biflorina vem sendo amplamente estudadas (VASCONCELLOS et al, 2005, 2007, 2010, 2011; MONTENEGRO et al, 2013). Esta possui efeitos antitumorais *in vivo* e *in vitro*, mas o mecanismo de ação ainda não é conhecido. Apresenta efeitos citotóxico-dependentes em diferentes células eucarióticas, mas não é mutagênica sobre bactérias e leveduras (VASCONCELLOS *et al*, 2010). Sua atividade antitumoral foi testada em células com sarcoma 180, carcinoma de células Ehrlich, melanoma, câncer de mama e no presente estudo, sobre a CAL-27 (carcinoma escamoso da cavidade oral).

Montenegro *et al.* (2013) avaliaram a toxicidade da biflorina sobre linhagens de células normais da mama (MCF-10A) e células neoplásicas (Sk-Br3) através do ensaio de Alamar Blue nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas. Os resultados mostraram que a biflorina não apresentou citotoxicidade frente as células normais da mama. As células cancerígenas tratadas com biflorina (1-10µM) apresentaram citotoxicidade em 24 horas quando

comparadas com as células não tratadas, entretanto, após 24 horas as células começaram a proliferar com o controle negativo. A inibição do crescimento foi observada na concentração de 20 μM em todos os tempos testados (MONTENEGRO *et al*, 2013).

Foi demonstrado anteriormente por Vasconcellos *et al* (2006) que a biflorina possui efeito citotóxico frente a cinco linhagens tumorais, elas: CEM e HL-60 (leucemia humana), B-16 (melanoma murinho), HCT-8 (côlon humano) e MCF-7 (mama humano). Vasconcellos *et al* (2007), também demonstraram que a biflorina possui atividade antitumoral em animais transplantados com Sarcoma 180 e tumor de Erlich com baixa toxicidade. Além disso, foi observado o efeito da biflorina sobre animais transplantados com melanoma B16 e observou que esta aumentava a sobrevida desses animais, mesmo apresentando pouco efeito antitumoral (VASCONCELLOS, 2007; VASCONCELLOS, 2011).

De acordo com o trabalho de Carvalho (2011) no qual avaliou o potencial citotóxico da biflorina frente a linhagem de célula normal MDAMB-435 (células polimorfonucleares de sangue periférico) através do ensaio de alamar blue determinou IC_{50} de 5.12 (4.28-6.12) $\mu\text{g}/\text{mL}$, sugerindo uma baixa seletividade entre sua ação sobre células tumorais e normais.

Barbosa (2012) determinou os valores da IC_{50} da biflorina em células tumorais gástricas e células normais MRC5 em 24 e 72 horas. E para controle utilizou-se a Doxorubicina nos mesmos tempos, porém na tabela 4 abaixo só será representado o tempo de 72 horas.

Linhagens celulares	Biflorina 72 h $\mu\text{M}/\text{mL}$	Doxorubicina 72h $\mu\text{M}/\text{mL}$
ACP02	1.92 (1.7 – 2.19)	1.30 (1.21 – 1.41)
AGP01	3.44	5.89

	(3.32 – 3.56)	(4.76 - 7.30)
PG100	6.35	0.43
	(5.67 – 7.11)	(0.37 - 0.51)
MRC5	0.73	0.10
	(0.62 – 0.85)	(0.086 - 0.13)

Tabela 4 -Valores da IC₅₀ da biflorina sobre células gástricas tumorais e não tumorais (Adaptado de Barbosa, 2012).

No presente estudo o valor da IC₅₀ da Biflorina no tempo de 72 horas sobre a CAL 27 foi de 3.69 e do controle Doxorrubicina foi de 0.039. Isto quer dizer que na concentração de 3,6% a biflorina foi capaz de lesionar ou causar dano em 50% das células, enquanto o controle em menor concentração foi capaz de ser mais tóxico (pois matou 50% da população com uma concentração menor). Ao comparar este índice aos valores de Barbosa (2011) pode-se inferir que a Biflorina sobre as células normais (MRC5) apresentou citotoxicidade na concentração de 0,73%, em uma concentração cerca de 3 vezes menor que sobre a CAL 27, sugerindo que a biflorina, neste caso, foi mais citotóxica para células normais e menos nas células tumorais, discordando dos resultados de Montenegro *et al.* (2013). No entanto, necessita-se para nível de comparação estudos futuros da avaliação da citotoxicidade com células normais da cavidade bucal.

Diante do exposto, a continuidade dos estudos é necessária, principalmente em relação à atividade antimicrobiana, na busca de substâncias que possuam atividade antimicrobiana e não danifiquem as células normais, podendo-se planejar a incorporação dessas substâncias nos produtos de uso na odontologia. Em relação à atividade antitumoral na área da odontologia, os estudos ainda estão dando os primeiros passos e inicialmente sugerem resultados de interesse para o tratamento das neoplasias que acometem a cavidade oral, dessa forma os resultados apresentados tem grande relevância para esta área.

7 CONCLUSÃO

- 1) A biflorina apresentou atividade antimicrobiana na concentração de 1mg/mL frente a *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. oralis* e *L. paracasei*.
- 2) A biflorina apresentou maior atividade antimicrobiana frente ao *S. mutans* (CIM 0.70 µg/mL) e menor frente ao *L. paracasei* (CIM 100 µg/mL).
- 3) A biflorina apresentou menor toxicidade no tempo de 72 horas sobre a linhagem CAL 27 do que o controle positivo Doxorrubicina.
- 4) Os resultados comprovaram o potencial antimicrobiano e antitumoral da biflorina na odontologia, porém é necessária a continuidade dos estudos para que futuramente essa substância possa ser incorporada a produtos de uso odontológico, e também, para o tratamento de neoplasias que acometem a cavidade oral.

8 REFERÊNCIAS

- AAS, J.A.; PASTER, B.J.; STOKES, L.N.; OLSEN, I; DEWHIRST, F.E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol*, v. 43, n. 11, p.5721-732, 2005.
- ADDY, M., MORAN, J. M. Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: chlorhexidine formulations. *Periodontol 2000*, v. 15, n.1, p. 52-4, 1997.
- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H]thymidine incorporation assay, *Journal of immunological methods*, v. 170, n.2, p. 211-24, 1994.
- ALVES, T. M. de A.et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 367-73, 2000.
- ALVES, T. M. de A.et al. Polygodial, the fungitoxic component from the Brazilian medicinal plant *Polygonum punctatum*. *Mem InstOswaldo Cruz*, v. 96, n. 6, p. 831-33, 2001.
- AQUINO, T. M de A.et al. *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae): uma Revisão. *Acta Farm. Bonaerense*, v. 25, n.3, p. 460-67, 2006.
- ARAÚJO FILHO, V.J.F., DE CARLUCCI, J.D., SASAKI, S.U. Perfil da incidência do câncer oral em um hospital geral em São Paulo. *Rev HospClinFac Med*, v.55, n. 3, p. 110-13, 1998.
- BANAS, J.A., VICKERMAN, M.M.Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med*.v.14, n.2, p. 89-99, 2003.
- BANAS, J.A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*.*Front Biosci*, v.9, n.1, p.1267-1277, 2004.

BARBIERI, D.S.V., VICENTE, V.A., FRAIZ, F.C., LAVORANTI, O.J., SVIDZINSKI, T.I.E., PINHEIRO, R.L. Analysis of the in vitro adherence of streptococcus mutans and Candida albicans. *Braz J Microbiol*, v. 38, n.1, p. 624-631, 2007.

BARBOSA, G dos S. Dissertação de mestrado. Pós graduação em Ciências Farmacêuticas. Atividade Anticâncer da Biflorina em células tumorais gástricas. Universidade Federal do Amazonas, 2012.

BOWEN, W.H., SCHILLING, K., GIERTSEN, E., PEARSON, S., LEE, S.F., BLEIWEIS, A., BEEMAN, D. Role of a cell surface-associated protein in adherence and dental caries. *Infect Immun*, v. 59, n.12, p. 4604-4609, 1991.

BRENER, S., JEUNON, F.A., BARBOSA, A.A., GRANDINETTI, H.A.M. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto, *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, n.1, p.63-69, 2007.

BRIZUELA, M. A. et al. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios (Revisión). *Rev. Iberoam. Micol.*, v. 15, p. 69-74, 1998.

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

CARVALHO, A. A. Estudo do potencial antimetastático da biflorina. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2011.

CHELLI-CHENTOUF, N. et al. In vitro and in vivo antimicrobial activity of Algerian HoggarSalvadorapersica L. extracts against microbial strains from children's oral cavity. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 144, n. 1, p. 57–66, 2012.

CHEN, Li; WEN, Yu-mei. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *Int J Oral Sci*, v. 3, p. 66-73, 2011.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement*. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement*. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

COLLINS, D. O. et al. New skeletal sesquiterpenoids, caprariolides A – D, from *Caprariabiflora* and their insecticidal activity. *J. Nat. Prod.*, v. 63, n. 1, p. 1515 -1518, 2000.

CORBY, P. M., BRETZ, W.A., HART, T.C., SCHORK, N.J., WESSEL, J., WEILER, L., PASTER, B.J. Heritability of oral microbial species in caries-active and caries-free twins. *Twin Res. Hum. Genet.*, v. 10, n.1, p. 821–828, 2007.

CORDEIRO, R., NUNES, V. A., ALMEIDA, C. R. “Plantas Que Curam”, Rideel, São Paulo, 1996.

CORRÊA, M. P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Ed. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Brasil, v. 2, p. 205, 1984.

CORTELLI, J. R.; THÉNOUX, R.E.S. The effect of mouthrinses against oral microorganisms. *Braz Oral Res.*, v. 21, n.1, p. 23-8, 2007.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 564 – 582, 1990.

DANTAS, D.D., RAMOS, C.C., COSTA, A.L., SOUZA, L.B., PINTO, L.P. Clinical pathological parameters in squamous cell carcinoma of the tongue. *Braz Dent J.*, v. 14, n.1, p. 22-5, 2003.

DEMAIN, A.L. Indiolites from microorganisms: a brilliant past, a bright future. In: LUIJENDIJK, T.J.C. Ed. *Years of Natural Products Research Past, Present and Future*. 1^a e.d. Leiden: *Phytoconsult*, p. 119-136, 2000.

DE OLIVEIRA, *et al.* Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 13, n.1, p.208-15, 2013.

DEWHIRST, F. E. *et al.* The Human Oral Microbiome. *Journal of bacteriology*.v. 192, n.19, p. 5002–17, 2010.

DEWICK, P.M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. London: John Wiley & Sons, 2002.

DONLAN, Rodney M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Healthcare epidemiology*.v. 33, n. 1, p. 1387–139, 2001.

DOWNES, J., VARTOUKIAN, S. R., DEWHIRST, F. E., IZARD, J., CHEN, T., YU, W. H., Sutcliffe, I. C., Wade, W.G. *Pyramidobacterpiscolens* gen. nov., sp.nov., a member of the phylum ‘Synergistetes’ isolated from the human oral cavity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v. 59, n. 1, p. 972–980, 2009.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Construindo a história dos produtos naturais*. Multiciência.v.7, 2006.

FANI, M.; KOHANTEB, J. Inhibitory activity of Aloe vera gel on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. *Journal of Oral Science*, v. 54, n.1, p. 15-21, 2012.

FERREIRA, S.B., GONZAGA, D.T.G., SANTOS, W.C., ARAÚJO, K.G.L., FERREIRA VF. βLapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. *Rev Virtual Quim*, v. 2, p. 140-160, 2010.

FETROW, C. W.; AVILA, J. R. *Manual de Medicina Alternativa para o Profissional*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999.

FIGUEIREDO, L. C.; CORTELLI, S. C.; ARAUJO, M. W. B.; COELHO, M. H. H.; BARRETO, I. M. Q.; FERES, M. Ação antimicrobiana de extratos vegetais sobre a microbiota da placa dentaria e saliva: estudo in vitro. *Rev. Odontol. UNICID*, v. 16, n. 1, p. 15-20, 2004.

FONSECA, A. M., PESSOA, O. D. L., SILVEIRA, E. R., MONTE, F. J., BRAZ-FILHO, R., LEMOS, T. L. G. Total assignments of ^1H and ^{13}C spectra of biflorin and bis-biflorin from *Caprariabiflora*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 41, n.1, p. 1038-40, 2003.

FONSECA, A. M.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. G. Total assignmentes of ^1H and ^{13}C spectra of biflorin and bis-biflorin from *Caprariabiflora*. *Magnetic resonance in chemistry*. v. 41, p. 1038-40, 2002.

GONCALVES DE LIMA, O et al. Biflorina, Novo Antibiótico, Isolado da *Capraria biflora*. *Rev. Quim. Industrial*, v.14, n.1, p. 2-3, 1953.

GONCALVES DE LIMA, O et al. Breve Nota Sobre a Atividade Antimicrobiana da Biflorina Purificada por Partição Graig. *Rev. Inst. Antiot.* ½, p. 95-97, 1958.

GONCALVES DE LIMA, O., D'ALBUQUERQUE, I.L., MAIA, D., BORBA, M.A. A ação da luz sobre a biflorina. *RevInstAntibiot*, v. 3, n.1, p. 97-100, 1961.

GONCALVES DE LIMA, O.; D' ALBUQUERQUE, I.L.; NAVARRO, M. C. P. Novo Método de Extração e Purificação da Biflorina com Possibilidade Industrial. *Rev. Inst. Antibiot.* ½, p. 79-81, 1962.

HAIDA, K. S., PARZIANELLO, L., WERNER, S., GARCIA, D. R., INÁCIO, C. V. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umarama, set./dez.*, v. 11, n. 3, p. 185-192, 2007.

HARVEY, A.L. Natural products in drug discovery. *Drug discovery today*, v.13, n.19/20, p. 894-901, 2008.

HUANG, H-W. , CHING Y-A., CHANG, H-S., TANG, Y-J., CHEN, I-S., CHANG, H-W. Antiproliferative Effects of Methanolic Extracts of *Cryptocarya concinna* Hance Roots on Oral Cancer Ca9-22 and CAL 27 Cell Lines Involving Apoptosis, ROS Induction, and Mitochondrial Depolarization. Hindawi Publishing Corporation, 2014.

INCA, 2014. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.124p.

JEMAL, A., SIEGEL, R., WARD, E., HAO, Y., XU, J., THUN, M.J. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, v. 59, n.4, p. 225-49, 2009.

JIANG, L., JI, N., ZHOU, Y., LI, J., LIU, X., WANG, Z., CHEN, Q., ZENG, X. CAL 27 is an oral adenosquamous carcinoma cell line. *Oral Oncol*, v. 45, n.11, p. 204-207, 2009.

JORGE, Antonio Olavo Cardoso. *Microbiologia e imunologia oral*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

KUTCHAN, T.M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiology*, v. 125, p. 58-60, 2001.

LEWANDOWSKI Z. Structure and function of biofilms. In: EVANS LV, ed. *Biofilms: recent advances in their study and control*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 1-17, 2000.

LOE, H., SHIOTT. C.R. The effect of suppression of the microflora upon the development of dental plaque and gingivitis. In McHugh, W. D.; *Dental Plaque*. E. eLivistone. Edinburgh. 247 – 256, 1970.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. “Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas” Instituto Plantarum, São Paulo, 2002. In: AQUINO, T. M. de, LIMA C. S. A, ALBUQUERQUE, U. P. de, AMORIM, E. L. C. de. *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae): uma Revisão. *Acta Farm. Bonaerense*, v. 25, n.3, p. 460-467, 2006.

LYRA JUNIOR, D. P. Isolamento, Atividade Antifúngica e Validação do Método de Doseamento da 3-prenil-6,9-dimetil-7,8-dioxoquinona – Biflorina. Recife. Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE, 1999, 106p. Dissertação de Mestrado

MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*, v. 149, n. 2, p. 279-294, 2003.

MARSH, P. D. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am*, v. 54, n. 3, p. 441-54, 2010.

MASADEH, M. M., GHARAIBEH, S. F., ALZOUBI, K. H., AZZAM, A. OBEIDAT, W. M. Antimicrobial activity of common mouthwash solutions on multidrug-resistance bacterial biofilm. *J Clin Med Res*, v. 5, n. 5, p. 389-94, 2013.

MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais. Univ. Aberta, p. 2, 1988. In: AQUINO, T. M. de, LIMA C. S. A, ALBUQUERQUE, U. P. de, AMORIM, E. L. C. de. *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae): uma Revisão. *Acta Farm. Bonaerense*, v. 25, n.3, p. 460-467, 2006.

MONTENEGRO, R. C., BURBANO, R.R., DA SILVA, M.N., LEMOS, T.G., VASCONCELLOS, M.C. Biflorin, A Naphthoquinone, Inhibitsegfr in BreastCancerCells. *Med chem*, an open access jornal, v.3, n.1, p.179-182, 2013.

MOREIRA, R.R.D., MARTINS, G.Z., BOTELHO, V.T., SANTOS, L.E., CAVALEIRO, C., SALGUEIRO, L., ANDRADE, G., MARTINS, C.H.G. Composition and Activity against Oral Pathogens of the Essential Oil of *Melampodiumdivaricatum* (Rich.). *Chemistry & biodiversity*, v.11, n.1, 2014.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (Resazurin fluorescent dye for tgeassesmente of mammalian cell cytotoxicity, *European Journal of Biochemistru*, v. 267, p. 5421-26, 2000.

PALOMINO, J. C. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.*46, 2720, 2002. In: STOPPA, MarcosAurélio et al. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. *Quím. Nova* [online], v.32, n.2, p. 498-502, 2009

PARK, H-W., CHOI, K-D., SHIN I-S. Antimicrobial Activity of Isothiocyanates (ITCs) Extracted from Horseradish (*Armoracia rusticana*) Root against Oral Microorganisms. *Biocontrol Science*, v. 18, n. 3, 163-168, 2013.

REESE S., GUGGENHEIM B. A novel TEM contrasting technique for extracellular polysaccharides in in vitro biofilms. *Microsc Res Tech*, v. 70, n.9, 816-822, 2007.

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J.P.V.; DANTAS-BARROS, A.M. Perfil da utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob influência da legislação nacional. *Rev. Bras. Farmacogn*, v. 15, n. 1, p. 65-70, 2005.

ROLLA, G; MELSEN, B. On the mechanism of plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res*. v. 54, p. B57-62, 1975.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Orgs.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, p. 403-434, 2003

SCULLY, C., KIRBY, J. Mouth câncer statement lauch. *PrimDent J*, v. 3, n.1, p. 24-25, 2014.

SERPA, J. Ticosporonose Cutânea Curada com Biflorina. *Anal. Fac. Med. Recife*, v.18, n.1, p. 33 – 37, 1958.

SILVA, B. R. Antimicrobial activity of the synthetic peptide Lys-a1 against oral streptococci. *Peptides*, v. 42, n. 1.P. 78–83, 2013.

SMIECH-SLOMKOWSKA, G.; JABLONSKA-ZROBEK, J. The effect of oral health education on dental plaque development and the level of caries-related *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. *European Journal of Orthodontics*, v. 29, n.1, p. 157–160, 2007.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*, v. 28, n. 1, p. 12–55, 2002.

TANAKA, T., TANAKA, M., TANAKA, T. Oral carcinogenesis and oral cancer chemoprevention: a review. *Patholog Res Int*.2011.

TEIXEIRA, K. I. R.; BUENO, A. C.; CORTÉS, M. E. Processos Físico-Químicos no Biofilme Dentário Relacionados à Produção da Cárie. *Química Nova na Escola*, v. 32, n. 3, p. 145-150, 2010.

TOBIAS, R.S., BROWNE, R.M., WILSON, C.A. Antibacterial activity of dental restorative materials. *Int Endodo J*, v. 18, n.3, p.161-171, jul, 1985.

TOMCYK, M.; PLESZCYNska, M.; WIATER, A. Variation in Total Polyphenolics Contents of Aerial Parts of *Potentilla* Species and Their Anticariogenic Activity. *Molecules*, v. 15, n. 1, p. 4639-51, 2010.

TSUMORI, H., KURAMITSU, H. The role of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases in the sucrose-dependent attachment to smooth surfaces: essential role of the GtfC enzyme. *Oral Microbiol Immunol*, v.12, n.5, p. 274-280, 1997..

TURESKY, S. et al. Prolongation of anti-bacterial, activity of chlorhexidine absorbed to teeth. Effect of surfaces. *J. Periodontol*.v. 48, n. 10, p. 646-649, 1977.

VASCONCELLOS, M.C. et al. Bioactivity of biflorin, a typical o-naphthoquinone isolated from *Caprariabiflora*, L. Z. Naturforsch C 60, p.394-398, 2005.

VASCONCELLOS, M. C. et al. Antitumor Activity of Biflorin, an o-Naphthoquinone Isolated from *Capraria biflora* L. *Bio Pharm Bull*, v. 30, n. 8, p. 1416-21, 2007.

VASCONCELLOS, M. C. et al. Evaluation of the cytotoxic and antimutagenic effects of biflorin, an antitumor 1,4 o naphthoquinone isolated from *Caprariabiflora* L. *Arch toxicol*. p. 1-12, 2010.

VASCONCELLOS, M. C. et al. The in-vitro and in-vivo inhibitory activity of biflorin in melanoma. *Melanoma Research*, v. 21, n. 1, p. 106–114, 2011.

WADE, William G. Characterisation of the human oral microbiome. *Journal of Oral Biosciences*, v. 55, n. 3, Aug, p. 143-148. 2013.

WISINTAINER, G.N.S. et al. Biflorin: an o-naphthoquinone of clinical significance. *An Acad Bras Cienc*, 2014.

WOLFF, Mark Steven; LARSON, Charlie. The cariogenic dental biofilm: good, bad or just something to control?. *Braz. oral res*. São Paulo , v. 23, 2009

WOOD, S.R., KIRKHAM, J., MARSH, P.D., SHORE, R.C., NATTRESS, B. ROBINSON, C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Dental Research*, v. 79, n. 1, p. 21-27, 2000.

WU, C. D.; SAVITT, E. Evaluation of the safety and efficacy of over the counter oral hygiene products for the reduction and control of plaque and gingivitis. *Periodontol*, v. 28, n. 1, p. 91-105, 2000.

ZANELA, N. L. M.; BIJELLA, M. F.T. B; ROSA, O.P da S.The influence of mouthrinses with antimicrobial solutions on the inhibition of dental plaque and on the levels of mutans streptococci in children.PesquiOdontolBras, v. 16, n. 2, p. 101-106, 2002.

ZHANG, G. et al.Apoptosis of human tongue squamous cell carcinoma cell (CAL-27) induced by Lactobacillus sp. A-2 metabolites. J Appl Oral Sci, v. 22, n. 4, p.282-6, 2014.