

MARA RUBEA TINOCO RODRIGUES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DE LECTINAS
DE SEMENTES DE *Talisia esculenta* e *Labramia
bojeri* SOBRE O BIOFILME ORAL**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do Grau de Mestre em
Odontologia em Saúde Coletiva.

PIRACICABA – SP
2005

MARA RUBEA TINOCO RODRIGUES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO DE LECTINAS
DE SEMENTES DE *Talisia esculenta* e *Labramia
bojeri* SOBRE O BIOFILME ORAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Grau de Mestre em Odontologia em Saúde Coletiva.

Orientador: Prof. Dr^o. Francisco Carlos Groppo.

Coorientador: Prof. Dr^a Maria das Graças Machado Freire.

Banca examinadora:
Prof. Dr^o. Antônio Carlos Pereira
Prof. Dr^o. Francisco Carlos Groppo.
Prof^a. Dr^a Juliana Cama Ramacciato.

PIRACICABA - S.P
2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecário: Sueli Ferreira Julio de Oliveira – CRB-8ª. / 2380

OL4a	<p>Oliveira, Mara Rubea Tinoco Rodrigues de. Avaliação <i>in vitro</i> do efeito de <i>lectinas</i> de sementes de <i>Talisia esculenta</i> e <i>Labramia bojeri</i> sobre o biofilme oral. / Mara Rubea Tinoco Rodrigues de Oliveira. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2005.</p> <p>Orientadores: Francisco Carlos Groppo, Maria das Graças Machado Freire. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Lectinas de plantas. 2. <i>Streptococcus</i>. 3. Aderência bacteriana. 4. Biofilmes. I. Groppo, Francisco Carlos. II. Freire, Maria das Graças. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">(sfjo/fop)</p>
------	--

Título em inglês: Evaluation of in vitro effects of *Talisia esculenta* and *Labramia bojeri* seeds lectins on oral biofilm.

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): 1. Plant lectins. 2. *Streptococcus*. 3. Bacterial adhesion. 4. Biofilms.

Programa Mestrado Profissionalizante em Odontologia em Saúde Coletiva

Titulação: Mestre em Odontologia em Saúde Coletiva

Banca examinadora: Antônio Carlos Pereira, Francisco Carlos Groppo, Juliana Cama Ramacciato

Data da defesa: 12/12/2005.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO
PROFISSIONALIZANTE, em sessão pública realizada em 12 de Dezembro de 2005,
considerou a candidata MARA RÚBEA TINOCO RODRIGUES DE OLIVEIRA aprovada.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "F. C. Groppo".

PROF. DR. FRANCISCO CARLOS GROPPPO

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Juliana Cama Ramacciato".

PROFª. DRª. JULIANA CAMA RAMACCIATO

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marcelo de Castro Meneghim".

PROF. DR. MARCELO DE CASTRO MENEGHIM

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a quatro pessoas:

A Minha mãe, NADYR. Mulher guerreira,
vitoriosa! Meu orgulho, meu espelho!

A Minha tia Else Maria.

Por ter me acolhido como filha, contribuindo
para que chegasse até aqui.

A Minha amiga Flávia Amoy.

Pelo incentivo, paciência e grande amizade
que sempre demonstrou.

A Ivete Kabouk.

Que me fez perceber que poderia ir até
onde meus olhos alcançassem!

AGRADECIMENTOS

À Deus pela presença constante em minha vida!

À Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, na pessoa de seu Magnífico Reitor, Prof. Drº Carlos Henrique de Brito Cruz.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP, na pessoa de seu Diretor, Prof. Drº Thales Rocha de Mattos Filho.

Ao Coordenador Geral dos Cursos de Pós-Graduação da FOP, Prof. Drº Lourenço C. Sobrinho.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP, Profª Drª Maria Cristina Volpato.

Ao meu orientador, Prof. Drº Francisco Carlos Groppo, pela simpatia e simplicidade aliadas ao profundo conhecimento científico. Sabendo ser flexível e exigente na medida certa, contribuindo sobre maneira para meu crescimento profissional e científico.

A Profª Drª Maria das Graças Freire por ter me confiado à missão de levar adiante seu trabalho científico, mesmo sabendo de minhas limitações na área.

Ao Prof. Drº Antônio Carlos Pereira pela compreensão demonstrada frente às intercorrências.

Ao Prof. Drº Marcelo Meneghin pelas palavras de incentivo em momentos difíceis.

Ao Doutorando Marcelo Henrique Napinoga, que esteve ao meu lado, prestando preciosas informações e orientações, sem as quais este trabalho não seria possível.

A Mestranda Karina Gogo, pela paciência e conhecimento demonstrados, dedicando também parte de seu tempo à realização deste trabalho.

Aos colegas Cristina, Sebastião, Hayana, Edinalva, Viviane, Osvaldo, Isaura, Eloísio e Luis, pelos momentos bons e difíceis que passamos juntos nesta jornada.

De tudo ficou um grande carinho e já muita saudade!

EPÍGRAFE

De tudo ficaram três coisas:

*A certeza de que estamos
começando, a certeza de que
é preciso continuar e a
certeza de que podemos ser
interrompidos antes de
terminar.*

*Fazer da interrupção um
caminho novo.*

*Fazer da queda um passo de
dança.*

Do medo uma escola.

Do sonho uma ponte.

Da procura um encontro.

E assim terá valido a pena.

Fernando Sabino

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	02
1. INTRODUÇÃO	03
1.1 - A Fitoterapia na Atenção Primária a Saúde	03
1.2 - A Pesquisa de Produtos Naturais em Odontologia	09
1.3 - Microrganismos Orais	11
1.4 - Lectinas	14
2. CAPÍTULO	17
3. CONCLUSÃO	30
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
5. ANEXO	40
1-E-mail de recebimento do artigo	41

RESUMO

A medicina natural e complementar, especialmente a fitoterapia, suprem as necessidades em saúde de grande parte da população, particularmente nos países em desenvolvimento. Dentre os fitoterápicos, as lectinas podem ter valia como agentes antiplaca, uma vez que podem estar intimamente relacionadas com a aderência de microrganismos. O objetivo deste estudo foi testar *in vitro* a capacidade de inibição das lectinas isoladas (TEL - derivada da semente de *Talisia esculenta* e LABRAMIN - purificada da planta *Labramia bojeri*), na adesão e crescimento de microrganismos orais (*Streptococcus sanguinis*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. mutans*, *S. sobrinus*). A atividade antimicrobiana das duas lectinas foi determinada pelo teste convencional da macrodiluição de caldo, sendo testada as concentrações de 400, 200, 100, 50, 25 µg/mL contra 10⁵ CFU/mL dos microrganismos em estudo. Os tubos foram incubados (10% CO₂, 37°C, 18h) e submetidos à leitura de densidade óptica (OD a 600nm). A MBC foi determinada pela adição das amostras de cada tubo em placas de petri contendo agar BHI (10% CO₂, 37°C, 18h). Para avaliação de aderência foi feito um ensaio semiquantitativo de aderência em placas de microtitulação de poliestireno, onde foi adicionado 100 µL de saliva clarificada e incubada por 2h a 37°. Após lavagem com PBS, foram adicionadas às placas em triplicata 100 µL de lectinas (6.25, 12.5, 25, 50 e 100 µg/mL) e incubados durante 1h. A seguir foi adicionada 100 µL de suspensão bacteriana (10⁶ UFC/mL) e incubado a 37°C em uma atmosfera de 10% de CO₂. A aderência foi revelada e quantificada por tintura com cristal violeta. A absorção do cristal violeta foi determinada por um leitor de placa (575nm). Nem a TEL nem a LABRAMIN foram capazes de inibir ou matar os microorganismos estudados. No teste de inibição de aderência, a LABRAMIN reduziu significativamente a aderência de *S. mutans* e *S. sobrinus*, na concentração de 100µg (p< 0,05). A TEL não inibiu a aderência dos estreptococos e ainda favoreceu a aderência do *S. mitis*. Concluiu-se que embora nenhuma das lectinas estudadas tenham atividade antimicrobiana, a LABRAMIN foi capaz de inibir a aderência de estreptococos cariogênicos.

ABSTRACT

Natural and complementary medicine, with special regard to phytotherapy, provide care for health needs of a great part of the world's population, particularly in developing countries. Among phytotherapeutic compounds, lectins could be of value as anti-plaque agents, once they can be closely related to microorganisms' adherence. Our study intended to test, *in vitro*, the capacity of two isolated lectins – TEL (derived from *Talisia esculenta* seeds) and LABOL (purified from the plant *Labramia bojeri* – for inhibiting the adherence and growth of oral microorganisms (*Streptococcus sanguinis*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. mutans*, *S. sobrinus*). Both lectins' antimicrobial activities were determined by a conventional macrodilution broth test. Study's microorganisms concentrations were tested for 400, 200, 100, 50, 25 µg/mL against 10⁵ CFU/mL. Tubes were incubated (10% CO₂, 37°C, 18h) and submitted to optical density reading (OD at 600nm). MBC was determined by the addition of samples from each tube to petri dishes containing agar BHI (10% CO₂, 37°C, 18h). A semiquantitative assay was performed for adherence assessment in polystyren microtiter plates. A hundred microliter (100µL) of clarified saliva were added and incubated for 2h at 37°. Following PBS wash, 100 µL lectins (6.25, 12.5, 25, 50 e 100 µg/mL) were added to the triple plates and incubated for 1h. Then, 100 µL of bacterial suspension (10⁶ UFC/mL) were added and incubated at 37°C in a 10% CO₂ atmosphere. Adherence was revealed and quantified by crystal violet staining. A plate reader (575nm) determined crystal violet absorbance. Nor TEL nor LABOL were able to inhibit or kill the studied microorganisms. Regarding adherence inhibition, 100µg concentration of LABOL showed statistically significant ($p < 0.05$) on *S.mutans* and *S. sobrinus*. TEL did not inhibit streptococci adherence; yet, it favored *S. mitis* adherence. It was concluded that, although none of the studied lectins had presented antimicrobial activity, LABOL was capable of inhibiting cariogenic streptococci adherence. Further studies will be necessary to assess such lectins' potential over other microorganisms and over oral biofilm.

1 INTRODUÇÃO

1.1- A Fitoterapia como Estratégia na Atenção Primária a Saúde

As plantas medicinais compõem o arsenal terapêutico desde tempos remotos. O fato de recorrer às suas virtudes curativas retrata um dos primeiros esforços do homem para decifrar e utilizar a natureza em seu benefício direto, sendo uma resposta ao mais antigo desafio vencer a doença e, acima de tudo, a morte. Todas as civilizações em momentos históricos diversos, desenvolveram, além da habilidade do cultivo de plantas para alimentação, a capacidade de pesquisar e armazenar conhecimentos sobre suas propriedades terapêuticas. Conhecimentos estes, que foram transmitidos de geração em geração, por via formal e informal, persistindo até os dias atuais.

Mesmo o advento e crescimento da indústria farmacêutica no final do século XIX e início do século XX, apesar de ter negligenciado estes conhecimentos, não foi capaz de romper totalmente seus alicerces, em especial com aqueles desprovidos de recursos e acesso a crescente e fértil indústria alopática.

É provável que a medicina herbária chinesa tenha uma história de quatro mil anos, sendo as primeiras publicações sobre o assunto datado do século 400AC. As civilizações Egípcia, Grega e Romana também acumularam conhecimentos empíricos que foram transmitidos principalmente pelos árabes aos herdeiros europeus destas civilizações. Dentre estes conhecimentos, se destaca a capacidade dos egípcios em utilizar o ópio obtido da papoula há mais de 4000 anos antes de se conhecer o processo de isolamento da morfina, ocorrido somente no século XIX. Um conjunto de tratados, conhecido como *Corpus Hipocraticum*,(460-377 AC) onde para cada enfermidade era descrito um remédio vegetal a ser utilizado, foi contribuição dos gregos (CARVALHO, 1988).

Nos séculos XVII e XVIII aconteceram as primeiras identificações de princípios ativos. Algumas substâncias importantes foram decifradas neste

período, tais como a vitamina C, isolada a partir da casca do Limão e usada para combater o escorbuto; o quinino extraído da árvore *Chinchona officinales*, utilizada para combater a febre e posteriormente à malária; o ácido acetilsalicílico, a partir da casca do salgueiro; a vitamina B, a partir da casca do arroz; a atropina a partir da beladona; a cocaína a partir da coca; a pilorcapina do jaborandi brasileiro; os digitais da dedaleira, entre outros.

Assim, o sucesso dos medicamentos sintéticos foi diretamente proporcional à descoberta dos princípios ativos oriundos, na sua grande maioria, de vegetais. No entanto, a crescente indústria quimioterápica se colocou como o grande milagre científico em detrimento a fitoterapia, classificada naquele momento como magia, feitiçaria e charlatanismo. Portanto, pode-se afirmar que a ciência se valeu da medicina folclórica, para seguir em frente na luta contra as doenças, uma vez que as informações dos “raízeiros”, “anciãos” e “indígenas” foram às fontes primárias para o isolamento dos princípios ativos (XAVIER, 1997).

Atualmente, as plantas medicinais apresentam-se em formulações desde artesanais até as mais sofisticadas, fabricadas em escala industrial (MATOS, 1997). É crescente o interesse global no aproveitamento da biodiversidade, representando a expansão de novas fronteiras de um mercado cada vez mais lucrativo em países desenvolvidos e a possibilidade do uso racional das riquezas naturais em prol da saúde pública em países em desenvolvimento, representando formas de terapia mais baratas e mais acessíveis.

É importante ressaltar que um lado obscuro do interesse pela fitoterapia é a biopirataria. Calcula-se que esta atividade ilícita movimentou cerca de US\$ 20 bilhões/ano (ARRUDA, 2003). É evidente que toda esta movimentação é estimulada pela indústria farmacêutica, em sua maioria multinacionais.

Valores fornecidos por uma consultoria internacional na área de fitoterápicos, mostram que no ano de 2000, o mercado mundial de fitoterápicos movimentou cerca de 19,6 bilhões de dólares. Para o ano de 2002, a previsão era de que, somente a Europa, fosse registrado um volume da ordem de 7,5 bilhões de dólares. Na Europa, a Alemanha lidera o uso de fitoterápicos, com vendas

anuais totalizando aproximadamente 2,7 bilhões de dólares, sendo que o valor gasto por habitante/ano naquele país alcança 84,00 dólares. No Brasil, existem estatísticas que indicam que os laboratórios privados produzem cada vez mais produtos, com um aumento estimativo de 20% ao ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (O.M.S.) (WHO,2005), apesar da medicina moderna ter alcançado grande avanço tecnológico, grande parte da população dos países em desenvolvimento depende dos profissionais tradicionais, das plantas medicinais e dos medicamentos fitoterápicos para a sua atenção primária de saúde, sendo que este percentual pode variar entre 80 a 85% da população destes países (ELIZABETSKY, 1987; FARNSWORTH, 1985).

Há décadas a O.M.S. vêm estimulando o uso das chamadas práticas de medicina tradicional e medicina complementar alternativa (MT/MCA),entre as quais a fitoterapia, de forma integrada aos sistemas nacionais de saúde, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico (WHO,2005). Para melhor entendimento pode-se definir cada uma destas práticas como:

MEDICINA COMPLEMENTAR ALTERNATIVA (MCA)-refere-se grosso modo, ao conjunto de práticas de cuidados em saúde que não fazem parte da tradição de um país e não estão inseridos ao Sistema de cuidados em saúde dominante. Também conhecidos como “medicina natural” ou “medicina holística”.

MEDICINAS TRADICIONAIS (MT)-nesta área compilam-se conhecimentos, técnicas e práticas intrínsecas a diferentes culturas, explicáveis ou não, usados para todas as formas de cuidados em saúde.

Na Conferência Internacional de Cuidados Primários em Saúde (1978), a qual foi reconhecida mundialmente como um marco teórico conceitual de afirmação do Paradigma de Promoção de Saúde, foi recomendada aos governos a inserção da medicina tradicional nos Sistemas Nacionais de Saúde (WHO,1978). No mesmo sentido foi elaborado o programa de Medicina Tradicional e Medicina Complementar Alternativa (MT/MCA), recomendando a difusão, em nível mundial,

dos conhecimentos necessários para o seu uso. Desde então a OMS vem através de comunicados e resoluções incentivando os estados-membros a adotar políticas nesta área (WHO, 2002). Na 40ª Assembléia Mundial de Saúde (1987), são reiteradas as considerações da Conferência de Internacional de 1978, além de enfatizar aos estados membros a necessidade de implementação de programas amplos de produção, preparo e conservação de plantas medicinais, bem como da garantia de qualidade das mesmas e de seus derivados. (WHO, 2002).

Dentre as muitas características positivas na prática da MT/MCA, podem se destacadas a diversidade e a flexibilidade; acessibilidade e equidade em muitas partes do mundo; ampla aceitação popular em países em desenvolvimento; aumento da popularidade nos países desenvolvidos; custo comparativo relativamente baixo; baixo nível de investimento tecnológico e uma crescente importância econômica. Entretanto, existem obstáculos para a implementação dos programas de MT/MCA, tais como a falta de uma política nacional de inclusão destas práticas na atenção primária; ausência de pesquisas adequadas e, portanto, de evidência científica da eficácia de muitas destas terapias; escassez de investimentos na formação de recursos humanos e inexistência de programas educativos que incentivem e orientem sobre uso racional destes produtos (OMS, 2000). Estas abordagens começaram a se fortalecer no Brasil na década de 80, principalmente com a implementação do Sistema Único de Saúde (SUS) em 1988.

Analisando que, para um contingente considerável de pessoas (cerca de dois terços da população), a rede pública brasileira de prestação de serviços é a única alternativa para assistência à saúde e, conseqüentemente, do acesso aos medicamentos essenciais (CONASS, 1997), o uso de medicamentos alternativos mais baratos deve-se constituir em ação governamental concreta para fazer frente às necessidades terapêuticas.

A criação do SUS na constituição e a regulamentação das leis 8080 e 8142 em 1990, firmaram novas doutrinas e diretrizes no rumo das políticas de

saúde, entre elas a descentralização propiciou aos municípios maior autonomia para implementação de políticas locais. A participação popular também veio garantir a população maior ingerência na formulação e fiscalização das políticas de saúde.

A Lei 8080/90, em seu artigo 6º, estabelece como campo de atuação do Sistema Único de Saúde - SUS - "formulação da política de medicamentos (...) de interesse para a saúde (...)", sendo seu propósito garantir a necessária segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos, a promoção do uso racional e o acesso da população àqueles considerados essenciais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1990).

No entanto, a implantação da fitoterapia no SUS, atravessou muitos percalços, dentre eles o pouco interesse político e a falta de um suporte legal consistente, ficando como marco deste processo algumas experiências pontuais de alguns municípios, muitas consideradas hoje referência nacional. Porém, ficou latente a necessidade de diretrizes específicas no que diz respeito a financiamento, recursos humanos, apoio técnico-científico e definição intersetorial para execução dos objetivos propostos.

Existe um movimento crescente com vias à institucionalização da fitoterapia no SUS, o que se evidencia nas várias portarias e resoluções publicadas, em especial a partir dos anos 80.

Em 1982, ainda na gestão do INAMPS, a Central de Medicamentos do Ministério da Saúde (CEME) criou o Programa de Plantas Medicinais, que teria como estratégia específica o estabelecimento do real valor terapêutico das preparações de plantas medicinais de uso popular, a partir de uma completa bateria de testes farmacológicos, toxicológicos, pré-clínicos e clínicos. Aquelas preparações em que fossem comprovados reais efeitos terapêuticos seriam incorporadas a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1982).

As Resoluções da Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação – Ciplan – nº 4, 5, 6, 7 e 8/88, de 1988, fixaram normas e diretrizes

para o atendimento em homeopatia, acupuntura, termalismo, técnicas alternativas de saúde mental e fitoterapia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1988).

O Conselho Federal de Medicina (CFM), por meio do parecer nº 06/91, no ano de 1991, reconhece a prática da fitoterapia sob supervisão do profissional médico. Em 1992, por meio do parecer 04/92 o CFM reconhece a fitoterapia como método terapêutico, devendo ser respeitada a devida fiscalização pela Vigilância Sanitária e realizar-se maior investimento na formação de recursos humanos qualificados. (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA, 1991, 1992).

A 10ª Conferência Nacional de Saúde em 1996, no seu relatório final, aprovou a “incorporação ao SUS, em todo o País, de práticas de saúde como a fitoterapia, acupuntura e homeopatia, contemplando as terapias alternativas e práticas populares” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996).

Em 2003, o relatório da 1ª Conferência Nacional de Assistência Farmacêutica, enfatizou a importância de ampliação do acesso aos medicamentos fitoterápicos e homeopáticos no SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). No mesmo ano, o relatório final da 12ª Conferência Nacional de Saúde delibera para a efetiva inclusão da Medicina Natural e Práticas Complementares no SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Em 2005, o Ministério da Saúde apresentou a Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares que compila uma série de objetivos e estratégias para incorporação efetiva das práticas de homeopatia, fitoterapia, acupuntura e medicina antroposófica no âmbito do SUS. Aprovado pela comissão intergestora tripartite, o documento aguarda aprovação pelo Conselho Nacional de Saúde.

Com a elaboração deste documento e o conseqüente comprometimento das instituições com suas bases, vislumbra-se um aprofundamento ainda maior nos preceitos filosóficos do SUS, uma vez que as práticas naturais e complementares vêm de encontro a uma visão integralizada, equânime e universal da saúde pela conotação holística de sua aplicação, construindo novos alicerces na dialética que envolve o processo saúde-doença.

1.2 - Pesquisas com Produtos Naturais em Odontologia

A pesquisa e utilização de fitoterápicos são mais difundidas na medicina que na Odontologia. Entretanto, muitas propriedades aplicáveis à área médica podem também ser transferidas à odontológica.

Alguns agentes terapêuticos vêm sendo estudados com o objetivo de reduzir os níveis de estreptococos orais. Dentre eles, a clorexidina tem-se demonstrado efetiva e segura em seus resultados (PUCHER & DANIEL, 1992; JENKINS et al., 1993; RENTON-HARPER *et al.*, 1996; HILDEBRANDT, 1996).

Entretanto, os efeitos colaterais desta bisguanidina catiônica, tais como alterações de paladar, gosto desagradável, inflamação gengival e manchamento dental, são ainda motivos de preocupação (BOWDEN, 1996). Devido a estes efeitos colaterais, têm sido feitas pesquisas que buscam, basicamente, compostos com efeitos terapêuticos similares a clorexidina, mas que tenham menor indução de efeitos colaterais.

Já foi demonstrado que extratos hidroalcoólicos de *Matrichara camomila* e mirra exibem efeitos comparáveis a clorexidina sobre microorganismos anaeróbios (MATOS, 1997). Também foi demonstrada a ação antimicrobiana contra bactérias cariogênicas de flavonas extraídas de plantas como *Artocarpus heterophyllus* e a *Sophora exigua* contra lactobacilos e actinomicetos (BANDEIRA, 1999; TSUCHIYA, 1999).

O óleo de *Melaleuca alternifolia*, uma mirtácea australiana, demonstrou efetividade *in vitro* contra muitas cepas de estreptococos orais (KIM, 1997), sendo que da *Camelia sinenses* é extraído um polifenol (sunfenon), que apresenta efeito inibitório sobre glucanos insolúveis produzidos pela glicosiltransferase dos *S. mutans* e *S. sobrinus* (KASHKET, 1985). O extrato aquoso de alho mostrou inibição da síntese de proteínas, de ácidos nucleicos e de lipídeos de *Candida albicans*, traduzindo-se em potente efeito fungicida (ADENTUMBI *et al.*, 1986).

RAMACCIATO, J.C. (2000), avaliou *in vivo* atividade antimicrobiana de soluções a base de alho (*Allium sativum*), óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e clorexidina sobre microrganismos totais e estreptococos do grupo mutans, concluindo que as três soluções promoveram reduções favoráveis, não havendo diferença estatística no efeito comparativo entre elas. Desta forma, sugere a autora, que apesar do alho apresentar efeitos indesejáveis, esta solução assim como o óleo de melaleuca podem ser usados como alternativa à clorexidina.

É claro o grande potencial a ser explorado e a necessidade latente de incremento técnico e financeiro em pesquisas para avaliar a efetividade de produtos naturais, uma vez que são necessárias análises progressivas começando com estudos laboratoriais *in vitro*, passando por modelos de estudo *in vivo* e culminando com os estudos clínicos longitudinais (TEN CATE & MARSH, 1994).

1.3- MICROORGANISMOS ORAIS

A cavidade oral dos humanos suporta uma microbiota complexa, que reflete a diversidade dos *habitats* e dos ecossistemas ali localizados (THYLSTRUP & FEJERSKOV, 1995), compondo uma rede dinâmica de mais de 500 espécies de microrganismos, entre bactérias, fungos, protozoários e micoplasmas (LOESCHE, 1986).

Diferentes locais na cavidade bucal são colonizados por populações distintas de bactérias. Todas as superfícies expostas da boca (dentes, tecidos periodontais e a língua) apresentam microrganismos específicos associados. A sensibilidade a agentes nocivos de uma espécie para um determinado nicho pode ser influenciada por especificidade de aderência a determinados substratos, especialmente no caso dos colonizadores iniciais da cavidade bucal. As bactérias que chegam posteriormente podem ser capazes de aderir não só as superfícies bucais, mas também as outras bactérias que já estão aderidas às superfícies (WEN, 2002).

Numa fase inicial, entre 3 a 4 horas após a limpeza adequada, o dente é colonizado por estreptococos, particularmente *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. mitis*, e por alguns bastonetes gram-positivos como *Actinomyces viscosus* e *A. naeslundii*, considerados colonizadores iniciais, sendo necessário pelo menos 24 horas sem remoção mecânica adequada para que haja formação de uma camada de “biofilme” clinicamente evidenciável (MERIJOHN, 2001).

Os estreptococos do grupo *mutans* (particularmente o *S. mutans* e *S. sobrinus*) têm sido fortemente implicados como microrganismos causadores de cárie dental (HAMADA & SLADE, 1980). A presença de sacarose é essencial para o acúmulo de destes estreptococos sobre os dentes e para o início da cárie. Estes microrganismos sintetizam grandes quantidades de glucanos a partir da sacarose e têm normalmente uma lectina de ligação de glucano (LLG) e as chamadas glicosiltransferases, as quais são capazes de se ligarem aos glucanos e sintetizá-los.

Devido a sua associação com a cárie, uma avaliação do número destes estreptococos no biofilme dentário e na saliva pode ser útil como auxiliar no diagnóstico de cárie (BOWDEN,1996).

A colonização microbiana não é um processo passivo e requer aderência da bactéria à superfície (NYVAD & FEJERKOV, 1995). A adesão inicial ocorre através da película adquirida, por meio de receptores que estabelecem ligações específicas com adesinas da superfície bacteriana (MARSH, 1992). Entende-se por película adquirida uma camada acelular que se deposita no esmalte superficial dos dentes, tendo como principais constituintes componentes originários da saliva e do fluido gengival, como proteínas, glicoproteínas e lipídios, além de componentes bacterianos, como as glicosiltransferases (MARCOTTE & LAVOIE, 1998). Por este processo de especificidade, as bactérias com pouca ou nenhuma afinidade à película, são eliminadas pelo fluxo salivar. Assim as interações bactéria/película são de suma importância nos estágios iniciais de formação do biofilme dental (GIBBONS *et al*, 1990).

Após a colonização inicial, ocorre o crescimento rápido dos colonizadores (BOWDEN & EDWARDSSON, 1995). Através de relações interbacterianas, como co-agregação, produção de bacteriocinas e interações nutricionais, ocorre o aumento da diversidade microbiana até atingir uma comunidade clímax em duas ou três semanas. Neste contexto, os dentes oferecem condições ideais para colonização e desenvolvimento microbiano, pois são superfícies não renováveis e, em alguns locais, propícios ao acúmulo bacteriano (NYVAD & FEJERSKOV, 1995).

As doenças que surgem neste ambiente são ocasionadas por um desequilíbrio no ecossistema do biofilme oral, pois é reconhecido que a formação do mesmo é temporário e envolve um processo heterogêneo em relação à microbiota, no qual o crescimento desta estrutura e as mudanças ocorrem em decorrência da alteração do substrato e das condições locais (THEILADE, 1990). Portanto, o controle adequado do biofilme oral é de suma importância para

prevenção tanto da cárie, quanto da doença periodontal (THYLSTRUP & FEJERSKOV, 1995).

1.3- LECTINAS

As lectinas são definidas como proteínas de origem não imune que se ligam de maneira reversível a carboidratos ou substâncias que contenham açúcares, tais como glicoproteínas. Têm capacidade em aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados devido a sua capacidade específica de reconhecimento e ligação sem, entretanto, alterar a estrutura de nenhum glicosil ligante (GOLDSTEIN *et al.*, 1978; LIENER *et al.*, 1986).

As lectinas foram descritas inicialmente por STILLMARK (1988), que observou a aglutinação de hemácias quando estudava o efeito tóxico de extratos de semente de mamona (*Ricinus communis*) sobre o sangue, sendo que posteriormente se confirmou que o material responsável pela hemaglutinação era uma proteína, a qual foi chamada posteriormente de ricina. Atualmente, se sabe que a ricina é na verdade uma complexa mistura de moléculas tóxicas e lectinas não-tóxicas.

Estas proteínas têm sido encontradas em larga escala, em uma variedade de formas de vida – microrganismos, mamíferos e vegetais - sendo que aquelas encontradas nos vegetais superiores têm sido mais estudadas (GILBOA-GARBER *et al.*, 1977; OTTENSÖOSER *et al.*, 1974).

Dentre os papéis biológicos detectáveis nas lectinas, podemos citar sua ação fungicida, antimicrobiana e inseticida, além de mimetizar as selectinas humanas e estimular células do sistema imune (FREIRE, 2003).

De acordo com KOLENBRANDER (1993), muitas das interações específicas de aderência entre bactérias da placa bacteriana oral humana apresentam-se mediadas por lectinas. Uma adesina lactose sensível tem sido isolada da *Prevotella loescheii* PK 1295, exibindo propriedades de aderência em todas as células. A adesina do *Streptococcus sanguinis* é uma lipoproteína que parece ter dupla função de reconhecimento de ambos os receptores bacterianos e na saliva humana.

A co-agregação oferece uma boa explicação para a agregação temporária da placa bacteriana e do reconhecimento da superfície de mucosas. Segundo NYVAD (1987), na colonização microbiana da superfície dentária pelos estreptococos do grupo *viridans* e actinomicetos, é tido como certo o envolvimento de lectinas mediando a adesão bacteriana. Têm sido observada uma coagregação lactose-sensitiva entre alguns estreptococos e actinomicetos, além da co-agregação do tipo GalNAc (CISAR, 1986). Este tipo de coagregação é mediado pelas interações de receptor de lectina envolvendo galactose (Gal), adesinas GalNAc reativas associadas com um tipo de fímbria (tipo 2) do *Actinoyces naeslundii*, adesinas reativas de *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus gordonii*, além de receptores complementares de muitos outros estreptococos do grupo *viridans* (HUS, 1994).

As interações mediadas pelas lectinas entre alguns grupos de microrganismos orais (CISAR *et al*, 1997) têm importante papel na colonização das superfícies dentárias. Alguns tipos de lectinas vegetais podem inibir o crescimento microbiano e a atividade proteolítica (JORGE *et al.*, 1998). Além disso, seria possível a inibição da aderência, mediada pelas lectinas bacterianas, pelas lectinas vegetais.

Entre as lectinas vegetais recentemente isoladas tem-se a TEL, originária da planta *Talisia esculenta*, de nome vulgar “pitomba”, e a LABRAMIN extraída da espécie *Labramia bojeri*, popularmente conhecida como “abricó da praia”.

A *Talisia esculenta* pertence à família *Sapindaceae*, com ocorrência no Amazonas, Pará e Maranhão até o Rio de Janeiro, nas florestas pluvial amazônica e atlântica. É particularmente freqüente na Amazônia ocidental e no norte do Espírito Santo (Vale do Rio Doce). Sendo seus frutos comestíveis e muito saborosos, a ponto de serem comercializados nas feiras da região Nordeste e Norte do país. Também são muito procurados por pássaros que agem como dispersores das sementes (LORENZI, 1992 apud FREIRE, 2003).

MACEDO *et al.* (2001), relata que a TEL e a LABRAMIM foram isoladas através de técnicas cromatográficas.

Lectina

Características estruturais

TEL

- Glicoproteína com 18% de carboidratos totais, que dependem do íon cálcio para realizar atividade hemaglutinante;
- Estável na faixa de pH de 3 a 9;
- Estável na faixa de temperatura de 37° a 60°;
- Quatro isoformas constituídas por cadeias polipeptídicas (peso= 20 e 40 KDa), ligadas covalentemente;
- 40 a 50% de aminoácidos hidrofóbicos;
- Ligação específica aos carboidratos: D-manose, D-glicose e n-acetilglicosamina.

LABRAMIN

- Estável em temperaturas até 70° C;
- Estável numa faixa de pH de 2 até 10;
- Apresenta ligação aos carboidratos específicos: D-manose e D-glicose;

Em Odontologia, ainda são escassos os estudos avaliando a ação inibitória de lectinas vegetais na aderência de microrganismos ao biofilme oral.

Portanto, sendo as lectinas proteínas ou glicoproteínas que tem a propriedade de se ligar a carboidratos e uma vez que existe este tipo de interação no processo de formação do biofilme bacteriano, o presente trabalho visou estudar *in vitro* os efeitos da lectina das sementes de *Talisia esculenta* (TEL) e *Labramia bojeri* (LABRAMIN) sobre o biofilme oral, objetivando futuramente, sua aplicação em Saúde Pública.

2 CAPÍTULO

Esta tese está de acordo com a Informação CCPG 001/98, UNICAMP, que regulamenta o formato alternativo para dissertação e tese, permitindo a inserção de artigos científicos de autoria ou co-autoria do candidato. Assim sendo, esta tese é composta de um estudo que se encontra em fase de submissão em revista científica conforme descrito abaixo:

INHIBITION OF BACTERIAL ADHERENCE TO SALIVA-COATED THROUGH PLANT LECTINS

O artigo foi submetido à revista *Protein Peptide Letters*.

O objetivo geral do presente trabalho foi analisar *in vitro* o efeito das lectinas TEL e LABRAMIN sobre o crescimento e a adesão inicial de estreptococos orais à película adquirida.

INHIBITION OF BACTERIAL ADHERENCE TO SALIVA-COATED THROUGH PLANT LECTINS

Mara Rúbea Tinoco Rodrigues de Oliveira¹; Marcelo Henrique Napimoga²; Karina Cogo¹; Reginaldo Bruno Gonçalves²; Maria Lígia Rodrigues Macedo³; Maria das Graças Machado Freire⁴; Francisco Carlos Groppo^{1*}.

¹Department of Physiologic Sciences, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, SP

²Department of Oral Diagnostic, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, SP

³Department of Natural Sciences, Federal University of Mato Grosso do Sul, Três Lagoas, MS

⁴Research' Center, Superior Institutes of CENSA, Campos dos Goytacazes, RJ

*** Correspondent author address:**

Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

Pharmacology, Anesthesiology and Therapeutics Area, **Piracicaba Dental School, State University of Campinas**

Av. Limeira, 901 – Areião - Piracicaba, São Paulo, Brazil

13414-903 – Caixa Postal 052

fcgroppo@fop.unicamp.br

Phone/FAX: + 55 19 3412 5310

*To whom all correspondence should be addressed

Running Title: Oral streptococci adherence inhibition by plant lectin

Supported by: FINEP, CNPq, FUNDECT

ABSTRACT: The ability to inhibit adherence of microorganisms and the antimicrobial properties of two proteins extracted from plants, a lectin from *Talisia esculenta* (TEL) and a protein from *Labramia bojeri* seeds with lectin-like properties (Labramin) were studied. Minimum inhibitory (MIC) and bactericidal (MBC) concentrations of each protein were obtained against *Streptococcus mutans* 159, *Streptococcus sobrinus* 6715, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mitis* ATCC 903 and *Streptococcus oralis* PB 182 growth. In addition, the same microorganisms were submitted to the adherence assay by using sterile polystyrene U-bottom microtiter plates and human saliva. Plates were washed with PBS twice and 100 μ L of each lectin solution previously filtered (0.2 μ m) were added (6.25, 12.5, 25, 50 and 100 μ g/mL) and then incubated during 1 h, aerobically, at 37°C. Plates were washed with PBS and an aliquot of 100 μ L of the bacterial suspension of each species (10^6 UFC/mL) was transferred to the plate and incubated at 37°C during 1 h, in an atmosphere of 10% CO₂. The adherence of bacteria to the acquired pellicle was revealed and quantified by staining with crystal violet. Crystal violet absorbance was determined with a plate reader at 575 nm. Acquired pellicle, which was induced by saliva, plus lectin solutions negative and acquired pellicle and bacteria consisted as and positive control respectively. The assays showed that neither Labramin nor TEL in any of the studied concentrations were able to inhibit any of the microorganisms. Only Labramin showed inhibitory effect against the adherence of cariogenic streptococci (*S. mutans* and *S. sobrinus*) at 100 μ g/mL. We concluded that Labramin lectin has potential as biofilm-inhibitory solution.

Key Words: Streptococci, plant lectins, adherence, dental biofilm

1. Introduction

Dental surfaces exposed to the oral environment are almost instantaneously covered by a proteinaceous film, designated the acquired enamel pellicle. This protein film is formed by a selective adsorption process comprising salivary proteins, peptides and other organic molecules [1]. The initial process of adhesion comprises the specific adsorption of these species present in the oral cavity to the proteinaceous film covering tooth surfaces, which is also known as acquired enamel pellicle [2].

Dental caries are caused by colonization and accumulation of oral microorganisms and the adherence phenomenon is the first step to colonization [3]. Oral organisms attach to salivary components of the acquired enamel pellicle and, through growth and interactions between species, form a biofilm community [4]. Consequently, bacterial recognition of salivary receptors on the tooth surface represents an important early step in the pathogenesis of oral disease.

In vitro findings have shown that bacteria adhering to saliva-coated and uncoated hydroxyapatite are different [1] suggesting that pellicle somehow determines at least the initial stages of bacterial attachment to the tooth surface.

Most bacteria grow into populations by adhering to solid surfaces and ultimately forming mixed culture biofilms where *actinomyces* and *streptococci* are predominant in biofilm collected within the first hours of its formation [5].

Because of their role in adhesion and agglutination, lectins have been considered to be important in both symbiotic and pathogenic interactions between some microorganisms and hosts [6]. In bacteria, expressed surface-exposed carbohydrates, such as peptidoglycan, teichoic acids and lipopolysaccharides are potential lectin-reactive sites. The ability of lectins to complex with microbial glycoconjugates has made it possible to employ the proteins as probes to investigate cell surface structures and functions. One of the important applications of lectin in microbiology is direct aggregation of suspended microorganisms [7]. Lectins are the only plant proteins capable of recognizing and binding glycoconjugates present on the external surface of microorganisms such as bacteria and fungi, inhibiting their motility and multiplication [8], [9].

The purpose of the present study was to examine the inhibitory effects of *Talisia esculenta lectin* (TEL) and a protein extracted from *Labramia bojeri* seeds with lectin-like properties (Labramin), on biofilm formation *in vitro*.

2. Material and Methods

2.1. Microorganisms

Exponentially growing cells of each one of the species (*Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus sobrinus* 6715, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mitis* ATCC 903 *Streptococcus oralis* PB 182) were centrifuged at 10,000 rpm during 5 min, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS, pH 6.8) and then, re-suspended. The cell suspension was then spectrophotometrically (Genesys 10UV, Rochester, USA) adjusted to give a final concentration of 10^6 CFU/mL.

2.2. Proteins

Talisia esculenta lectin (TEL) were prepared as previously described by Freire et al. [10] and Labramin was obtained as described by Macedo et al., [11].

The purity level of both lectins was evaluated through PAGE-SDS method according to Laemmli [12], which is basically consisted of denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.

2.4. Collection of whole saliva

Written informed consent was obtained from all individuals and the experimental procedures were approved by the Institutional Ethical Committee of Faculty of Dentistry of Piracicaba, State University of Campinas. Saliva was collected from individuals refrained from food and tooth brushing for 2 hours under masticatory stimulation, mixed and clarified by centrifugation (14,000 rpm, 4°C, 20 min) and immediately used.

2.5. Minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC)

The antimicrobial activity of the two proteins was determined by the conventional broth macrodilution test [13]. All microorganisms were submitted to MIC assay.

Aliquots (50 μL) of previously adjusted suspensions (10^5 CFU/mL) of each microorganism were added to screw-capped sterile tubes containing 5 mL of BHI with serial two-fold dilutions of both lectins (400, 200, 100, 50, 25 $\mu\text{g/mL}$). Positive controls were tubes containing the standardized inoculum and broth. Negative controls were tubes containing broth plus each dilution of the lectins.

Reading of optical density (OD at 660 nm) of all tubes was performed by using a spectrophotometer before and after incubation (10% CO_2 , 37°C, 18h). MIC was considered as the lowest concentration that produced no growth in comparison to negative controls. MBC was considered as the lowest concentration which killed 99.9% of inoculum) and it was determined by spreading 25 μL of samples of each tube in petri dishes containing 9 mL of BHI agar and incubating (10% CO_2 , 37°C, 18h).

2.6. Adherence on surface of microtiter plates

Aliquots of 100 μL of clarified saliva were transferred to a sterile polystyrene U-bottom microtiter plates (Dynatech Lab, Chantilly, Va, USA) and incubated aerobically for 2 h at 37°C. Plates were washed with PBS twice and 100 μL of lectin solution previously filtered (0.2 μm) were added (6.25, 12.5, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$) and then incubated during 1 h under the same conditions described above. Plates were washed with PBS and an aliquot of 100 μL of the bacterial suspension of each species (10^6 UFC/mL) was transferred to the plate and incubated at 37°C during 1 h in an atmosphere of 10% CO_2 [14].

The adherence of bacteria to the acquired pellicle was revealed and quantified by staining with crystal violet [15] Crystal violet absorbance was determined with a plate reader at 575 nm (Versa Max, Microplate Reader). The assay was performed in triplicate plates for all bacteria and lectins. Acquired pellicle, which was induced by saliva, plus lectin solutions negative and acquired pellicle and bacteria consisted as and positive control respectively.

2.7- Statistical analysis

Statistical analyses were carried out by Kruskal-Wallis test with the level of significance set at $p < 0.05$ (Bioestat 3.0).

3. Results

MIC and MBC assay showed that neither Labramin nor TEL were able to inhibit or kill any of the microorganisms in any of the studied concentrations.

The inhibitory effect over adherence of both proteins is shown in Figure 1 (Labramin) and Figure 2 (TEL). To determine the response trend and the ideal concentration that have effectively inhibition, various concentrations of both lectins were tested. Only Labramin showed statistical inhibitory effect against the adherence of cariogenic streptococci *S. mutans* and *S. sobrinus* at 100 µg/mL ($p < 0.05$), while *S. mitis*, *S. oralis* and *S. sanguinis* were not efficiently inhibited. However, the assay using TEL (100 and 50 µg/mL) showed increased biofilm formation of *S. mitis*, and no inhibitory effects among the others four streptococci species tested.

4. Discussion

Long-term survival of bacteria in the oral cavity requires that the organisms adhere to a tissue surface or identify a suitable niche in the complex multispecies biofilm that exists on human oral tissues. However, the molecular mechanisms utilized by many oral organisms to recognize and distinguish appropriate environmental niches in the oral biofilm are still not well understood [16]. Microbial colonization of the human tooth surface is initiated by the attachment of *viridans* group streptococci to salivary components of the acquired pellicle, followed by the growth of these bacteria together with neighboring members of the developing biofilm community. One of the many molecular mechanisms of adherence and the development of mixed species oral biofilms is the specific lectin–carbohydrate interactions between bacteria, such as those detected by the lactose-sensitive coaggregations of actinomyces with streptococci [17].

Carbohydrate chains on the human cell are primary receptors for many microorganisms. The corresponding lectin (adhesin) of a microorganism ensures the binding to these chains. The anti-adhesion therapy means inhibition or, better yet, complete blocking of lectin-mediated adhesion [18]. It is believed that reducing the mass of mutans streptococci in dental biofilm could lower the incidence of dental carries. The use of anti-adhesion agents that disengage mutans streptococci from the dental biofilm or interfere with their adhesion, without affecting their viability, may prove clinically advantageous, as selective pressure and

overgrowth of resistant bacteria would be avoided [19]. Thus, the research of substances that affect the adhesion but not kill mutans streptococci, such as the lectins in the present study, are very important.

Recently, two acid lectins of mulberry leaves were discovered and it was verified that they were able to agglutinate the pathogenic bacteria *P. syringae* pv *mori* [20]. Other vegetable lectins, such as *Griffonia simplicifolia* lectin (GS I), *Canavalia ensiformis* lectin (Con A), wheat-germ agglutinin (WGA), peanut lectin (*Arachis hypogaea*) and the lentil lectin (*Lens culinaris*), also showed effect against this bacterium. Other plant lectins, such as soybean agglutinin (SBA) [21] and *Dolichos biflorus* [22] can specifically react with group C streptococci. These lectins probably affect these bacteria by the interacting with N-acetyl-D-galactosamine residues found in their external structures.

TEL and Labramin were previously tested against different phyto-bacteria strains such as *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Gram-positive) and *P. cichorii*, *X. campestris* pv *campestris*, *X. campestris* pv *melonis* (Gram-negative). All these bacteria showed exponential pattern of growth in comparison to those incubated with TEL (100 µg). Inhibition of *P. cichorii* growth takes place mainly at initial stages of multiplication, 3 h (76%) and 4 h (56%) as an early response of blockage of bacterial motility. However, inhibitions were detected on growth of *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (42%) after 18 h; *X. campestris* pv *campestris* (16%) after 32 h and *X. melonis* (60%) after 12 h. Considering Labramin (100 µg), a delay in the bacterial growth were just detected on growth of *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (20%) after 14 h and *X. melonis* (23%) after 18 h [23]. These results were not similar in comparison to the ones observed at the present study, since we observed the effectiveness of Labramin but not TEL, probably because the bacteria used here were completely different from the phyto-bacteria.

Lectin interaction with exogenous glycosylated macromolecules or cells may also lead to conformational changes which enable the adjacent lysin activity [24,25]. The lysins which may reside with the lectins in the same molecule or in adjacent location, display various lytic or toxic activities, including: sialidases, o-glycosidases, N-glycosidases, glycosyl or sialyl transferases and hemolytic activities. The functions of lectins are: homing onto glycosylated receptors, anchoring to them and induction of cooperative conformational effects which enable their counterpart lysin activity on exogeneous or endogeneous target

molecules and cells. The final result of their co-function is practically irreversible: cell and macromolecule lysis for nutrition, homeostasis and protection or cell alteration, reorganization and new productivity [26].

In our study it was possible to observe that Labramin showed the ability to inhibit biofilm from cariogenic streptococci however did not inhibit others streptococci tested. Interestingly, both lectins did not show any antimicrobial activity against the microorganism tested. Lee et al. (1998) [27] tested lectins of various specificities for interaction with strains of oral streptococci of various species. The lectins were capable of binding galactose, N-acetylgalactosamine, glucose, N-acetylglucosamine, mannose, fucose and sialic acid. Lectin reactivities were strain-dependent in that some members of a species, but not others, could be aggregated by certain lectins.

Unique ligands on the surfaces of microorganisms appear to interact specifically with pellicle components by diverse mechanisms, including cell-cell and substrate-cell interactions [28,29]. In the case of several oral bacterial species, this interaction may involve lectin-like components of the organism, which bind to saccharide receptors in the salivary glycoproteins making up the pellicle [30,31]. TEL and its isoforms present approximately 40 to 50% of hydrophobic amino acids and specific carbohydrate linkage (D-mannose, D-glucose and N-acetylglucosamine), however Labramin is composed by D-mannose and D-glucose.

Our study revealed a new type of plant lectin effect, involving alterations on biofilm formation. The above study was conducted on a homo-species culture. Further studies on multi species cultures will broaden our knowledge on the effect of both lectins used as an anti-biofilm agent.

References

- [1] Clarck, W.B., Bammann, L.L., Gibbons, R.J. (1978) *Infect. Immun.*, 19, 846-853.
- [2] Yao, Y., Berg E.A., Costello C.E., Troxler R.F., Oppenheim, F.G. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 5300-5308.
- [3] Gibbons, R.J. (1984) *J. Dent. Res.*, 63, 378-85.
- [4] Palmer Jr., R.J., Gordon, S.M., Cisar, J.O., Knolenbrander P.E. (2003) *J. Bacteril.*, 185, 3400-3409.
- [5] Li, J., Helmerhorst, E.J., Leone, C.W., Troxler, R.F., Yaskell, T., Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Oppenheim, F.G. (2004). *J. Appl. Microbiol.*, 97, 1311-8.
- [6] Slifkin, M., Doyle, R.J. (1990). *Clin. Microbiol.*, 3, 197-218.
- [7] Calderon A.M., Buck, G., Doyle, R.J. (1998) in *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* TEXTOP (Bog-Hansen, T.C., Van Driessche, E., Eds). Denmark.
- [8] Broekaert, W.F., Peumans, W.J. (1986) *Clin. Biochem.*, 5, 57-65.
- [9] Gaidamashvili, M., van Staden, J. (2002) *South African. J. Botan.*, 68, 36-40.
- [10] Freire, M.G.M., Gomes, V.M., Corsini, R.E., De Simone, S.G., Novello, J.C., Marangoni, S., Macedo, M.L.R. (2002) *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 61-68.
- [11] Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Martins, L.T.D.M., Martinez, D.S.T., Gomes, V.M.G., Smolka, M.B., Toyama, M.H., Marangoni, S., Coelho, L.C.B.B. (2004) *J. Agric. Food Chem.*, 52, 7548-7554.
- [12] Laemmli, V.K. (1970) *Nature*, 227, 680-685.
- [13] Koneman, E. W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn J.R., W.C. (1994) in *Introduction to diagnostic microbiology*. (Winters, R., Ed). pp. 1140-1151 J.B. Lippincott Company, Philadelphia.
- [14] Palmer Jr., R.J., Gordon, S.M., Cisar, J.O., Kolenbrander, P.E. (2003) *J. Bacterial.*, 185, 3400-3409.
- [15] Mattos-Graner, R.O., Napimoga, M.H., Fukushima, K., Duncan, M.J., Smith, D.J. (2004) *J. Clin. Microbiol.*, 42, 4586-4592.
- [16] Demuth, D.R., Irvine, D.C., Costerton, J.W., Cook, G.S., Lamont, R.J. (2001) *Infect. Immun.*, 69, 5736-41.

- [17] Takahashi, Y., Ruhl, S., Yoon, J.W., Sandberg, A.L., Cisar, J.O. (2002) *Oral Microbiol. Immunol.* 17, 257-62.
- [18] Zopf, D., Roth, S.(1996) *The Lancet.* 347, 1017-21.
- [19] Steinberg, D., Feldman, M., Ofek, I., Weiss, E.I. (2004) *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 86-89.
- [20] Ratanapo, S., Ngamjuyaporn, W., Chulavatnatol, M. (2001). *Plant Science*, 160, 739-744.
- [21] Olson, M.O., Liener, I.E. (1967) *Biochemistry*, 380, 1-8.
- [22] Kahane, L., Tully, J.G. (1976) *J. Bacteriol.*, 128, 1-7.
- [23] Freire, M.G.M., Araújo Júnior R.T., Mazzafera, P., Macedo, M.L.R. (2005) in *X Brazilian Congress of Plant Physiology; XII American Latin Congress of Plant Physiology* (<http://www.cfv2005.com.br/trabalhos10.php>)
- [24] Barondes, S.H. (1981) *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 207-231.
- [25] **Zusman, D.R., Cumsy, M.G., Nelson, D.R., Romeo, J.M.** (1986) in *Microbial lectins and agglutinins: properties and biological activity* (Mirelman, D., Ed). pp. 197-216. John Wiley & Sons, New York.
- [26] Garber-Gilboa, N., Garber, N. (1989). *FEMS Microbiol.*, 63, 211-222.
- [27] Lee, W., De La Barca, A.M., Drake, D., Doyle, R.J. (1998) *J. Med. Microbiol.*, 47,29-37.
- [28] Gibbons, R.J., Hay, D.I, Cisar, J.O., Clark, W,B.(1988) *Infect. Immun.*, 56, 2990-2993.
- [29] Kolebrander, P,E., London, J. (1993) *J. Bacteriol.*, 175, 3247-3252.
- [30] Gibbons, R.J., van Houte, J. (1980), in *Bacterial Adherence*. (Beachey, E.H., Ed.) pp.61-104. Chapman Hall, London.
- [31] Murray, P.A., Prakobphol, A., Lee, T., Hoover, C.I., Fisher, S.J. (1992), *Infect. Immun.* 60, 31-38.

Figures and legends

Fig. 1. Dose-response of TEL lectin on adherence of *S. mutans* UA159, *S. sobrinus* 6715, *S. mitis* ATCC 903, *S. oralis* PB 182 and *S. sanguinis* ATCC 10556. Assays were performed in triplicate and the values are OD means (\pm SD). (*) represents statistically significant differences ($p < 0.05$) considering each microorganism.

Fig. 2. Dose-response of Labramin lectin on adherence of *S. mutans* UA159, *S. sobrinus* 6715, *S. mitis* ATCC 903, *S. oralis* PB 182 and *S. sanguinis* ATCC 10556. Assays were performed in triplicate and the values are OD means (\pm SD). (*) represents statistically significant differences ($p < 0.05$) considering each microorganism

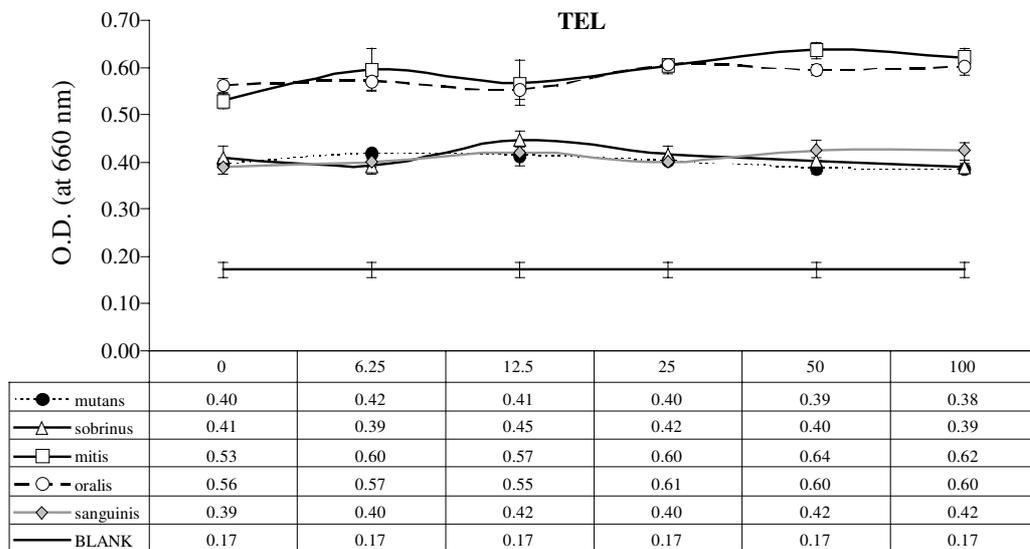


Figure 1

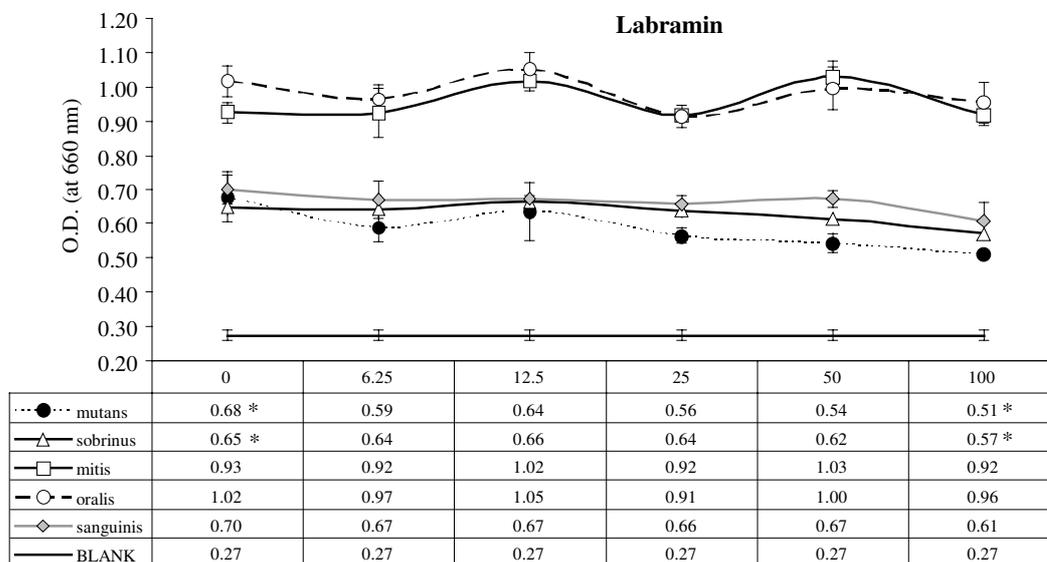


Figure 2

3 CONCLUSÃO

Conclui-se com estes resultados a lectina LABRAMIN inibiu significativamente a aderência de estreptococos cariogênicos.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADETUMBI, M., JAVOR, G.T., LAU, B. H. Allium sativum (garlic) inhibits lipid synthesis by *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother, Washington, v.30, n.3, p. 499-501, Sep. 1986.

BANDEIRA, M. F. Atividade antibacteriana do óleo de copaíba associado ao Ca(OH)₂, e ao óxido de zinco. In: 16^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Odontologia, 1999, Águas de São Pedro. **Anais....** Águas de São Pedro: SBPQO, 1999, p.9.

BOWDEN, G. & EDWARDSSON, S. Ecologia Oral e Cárie dental. In: THYLSTRUP, A. & FEJERSKOV, O. Cariologia Clínica. 2^o ed. São Paulo: Santos, 1995, p.45-66.

BOWDEN, G. Mutans streptococci caries and chlorhexidine. J. cant. Dent. Assoc., Ottawa, , v.62, n.9, p.700, Sep. 1996.

BRASIL . Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília: Senado, 1988.

_____, Ministério da Saúde. Lei n 8.080 (Lei Orgânica da Saúde), de 19 de setembro de 1998. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização dos serviços correspondentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília-DF, pp. 018055, col. 1, 20 set. 1998.

* Baseada na NBR-6023 de ago. de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos títulos dos periódicos em conformidade com o MEDLINE.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei n. 8.142, de 28 de setembro de 1990. Dispõe sobre a participação da comunidade na gestão do Sistema Único de Saúde e sobre as transferências intergovernamentais de recursos financeiros na área da saúde e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 28 de dezembro de 1990.

_____. Ministério da Saúde. CEME (Central de Medicamentos), Relatório de Atividades. Brasília: CEME, 1982.

_____. Ministério da Saúde. CONASS (Conselho Nacional de Secretários de Saúde), 1997. Assistência farmacêutica. In: CONASS. Relatório Final de Oficina de Trabalho. Aracaju, junho de 1997. Brasília: CONASS, p.91-114.

_____. Ministério da Saúde. Conferência Nacional de Saúde, 10. Onde dá SUS, dá certo! Relatório Final. Brasília, 1996.

_____. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. 1ª Conferência Nacional de Medicamentos e Assistência Farmacêutica. Relatório Final. Brasília: CNS, 2005. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/biblioteca/Relatorios.htm>
Acesso em :01 de setembro de 2005.

_____. Ministério da Saúde. Conferência Nacional de Saúde, 12. Relatório Final. Brasília, 2003. Disponível em : <http://www.ensp.fiocruz.br/biblioteca/>. Acesso em: 01 de setembro de 2005.

_____. Ministério da Saúde. Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares- PMNPC. Brasília, 2005. Disponível em:
www.conasems.org.br/Doc_diversos/cit/POLITICAMNPC140205.pdf Acesso em:
05 de julho de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Relatório final da 8ª Conferência Nacional de Saúde in: Conferência Nacional de Saúde, 8. Anais... Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1987, p.381-9.

_____. Ministério da Saúde. Resolução CIPLAN n. 08, de 08 de março de 1988. Implanta a prática da fitoterapia nos serviços de saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, mar. 1988.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos. Versão Sistematizada. Brasília - DF, março, 2002. 31p. (Documento não publicado).

CARVALHO, J.H. A. *et al.* Utilização de plantas medicinais pela população das áreas de unidades elementares da fundação SESP. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde/ Fundação SESP, 1988. 40p.

CISAR, J.O . Fimbrial Lectins of the oral actinomices. In:..MIRELMAL, D. Microbial lectins and agglutinins: properties and biological activity.. New York, N.Y: John Wiley & Sons, 1986, p.183-196.

CODETEC(Companhia de Desenvolvimento Tecnológico),. A Indústria Farmacêutica. Diagnóstico e Perspectivas. Campinas: Codetec (mimeo), 1991.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. Parecer 4/1992. Reconhecimento da acupuntura e da fitoterapia. Disponível em: <http://www.portalmedico.org.br/php/pesquisa_pareceres.php> Acesso em: 05 de setembro de 2005.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. Parecer 6/1991. Projeto Lei sobre exercício da medicina e os atos privativos dos médicos. Disponível em: <http://www.portalmedico.org.br/php/pesquisa_pareceres.php> Acesso em: 05 de setembro de 2005.

DASANAYAKE, A. P. *et al.* Differences in the detection and enumeration of mutans streptococci due to differences in methods. Archs Oral Biol, Oxford, v.40, n.4, p.345-351, 1995.

ELISABETSKY, E. Pesquisas em plantas medicinais. Ciência e cultura. v.39, n.8, p. 697-702. Ago. 1997.

FARNSWORTH, N.R. Medicinal plants in therapy. Bull World Health Organ. Geneva, v.63, n.3, p.965-81,1985.

FREIRE, M.G. Isolamento, caracterização físico-química e estudo das atividades inseticida, microbicida e inflamatória da lectina de sementes de *Talísia Esculenta* (ST. HILL) RALDLAK. 2003. 189p. Tese (Doutorado em Bioquímica). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Campinas,SP, 2001.

GIBBONS, R. J. *et al.* Role of cryptic receptors (cryptitopes) in bacterial adhesion to oral surfaces. Arch Oral Biol., v.35, p. 1075-145. 1990.

GILBOA, N. *et al.* Microbios. In: BITTIGER, H. *et al.* Concanavalin A. as a tool. Great Britain: John Wiley & Sons, 1976, p.99-109.

GOLDESTSTEIN, I. J. *et al.* Chemical taxionomy molecular biology and function of plant lectin., New York: R. Liss Incorp, 1983, p.225-36.

HACKMAN, R. H. *et al.* New substrates for use with chitinases. Anal. Biochem. Health. Nova York: Wiley & Sons; 1977.

HAMADA, S.;SLADE, H.D. Biology, immunology and cariogenicity of streptococcus mutans. Microbiol Rev. v.44, p.331-84. 1980.

HILDEBRANTE, G. H. Effects of Repeated Treatment with Sustained-Release Chlorhexidine Mouth Guards on Salivary Levels of Mutans Streptococci. Cáries Res, Basel, v.30, p.445-453,1996.

HUS, S. D. *et al.* Adhesive properties of viridans streptococcal species. Microb. Ecolo.Health Dis., v. 7, p.125-137, 1994.

JENKINS, S., ADDY, M., NEWCOMBRE, R. The effects of a chlorhexidine toothpaste on the development of plaque, gingivitis and tooth staining. J. Clin Periodontol, Copenhagen, v.20, n.1, p.59-62, JAN. 1993.

JORGE, A.O.C. Microbiologia Bucal. 2º ed. São Paulo: Santos,1998, p. 58.

KAPLAN J.B. *et al.* Fine DH. Sequence diversity in major fimbrial subunit gene (flp-1) of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Oral Microbiol Immunol; v.17, p.354-359, 2002.

KASHKET, S. In-vitro inhibition of glucosyltransferase from the dental plaque bacterium *Streptococcus mutans* by common beverages and food extracts. J. Arch. Oral Biol. v. 30, n. 11-12, p. 821-826, 1985.

KIN, J. H. Anti- bacterial action of onion (*Allium cepa* L.) extracts against oral pathogenic bacteria. J. Nihon Univ. Sch. Dent. v. 39, n. 3, p.136-141,1997.

KOLENBRANDER, P.E., et al. Coaggregation; specific adherence among human oral plaque bacteria. FASEB J, v.7, n. 5, p. 406-13, 1993.

LAEMMLI U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the bacteriophage T 4 Nature. v.277, p. 680-685, 1970.

LEWIS, H; ELVIN-LEWIS, M.P.F.. In: Medical Botany - Plants Affecting Man's, v.8, p.397-401, 1964.

LIENER, I. R., SHARON, N. AND GOLDSTEIN, I. J. The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine. Academic Press, New York, 600pp, 1986.

LIMA, D. As plantas medicinais no Brasil: há muito o que pesquisar e a descobrir. Rev. Diálogo médico. V.13, n.4, p.39-41.1987.

LOESCHE, W.J. The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental cáries by enzymatic methods. Oral microbial Immunol., v. 1, p. 65, 1986.

MARSH, P.D. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. J. Dents res. Washington, v.71, n.7, p.1431-38, 1992.

MATOS, F. J. A. Farmácias Vivas. 2 ed. Fortaleza: [s.n.],1994. 62 p.

MATOS, F. J. A. Living pharmacies. Ciência e Cultura. v. 49, n. 5-6, p. 409-412.

MICHELIS, E. Fitoterapia como Prática institucional: a experiência do Estado do Rio de Janeiro. Jornal Brasileiro de Fitomedicina. São Paulo, v.2, n.1-4, p.30-35, jan/dez. 2002.

NYVAD, B., *et al.* Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. Scand. J. Dent. Res., v. 95, p.369-380, 1987.

NYVAD, B.; FEJERSKOV, O. Desenvolvimento, estrutura e ph da placa dental. In: THYLSTRUP, A. & FEJERSKOV, O. Cariologia Clínica. 2º ed. São Paulo: Santos.1995, p.89-110.

O.M.S. Organización Mundial de La Salud. Situación regulamentaria de los medicamentos: uma reseña mundial. Traducción del inglés: Organización Panamericana de la Salud. Washington: OPAS, 2000. 62p.

OTTENSOOSER, F., *et al.* Lectins detecting groups C streptococci. Infection and Immunology. v. 9, p.971-73,1974.

RAMACCIATO, J.C. Atividade antimicrobiana de soluções a base de alho (*Allium sativum*), óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e clorexidina sobre microrganismos totais e estreptococos do grupo mutans. Estudo *in vivo*. 2000, 96p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

RENTON-HARPER, P. *et al.* Efeito da Malaleuca *alternifolia* sobre estreptococos e *Staphylococcus aureus*. In: 16º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa em odontologia, 1999, Águas de São Pedro. **Anais...** Águas de São Pedro: SBPQO, 1999, p.10.

ROBERTS S.K. *et al.* Evaluating biofilm growth of two oral pathogens. Lett Appl Microbiol. v.35, p.552-556,2002.

PHUCHER, J.J. , DANIEL, J.C. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts *in vitro*. J. Periodontol, Chicago, v.63.n.6,p.526-532,Jun. 1992.

STILLMARK, H. Über ricin, ein giftigs ferment aus den samen von *Ricinus communis* L. und einigen Euphorbiaceen. Thesis Univ. Dorpat, 1888. In: LIENER *et al*, 1986.

TEN CATE J.M., MARSH P.D. Procedures for establishing efficacy of antimicrobial agents for chemotherapeutic caries prevention. J Dent Res. Copenhagen, v. 73, n. 3, p. 695-703, Mar, 1994.

THEILADE, E. Factors controlling the microflora of the healthy human mouth. In: Hill M. J., Marsh P. D. Human microbial ecology. ed. Boca Raton, 1990, F.L.: CRC Press, p. 1-56.

THYLSTRUP & FEJERSKOV. Cariologia Clínica. 2º ed. São Paulo: Santos. 1995, p. 89-110.

TSUCHIA, H. Effects of green tea catechins on membrane fluidity. Pharmacology. v. 59, n. 1, p.34-44, 1999.

WEN, Z. T.; BURNE, R. A. Functional Genomics Approach to identifying genes requires for biofilm Development by *Streptococcus mutans*. Appl Environ Microbiol. v. 68, n.3, p. 1196-1203, 2002.

WHO. Declaration of Alma-Ata. Alma-Ata: WHO, 1978. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em 06 de setembro de 2005.

WHO. National policy on traditional and regulation of herbal medicines: report of a WHO global survey. Geneva: WHO, 2005. . Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em 31 de agosto de 2005.

_____. Tradicional Medicine Strategy 2002-2005. Geneve: WHO, 2002. 65p.

XAVIER, M. N. Terapêutica alopática versus fitoterapia em pacientes idosos portadores de candidose bucal. 1997. 110p. Dissertação (Mestrado em Estomatologia) - Faculdade de Odontologia – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1997.

5 ANEXOS

E-mail de confirmação de recebimento do artigo acima pela revista
Protein Peptide Letters.

[Home](#)

BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS

Publishers of Excellence for all Biomedical and Pharmaceutical Decision Makers

Confirmation On-Line abstract submission

Dear Dr. Freire ,

Thank you very much for submitting the abstract (given bellow) for the journal
Protein and Peptide Letters .

We are forwarding it to the Editor-in-Chief of the journal, who will soon inform you
by email (maria.freire@terra.com.br) with the decision about submitting the
completed article.

Should you have any questions then please [contact us](#) and state your submitted
abstract title and journal.

You have submitted the following information:

Name: Dr. Maria das Graças Freire

Title: Prof. Dr.

Affiliation: Superior Institutes of CENSA,

Address:

Salvador Correa, 139

Bairro Centro , Campos dos Goytacazes , Rio de Janeiro , 28035-

310

Brazil

maria.freire@terra.com.br

Proposed Article title: INHIBITION OF BACTERIAL ADHERENCE
TO SALIVA-COATED THROUGH PLANT LECTINS

Abstract:

The ability to inhibit adherence of microorganisms and the antimicrobial properties of two proteins extracted from plants, a lectin from *Talisia esculenta* (TEL) and a protein from *Labramia bojeri* seeds with lectin-like properties (Labramin) were studied. Minimum inhibitory (MIC) and bactericidal (MBC) concentrations of each protein were obtained against *Streptococcus mutans* 159, *Streptococcus sobrinus* 6715, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mitis* ATCC 903 and *Streptococcus oralis* PB 182 growth. In addition, the same microorganisms were submitted to the adherence assay by using sterile polystyrene U-bottom microtiter plates and human saliva. Plates were washed with PBS twice and 100 mL of each lectin solution previously filtered (0.2 μm) were added (6.25, 12.5, 25, 50 and 100 mg/mL) and then incubated during 1 h, aerobically, at 37°C. Plates were washed with PBS and an aliquot of 100 mL of the bacterial suspension of each species (10⁶UFC/mL) was transferred to the plate and incubated at 37°C during 1 h, in an atmosphere of 10% CO₂. The adherence of bacteria to the acquired pellicle was revealed and quantified by staining with crystal violet. Crystal violet absorbance was determined with a plate reader at 575 nm. Acquired pellicle, which was induced by saliva, plus lectin solutions negative and acquired pellicle and bacteria consisted as and positive control respectively. The assays showed that neither Labramin nor TEL in any of the studied concentrations were able to inhibit any of the microorganisms. Only Labramin showed inhibitory effect against the adherence of cariogenic streptococci (*S. mutans* and *S. sobrinus*) at 100 mg/mL. We concluded that Labramin lectin has potential as biofilm-inhibitory solution.

Tentative date for submission of complete manuscript:

09/21/2005

Home

Bentham Science Publishers Ltd.

www.bentham.org/