BRUNA DE ARAÚJO LIMA

Bióloga

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FRAÇÕES PURIFICADAS E EXTRATOS DE INVERTEBRADOS E MICRORGANISMOS MARINHOS SOBRE S*treptococcus mutans* E INFLUÊNCIA SOBRE SEUS PRINCIPAIS FATORES DE VIRULÊNCIA.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Biologia Buco-Dental, Área de Microbiologia e Imunologia.

Orientadora:
Profa. Dra. Regianne Umeko Kamiya

Co-Orientador:
Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

PIRACICABA, SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

L628a

Lima, Bruna de Araújo.
Análise da atividade antimicrobiana de frações purificadas e extratos de invertebrados e microrganismos marinhos sobre *Streptococcus mutans* e influência sobre seus principais fatores de virulência. / Bruna de Araújo Lima. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Regianne Umeko Kamiya, Reginaldo Bruno Gonçalves.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Antimicrobianos. 2. Produtos naturais marinhos. 3. Estreptococos. I. Kamiya, Regianne Umeko. II. Gonçalves, Reginaldo Bruno. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Analysis of antimicrobial activity of purified fractions and extracts of marine invertebrates and microorganisms on *Streptococcus mutans* and influence on main virulence factors

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Antimicrobial. 2. Marine natural products. 3. Streptococci

Área de Concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Mestre em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Regianne Umeko Kamiya, Cristiane Yumi Koga Ito, Cristiane Duque

Data da Defesa: 27-02-2009

Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental

UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2009, considerou a candidata BRUNA DE ARAÚJO LIMA aprovada.

PROFa. DRa. REGIANNE UMEKO KAMIYA

PROFa. DRa. CRISTIANE YUMI KOGA ITO

PROFa. DRa. CRISTIANE DUQUE

DEDICATÓRIA

À **Deus** e **Nossa Senhora da Aparecida** pela presença e vigília constantes em todas as minhas realizações;

À minha enorme e alegre **Família**: aos meus pais **Neuza de Araújo Lima** e **Merchides Leonel Lima**, meu irmão **Renato de Araújo Lima**, avós, tios, primos, Família Araújo Lima e à Família Berton Silotto, pelo amor, incentivo, apoio e carisma;

Ao **Diego Berton Silotto** pela amizade, amor, carinho, companheirismo, compreensão e muita paciência.

Com carinho,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Profa. Dra. Regianne Umeko Kamiya pela orientação, pela amizade e dedicação, confiança, incentivos e pela importante contribuição à minha formação científica, e à Júlia Kim que já faz grande diferença nas nossas vidas.

Ao Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves, pela orientação, pela confiança, incentivo e oportunidade oferecidos.

Ao Prof. Roberto Gomes de Souza Berlinck agradeço pela estimável orientação, colaboração e contribuição à minha carreira profissional.

À Universidade Estadual de Campinas na pessoa do Reitor Prof. Dr. José Tadeu Jorge, e a Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por meio do Diretor Prof. Dr. Francisco Haiter Neto.

À Coordenadoria de Pós Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do Coordenador Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior e da secretária Érica A. Pinho Sinhoreti.

Aos professores da disciplina de Microbiologia e Imunologia Prof. Dr. José Francisco Höfling, Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos-Graner, Prof. Dr. Daniel Saito, à Profa. Dra. Cinthia Pereira Machado Tabchoury da disciplina de Bioquímica, ao Prof. Dr. Pedro Rosalen da Farmacologia e ao Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line da Histologia pela contribuição e pelo exemplo profissional.

Aos examinadores que compuseram a banca de dissertação, Profa. Dra. Regianne Umeko Kamiya; Prof. Dr. Cristiane Yumi Koga Ito; Profa. Dra. Cristiane Duque, e suplentes Prof. Dr. Alexandre Nunes Ponezi e Prof. Dr. Gilson César Nobre Franco, pela análise, avaliação e colaboração nesse trabalho.

Aos amigos e amigas da Pós-Graduação e Iniciação Científica: Aline Castilho, Aline Cristiane Planello, Carolina Vieira de Almeida, Fernando Tadeu Zámuner, Flávia Sammartino Mariano Rodrigues, Gustavo A. O. Pereira, Iriana Carla Zanin, Ítalo Sarto, Iza Teixeira Alves Peixoto, Janaina de Cássia Orlandi Sardi, Julianna Joanna de Carvalho Moraes, Karla Elena Torres Chávez, Luciana Souto Mofatto, Maria Paula Rando Meirelles, Mariana Martins Ribeiro, Marlize Klein, Natália Leal Vizoto, Paula Cristina Aníbal, Rafael Nóbrega Stipp, Rodolfo Alberto Pires de Camargo, Sérgio Eduardo Braga da Cruz, Thais Negrini, Thássia Bassinello, Tiago Taiete, Vivian Fernandes Furletti, pelos ensinamentos trocados, pelas risadas e por nossa maravilhosa convivência.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Anderson Laerte Teixeira, Carla Sarruge Trevisan, Flávia Pampolini, Leandro Justino e Wilma Correa Ferraz pela disposição com que me auxiliara e pela amizade desenvolvida.

Aos alunos e professores do Instituto de Química de São Carlos – IQSC/USP, que me acolheram muito bem e me auxiliaram neste trabalho.

A todos meus amigos e professores da Graduação da UNIMEP, meus queridos biólogos, seriam muitos para listar aqui. Em especial às minhas eternas amigas Juliana Maia Teixeira, Renata Proença Ferreira e Carolina Vieira de Almeida, pela vibração e torcida a cada vitória e apoio em todos os momentos difíceis vivenciados.

Aos meus queridos amigos de ontem, hoje e sempre Aline Farias, Bruna Cristina Muller, Camila Camargo Diniz, Cristiane Camargo Diniz, Camila Rozinelli Ballestero da Silveira, Juliana Werkling, Larissa Losz, Luana Gullo France, Luis Favetta, Rafaela Cristine Terossi, Taise Santa Rosa, Thales Vicentini e Thiago Pedersen pela cumplicidade, amizade sincera, companheirismo e pela alegria e diversão de cada um me proporciona.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processos 2005/60175-2 e 2007/01078-2, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e FAEP/FUNCAMP pelos recursos concedidos para realização desse trabalho e concessão de bolsa.

"Estude como se fosse viver para sempre. Viva como se fosse morrer amanhã."

(Autor Desconhecido)

RESUMO

Streptococcus mutans é o principal agente etiológico da cárie dental. A busca por novos agentes antimicrobianos naturais capazes de inibir os principais mecanismos de virulência de *S. mutans,* como a síntese e tolerância a ácidos e a formação de biofilme dental pode representar uma importante estratégia de prevenção e tratamento desta infecção. Estudos recentes confirmaram que produtos naturais de origem marinha possuem significativa atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a atividade antimicrobiana de extratos ou frações purificadas obtidos a partir de invertebrados e microrganismos marinhos associados sobre *S. mutans* e outros estreptococos orais como *S. sobrinus* e *S. sanguinis*, pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Adicionalmente, avaliamos a influência de extratos e/ou frações ativas sobre a formação de biofilme e sobre a expressão dos genes associados aos principais fatores de virulência de *S. mutans* UA159 e um isolado clínico da espécie. Foram analisados genes associados com a capacidade de formação de biofilme (*gtf* B/C, *gbp*B), com a síntese de ácidos (*ldh*) e com tolerância ao estresse ácido (*dna*K, *gro*EL, ATPase). De 768 frações/extratos testados cerca de 10% inibiram de 50% a 100% do crescimento microbiano de estreptococos orais (com CIM e CBM inferiores a 500 µg/mL). Dentre os extratos e frações utilizadas, foram selecionados um extrato (DR(M3)6) e duas frações purificadas (PcS2d e DR-MSP-10d-P3) com atividade antimicrobiana e CIM/CBM inferiores a 125 µg/ml sobre *S. mutans,* para avaliação da atividade sobre fatores de virulência da espécie. Nas concentrações 7µg/mL, 31µg/mL e 62µg/mL, as frações PcS2d, DR-MSP-10d-P3 e o extrato DR(M3)6, respectivamente, inibiram a formação do biofilme sem interferir no crescimento planctônico das duas cepas analisadas, em adição o tratamento com os respectivos antimicrobianos, nestas mesmas concentrações por 30 minutos, resultou principalmente na redução da expressão dos genes *gtfB, gbpB, dnaK* e *ATPase* em proporções diferentes para as cepas *S. mutans* UA 159

e o isolado clinico. Em conclusão, as substâncias avaliadas, principalmente as frações purificadas podem futuramente ser empregadas como potenciais anticariogênicos/cariostáticos, entretanto mais estudos serão necessários para tal aplicabilidade.

Palavras chaves: Atividade Antimicrobiana, Produtos Naturais Marinhos, S*treptococcus mutans,* Fatores de Virulência.

ABSTRACT

Streptococcus mutans are the principal etiologic agent of dental caries. The search for new natural antimicrobial agents capable of inhibiting the mechanisms of virulence of *S. mutans*, as synthesis and tolerance to acid and dental biofilm formation may represent an important strategy for prevention and treatment of this infection. Recent studies have confirmed that natural products of marine origin have significant antimicrobial activity against pathogenic microorganisms. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of extracts or purified fractions obtained from marine invertebrates and microorganisms associated on *S. mutans* and other oral streptococci such as *S. sobrinus* and *S. sanguinis* by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Additionally, we evaluated the influence of extracts and / or active fractions on the formation of biofilm and the expression of genes associated with virulence factors of *S. mutans* UA159 and a *S. mutans* clinical isolate. We analyzed genes associated with the capacity of biofilm formation (*gtf*B/C, *gbp*B), acids synthesis (*ldh*) and acid stress tolerance (*dnaK, GroEL, ATPase*). 768 fractions / extracts was tested and about 10% inhibited by 50% to 100% of the microbial growth of oral streptococci (MIC and MBC with less than 500µg/mL). Among the extracts and fractions used were selected an extract (DR (M3) 6) and two purified fractions (PcS2d and DR-MSP-10d-P3) with antimicrobial activity and MIC / MBC less than 125µg/mL on *S. mutans*, to evaluate the activity of virulence factors. At concentrations 7µg/mL, 31µg/mL e 62µg/mL, the fractions PcS2d, DR-MSP-10d-P3 and extract DR (M3) 6, respectively, inhibited the formation of biofilms without interfering with planktonic growth the two strains examined, in addition to treatment with the antimicrobial agents, these same concentrations for 30 minutes, resulted in reducing the expression of genes *gtfB, gbpB, dnaK ATPase* in different proportions for the strains *S. mutans* UA159 and clinical isolate. In conclusion, substances evaluated, especially the purified fractions can further be

used as anticariogenic / cariostatic potential; however, more studies are needed for this application.
Keywords: Antimicrobial Activity, Marine Natural Products, *Streptococcus mutans*, Virulence Factors.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ºC: grau Celsius

10% CO_2: pressão parcial de dióxido de carbono a 10%

16S RNA: gene codificador do RNA ribossômico 16S

ABS: absorbância

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: adenosine trifosfato (molécula de energia)

BHA: Brain Heart Infusion com Ágar à 1,5% (peso/volume)

BHI: Brain Heart Infusion Broth (infusão de cérebro e coração comercial)

cDNAs: DNAs obtidos a partir de transcrição reversa

CBM: concentração bactericida mínima

CIB: concentração bactericida ou inibitória do biofilme

CIM: concentração inibitória mínima

cm: centímetro

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico gênomico

dNTP: trifosfatos de desoxirribonucleotídeos

DPEC: dietolpirocarbonato

EDTA: áido etilenodiaminotetracético

et al.: e outros (de *et alli*)

Fase log: fase logarítima de crescimento microbiano

g: gramas

GbpB: proteína ligante de glucano B (glucan-binding protein)

Gtf B/C: proteína glicosiltransferase B ou C

h: hora

H_2O: água

L: litro

Ldh: enzima lactato desidrogenase

M: molar

Min: minuto

mL: mililitro

n: número

nm: nanômetros

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia de polimerase

pH: potencial hidrogênico

RNA: ácido ribonucléico

RNAm: ácido ribonucléico mensageiro

RT: transcrição reversa

RT-PCR semi-quantitativa: transcrição reversa – PCR semi quantitativa

S. mutans: Streptococcus mutans

s: segundo

THB: Todd-Hewitt Broth (caldo)

UFC: unidades formadoras de colônia

µg: micrograma

µl: microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO LITERATURA	4
3. PROPOSIÇÃO	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
5. RESULTADOS	27
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença infecto-contagiosa de etiologia multifatorial e dependente da interação de um hospedeiro suscetível com falta de higienização, agindo por determinado período de tempo, com uma dieta rica em carboidratos fermentáveis e uma microbiota patogênica. Dentre os microrganismos cariogênicos, ressalta-se o *Streptococcus mutans* como o principal agente etiológico da cárie dental (Loesche, 1986; Whiley & Beighton, 1998). Vários fatores associados à microbiota cariogênica, estão relacionados com características de virulência de *S. mutans,* dentre as quais a síntese de ácido láctico (Yang *et al.,* 2005 e 2006), a tolerância ao mesmo e a formação de biofilme dental na presença de sacarose (Hamada *et al.*, 1981).

Através da enzima lactato desidrogenase (LdH), expressa pelos genes *ldh,* a espécie cariogênica sintetiza ácido láctico a partir do piruvato, na via glicolítica (Kochhar *et al.*, 1992; Yang *et al.,* 2005 e 2006), mesmo em ambientes com baixo pH, como o biofilme dental (Whiley & Beighton, 1998). Neste biofilme, o acúmulo de metabólitos ácidos produzidos por *S. mutans*, provoca a desmineralização da superfície do esmalte e a formação de cavitações (Hamada & Slade, 1980), tornando o meio seletivo para espécies mais acidúricas (Li *et al.,* 2002b).

Outra característica de virulência marcante de *S. mutans* é a aciduricidade (resistência a baixos pHs) que está associada ao aumento da atividade de enzimas F-ATPases de membrana, capazes de manter o pH citoplasmático estável (Smith *et al.,* 1996). Quando culturas de *S. mutans* tornam-se acidificadas, esses organismos aumentam os níveis de produção e atividade destas enzimas, a fim de remover prótons do seu citoplasma e proteger enzimas glicolíticas e ácido-sensíveis presentes na célula (Kuhnert *et al.,* 2004). Adicionalmente, o aumento da produção de enzimas *heat-shock,* como DnaK e GroEL, é evidenciado durante o crescimento celular, sob condições de estresse ambiental ácido (Lemos *et al.,*

2001), provavelmente para reparar danos causados a proteínas ácido-sensíveis durante o processo de adaptação.

Além do metabolismo ácido, os *S. mutans* são capazes de sintetizar glucanos insolúveis em água, em presença de sacarose (Hamada *et al.*, 1981), através da atividade de enzimas glicosiltransferases (*Gtf*B e *Gtf*C, principalmente – Goodman & Gao, 2000; Mattos-Graner *et al.,* 2001; Koo *et al,* 2006). Estes glucanos insolúveis, assim como as proteínas ligantes de glucanos (*Gbp*B, principalmente - Mattos-Graner *et al.,* 2001 e 2006) aumentam a aderência da espécie, na superfície dental, promovendo a formação do biolfilme cariogênico (Smith *et al.,* 1994; Sato *et al.,* 1997).

Assim sendo, a busca por novos agentes antimicrobianos naturais capazes de inibir tais mecanismos de virulência ou de controlar o crescimento de microrganismos patogênicos, etiologicamente relacionados com a cárie dental, pode representar uma importante estratégia de prevenção e tratamento desta infecção.

Nas últimas décadas, tem se observado um crescente interesse por medicinas alternativas e terapias naturais de baixa citotoxicidade, especialmente no uso de substâncias antimicrobianas e cariostáticas, como por exemplo, a própolis (Park *et al.*, 1998; Koo *et al.*, 2000; Koo *et al.*, 2006); a *Arnica* (Koo *et al.*, 2000); o bakuchiol (Katsura *et al.*, 2001); óleos essenciais de *Croton cajucara* (sacaca) (Alviano *et al.*, 2005), de *Melaleuca alternifolia* (chá verde) e *Leptospermun scoparium* (manuka) (Takarada, *et al.*, 2004), sugerindo possíveis medidas de prevenção e terapêutica da cárie dental.

Considera-se que produtos naturais provenientes de microrganismos, plantas e animais ainda constituem o melhor grupo de compostos disponíveis para a descoberta de novos fármacos (Abel *et al.,* 2002; Butler 2004 e 2005). Produtos naturais de origem marinha ganharam significativa importância, pelo fato de

apresentarem potentes atividades biológicas (Berlinck *et al.,* 2004). Particularmente esponjas, ascídias, octocorais e briozoários, que pertencem ao grupo dos invertebrados marinhos, e microrganismos isolados dos mesmos, tais como bactérias, fungos, cianobactérias e dinoflagelados, são fontes notórias de compostos biologicamente ativos (Blunt *et al.*, 2005).

Estudos recentes coordenados pelo Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck, confirmaram que produtos naturais de origem marinha possuem atividade antimicrobiana contra fungos, bactérias Gram positivas e Gram negativas, além de atividades contra *Mycobacterium tuberculosis,* algumas espécies de protozoários (*Leishmania* sp. e *Trypanossoma* sp.*)* e células cancerígenas. Neste estudo, cerca de 400 extratos brutos biologicamente ativos obtidos a partir de invertebrados marinhos e microrganismos isolados dos mesmos, coletados em diferentes regiões da costa brasileira, foram submetidos a diversos bioensaios para isolamento de compostos ativos. A atividade antimicrobiana significativa de frações ativas desses extratos foi evidenciada recentemente por Torres *et al.*, (2002); Kossuga *et al.*, (2004); Oliveira *et al.*, (2006), com valores de concentração inibitória mínima (CIM) abaixo de 50 µg/mL, contra microrganismos patogênicos resistentes à antibióticos como: *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans.*

Nossa colaboração, junto ao grupo de estudos acima citado, rendeu a submissão do trabalho sobre o composto puro dicetopiperazinas modificadas, isolado da ascídia *Didemnum rodriguesi*, no qual se avaliou a atividade antimicrobiana desse composto frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (resistente à oxacilina), *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans, Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans,* que resultou em valores de CIM abaixo de 125 µg/mL para todos os microrganismos avaliados (Kossuga, *et al.*, submetido em 2008).

2. REVISÃO DE LITERATURA

S*treptococcus mutans* e cárie dental

A cárie dental é uma doença infecciosa e transmissível (Keyes, 1960; Caufield, 1997) multifatorial, entretanto, etiologicamente pode ser atribuída a um desequilíbrio da microbiota bucal (Marsh & Martin, 1984) pela presença freqüente de carboidratos fermentáveis (Bowben & Edwardsson, 1995) e falta de higiene bucal. Além, numerosos fatores podem afetar o equilíbrio da população de microrganismos orais como ácidos, peróxido de hidrogênio (Donughue & Tyler, 1975) e antibióticos (Sanders & Sanders, 1982). Bem como, a colonização e o acúmulo da espécie cariogênica são influenciados por diversos fatores na cavidade bucal, como: condições nutricionais, componentes salivares e fluxo salivar (Hamada & Slade, 1980).

Streptococcus mutans são amplamente distribuídas não apenas em populações com moderada ou alta prevalência cárie, como também nas populações com baixa ou nenhuma experiência de cárie (Napimoga *et al*., 2004). Uma possível explicação para sua presença em indivíduos com baixa experiência de cárie é a dependência de fatores de virulência dos estreptococos e dos fatores promotores da doença, que podem diferir entre populações com prevalência de cárie (Napimoga *et al*., 2004).

Vários fatores associados à microbiota cariogênica, também estão relacionados com características de virulência de *S. mutans,* dentre as quais a síntese de ácido láctico (Yang *et al.,* 2005 e 2006), a tolerância ao mesmo e a formação de biofilme dental na presença de sacarose (Hamada *et al*., 1981).

S*treptococcus mutans* e biofilme dental

De acordo com Shemesh e colaboradores (2007), a bactéria *S. mutans* evoluiu para a sobrevivência e persistência em seu ecossistema natural de biofilmes. *S. mutans* é encontrado como comunidades associadas às superfícies dentárias em matrizes embebidas de polissacarídeos formando biofilmes (Marsh, 2005). Essa organização biológica proporciona um microambiente para bactérias imobilizadas (Bowden & Hamilton, 1998; Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

A aderência é o primeiro passo na formação de comunidades do biofilme. Como principal agente bacteriano da cárie dentária, os mecanismos pelos quais *S. mutans* adere às superfícies dentárias são importantes alvos potenciais para intervenção anti-cariogênica. Mecanismos de aderência sacarose-dependente, como mediado por enzimas extracelulares [glicosiltransferases (Gtfs) e frutosiltransferases (Ftfs)] e proteínas ligantes de glucanos [glucan-binding proteins (Gbps)], têm papéis bem estabelecidos na virulência de *S. mutans* (Kuramitsu, 1993, 2001; Steinberg, 2000; Banas & Vickerman, 2003). Mecanismos independentes de sacarose também podem promover colonização microbiana através do fornecimento de sítios para bactérias, a exemplo de adesinas (Lee *et al.,* 1989; Shemesh & Steinberg, 2006).

Além da aderência inicial, assegura-se que uma variedade de genes é necessária para a adaptação de *S. mutans* e outros estreptococos orais em biofilmes. Células existentes no biofilme têm características fenotípicas, que são distintas das células dos seus homólogos planctônicos, provavelmente acompanhado por mudanças significativas nos padrões de expressão gênica (Costerton, 1987; Whiteley *et al*., 2001). Estes incluem genes associados a sistemas de comunicação intercelular e sistemas sensores ambientais, reguladores do metabolismo de carboidratos e genes que promovem a aderência (Lemos & Burne, 2002; Senadheera *et al*., 2005; Shemesh *et al*., 2007).

Vários estudos têm indicado que a expressão dos genes responsáveis pela formação biofilme é dependente das condições ambientais (Kiska & Macrina, 1994; Hudson & Curtiss, 1990, Li & Burne, 2001).

Principais fatores de virulência de *S. mutans*

Para aderir à superfície dental, *S. mutans* produz uma série de proteínas extracelulares ou enzimas. A síntese de glucano, durante o crescimento da espécie cariogênica, ocorre pela ação de enzimas glicosiltransferases (Gtfs), as quais utilizam a sacarose como seu único substrato (Goodman & Gao, 2000). Os glucanos promovem o acúmulo de estreptococos cariogênicos (dentre outros microrganismos orais) na superfície do dente, sendo um fator crítico para a formação e estrutura integral do biofilme, com o acúmulo de ácidos que levam a desmineralização do esmalte dos dentes (Ooshima *et al.,* 2000; Duarte *et al.,* 2006). Sendo assim, a Gtf é essencial para a expressão de virulência desse microrganismo.

Três Gtfs, GtfB, GtfC e GtfD, codificadas pelos genes *gtfB*, *gtfC* e *gtfD* respectivamente, foram identificadas em *S. mutans*. As atividades de cada Gtf são distinguidas pelo tipo de ligação glicosídica predominante no glucano sintetizado (Hanada & Kuramitsu, 1988). GtfB catalisa a síntese de glucanos ricos em ligações glicosídicas do tipo *α-1-6*, que resultam em polímeros insolúveis em água, enquanto que a GtfD catalisa a formação de glucanos ricos em ligações glicosídicas *α-1-6* que resultam em moléculas solúveis em água. Por fim, a GtfC está envolvida na síntese de glucanos solúveis e insolúveis em água. (Hanada & Kuramitsu, 1988; Duarte *et al.,* 2003).

Entre eles, GTFs B e C parece ser as GTFs mais importantes relacionados com a cárie dental. Evidentemente, GTF deve ser um foco primário de qualquer estratégia baseada na prevenção da cárie dentária ou a formação de biofilmes. Além disso, atualmente a maioria dos produtos de higiene bucal disponíveis comercialmente não são eficazes inibidores de enzimas GTF (Duarte *et al.,* 2003).

As proteínas ligantes de glucano (Gbps de *Glucan Binding Proteins*) compõem um grupo heterogêneo de proteínas extracelulares ou de superfície, que

exibem afinidade a glucanos insolúveis em água em ensaios *in vitro.* Quatro Gbps distintas foram identificadas em *S. mutans,* sendo GbpA, GbpB, GbpC e GbpD (Banas & Vickerman, 2003). A GbpB foi primeiramente purificadas de sobrenadantes de cultura de *S. mutans*, através de sua afinidade por dextrano (Smith *et al.,*1994), sendo esta produzida por todas as cepas testadas em estudos de Mattos-Graner *et al.,* 2001.

Estudos de Smith e colaboradores (2003) em modelos animais, demonstram a importância da GbpB na patogênese da cárie, uma vez que a imunização sistêmica ou de mucosas contra GbpB inibe, em média, em 50% o desenvolvimento da cárie em animais infectados com *S. mutans* e submetidos a dieta com 56% de sacarose.

A enzima lactato desidrogenase (LdH), expressa pelos genes *ldh*, tem demonstrado ser um importante fator de virulência de *S. mutans* , resultando na produção de ácido láctico a partir de piruvato, dependendo do potencial cariogênico da espécie (Yang *et al.,* 2006).

Estudos de Hillman *et al*., 1994 e Chen *et al.,*1994, demonstraram que a deficiência desta enzima é letal ao *Streptococcus mutans* em variadas condições de cultivo, tendo a LdH importante papel nas vias glicolíticas geradoras de ATP (Merritt *et al.,* 2004).

A capacidade de se adaptar às mudanças nas condições ambientais é essencial para a sobrevivência dos microrganismos. Bactérias presentes no biofilme bucal são constantemente submetidas ao choque ácido e manter a acidificação é resultado da rápida acumulação de ácidos gerados a partir da glicólise da microbiota oral acidogênica. Fundamental para tolerar esses ambientes, os microorganismos produzem uma variedade de proteínas de estresse, incluindo as chaperonas moleculares GroEL e DnaK. Estas proteínas desempenham papéis essenciais no metabolismo celular, auxiliando no

dobramento de proteínas recém-sintetizadas ou desnaturar proteínas, bem como na montagem, transporte e degradação de proteínas celulares (Lemos *et al.*, 2001).

Utilizando uma contínua cultura, ficou demonstrado que os níveis do mRNA de *dnaK* foram aumentadas em resposta ao choque ácido e permaneceram elevados em células ácido-adaptadas (isto é, as células que havia induzido a ATR – Resposta Ácido Tolerante), sugerindo que DnaK está intimamente envolvida em respostas à acidificação ambiental (Lemos *et al.*, 2001).

Streptococcus sanguinis

Streptococcus sanguinis, membro da microbiota oral humana indígena, há muito tem sido reconhecido como um fator fundamental na colonização bacteriana da boca. *S. sanguinis* é comumente referido como um membro do streptococci grupo *viridans* (Coykendall, 1989).

S. sanguinis liga-se diretamente às superfícies orais e serve como uma corrente para a adesão de uma variedade de outros microrganismos que colonizam superfície do dente, formando placa dental, e contribuindo para a etiologia de ambas as doenças: cárie e doença periodontal (Coykendall, 1989). Além disso, *S. sanguinis* tem sido há muito reconhecido como uma das principais causas de endocardite bacteriana, uma doença de alta morbidade, que é fatal se não tratada (Bochniak & Sadlak-Nowicka, 2004).

Como também, *S. sanguinis* e outros estreptococos *viridans* da microbiota bucal estão surgindo como importantes patógenos em infecções sangüíneas que ameaçam pacientes neutropênicos (Bochniak & Sadlak-Nowicka, 2004). E essas infecções estão sendo agravadas pelo aumento da frequência da resistência à penicilina, observado nesse grupo de organismos. Essa resistência aos antibióticos é tanto surpreendente e preocupante, porque o streptococci grupo *viridans*, incluindo *S. sanguinis*, historicamente é classificado como sensível à

penicilina e, durante muitos anos acreditava-se ser incapaz de se tornar resistente a β-lactâmicos (Handwerger & Tomasz, 1985).

Streptococcus sobrinus

A bactéria *Streptococcus sobrinus* é habitante da flora oral humana, anaeróbia facultativa, e está associada com o desenvolvimento de cáries dentárias. *S. sobrinus* adere à superfície do dente através da ação da enzima microbiana glicosiltransferase, permitindo-os aderir à película do dente. Uma vez aderido, essa espécie bacteriana codifica enzimas para metabolizar glicose e refinar açúcar para a produção de ácido láctico. O pH ácido resultante pode afetar o esmalte do dente (Hardie, 1986).

S. sobrinus está estreitamente relacionada com a mais prevalente espécie *S. mutans*, principal agente etiológico da cárie dental. Embora possam ser distinguidos através de análises laboratoriais, ambos os organismos têm a mesma morfologia, fatores de virulência e causam os mesmos sintomas da doença.

Atualmente não existe uma vacina para tratar *S. sobrinus* e outros patógenos bucais. As medidas preventivas podem sugerir diminuição do consumo de sacarose, que é necessário para o início da formação de placa bacteriana, tratamentos com flúor ou uso de antimicrobianos (Kolenbrander, 2000).

Antimicrobianos

O descobrimento dos componentes antibacterianos do *Penicillium notatum* por Alexander Fleming permitiu o desenvolvimento dos antibióticos que são as principais armas no combate às infecções bacterianas (Chen *et al.*, 2005). No entanto, desde muito cedo, o aparecimento de patógenos resistentes aos antibióticos, vêm sendo reconhecido como um significante problema clínico, e intensas pesquisas estão voltadas para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos alternativos (Ryan *et al.*, 1996). Cepas emergentes com resistência intermediária ou alta à penicilina estão crescendo e sendo

reconhecidas mundialmente, além de complicar a terapia antimicrobiana em endocardites (Teng *et al*., 1998).

No passado, eritromicina e clindamicina apresentavam boa atividade no combate a microrganismos, mas recentes estudos mostraram que a resistência aos macrolídeos pode ser um problema em várias áreas (Johnson *et al*., 1999). Como exemplo de microrganismos resistentes aos antimicrobianos temos: *Escherichia coli, Proteus* sp., *Pseudomonas aeruginosa, Shigella dysenteriae, Salmonella enteritidis, Salmonela typhi, Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis* e *Candida albicans* (Barbour *et al*., 2004). Estudos realizados por Teng *et al.* (1998), demonstraram resistência em estreptococos grupo mutans à penicilina e macrolídeos, resultado da alteração da proteína ligadora de penicilina e genes de resistência que podem ser transferidos entre esses estreptococos e *S. pneumoniae,* assim como Tsuda *et al.* (2002), relataram resistência à bacitracina, um antibiótico tópico da família das penicilinas, que inibe a síntese da parede celular bacteriana (Page *et al*., 2004).

A resistência dos *Streptococcus mutans* à bacitracina é bem conhecida. A bacitracina é um antibiótico polipeptídico cíclico, produzido por *Bacillus* sp, e sua ação é inibir a síntese de peptidioglicana da parede celular bacteriana. Seu uso oral vem adquirindo importância pela sua capacidade de erradicar enterococos resistentes à vancomicina do trato gastrointestinal.

Antimicrobianos e *Streptococcus mutans*

Muitos estudos têm mostrado microrganismos cariogênicos, principalmente *S. mutans*, podem ter a sobrevivência ou fatores de virulência interferidos por produtos naturais (Koo *et al*., 2000, Katsura *et al*., 2001, Yatsuda *et al*., 2004; Bakri & Douglas, 2005; Duarte *et al.,* 2006; Fani *et al*., 2007).

O notável potencial anticariogênico observado por componentes bioativos naturais, testados *in vitro* e *in vivo,* possui diversas fontes. Com diversos trabalhos

na literatura, temos as plantas medicinais como potentes fontes de biomoléculas, que estão sendo mais bem investigadas como possíveis alternativas terapêuticas.

Almeida e colaboradores (2008) descreveram a atividade antimicrobiana de extratos da fruta *Rhedia brasiliensis* e do composto 7-epiclusianona com atividade antimicrobiana de CIM de 2,5 µg/mL e CBM de 20 µg/mL sobre *S. mutans.*

Outra planta bastante utilizada em estudos de atividade antimicrobiana, *Polygonum cuspidatum*, planta japonesa de tradicional uso na medicina alternativa, apresentou CIM de 500 µg/mL para *S. mutans* e *S. sobrinus*, a partir de uma fração denominada F1 (Song *et al*., 2006 e 2007).

Óleos essenciais, produtos voláteis de metabolismo secundário de plantas, vêm sendo utilizado como agentes antimicrobianos há anos, e em casos específicos de microrganismos orais, óleos essenciais em enxaguatórios bucais tem demonstrado benefícios na rotina da saúde oral. Por exemplo, o óleo essencial da planta *Croton cajucara* apresentou CIM de 40 µg/mL para *Candida albicans, S. aureus, S. sobrinus, P. gingivalis* e *S. mutans* (Alviano, *et al*., 2005)

Ainda, estudos envolvendo a própolis (Duarte *et al*., 2003), favos de mel (Xiao *et al*., 2007) e apigenina (Koo *et al*., 2005), produtos originados de insetos sociais, tem ganhado bastante atenção pela variedade de atividade biológica como: antimicrobianos, antiinflamatórios, anestésicos, citostáticos e propriedades cariostáticas.

Em um dos primeiros estudos envolvendo atividade antimicrobiana de produtos naturais marinhos sobre *S. mutans* (Kossuga *et al*., submetido em 2008), demonstrou novas fontes de produtos biologicamente ativos, obtendo CIM de 62,5 µg/mL com o composto puro dicetopiperazinas modificadas.

Produtos naturais marinhos

Os metabólitos secundários (produtos naturais) de origem marinha ganharam significativa importância durante as duas últimas décadas, pelo fato de apresentarem potentes atividades biológicas bem como características estruturais

únicas (Blunt *et al*., 2005). Particularmente esponjas, ascídias, octocorais e briozoários, que pertencem ao grupo dos invertebrados marinhos, e microrganismos marinhos, tais como bactérias, fungos, cianobactérias e dinoflagelados, são fontes notórias de compostos biologicamente ativos, os quais muitas vezes são entidades químicas extremamente sofisticadas do ponto de vista estrutural e que, por isso, constituem um verdadeiro desafio para os químicos orgânicos que realizam determinação estrutural (Blunt *et al*., 2005) e síntese (Nicholas & Philips, 2005).

Considerando que ainda dentre os atuais fármacos comercialmente disponíveis, cerca de 60% são provenientes direta ou indiretamente de produtos naturais (Cragg *et al*., 1997; Newman & Cragg, 2004), bem como que o número crescente de moléculas necessárias a serem submetidas a triagens farmacológicas com o objetivo de se obter bons "candidatos a fármacos" (drug-leads), aumentou-se consideravelmente a importância da "diversidade química" dos produtos naturais (Brennan, 2000).

Considera-se que produtos naturais oriundos de microrganismos, plantas e animais ainda constituem o melhor grupo de compostos disponível para a descoberta de novos fármacos, a despeito dos enormes avanços das estratégias de "screening" robotizadas que se utilizam de bibliotecas de compostos oriundos de síntese combinatória ou dos avanços significativos das técnicas computacionais utilizadas em química medicinal (Butler, 2004, 2005; Abel *et al*., 2002; Cragg & Newman, 2005).

Sendo assim, o cenário atual é extremamente promissor para a exploração da biodiversidade como fonte de potenciais agentes quimioterapêuticos para o tratamento das mais diversas formas de patogenias humanas e animais, para o desenvolvimento de novos agentes agroquímicos, produtos biotecnológicos, ferramentas bioquímicas e modelos-alvo para o estabelecimento de novas metodologias de síntese orgânica. O Brasil tem papel fundamental a exercer neste âmbito, tendo em vista sua enorme biodiversidade. O estado de São Paulo, com excelente massa crítica científica para desenvolver projetos de pesquisa de

bioprospecção, criou novas perspectivas para a exploração de produtos da biodiversidade brasileira.

Portanto, é extremamente relevante a diversificação das áreas de atuação de grupos de pesquisa que objetivem a investigação dos produtos da biodiversidade brasileira, de maneira a ampliar o espectro de possibilidades de descoberta de novos produtos de origem natural a partir das mais diversas fontes biológicas.

No Brasil a investigação do ambiente marinho como fonte de produtos naturais é ainda incipiente, porém não menos importante, tendo em vista que a costa brasileira é a segunda em extensão no mundo, abrigando uma grande variação de áreas geográficas, habitats e exposição a diferentes fatores naturais (Berlinck *et al.*, 2004).

3. PROPOSIÇÃO

De acordo com a revisão de literatura aqui apresentada, este trabalho de dissertação de mestrado foi realizado com os objetivos de:

- Avaliar a atividade antimicrobiana de frações purificadas e/ou extratos marinhos, sobre estreptococos orais, através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM);
- Avaliar a atividade de frações purificadas (PcS2d e DR-MSP-10d-P3) e extrato marinho (DR(M3)6), sobre a capacidade de formação de biofilme de *S. mutans* UA159 e um isolado clinico;
- Avaliar a atividade das frações purificadas (PcS2d e DR-MSP-10d-P3) e extrato marinho (DR(M3)6), sobre a expressão de genes de *S. mutans* UA159 e um isolado clinico relacionados com: 1. a formação do biofilme (*gtf*B, *gtf*C e *gbp*B), 2. com a síntese de ácido láctico (*ldh*) e 3. com a tolerância ao estresse ácido (*ATPase*, d*na*K e g*ro*EL).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Rastreamento de extratos e frações com atividade antimicrobiana

4.1.1. Microrganismos

Para o rastreamento de novos extratos brutos de invertebrados e microrganismos marinhos bem como frações purificadas, foram selecionadas cepas padrões de estreptococos orais de interesse médico e odontológico (tabela 1).

Tabela 1. Relação de cepas padrões ou isolado clínico, selecionados para o rastreamento de extratos marinhos com atividade antimicrobiana.

Microrganismo	Origem
Streptococcus mutans	Isolado Clínico
Streptococcus mutans	UA159
Streptococcus sanguinis	ATCC 15300
Streptococcus sobrinus	ATCC 27607

4.1.2. Perfil de sensibilidade das cepas padrões de interesse médico/odontológico aos antibióticos usuais

Foram traçados os perfis de sensibilidade de cepas padrões (bactérias) de interesse médico e odontológico, através do método Kirk-Bauer de difusão, a partir de discos colocados na superfície do meio de cultura. Foram empregados discos de antibióticos comumente utilizados em terapias como: azitromicina 15µg, imipinem 10µg, vancomicina 30µg, penicilina G 10µg, tetraciclina 30µg, estreptocimicina 10µg, amoxacilina/ácido clavucâncio 30µg e amoxicilina 10µg, seguindo-se as normas do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute documento M26-A, 1999).

Resumidamente, culturas *overnight* das cepas padrões, na concentração de aproximadamente 10^8 UFC/mL (D.O. = 0,5 a 0,6, 560 nm), foram inoculadas sobre a superfície do ágar Müeller Hinton utilizando-se Swab estéril. Após secagem, foram depositados assepticamente os discos de antibióticos de forma eqüidistante, e após 24 horas de incubação nas condições favoráveis para o crescimento de cada cepa, realizou-se a medição dos respectivos diâmetros dos halos inibitórios, em mm (Ambaye *et al.*, 1997).

Quanto às sensibilidades, as cepas indicadoras foram classificadas como sensíveis (S), moderadamente sensíveis (MS), intermediárias (I) ou resistentes (R) de acordo com as normas pré-estabelecidas pelo CLSI.

4.1.3. Curvas de crescimento microbiano

Estes ensaios foram realizados de acordo com as normas de padronização publicadas no documento M27-A2, CSLI, 2002. Resumidamente, 1 mL culturas overnight das cepas escolhidas para o presente trabalho foram inoculadas em 5 mL de BHI caldo (*Brain Heart Infusion*, OXOID®, UK) e acompanhada a absorbância de crescimento em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 550 e 560 nm de hora em hora. A cada tempo, alíquotas da cultura microbiana foram diluídas em salina estéril (diluição seriada) e plaqueados (25 µL) em BHI ágar para contagem de UFC/mL em triplicata (Westergren & Krasse, 1978) e padronização do inóculo microbiano inicial a 10^8 UFC/mL para todos os experimentos.

4.1.4. Obtenção dos extratos e frações

Foram utilizadas no presente estudo frações purificadas que apresentaram atividade antimicrobiana em estudos prévios (Oliveira *et al.*, 2006; Kossuga *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2002). Adicionalmente, novos extratos brutos e suas respectivas frações purificadas de invertebrados e microrganismos marinhos foram fornecidos pelo colaborador Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck, coordenador do projeto temático, intitulado: “Descoberta e desenvolvimento de

potenciais agentes quimioterapêuticos a partir de invertebrados marinhos e de microrganismos associados", em andamento (Processo FAPESP nº 05/60175-2). Foram empregados nos testes antimicrobianos, os extratos obtidos de invertebrados marinhos (ascídias, briozoários, esponjas e octocorais) e de microrganismos isolados dos mesmos (figura 1). Extratos com atividade antimicrobiana foram fracionados por cromatografia, submetidos a uma análise de desreplicação por LC-UV/ELS/S (cromatografia líquida de alto desempenho) e cada fração obtida foi reavaliada nos bioensaios, na tentativa de se identificar compostos puros com potencial antimicrobiano.

4.1.5. Caracterização dos extratos ou frações purificadas

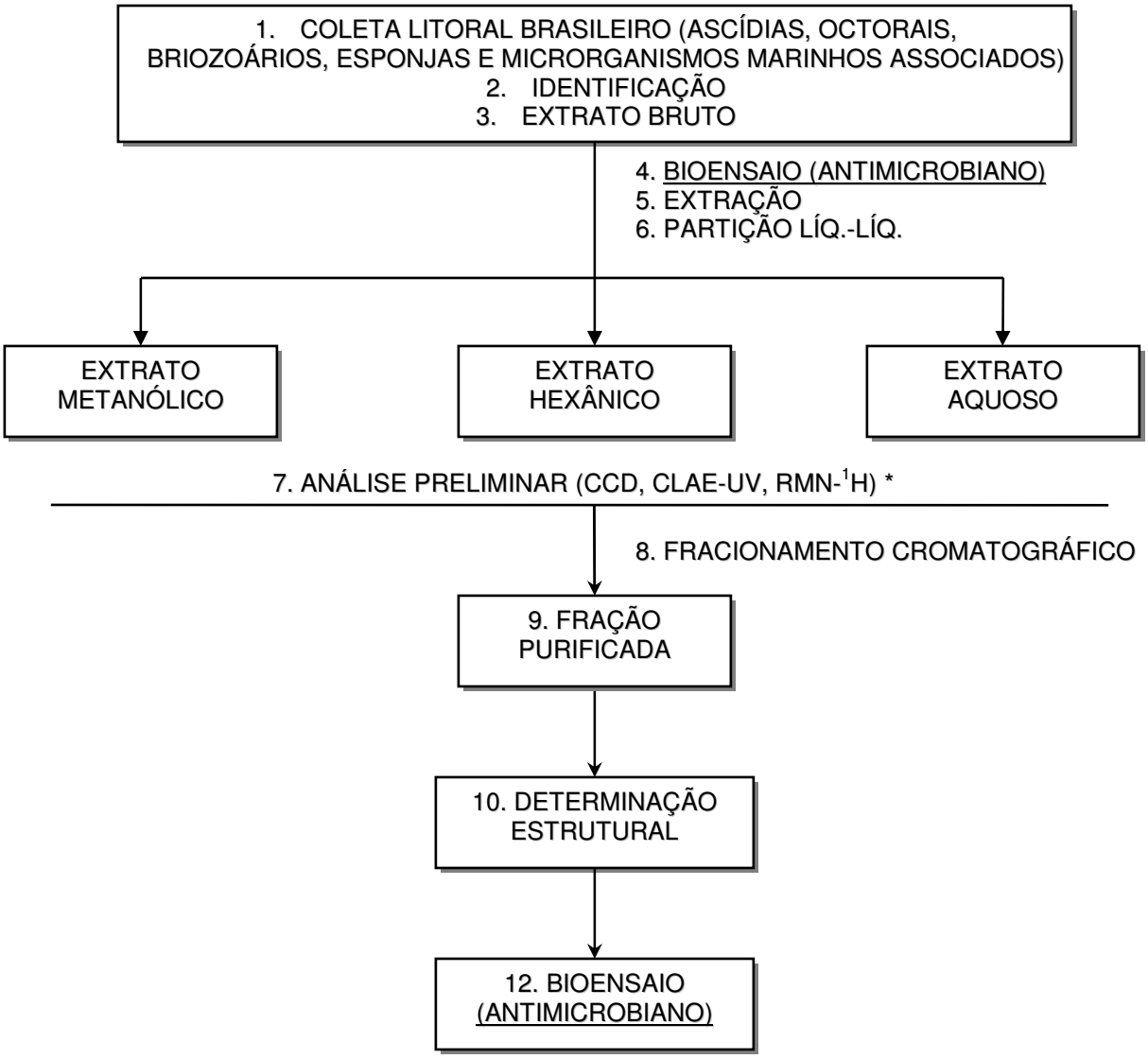
Foram caracterizados quanto ao espectro de atividade inibitória contra diferentes espécies bacterianas através: 1. da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e 2. da Concentração Bactericida Mínima (CBM).

4.1.5.1. Determinação de CIM (Concentração Inibitória Mínima)

As CIMs foram obtidas seguindo-se as normas do CSLI e o protocolo de Oliveira *et al.,* (2006), com algumas modificações. Resumidamente, os extratos/frações na concentração de 500 μg/mL foram diluídos serialmente em DMSO (1%). Suspensões bacterianas de cultura *overnight* de determinada cepa padrão ou isolado clínico crescidos em BHI (*Brain Heart Infusion* – OXOID, UK), foram diluídos até a concentração de 10^8 UFC/mL. Os testes foram realizados em microplacas estéreis com 96 poços de fundo chato, sendo que cada poço continha o volume total de 100 μL (40 μL de meio de cultura + 20 μL de inóculo + 40 μL da substância diluída em água). As placas foram incubadas por 18h, à 37ºC em microareofilia (10% CO_2) e o crescimento microbiano foi determinado pelas absorbâncias mensuradas antes e após incubação, a 550-560 nm em leitor automático de microplacas (Molecular Devices, Programa Versa Max). A CIM foi definida como a menor concentração do antimicrobiano que inibiu 50 a 100% do

crescimento em relação ao controle. Os experimentos foram realizados em triplicatas e tiveram como controles o antibiótico Doxicilina (Sigma-Aldrich Co.®, USA) e controle negativo a cultura microbiana sem adição do extrato/fração.

Figura 1. Fluxograma da obtenção dos extratos brutos e frações purificadas, em colaboração com o Prof. Roberto Gomes de Souza Berlinck.



* O isolamento das substâncias presentes nos extratos foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-1H). No processo de isolamento e purificação foram empregadas diversas técnicas cromatográficas. Para identificação das substâncias isoladas são utilizadas técnicas espectroscópicas de uso corrente: infravermelho, ultravioleta, diferentes experimentos de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas.

4.1.5.2. Determinação de CBM (Concentração Bactericida Mínima)

Após incubação e leitura de absorbância em leitor de microplacas, alíquotas de 50 µL foram removidas dos poços das placas de microtitulação, que não mostraram nenhuma turbidez, ou seja, nas concentrações maiores que a CIM. Estas alíquotas foram diluídas serialmente em salina estéril (NaCl 0,9%) e plaqueadas em meio de cultura propício para o crescimento. Após 24 horas em 10% CO_2, foram realizadas a contagem de células viáveis e a determinação da CBM, sendo esta definida como a menor concentração do antimicrobiano que teve capacidade de matar todas as células bacterianas presentes no inóculo inicial.

4.2. Avaliação da atividade de frações purificadas e/ou de extratos marinhos sobre características fenotípicas de virulência de *S. mutans*

Para a análise da atividade do(s) extrato(s) ou frações sobre *S. mutans,* selecionamos 2 cepas da espécie, incluindo a cepa padrão *S. mutans* UA159. Em adição, foram selecionados 1 extrato bruto e 2 frações purificadas que apresentaram maior espectro de atividade antimicrobiana contra a espécie cariogênica, baseando-se em dados prévios obtidos pelo teste determinação da CIM e CBM.

4.2.1. Detecção da atividade inibitória sobre células planctônicas e sobre a formação de biofilme *"in vitro"*

A atividade inibitória de cada extrato (pré-selecionado) ou fração purificada foi testada sobre células planctônicas e de biofilmes (em formação) de *S. mutans*. Para isso, realizamos um piloto inicial utilizando a metodologia abaixo, com o antibiótico Doxiciclina (Sigma-Aldrich Co.®, USA) e a cepa *S. mutans* UA159.

Neste teste, objetivou-se determinar a concentração de antibiótico/antimicrobiano capaz de inibir a formação de biofilme, sem interferir no

crescimento planctônico (CIB – Concentração Inibitória do Biofilme). Para tanto se comparou os resultados com o controle.

Foram realizados estudos pilotos com a cepa padrão *S. mutans* UA159 utilizando o antibiótico Doxiciclina (Sigma-Aldrich Co.®, USA) que possui valor de CIM aproximadamente 1 µg/mL para o microrganismo testado, objetivando determinar a menor concentração de antibiótico capaz de inibir a formação de biofilme, mas não interferir no crescimento planctônico (CIB – Concentração Inibitória do Biofilme). A utilização do antibiótico foi para comparar os resultados com os demais antimicrobianos, um controle de antibiótico comercialmente utilizado. Para tanto se comparou os resultados com o controle sem droga.

Para testar a atividade dos antimicrobianos (doxiciclina, extrato ou fração) no desenvolvimento do biofilme bacteriano foram realizadas diluições seriadas dos mesmos (concentrações próximas CIM e CBM para ambas as espécies: PcS2d - 31 µg/mL; DR-MSP-10d-P3 - 62 µg/mL; DR(M3)6 - 125 µg/mL) em 100 µL de THB (*Toddy Hewitt Broth, OXOID,* UK) contendo sacarose (0,5%) em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo redondo, foram feitas duas microplacas para cada condição. Às diluições, foi acrescentado o inóculo inicial (10^8 UFC/mL) de cada cepa de *S. mutans*. As microplacas foram, incubadas em 10% CO_2, a 37^{o}C por 18 horas.

A formação do biofilme foi quantificada pelo método de evidenciação de células aderidas ao poliestireno: uma microplaca de cada condição teve a cultura planctônica removida, lavada com água destilada e adicionou-se corante cristal violeta (1%) por 30 minutos. Em seguida lavou-se com água destilada e após secagem por 2 horas, ocorreu descoloração com álcool etílico (98%) por 30 minutos e transferiu-se a coloração obtida para microplacas de fundo chato para leituras de absorbância a 575 nm em leitor de microplacas (Molecular Devices, Programa Versa Max) (O'Toole & Kolter, 1998).

A atividade biológica dos extratos ou frações purificadas na inibição da formação do biofilme de espécies sensíveis foi detectada através de comparações com o biofilme formado em solução controle (teste *t* Student).

Após análises dos dados obtidos e definição da CIB, o crescimento planctônico foi monitorado através de medidas de absorbância a 550 nm, em leitor de microplacas, sendo comparados com o crescimento planctônico do controle (teste *t* Student) em outra placa da mesma condição. Após a obtenção dos resultados por absorbância, as culturas planctônicas dos poços contendo os biofilmes nas CIB e dos respectivos controles foram diluídas serialmente e plaqueadas em BHA para se confirmar a quantidade de células viáveis (em UFC/ml) presentes nestas concentrações, em relação ao controle.

4.3. Avaliação da atividade de frações purificadas e/ou de extratos marinhos sobre a expressão de genes de virulência de *S. mutans*

4.3.1. *Primers* específicos para os genes de virulência

As seqüências dos genes de virulência relacionados com o desenvolvimento do biofilme, produção e adaptação ao ácido, bem como as seqüências do gene 16S foram utilizadas para delinear os *primers* específicos (tabela 2). Os *primers* delimitaram regiões específicas de até 200 pares de bases, para otimizar os resultados do RT-PCR. Todas as seqüências foram obtidas no Gene Bank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) e os delineamentos dos oligonucleotídeos foram desenvolvidos no programa *Primer* 3 (http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi).

Tabela 2. Seqüência dos *primers* para os genes *16SRNA* e de virulência *ATPase, dnaK, gbpB, gtfB, gtfC, groEL* e *ldh* de *S. mutans*.

Primers	Seqüências	Amplificado	Gene Bank
*ATPase*_Forward	TAATCATGAGCGTTTGTAAT	130 pb	1028775
ATPase _Reverse	TTAAAGATTTTAGCACTTGG		
*dnaK*_Forward	CAGTGACTAATCCAGAAACA	107 pb	1029666
*dnaK*_Reverse	CATAGCTGAGATTTCTTGTG		
*gbpB*_Forward	TTAATACGATTCAAGGACAA	121pb	1029610
*gbpB*_Reverse	CTTGAAAGTGTTTGAATTTG		
*gtfB*_Forward	AGATGGAACTTACGCTTATT	150 pb	1028336
*gtfB*_Reverse	TCATCAAAGTATTGAACCTG		
*gtfC*_Forward	TGATTAACATGGATAACAGG	102 pb	1028343
*gtfC*_Reverse	CCAAACTGTTAGTGATCAGA		
*groEL*_Forward	ACCTTGACAGGATCAATAAT	132 pb	1029159
*groEL*_Reverse	TAAAAATGCTGGTTATGAAG		
*ldh*_Forward	GATCTCGTTGGTAAAAATCT	107 pb	1028428
*ldh*_Reverse	AAGATATCAACTGGGTTAGC		
*16S*_Forward	TATCTTCCTCAATTAAACCA	181pb	NP722374
*16S*_Reverse	TAGTTAAGATTGCCAGTGAT		

4.3.2. Extração de DNA e PCR para teste dos *primers*

O DNA da cepa *S. mutans* UA159 foi extraído com o MasterPure^{TM}DNAPurification Kit (Epicentre, USA) com adaptações. Após centrifugar 1,5 mL de cultura, adicionou-se 300 µL da solução de lise de célula + 2µL de Proteinase K e incubou-se a 65ºC por 15 minutos as amostras foram

resfriadas a 37ºC. Cerca de 2μL de RNAse (20 ug/ml) foi adicionado a cada amostra e sendo estas incubadas novamente a 37ºC por 30 minutos.

Após, realizou-se a precipitação do DNA com reagente de precipitação de proteínas (150 μL) e centrifugação (10 minutos à 12000 x g a 4ºC). Transferiu-se o sobrenadante a um tubo eppendorf limpo e descartou-se o pellet, adicionou-se 500μL de isopropanol, seguindo-se com centrifugação (10 minutos à 12000 x g a 4ºC). Removeu-se o isopropanol e acrescentou-se etanol 75%, lavando-se por duas vezes. Os pellets foram secados com os tubos abertos por 2 h. Finalmente, adicionou-se 30μL de TE (TrisEDTA). O DNA foi armazenado a -20^{o}C.

Cerca de 2 μL do DNA purificado foram utilizados como *template* para amplificação por PCR (reação para 25 μL), juntamente com 50 mM de $MgCl_2$, 0.3mM de cada *primer* específico, 200 μM de dNTPs, 1.25 unidades de Taq polimerase (Invitrogen) e tampão para PCR 10x. Após a desnaturação inicial (94^{o}C por 2 min), as amplificações foram realizadas através de 35 ciclos térmicos, com exceção do gene *16SRNA* que fora amplificado com 27 ciclos (94°C/45seg, 52°C/1min e 72°C/5min), seguidos de extensão final a 72^{o}C/7min. Os produtos da PCR (10 μL) foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TBE 1 x, corado com brometo de etídio (0,3 μg/ml).

4.3.3. Extração de RNA

A influência das frações e extratos marinhos pré-selecionados sobre a expressão de genes relacionados com a formação de biofilme, com a produção e/ou tolerância ao ácido foi realizada seguindo o protocolo de Koo *et al.*, (2006).

Assim, células planctônicas de *S. mutans* (cepa padrão e isolado clínico) foram crescidas até a metade da fase exponencial de crescimento (D.O. ≅ 0,5), sendo a curva monitorada por densidade óptica a 550-560 nm. O extrato ou fração purificada, em concentrações sub-CIM para ambas as espécies: PcS2d - 7μg/mL;

DR-MSP-10d-P3 - 31 µg/mL; DR(M3)6 - 31 µg/mL e Doxiciclina – 0,62 µg/mL (ou veículo controle, DMSO 1%) foram adicionados à suspensão celular e após 1 minuto (T_1) ou 30 minutos (T_{30}) de exposição ao antimicrobiano, as suspensões bacterianas tratadas (e o controle DMSO T_{30}) foram processadas imediatamente para a extração de RNA.

Para a coleta das células, as culturas foram precipitadas sob centrifugação (10 minutos a 12000 x g a 4ºC), sendo o precipitado celular re-suspendido em 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%, estéril), para a lavagem das células e transferência em microtubo de 1,5 mL (AxygenScientific, EUA). As amostras foram centrifugadas a 12000 x g a 4°C por 1min e os sobrenadantes descartados. Os precipitados celulares foram congelados a -73°C, onde permaneceram até o momento da extração de RNA.

O RNA total foi extraído a partir do Kit Qiagen (RNeasy®, Qiagen). O precipitado celular foi descongelado em banho de gelo e acrescentou-se 100 µL de Lisozima (20mg/mL) ao pellet recém descongelado e agitou se no vórtex por 1 minuto. Os tubos foram mantidos a 37ºC por 30 minutos, sendo que a cada 5 minutos estes eram agitados no vórtex. A seguir, adicionou-se 350 µL de RLT(tampão do Kit) / βMercaptanol e agitou vigorasamente, após, 250 µL de etanol 100% foram adicionados a cada amostra, e estas transferidas (+/- 700 µL) para a coluna do kit e centrifugou por 15 segundos a 12000 x g a 25ºC.

Descartou-se o eluído que atravessou a coluna, adicionou-se 700 µL de RW1 (tampão do Kit), e centrifugou por 1 minuto a 12000 x g a 25ºC. O eluído foi descartado. As colunas foram transferidas para um tubo limpo, e adicionou-se 500 µL de RPE (tampão do Kit) e centrifugou-se nas mesmas condições, e o eluído novamente foi descartado. Após, repetiu-se o último passo, e a coluna foi transferida para outro tubo eppendorf (1,5mL). Os RNAs precipitados foram solubilizados em 35 µL de H2O tratada com DEPC (Kit) e as amostras foram centrifugadas (1 minuto a 12000 x g a 4ºC) e estocadas a -70°C.

A determinação da concentração e pureza das amostras de RNA foi realizada através da leitura em espectrofotômetro. O material foi considerado puro quando a razão entre as leituras A260nm/A280nm foi igual ou superior a 1,7.

A integridade das amostras de RNA foi determinada através da separação eletroforética de 6ul de cada amostra em géis desnaturantes de agarose a 1,2% (com 1,8% de formaldeído) contendo 0,15ul/ml de brometo de etídio, em tampão de corrida (20mM MOPS, 5mM acetato de sódio e 1 mM EDTA).

As imagens digitais dos géis foram obtidas sob luz UV, com auxílio de sistema de captura de imagens digital *Gel logic 100 Imaging System* (Eastman Kodak Co, EUA). A presença das duas bandas definidas, correspondentes aos RNAs ribossômicos (23S e 16S) indicou integridade das amostras.

4.3.4 Síntese de cDNA e RT-PCR semi-quantitativo

O DNA residual presente na amostra de RNA foi removido com DNase I (INVITROGEN®,USA), seguindo-se as recomendações do fabricante. Para tanto, a cada 1 μg de RNA, foi adicionado Tampão de reação 10x, DNase I e água DEPC para 10 μL. A suspensão foi incubada a temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente, foi adicionado 1 μL de EDTA para inativar a DNase com incubação a 65°C por 10 min (em termociclador). O RNA total (12 μg) tratado foi submetido à Transcrição Reversa (RT) com a enzima Super Transcrispt RT III (INVITROGEN®,USA) e um Mix de *primers* randômicos (20μM) Ea1, Ea7, Es1, Es3 e Es8 (Chia *et al.,* 2001), para a síntese de cDNA.

Inicialmente, foi adicionado ao RNA total (12 ng), o Mix de *primers* randômicos (20 μM), dNTPs (10 mM) e água DEPC para 10 μL. A mistura foi submetida a temperatura de 65°C por 5 min e a 4°C por 1 min. A segunda fase de síntese de cDNA consistiu na adição de tampão RT 10x, $MgCl_2$ (25 mM), DTT (0,1 M), RNase OUT (40 U/μL) e a enzima Super Transcript RT III (200 U/μL). O volume total dos reagentes (20 μL) foi submetido ao ciclo térmico: 25°C/10min;

50°C/50min; 85°C/5min e 4°C/1min. Cerca de 2 μL da reação contendo cDNA foram utilizados como *template* para amplificação por PCR (reação para 25 μL), juntamente com 50 mM de $MgCl_2$, 0.3mM de cada *primer* específico, 200 μM de dNTPs, 1.25 unidades de Taq polimerase (Life Technologies - Gibco) e tampão para PCR 10x.

Após a desnaturação inicial (94°C por 2 min), as amplificações foram realizadas através de 40 ciclos térmicos (94°C/45seg, 52°C/1min e 72°C/5min), seguidos de extensão final a 72°C/7min. Os produtos da PCR (10 μL) foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE 1 x, corado com brometo de etídio (0,4 μg/ml). Foi realizada a densitometria das bandas, normalizando a absorbância em relação ao gene de referência 16S. Foram utilizados controles da síntese de cDNA com reações sem a transcriptase reversa, para verificar a existência de DNA residual ou contaminante em cada amostra.

4.4. Estatística

O teste *t* Student foi utilizado para analisar os valores representados por densidade ótica (D.O.) para os testes de biofilme de *S. mutans.*

O teste ANOVA foi empregado para comparar valores representados por unidades relativas da expressão dos genes de virulência de *S. mutans* em células, da metade da fase logarítmica de crescimento, submetidas ao tratamento com antimicrobiano(s) em relação aos respectivos controles.

5. RESULTADOS

5.1. Rastreamento de extratos e frações com atividade antimicrobiana

5.1.1. Microrganismos

Em primeiro instante, realizou-se a reativação de cepas microbianas padrões. Ainda, foi realizado o procedimento de congelamento em BHI Glicerol a 10% para armazenamento adequado das mesmas.

5.1.2. Perfil de sensibilidade das cepas padrões de interesse médico/odontológico aos antibióticos usuais

Todos os microrganismos foram avaliados quanto à sua sensibilidade a antibióticos comerciais, utilizando teste de antibiograma pelo método Kirk Bauer da difusão em agar (Ambaye *et al.*, 1997). A interpretação dos resultados e classificação das cepas em sensíveis (S), moderadamente sensíveis (MS), intermediárias (I) e resistentes (S) aos agentes antimicrobianos baseou-se nas normas do CSLI. Os resultados podem ser analisados na tabela 3.

Dentre as cepas indicadoras padrões avaliadas, 3 espécies foram selecionadas para a realização dos testes de atividade antimicrobiana de extratos brutos e frações purificadas de acordo com seus perfis de sensibilidade. Ainda, selecionou-se uma espécie de isolado clínico de *Streptococcus mutans* (código 2.M7/4) do banco de cepas do laboratório de Microbiologia e Imunologia (FOP/UNICAMP), caracterizada por apresentar grande produção de mutacinas, importante fator de virulência da espécie (Kamiya *et al.*, 2008).

Tabela 3. Perfis de sensibilidades das cepas padrões de interesse médico/odontológico frente antibióticos usuais, obtidos através de antibiograma (método da difusão em ágar).

	Antibióticos testados							
Cepas Padrões	Azitromicina 15ug	Imipinem 10ug	Vancomicina 30ug	Penicilina G 10ug	Tetracilcina 30ug	Estreptomicina 10ug	Amoxacilina / Ácido Clavucânico 30ug	Amoxicilina 10ug
Streptococcus mutans UA 159	R	S	S	S	S	R	S	S
Streptococcus sanguinis ATCC 15300	R	S	I	R	R	R	R	R
Streptococcus sobrinus ATCC 27607	S	S	S	S	S	R	S	S

Sensibilidade segundo CSLI: S = Sensível; MS = Moderadamente sensível; I = Intermediária; R= Resistente.

5.1.3. Curva de crescimento microbiano

Para padronizar os bioensaios para determinação da CIM (concentração inibitória mínima) e CBM (concentração bactericida mínima), a serem utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana de extratos e frações purificadas, todos os microrganismos da tabela 1 (selecionados para o presente trabalho) foram avaliados segundo sua curva de crescimento (absorbância de crescimento 550/560nm x tempo). Os experimentos foram todos realizados com o inóculo das cepas microbianas na fase de crescimento exponencial *(log)* com D.O. entre 0,5 a 0,6 (figura 2) nas absorbâncias de crescimento citadas e diluídas a 10^8 UFC/mL.

5.1.4. Obtenção dos extratos e frações

Até o presente período do estudo foram avaliadas a atividade antimicrobiana de 11 frações purificadas e 775 extratos brutos de invertebrados marinhos (ascídias, briozoários, esponjas e octocorias) fornecidos pelo colaborador Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck.

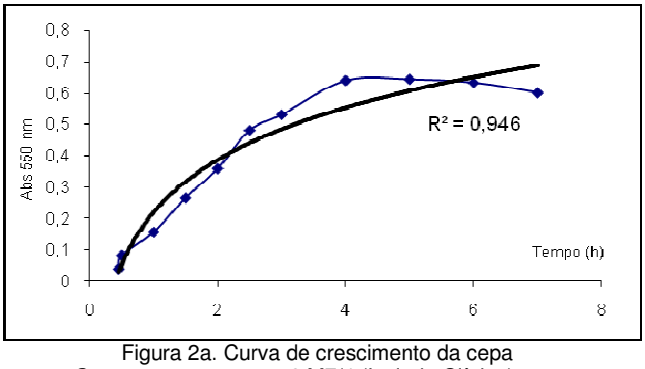


Figura 2a. Curva de crescimento da cepa *Streptococcus mutans* 2.M7/4 (Isolado Clínico)

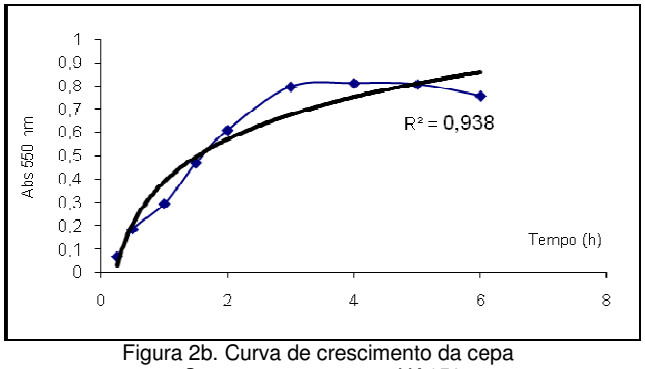


Figura 2b. Curva de crescimento da cepa *Streptococcus mutans* UA159

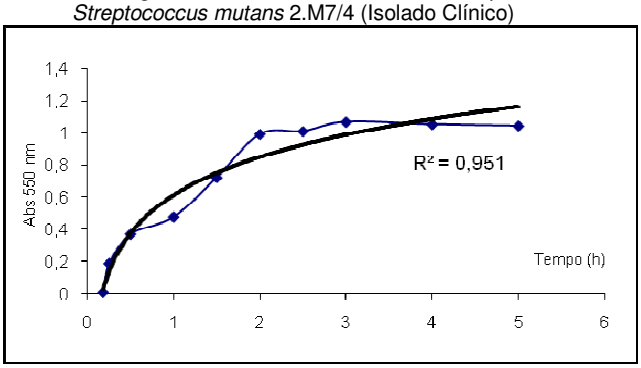


Figura 2c. Curva de crescimento da cepa *Streptococcus sanguinis* ATCC 15300

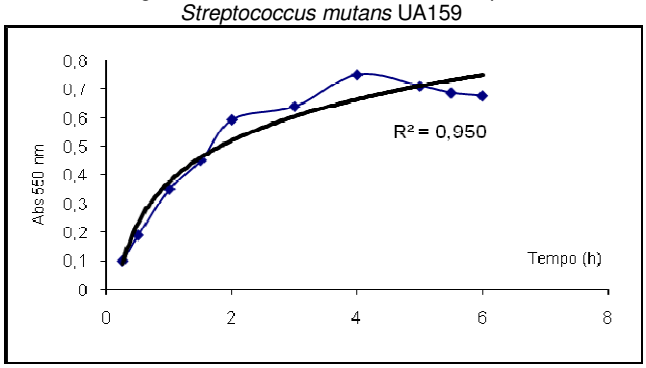


Figura 2d. Curva de crescimento da cepa *Streptococcus sobrinus* ATCC 27607

5.1.5. Caracterização dos extratos ou frações purificadas

5.1.5.1. Determinação de CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima)

Foram realizados os testes para determinação da CIM de 11 frações purificadas e 775 extratos brutos. Os resultados gerais em porcentagem (%) podem ser visualizados na tabela 4. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, obtendo como controle positivo o antibiótico Doxiciclina (Sigma-Aldrich Co.®, USA).

Tabela 4. Número e porcentagem de extratos brutos ou frações purificadas que apresentaram atividade antimicrobiana nos teste de CIM (concentração inibitória mínima), de um total de 786 extratos/frações testados.

Cepa Padrão ou Isolado Clínico testado	Número de extratos ou frações com atividade (%)
Streptococcus mutans 2.M7/4	77 (9,80%)
Streptococcus mutans UA159	60 (7,63%)
Streptococcus sanguinis ATCC15300	37 (4,71%)
Streptococcus sobrinus ATCC27607	26 (3,30%)

Dos extratos/frações que apresentaram atividade antimicrobiana, incluiu-se na definição de CIM a menor concentração do antimicrobiano que inibiu 50% à 85% ou 90% a 100% do crescimento microbiano após análise de densidade óptica, como poderá ser visualizado na figura 3.

Dentre os extratos brutos e frações purificadas testadas podemos destacar a atividade antimicrobiana de 37 extratos brutos e 3 frações purificadas (figuras 4 e 5), e os resultados podem ser visualizados na tabela 5, que demonstra os valores de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima (CIM e CBM).

Figura 3. Extratos brutos ou frações purificadas com inibição de 50% a 100% do crescimento de microrganismos nos testes de CIM (concentração inibitória mínima) (n=786).

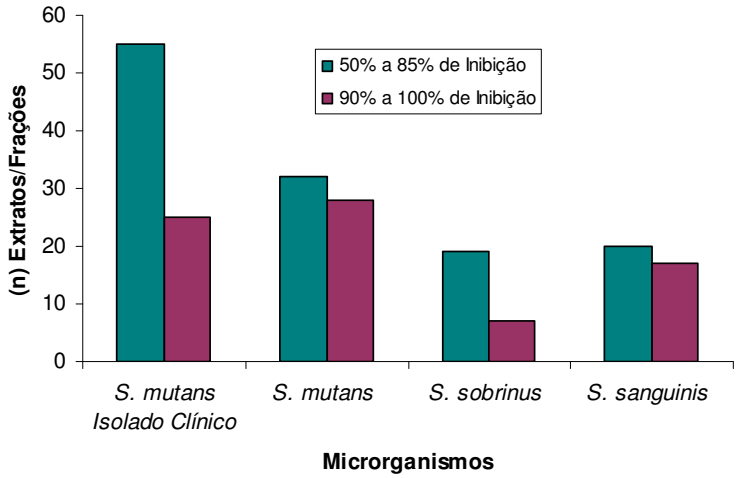


Tabela 5. CIM (CBM) em µg/mL de extratos brutos ou frações purificadas ativos sobre os microrganismos testados.

Código do Extrato bruto ou fração purificada	Microrganismos			
	Streptococcus mutans 2.M7/4	*Streptococcus mutans* UA159	*Streptococcus sanguinis* ATCC15300	*Streptococcus sobrinus* ATCC27607
AC2(B)3	-	125µg/mL (> 500 µg/ml)	-	-
AC2(F)2	-	125µg/mL (> 500 µg/ml)	-	-
AC2(G)4 - MeOH	15µg/mL	15µg/mL	15µg/mL	31µg/mL
AC2(M3)1D - MeOH	-	-	-	500µg/mL (> 500 µg/ml)
AC2(M3)1SD - MeOH	-	-	-	500µg/mL (> 500 µg/ml)
Afar-3A4B3*	500µg/mL (> 500 µg/ml)	500µg/mL (> 500 µg/ml)	-	500µg/mL (> 500 µg/ml)
B160-E2	500µg/mL (> 500 µg/ml)	500µg/mL	-	-
DR(A)7	250µg/mL (> 500 µg/ml)	250µg/mL (> 500 µg/ml)	-	-
DR(F)6	500µg/mL (> 500 µg/ml)	31,25µg/mL (> 500 µg/ml)	-	-
DR(M2)4	500µg/mL (> 500 µg/ml)	62,5 µg/mL (> 500 µg/ml)	250µg/mL	-
DR(M3)2	125µg/mL (> 500 µg/ml)	250µg/mL (> 250 µg/ml)	-	500µg/mL
DR(M3)6	62,5µg/mL (62,5 µg/ml)	31,25µg/mL (62,5 µg/ml)	62,5µg/mL (> 125 µg/ml)	62,5 µg/mL (> 125 µg/ml)
DR-MSP-10d-P3*	31,25µg/mL (62,5 µg/ml)	62,5µg/mL (62,5 µg/ml)	125µg/mL (125 µg/ml)	125µg/mL (> 125 µg/ml)
GC(F)10	125µg/mL (> 250 µg/ml)	7,81µg/mL (> 250 µg/ml)	-	-
GC(F)2	250µg/mL (> 500 µg/ml)	250µg/mL (> 500 µg/ml)	-	-
GC(G)2	125µg/mL	500µg/mL (> 500 µg/ml)	-	125µg/mL
GC(M2)1	-	500µg/mL (> 500 µg/ml)	-	-
GC(M2)3	-	500µg/mL (> 500 µg/ml)	-	-
GC(T)3	125µg/mL	-	125µg/mL	125µg/mL
MaAV-2-2	125µg/mL (> 500 µg/ml)	62,5µg/mL (250 µg/ml)	-	-
MaAV-3b	250µg/mL (> 500 µg/ml)	-	-	-
MaAV-3c	-	62,5µg/mL (500 µg/ml)	62,5µg/mL (250 µg/ml)	-
MaAV-5	250µg/mL (> 500 µg/ml)	125µg/mL (500 µg/ml)	125µg/mL (250 µg/ml)	-
MaAV-6	125µg/mL	-	125µg/mL	-
MaAV-6a	125µg/mL (> 500 µg/ml)	125µg/mL (500 µg/ml)	125µg/mL (500 µg/ml)	-
MaAV-6c	500µg/mL (> 500 µg/ml)	500µg/mL (> 500 µg/ml)	500µg/mL (> 500 µg/ml)	-
MaAV-c	500µg/mL (> 500 µg/ml)	-	125µg/mL (500 µg/ml)	-
MaAV-D	500µg/mL (> 500 µg/ml)	-	250µg/mL (> 500 µg/ml)	-
MaAV-F	500µg/mL (> 500 µg/ml)	-	250µg/mL (500 µg/ml)	-
MaAV-G2	125µg/mL (500 µg/ml)	250µg/mL (250 µg/ml)	62,5µg/mL (250 µg/ml)	-
MaAV-I	125µg/mL (500 µg/ml)	500µg/mL (> 500 µg/ml)	62,5µg/mL (250 µg/ml)	-
MaAV-J	250µg/mL (500 µg/ml)	-	125µg/mL (500 µg/ml)	-
MaAV-K	250µg/mL (> 500 µg/ml)	250µg/mL (> 500 µg/ml)	250µg/mL (> 500 µg/ml)	-
MaFU-1a	500µg/mL (> 500 µg/ml)	500µg/mL (> 500 µg/ml)	-	-
MaFU-2	250µg/mL (> 500 µg/ml)	125µg/mL (500 µg/ml)	-	-
MaFU-2-1	250µg/mL (> 500 µg/ml)	250µg/mL (500 µg/ml)	-	-
MaFU-b	500µg/mL (> 500 µg/ml)	500µg/mL (> 500 µg/ml)	-	-
MaFU-d	125µg/mL (500 µg/ml)	62,5µg/mL (125 µg/ml)	-	-
MaFU-E2	125µg/mL (> 500 µg/ml)	250µg/mL (> 500 µg/ml)	-	-
PcS2d*	15µg/mL (31,25 µg/ml)	15µg/mL (31,25 µg/ml)	250µg/mL	250µg/mL

* Frações purificadas
- Sem atividade antimicrobiana
(Valores em azul inibição de 50% à 85% do crescimento microbiano e valores em vermelho inibição de 90% a 100%).

Destacamos a atividade da fração purificada denominada DR-MSP-10d-P3 isolado da ascídia *Didemnum* sp. (figura 4), que apresentou atividade sobre todos os microrganismos com CIM abaixo de 125 µg/mL e CBM próximos desse valor, principalmente sobre *S. mutans* com CIM de 62,5 µg/mL. Esta fração foi escolhida para os experimentos para avaliação da sua atividade sobre fatores de virulência da espécie citada.

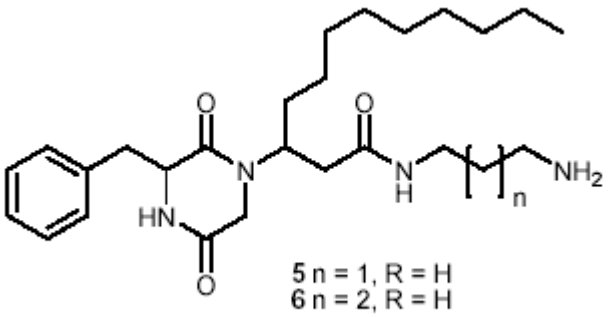
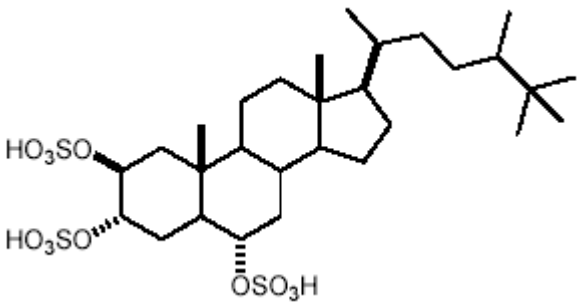


Figura 4. Cadeia representativa do composto puro DR-MSP-10d-P3 (mistura de dicetopiperazinas modificadas 5 e 6) isolado da ascídia *Didemnum* sp. (Estrutura cedida pelo grupo de estudos do Prof. Prof. Roberto Gomes de Souza Berlinck – IQSC/USP).

Outro composto puro com excelente atividade antimicrobiana (CIM de 15 µg/mL e CBM de 31 µg/mL contra *S. mutans*) denominado PcS2d foi identificado como trissulfato de halistanol e pode ser visualizado na figura 5. Esta fração também foi escolhida para os experimentos de avaliação da sua atividade sobre fatores de virulência da espécie citada.

Figura 5. Cadeia representativa do composto puro PcS2d (trissulfato de halistanol), isolado da esponja *Petromica ciocalyptoides* (Estrutura cedida pelo grupo de estudos do Prof. Prof. Roberto Gomes de Souza Berlinck – IQSC/USP).



Fungos isolados da esponja *Axinella corrugata* constam dos extratos AC2(M3)1SD-MeOH, AC2(M3)1DMeOH e AC2(B)3, AC2(F)2; e da esponja *Mycale angulosa*: Ma- I1(M3%)-MeOH, MaFU-1a, MaFU-2, MaFU-2-1, MaAV-2-2, MAFU-b, MaFU-d, MaFU-E2, MaAV-2a1, MaAV-3b.

Ainda, isolado da esponja *Dragmacidon reticulata*, o extrato bruto DR(M3)6 apresentou CIM de 62,5 µg/mL e CBM entre 62,5 µg/mL à 125 µg/mL para todos os microrganismos. Por se apresentar como um extrato com excelente atividade antimicrobiana avaliamos também a sua influência nos fatores de virulência de *S. mutans*.

5.2. Avaliação da atividade de frações purificadas e/ou de extratos marinhos sobre características fenotípicas de virulência de *S. mutans*

5.2.1. Detecção da atividade inibitória sobre células planctônicas e sobre a formação de biofilme *"in vitro"*

Em nossos estudos prévios de inibição na formação de biofilme, testou-se as concentrações de 5 µg/mL à 0,005 µg/mL (diluição serial 2). Nas concentrações de 5 µg/mL e 2,5 µg/mL de doxiciclina foi possível verificar a inibição de 100% do crescimento do biofilme da cepa indicadora (figura 6). Nos testes de biofilme, o teste t S*tudent* mostrou a diferença significante entre a formação de biofilme das células submetidas à atividade do antibiótico doxiciclina na CIB = 0,62 µg/mL e células do grupo controle ($p < 0,05$).

Os poços das microplacas contendo os biofilmes formados na CIB, assim como os biofilmes controles, foram submetidos ao ultrassom e as células foram diluídas serialmente e plaqueadas em meio BHA para contagem de células potencialmente viáveis (UFC/mL). Na CIB (0,62 µg/mL), verificou-se inibição na formação de biofilme maduro, com base resultados das densidades ópticas (figura 6) e nas contagens de UFC/ml em relação ao controle. Entretanto, o antibiótico doxiciclina não teve capacidade biocida e sim bacteriostática sobre células

planctônicas, pois as médias de contagem ficaram em torno de 10^8 UFC/mL para esta diluição. Desta forma, a concentração próxima a 0,62 µg/ml foi utilizada para verificarmos o efeito da doxicixiclina sobre a expressão de genes relacionados com a formação de biofilme.

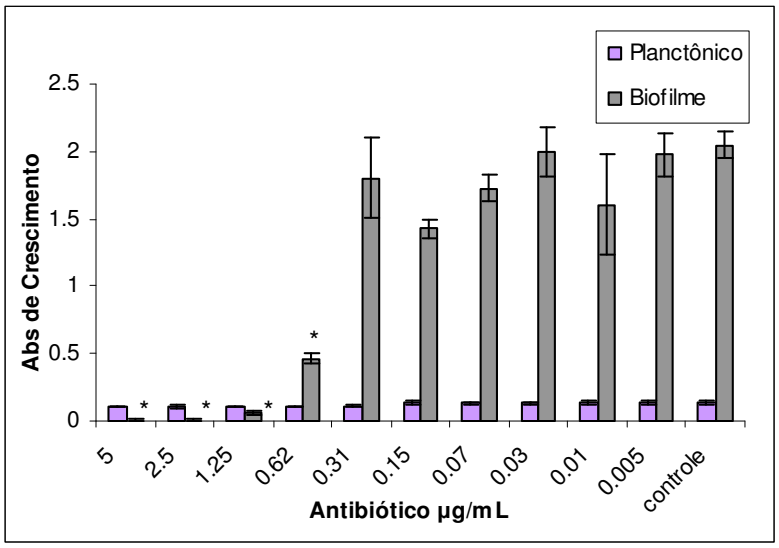


Figura 6. Atividade antimicrobiana da Doxiciclina nas células planctônicas e biofilme de *S. mutans*. Os dados foram expressos com médias e desvios padrão com base em quadruplicatas.

Com relação aos testes de influência do extrato bruto ou frações purificadas selecionados, sobre células planctônicas e células do o biofilme de *S. mutans* UA159 pudemos observar os resultados demonstrados nas figuras 7,8 e 9.

Em nossos estudos de inibição na formação de biofilme de *S. mutans* UA159, testou-se as concentrações sub-CIM do extrato bruto e frações, sendo a fração PcS2d de 31 µg/mL à 0,05 µg/mL; a fração DR-MSP-10d-P3 foi testada de 125 µg/mL à 0,2 µg/mL e o extrato bruto DR(M3)6 testado de 62 µg/mL à 0,1 µg/mL (em todos os experimentos diluição serial 2). As CIBs para a fração PcS2d, DR-MSP-10d-P3 e o extrato DR(M3)6 foram 7 µg/mL, 31 µg/mL e 31 µg/mL respectivamente, sendo a CIB definida como concentração do antimicrobiano capaz de inibir a formação do biofilme, sem interferir no crescimento planctônico.

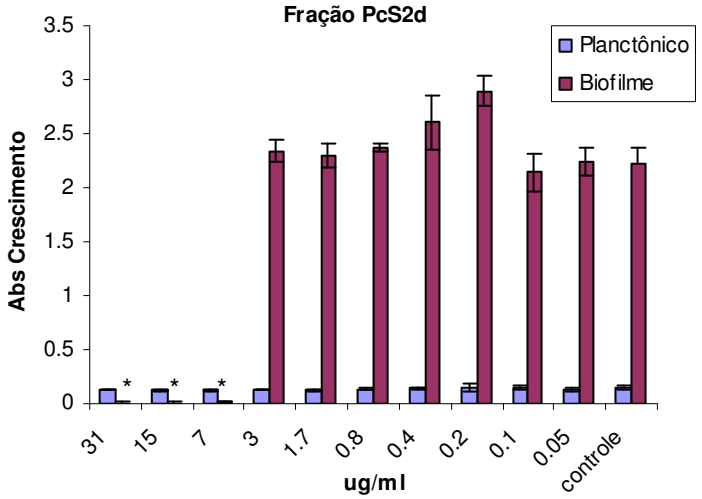


Figura 7. Atividade antimicrobiana da fração purificada PcS2d nas células planctônicas (Abs 550 nm) e biofilme (Abs 575 nm) de *S. mutans* UA159. Os dados foram expressos com médias e desvios padrão com base em quadruplicatas. (* diferença estatisticamente significante com relação ao controle, teste *t* Student, $p < 0,05$).

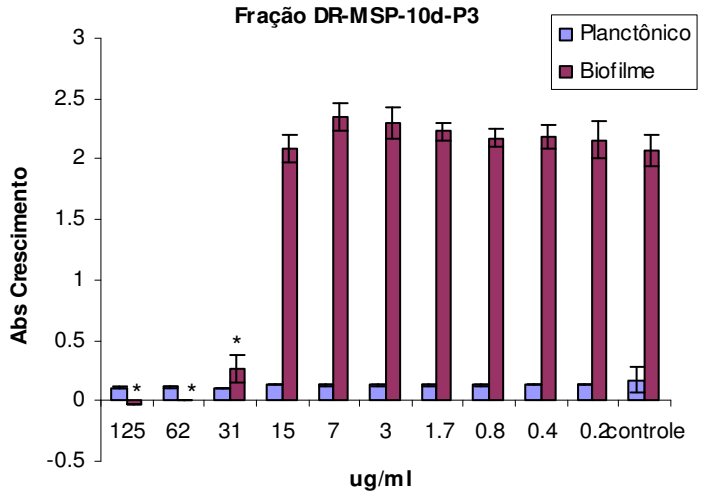


Figura 8. Atividade antimicrobiana da fração purificada Dr-MSP-10d-P3 nas células planctônicas (Abs 550 nm) e biofilme (Abs 575 nm) de *S. mutans* UA159. Os dados foram expressos com médias e desvios padrão com base em quadruplicatas. (* diferença estatisticamente significante com relação ao controle, teste *t* Student, $p < 0,05$).

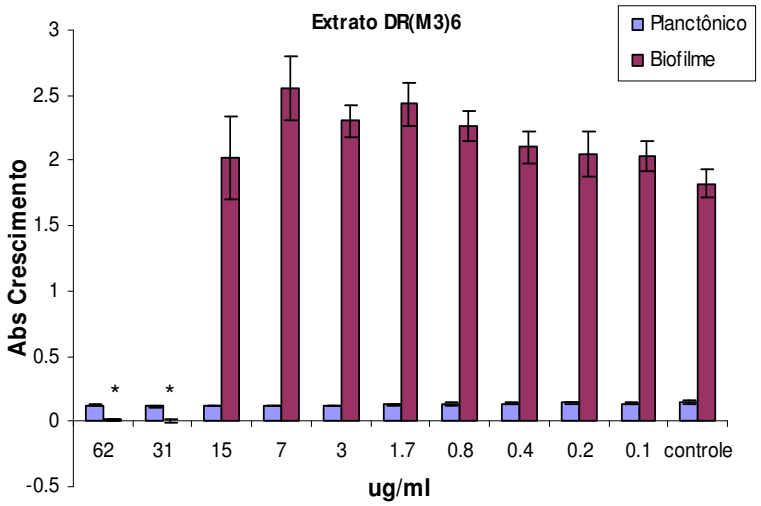


Figura 9. Atividade antimicrobiana do extrato bruto DR(M3)6 nas células planctônicas (Abs 550 nm) e biofilme (Abs 575 nm) de *S. mutans* UA159. Os dados foram expressos com médias e desvios padrão com base em quadruplicatas. (* diferença estatisticamente significante com relação ao controle, teste *t* Student, $p < 0,05$).

Para avaliarmos a interferência dos antimicrobianos na CIB sobre as células planctônicas, toda a cultura planctônica foi diluída e plaqueada em meio BHA para contagem de células viáveis (UFC/mL) comparando com o controle sem antimicrobiano. Os resultados podem ser visualizados na tabela 6. Ainda, os poços contendo os biofilmes formados nas CIB, assim como os biofilmes controles, foram submetidos ao ultrassom e as células desprendidas foram diluídas serialmente e plaqueadas em meio BHA para contagem de células viáveis (UFC/mL).

Tabela 6. Médias das contagens de células viáveis (em UFC/mL) da cultura planctônica e biofilme de *S. mutans* UA159, submetidas ao extrato ou frações, nas CIBs, comparados com os respectivos controles.

Extrato ou fração	CIM µg/mL	CIB µg/mL	Médias UFC/mL Planctônico na CIB	Médias UFC/mL Planctônico Controles	Médias UFC/mL Biofilme na CIB	Médias UFC/mL Biofilme Controles
PcS2d	31	7	1×10^6	2×10^6	0	$2{,}1 \times 10^8$
Dr-MSP-10d-P3	62,5	31	$1{,}24 \times 10^6$	$1{,}62 \times 10^6$	0	$1{,}66 \times 10^8$
DR(M3)6	62,5	31	2×10^6	$1{,}95 \times 10^6$	$0{,}8 \times 10^3$	2×10^6
Doxiciclina	1	0,62	$1{,}32 \times 10^6$	$1{,}85 \times 10^6$	0	$3{,}6 \times 10^8$

Todos os antimicrobianos testados apresentaram atividade antimicrobiana sobre o biofilme da cepa UA159. O extrato bruto e as frações inibiram a formação de biofilme em concentrações sub-CIMs (CIBs), sem que ocorressem alterações na quantidade de células viáveis da cultura planctônica, visualizadas na tabela 6.

Ainda, os resultados dos testes de influência do extrato bruto ou frações purificadas selecionados, sobre o biofilme de *S. mutans* 2.M7/4 (isolado clínico) podem ser observados nas figuras 10, 11 e 12. Nestes estudos, testou-se as concentrações sub-CIM do extrato bruto e frações, sendo a fração PcS2d de 31 µg/mL à 0,05 µg/mL; a fração DR-MSP-10d-P3 foi testada de 125 µg/mL à 0,2 µg/mL e o extrato bruto DR(M3)6 testado de 62 µg/mL à 0,1 µg/mL (em todos os experimentos diluição serial 2).

Os mesmos procedimentos de diluição e contagem da cultura planctônica, bem como uso do ultrassom nos poços do biofilme, foram realizados com a cepa de isolado clínico de *S. mutans*. Os resultados podem ser visualizados na tabela 7.

Da mesma maneira, os resultados encontrados para a atividade antimicrobiana sobre o biofilme da cepa isolado clínico 2.M7/4 demonstraram inibição a formação de biofilme em concentrações sub-CIMs de ambos extrato e frações testadas, sem que ocorresse alterações na quantidade de células viáveis da cultura planctônica, visualizadas nas contagens de UFC/mL.

Tabela 7. Médias das contagens de células viáveis (em UFC/mL) da cultura planctônica e biofilme de *S. mutans* isolado clínico 2.M7/4, submetidas ao extrato ou frações, nas CIBs, comparados com os respectivos controles.

Extrato ou fração	CIM µg/mL	CIB µg/mL	Médias UFC/mL Planctônico na CIB	Médias UFC/mL Planctônico Controles	Médias UFC/mL Biofilme na CIB	Médias UFC/mL Biofilme Controles
PcS2d	31	3	$1,62 \times 10^6$	$1,66 \times 10^6$	0	$2,34 \times 10^8$
Dr-MSP-10d-P3	62,5	31	4×10^6	$1,61 \times 10^6$	0	$1,85 \times 10^8$
DR(M3)6	62,5	62,5	$1,98 \times 10^6$	$2,13 \times 10^6$	$3,11 \times 10^3$	$2,1 \times 10^6$
Doxiciclina	1	0,62	$1,52 \times 10^6$	2×10^6	0	$2,8 \times 10^8$

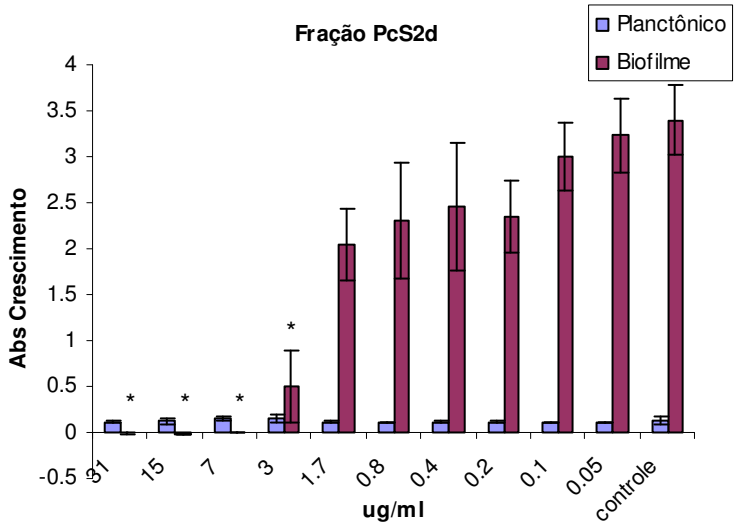


Figura 10. Atividade antimicrobiana da fração purificada PcS2d nas células planctônicas (Abs 550 nm) e biofilme (Abs 575 nm) de *S. mutans* 2.M7/4 (isolado clínico). Os dados foram expressos com médias e desvios padrão com base em quadruplicatas. (* diferença estatisticamente significante com relação ao controle, teste *t* Student, $p < 0,05$).

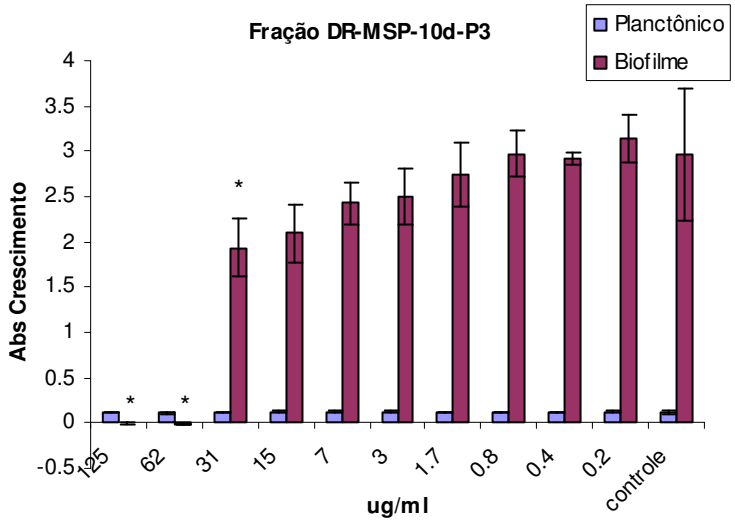


Figura 11. Atividade antimicrobiana da fração purificada Dr-MSP-10d-P3 nas células planctônicas (Abs 550 nm) e biofilme (Abs 575 nm) de *S. mutans* 2.M7/4 (isolado clínico). Os dados foram expressos com médias e desvios padrão com base em quadruplicatas. (* diferença estatisticamente significante com relação ao controle, teste *t* Student, $p < 0,05$).

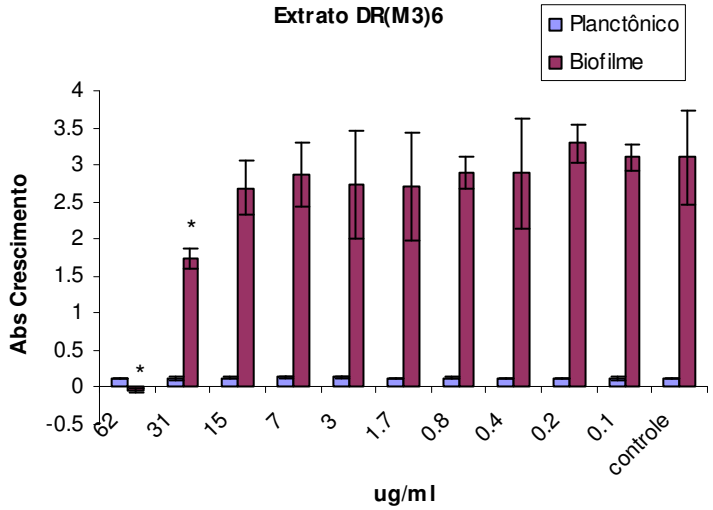


Figura 12. Atividade antimicrobiana do extrato bruto DR(M3)6 nas células planctônicas (Abs 550 nm) e biofilme (Abs 575 nm) de *S. mutans* 2.M7/4 (isolado clínico). Os dados foram expressos com médias e desvios padrão com base em quadruplicatas. (* diferença estatisticamente significante com relação ao controle, teste *t* Student, $p < 0,05$).

5.3. Avaliação da atividade de frações purificadas e/ou de extratos marinhos sobre a expressão de genes de virulência de S. mutans

5.3.1. Extração de DNA e PCR para teste dos *primers*

Os pares de *primers* para os genes de virulência *dh, dnaK, groEL, ATPase, gtfB, gtfC* e *gbpB* de *S. mutans* e *16S* (primer universal) foram sintetizados pela INVITROGEN®,USA. Para a verificação da temperatura de anelamento e qualidade dos mesmos, extraiu-se o DNA da cepa padrão *S. mutans* UA 159 com Kit (Master Pure, Epicentre) e após PCR (reação de polimerase em cadeia) verificou-se a qualidade dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, como pode ser observado na figura 13.

5.3.2. Extração de RNA

O método de extração através do Kit Qiagen padronizado neste estudo demonstrou resultados satisfatórios quanto à qualidade e à integridade dos RNAs totais extraídos. A integridade das amostras de RNA após tratamento com DNAse pode ser visualizada em gel de agarose (figura 14). As amostras de RNA apresentaram contaminantes de DNA em quantidades negligenciáveis. As intensidades das bandas avaliadas nos géis foram comparadas com as medições de absorbâncias (260/280nm) feita em espectrofotômetro, como controle da quantificação de RNA total.

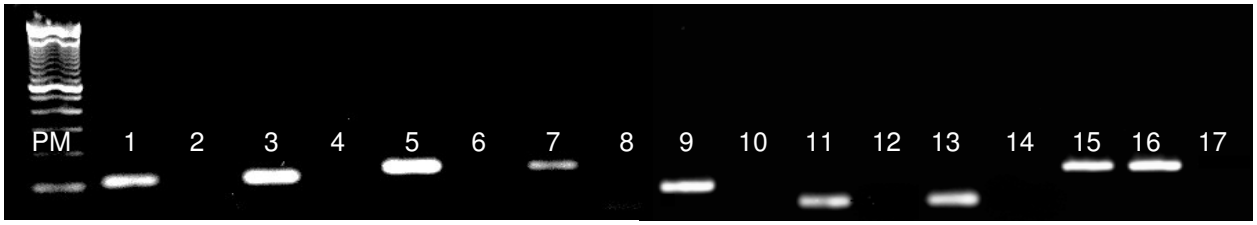


Figura 13. Produtos de PCR obtidos a partir de DNA genômico da cepa UA 159 em gel de agarose para verificação da qualidade dos primers *ldh, dnaK, groEL, ATPase, gtfB, gtfC, gbpB e 16S.* PM = peso molecular; 1 = ldh; 2 = controle negativo ldh; 3 = dnaK; 4 = controle negativo dnaK; 5 = groEL; 6 = controle negativo groEL; 7 = ATPase; 8 = controle negativo ATPase; 9 = gtfB; 10 = controle negativo gtfB; 11 = gtfC; 12 = controle negativo gtfC; 13 = gbpB; 14 = controle negativo gbpB; 15 = 16S; 16 = 16S; 17 = controle negativo 16S.

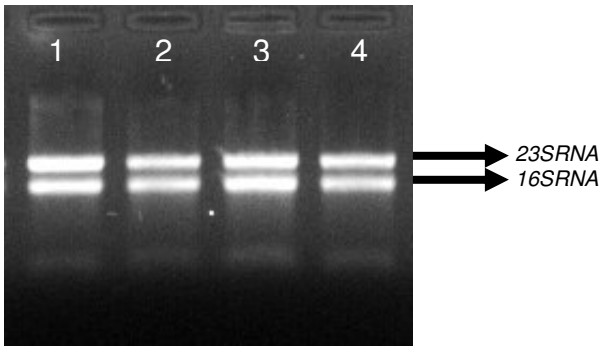


Figura 14. Padrão típico do RNA total extraído separado em gel de agarose a 1,2%. A presença das bandas referentes aos RNAs expressos em maior quantidade indica integridade das amostras. As canaletas de 1 a 4 são de amostras distintas.

5.3.3. Condições de RT-PCR Semi quantitativo

A identificação do ciclo em que as reações de PCR foram adequadas as análises de semi-quantificação foi realizada através de curvas das intensidades de produtos obtidos em cada número de ciclo testado. A linearidade da reação por números de ciclos foi avaliada através de coeficiente de equação de regressão linear (R^2). Valores de R^2 superiores a 0,95 indicam relação linear entre a intensidade das bandas e número de ciclos.

A figura 15 ilustra a curva construída com os valores absolutos de densitometria dos produtos de amplificação do gene *ATPase* em diferentes ciclos, identificando o ciclo 35 como ideal para análise semi-quantitativa deste gene. Todos os genes (exceto o gene *16S*) demonstraram curvas de amplificação semelhantes, permitindo a escolha do total de 35 ciclos para todas as análises semi-quantitativas. O número de ciclos ideal para expressão do gene *16S* foi de 27 ciclos, devido à alta quantidade de RNAm desse gene.

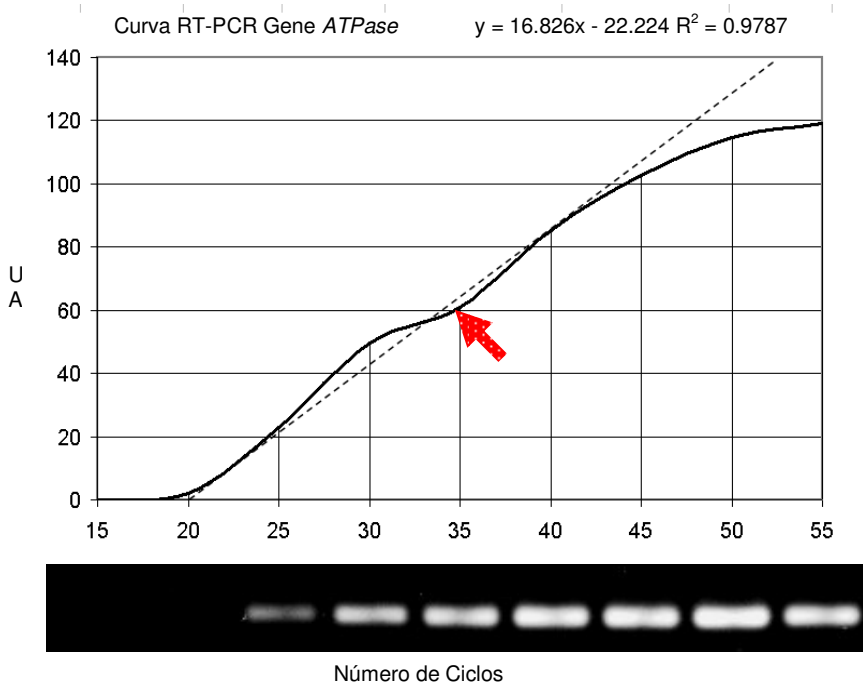


Figura 15. Gráfico representativo dos ensaios para determinação do número de ciclos da RT-PCR para o gene *ATPase*, relacionando valores de densitometria em Unidades Absolutas (U.A.) O número de ciclos é indicado acima das respectivas canaletas.

5.3.4. Ensaios de RT-PCR Semi quantitativo

Os valores de CIM e CBM, bem como os valores de inibição na formação de biofilme (CIB) de *S. mutans,* foram considerados para a escolha da concentração sub-CIM para avaliar a interferência nos níveis de expressão de genes de virulência da espécie cariogênica.

As intensidades das amplificações obtidas pelos ensaios de RT-PCR foram medidas por densitometria com auxílio do programa Kodak 1D V3.6 (Eastman Kodak Co., USA) e expressas como U.R. (unidades relativas), e os dados foram normalizados pelos valores de U.R. do gene *16SRNA*. Não foi possível observar diferenças significantes na expressão do gene *16SRNA*, utilizado para normalizar os dados obtidos.

Os resultados dos tratamentos com as frações purificadas PcS2d na concentração de 7 µg/mL e DR-MSP-10d-P3 à 31 µg/mL, com o extrato bruto DR(M3)6 à 31 µg/mL e com o antibiótico doxiciclina na concentração de 0,62

µg/mL, obtidos em T1 (1 minuto) e T30 (30 minutos), comparados ao controle DMSO 1% (veículo diluente de todas as substâncias) podem ser visualizados a seguir.

Nas figuras 16 e 17, encontram-se os valores das expressões gênicas relativas, obtidos dos tratamentos sob *Streptococcus mutans* UA159 comparados com DMSO (1%), com médias e desvios padrões baseados em triplicatas de dois experimentos independentes, analisados pelo teste ANOVA. Sendo T1, analisado sem diferenças estatísticas para ambas as cepas de *S. mutans* analisadas, e T30 com diferenças significativas ($p < 0,05$).

Como pode ser observado, nos tratamentos após 30 minutos, as variações significativas nos níveis de expressão dos genes de virulência de *S. mutans* UA159, principalmente para *gbpB* e ATPase para todos os antimicrobianos testados, com relação ao controle.

Os níves de expressão dos genes envolvidos no biofilme *gtfs* B e C, *ldh* (envolvido na produção de ácido) e *dna*K tiveram a redução de cerca de ~45% com relação ao controle para todos os antimicrobianos testados. Enquanto que *gbpB* e *ATPase* obtiveram maior redução, em torno de 80% nos níveis de expressão gênica.

As mesmas análises realizadas com a cepa de *Streptococcus mutans* isolado clínico 2.M7/4 podem ser visualizadas nas figuras 18 e 19.

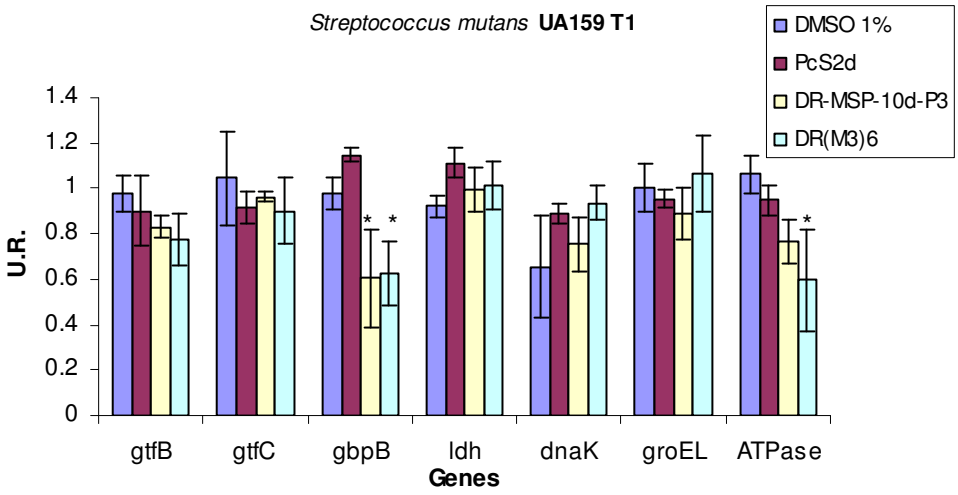


Figura 16. Ensaio da expressão de genes de virulência de *S. mutans gtfB, gtfC, gbpB*, *ldh, dnaK, groEL, ATPase,* da cepa UA159 após tratamento de 1 minuto com extrato ou frações escolhidas, normalizados pelos valores de densitometria do gene *16S* e comparados aos valores obtidos com DMSO 1% (controle).

.

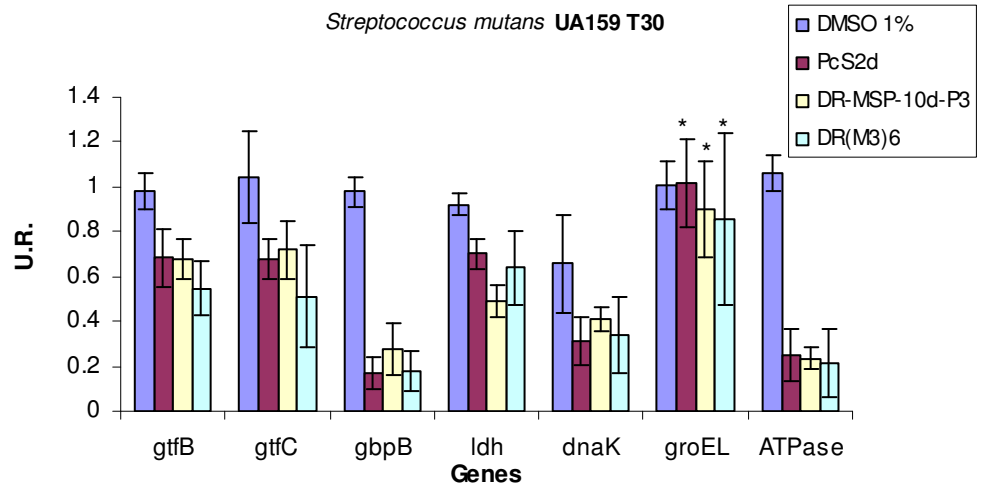


Figura 17. Ensaio da expressão de genes de virulência de *S. mutans gtfB, gtfC, gbpB*, *ldh, dnaK, groEL, ATPase,* da cepa UA159 após tratamento de 30 minutos com extrato ou frações escolhidas, normalizados pelos valores de densitometria do gene *16S* e comparados aos valores obtidos com DMSO 1% (controle). (* p > 0,05, ANOVA)

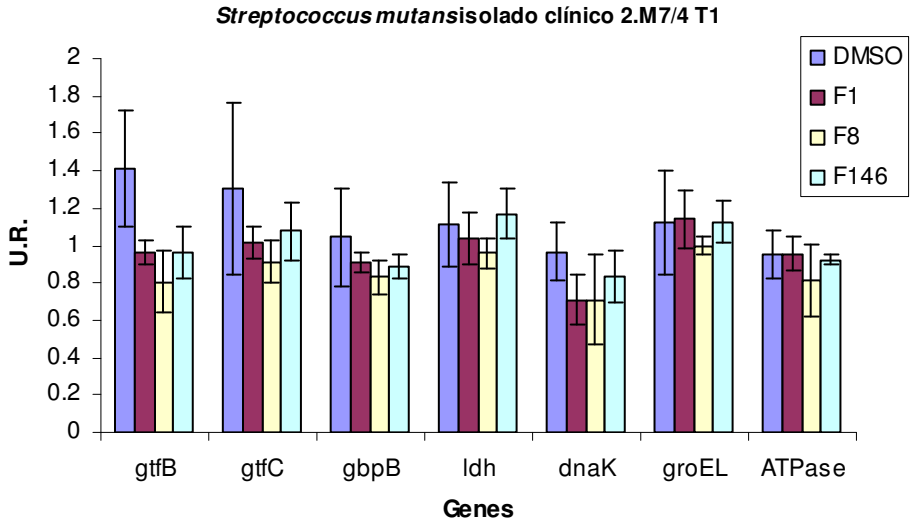


Figura 18. Ensaio da expressão de genes de virulência de *S. mutans gtfB, gtfC, gbpB*, *ldh, dnaK, groEL, ATPase,* da cepa isolado clínico 2.M7/4 após tratamento de 1 minuto com extrato ou frações escolhidas, normalizados pelos valores de densitometria do gene *16S* e comparados aos valores obtidos com DMSO 1% (controle).

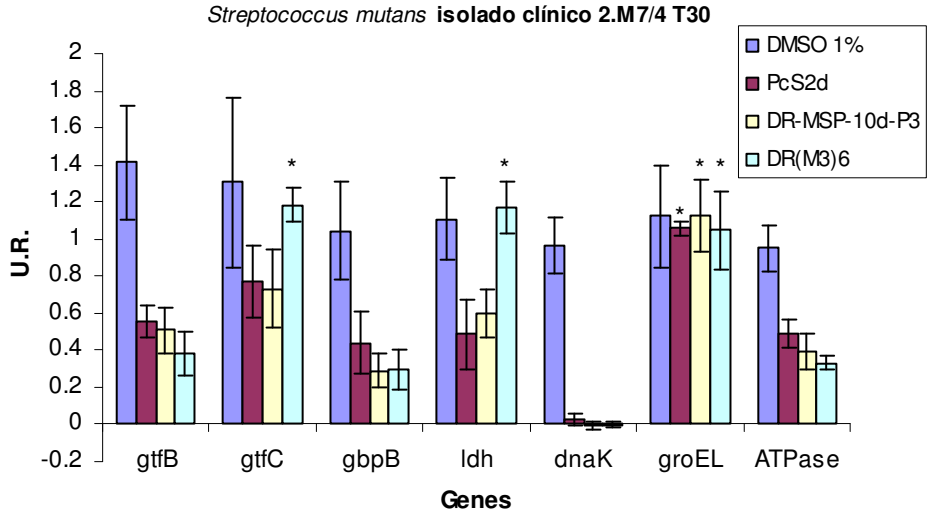


Figura 19. Ensaio da expressão de genes de virulência de *S. mutans gtfB, gtfC, gbpB*, *ldh, dnaK, groEL, ATPase,* da cepa isolado clínico 2.M7/4 após tratamento de 30 minutos com extrato ou frações escolhidas, normalizados pelos valores de densitometria do gene *16S* e comparados aos valores obtidos com DMSO 1% (controle). (* $p > 0,05$, ANOVA)

As maiores reduções nas expressões dos genes de virulência foram encontradas nos resultados para a cepa de *S. mutans* isolado clínico. Os genes *gtfB* e *gbpB* tiveram a redução de aproximadamente 70% em seus níveis de expressão para todos os antimicrobianos testados. Entretanto, somente perante as frações purificadas, *gtf*C obteve redução de 45% e *ldh* de 55%.

Frente aos 3 antimicrobianos, a expressão do gene *ATPase* obteve redução de cerca de 55%, e por fim, a inibição de 100% da expressão gênica de *dna*K. Em ambos as cepas, o gene g*roEL* relacionado ao estresse ácido da espécie cariogênica se manteve sem diferenças significativas com relação ao controle.

Afim de comparar os efeitos dos mesmos tratamentos com o antibiótico doxiciclina, utilizado para padronização de todas as metodologias, realizou-se a análise do padrão de expressão dos genes de virulência de *S. mutans* após 30 minutos de tratamento com o antibiótico. Os resultados podem ser avaliados nas figuras 20 para a cepa de *S. mutans* UA159 e 21 para a cepa de isolado clínico.

Ambos os gráficos dos tratamentos com doxiciclina foram baseados em resultados de médias e desvios padrões de triplicatas de três experimentos independentes, analisados pelo teste ANOVA, com diferenças significativas ($p < 0,05$).

As reduções na expressão gênica de *gtf*s B e C e *gbpB* para ambas as espécies tratadas com doxiciclina foram de ~55%, enquanto que *ldh* reduziu em média 40% e *ATPase* cerca de 70%. Na cepa UA159 os níveis de expressão de *dnaK* e *groEL* se mantiveram estáveis com relação ao controle, contudo, no isolado clínico observou-se a redução de 35% na expressão de *dnaK* e 20% na expressão de *groEL*.

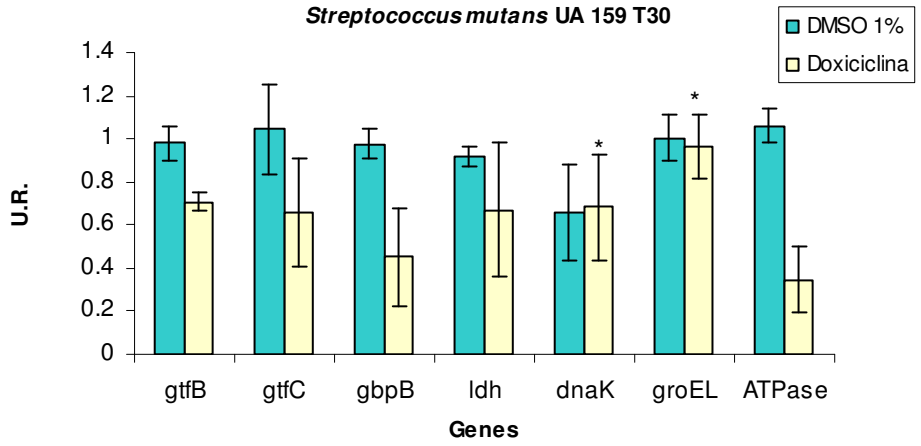


Figura 20. Ensaio da expressão de genes de virulência de *S. mutans gtfB, gtfC, gbpB*, *ldh, dnaK, groEL, ATPase,*da cepa UA159 após tratamento de 30 minutos com antibiótico doxiciclina, normalizados pelos valores de densitometria do gene *16S* e comparados aos valores obtidos com DMSO 1% (controle) (* p > 0,05, ANOVA)

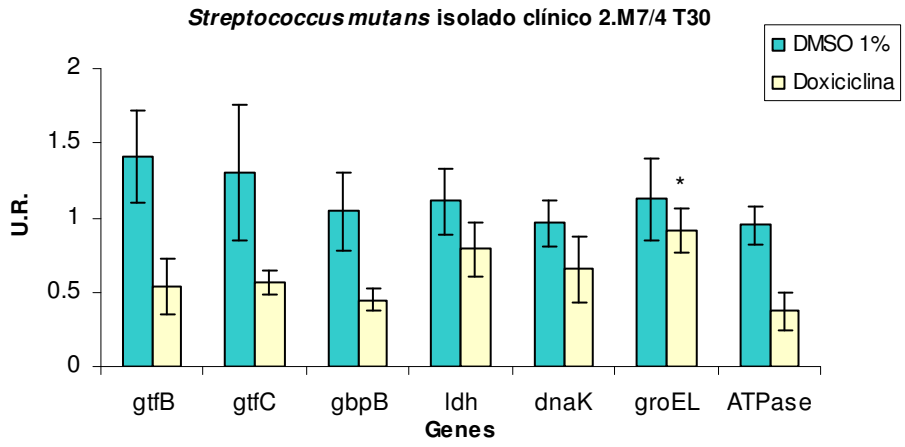


Figura 21. Ensaio da expressão de genes de virulência de *S. mutans gtfB, gtfC, gbpB*, *ldh, dnaK, groEL, ATPase,*da cepa isolado clínico 2.M7/4 após tratamento de 30 minutos com antibiótico doxiciclina, normalizados pelos valores de densitometria do gene *16S* e comparados aos valores obtidos com DMSO 1% (controle) (* p > 0,05, ANOVA)

6. DISCUSSÃO

6.1. Rastreamento de extratos e frações com atividade antimicrobiana

6.1.1. Perfil de sensibilidade das cepas padrões de interesse médico/odontológico aos antibióticos usuais

Foram traçados os perfis de sensibilidade de cepas padrões através do método Kirk-Bauer.

Assim sendo, nos testes de antibiograma, os estreptococos orais (*S. sobrinus* ATCC 27607, *S. mutans* UA 159) escolhidos para o presente estudo apresentaram resistência à estreptomicina em dose de 10 μg/mL. *S. sanguinis* ATCC 15300 (utilizado nos testes de CIM e CBM deste estudo) foi sensível somente ao imipinem, apresentando resistência total ou intermediária aos outros antibióticos testados. Muitas destas cepas, resistentes aos antibióticos usuais, foram inibidas por extratos brutos ou frações purificadas em outros estudos de nosso grupo de trabalho, o que enfatiza a importância da identificação destes antimicrobianos com possível aplicabilidade biotecnológica. As cepas de importância odontológica tais como: *Streptococcus mutans, S. sobrinus,* apresentaram sensibilidade a maioria dos antibióticos testados.

Segundo o CLSI, o espectro de atividade da penicilina (CIMs de 0.016μg/mL à 0.031μg/mL sobre *Streptococcus mutans*, Jarvinen, *et al.,* 1993) inclui, principalmente, bactérias Gram negativas, Gram positivas e algumas fastidiosas que não produzem β-lactamase. As aminopenicilinas (amoxicilina) são ativas contra espécies Gram negativas adicionais, incluindo alguns membros das *Enterobacteriaceae*. Na literatura encontra-se valores se CIM de 0.031 μg/mL à 0.063μg/mL para *Streptococcus mutans* (Jarvinen, *et al.,* 1993).

A estrutura dos carbapenems (imipinem) difere ligeiramente da estrutura das penicilinas, sendo que os primeiros são muito mais resistente à hidrólise por β-lactamase, o que lhes dá um amplo espectro de atividade contra muitas

bactérias Gram positivas e Gram negativas. A vancomicina é um agente antimicrobiano aceito para tratamento de infecções causadas por bactérias Gram positivas em pacientes alérgicos a penicilina, sendo úteis no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram positivas resistentes aos β-lactâmicos, por *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA) e por alguns enterococos.

Já os macrolídeos (eritromicina e azitromicina) são agentes antimicrobianos de amplo espectro contra isolados de bactérias Gram negativas, Gram positivas ou fastidiosas. As drogas neste grupo estão estreitamente relacionadas e, com poucas exceções, só é necessário testar uma das duas, rotineiramente a eritromicina (CLSI). Em trabalhos com *Streptococcus mutans* de Jarvinen, *et al.,* 1993, a eritromicina apresentou CIMs de 0.063µg/mL à 0.25µg/mL.

Em adição, os aminoglicosídeos (repres entados pela estreptomicina) são usados, principalmente, para tratamento de infecções por bastonestes Gram negativos aeróbios ou em combinações sinérgicas com agentes antimicrobianos ativos na parede celular (por exemplo, a penicilina, ampicilina e vancomicina) contra algumas bactérias Gram positivas resistentes, como os enterococos.

As tetraciclinas inibem a síntese protéica, em nível ribossômico, de certas bactérias Gram positivas e Gram negativas, apresentando amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo seus valores CIM encontrados de 0.063µg/mL à 1µg/mL sobre *Streptococcus mutans* (Jarvinen, *et al.,* 1993), condizentes com os valores de CIM do presente trabalho (com doxiciclina). Segundo CLSI, as drogas neste grupo estão estreitamente relacionadas e, com poucas exceções, só é necessário testar a tetraciclina de forma rotineira. Os microrganismos sensíveis à tetraciclina também são considerados sensíveis a doxiciclina e minociclina, entretanto, alguns organismos de sensibilidade intermediária ou resistentes à tetraciclina podem ser sensíveis a doxiciclina ou minociclina, ou a ambas.

Embora a indústria farmacêutica tenha desenvolvido um grande número de novos antibióticos nas três últimas décadas, a resistência a essas drogas pelos microrganismos aumentou. Em geral, as bactérias têm habilidade genética para transmitir e adquirir resistência às drogas, as quais são utilizadas como agentes

terapêuticos. Devido ao número de pacientes hospitalizados, que estão com seu sistema imunológico suprimido, e às novas espécies bacterianas multi-resistentes, novas infecções podem ocorrer nos hospitais, resultando num alto índice de mortalidade (Cohen, 1992). O aumento prevalente e microrganismos multi-resistentes, assim como o aparecimento de efeitos indesejáveis de algumas drogas, faz com que a busca por novos agentes antimicrobianos seja uma importante estratégia para o estabelecimento de terapias alternativas para infecções de difícil tratamento (Phongpaichit *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2006).

O extrato e frações purificadas, testadas no presente estudo, também apresentaram atividade inibitória sobre espécies de interesse médico, resistentes aos antibióticos usuais, em CIM e CBM próximas a 125 µg/mL e 500 µg/mL, respectivamente (resultados não mostrados). Neste contexto, além de serem candidatos a anticariogênicos, também podem representar potencial aplicabilidade como novos fármacos para o tratamento de infecções causadas por microrganismos multi-resistentes.

6.1.2. Caracterização dos extratos ou frações purificadas

6.1.2.1. Determinação de CIM (Concentração Inibitória Mínima)

Poucos extratos/frações (cerca de 10% de 786 extratos/frações testados) apresentaram atividade antimicrobiana, todavia, por se caracterizar como um rastreamento de substâncias potencialmente ativas, os resultados obtidos estão de acordo com o esperado.

Dos extratos/frações que apresentaram atividade antimicrobiana, incluiu-se na definição de CIM a menor concentração do antimicrobiano que inibiu 50% a 100% do crescimento microbiano após análise de densidade óptica.

Como pôde ser visualizado na figura 3, grande parte de extratos/frações analisados apresentaram atividade antimicrobiana inibindo cerca de 50% a 85% do crescimento dos microrganismos. Atribui-se esse resultado devido ao fato de

estarmos trabalhando com grande quantidade de extratos brutos, em que a substância potencialmente antimicrobiana poderia estar em concentrações menores do que a realmente testada, que foi de 500 µg/mL a 15µg/mL (diluição serial 2).

A cepa *S. mutans* UA 159 foi o microrganismo em que se observou inibição de 100% em grande parte de extratos/frações ativos, esse resultado é favorável a possíveis aplicações na área odontológica como anticariogênicos.

As concentrações inibitórias (CIMs) são bem menores do que as normalmente encontradas na literatura em miligramas/mL como nos estudos de Song *et al.*, 2006, Smullen *et al.*, 2007, Xiao *et al.*, 2007, que utilizaram extratos da planta japonesa *Polygonum cuspidatum*; extratos de plantas contando polifenóis e de favos de mel (*Nidus Vespae*) respectivamente.

Destacamos a atividade da fração purificada denominada DR-MSP-10d-P3 isolado da ascídia *Didemnum* sp., que apresentou atividade sobre todos os microrganismos com CIM abaixo de 125 µg/mL, principalmente sobre *S. mutans* com CIM de 62,5 µg/mL. Esta se refere ao composto puro já identificado pelo grupo de estudo do Prof. Roberto Gomes de Souza Berlinck como mistura de dicetopiperazinas modificadas representado na figura 4.

Podemos destacar também a atividade antimicrobiana dos extratos brutos de fungos isolados da esponja *Geodia corticostyllifera* como o extrato GC(F)10 com CIM de 7, 81 µg/mL contra *S. mutans* UA159 e GC(T)3 com CIM de 125 µg/mL.

Outro composto puro com excelente atividade antimicrobiana (CIM de 15 µg/mL contra *S. mutans*) denominado PcS2d foi identificado como trissulfato de halistanol isolado da esponja *Petromica ciocalyptoides* e pode ser visualizado na figura 5. Devido a CIM ser baixa e pela alta especificidade da atividade antimicrobiana, esta fração purificada foi escolhida para avaliação da sua ação sobre os fatores de virulência de *S. mutans.*

Os extratos DR(F)6, DR(M2)4, DR(M3)2 e DR(A)7 com principal atividade contra *S. mutans*, são de fungos isolados da esponja *Dragmacidon reticulata*.

Ainda, isolado da mesma esponja, o extrato DR(M3)6 apresentou CIM de 62,5 µg/mL para todos os microrganismos testados. Por se apresentar como um extrato com excelente atividade antimicrobiana avaliou se também a sua influência nos principais fatores de virulência de *S. mutans*.

O uso do antibiótico Doxiciclina no presente trabalho se deu pelo fato da necessidade de validar os valores de atividade antimicrobiana frente a um antibiótico comercial. Para tanto, a Doxiciclina, derivada de tetraciclinas caracterizam-se por terem amplo espectro de ação contra uma gama de microrganismos Gram positivos e Gram negativos, aqui demonstrado contra os estreptococos orais estudados, com baixos valores de CIM e CIB (próximo a 1 µg/mL) e interferência nos genes de virulência de *S. mutans*, como esperado.

Na odontologia, a doxiciclina não é utilizada como anticariogênicos, porém é descrita como alternativa terapêutica nos casos de alergia a penicilina, nos tratamentos de periodontites e infecções mistas da cavidade oral (Liñares & Martín-Herrero, 2003), dentre outras infecções sistêmicas. Ainda, é importante enfatizar, que o uso indiscriminado desse antibiótico pode selecionar cepas resistentes, dificultando um futuro tratamento.

6.1.2.2. Determinação de CBM (Concentração Bactericida Mínima)

Os resultados encontrados para este experimento (tabela 5) são condizentes ou menores do que os trabalhos da literatura, que também utilizam substâncias naturais potencialmente antimicrobianas, que demonstram valores de CBM entre 800 µg/mL a 1600 µg/mL com extratos de própolis (Duarte *et al.*, 2003) e alho (Bakri & Douglas, 2005), 4.000 µg/mL para os extratos de *Polygonum cuspidatum* (Song *et al.*, 2006) chegando a valores de 64.000 µg/mL para os extratos de plantas com polifenóis (Smullen *et al.*, 2007) contra microrganismos patogênicos orais, incluindo espécies de *S. mutans*. Ainda, considerando-se que no extrato bruto a substância potencialmente ativa poderia estar em concentrações menores do que a realmente testada, será fundamental o

fracionamento deste para encontrar compostos puros e ativos em menores concentrações.

No geral todos os extratos brutos testados foram bacteriostáticos nas concentrações analisadas, entretanto, destaca-se o valor de CBM próximo a 62,5 µg/mL para o extrato bruto DR(M3)6 (de fungo procedente da esponja *Dragmacidon reticulata*) contra *S. mutans*. A fração Dr-MSP-10d-P3 também apresentou CBM próximo a 62,5 µg/mL para o mesmo microrganismo e a fração PcS2d obteve CBM de aproximadamente 31 µg/mL também sobre *S. mutans*.

Já está bem estabelecido que *S. mutans* é o maior agente etiológico associado com a doença cárie dental, uma das maiores doenças com índices mundiais. Fatores associados com cariogenicidade incluem: adesão, acidogenicidade e tolerância ácida, levando a formação do biofilme dental. O controle da formação de biofilme pode vir a ser uma das maiores fontes de prevenção da cárie dental (Xiao *et al*., 2007).

O uso de produtos naturais vem obtendo grande sucesso com descoberta de novas alternativas terapêuticas. Já é bem conhecido que as novas drogas descobertas nas últimas décadas têm origem natural (Newman & Cragg, 2007). De 1983 à 1994, 78% dos novos antibióticos e 61% de novas drogas anti-tumoral aprovados pela American Food and Drug Administration, eram provenientes de produtos naturais ou derivados de produtos naturais. De acordo com Harvey (2000) o acesso à biodiversidade é fundamental para expandir a gama de produtos naturais para o uso na pesquisa de novas drogas.

Muitos estudos têm por objetivo a identificação de componentes de produtos naturais contra os estreptococos, especialmente os *S. mutans* (Tichy & Novak, 1998; Badria & Zidan, 2004; Yatsuda *et al.*, 2005, Duarte *et al.*, 2006).

Neste contexto, o extrato bruto DR(M3)6, e as frações purificadas PcS2d e DR-MSP-10d-P3, como produtos naturais relativamente não explorados, podem vir a ser valiosas fontes na pesquisa por novos compostos bioativos, devido a alta quimiodiversidade.

Ainda, de acordo com Rios *et al.*, 1998, produtos naturais que apresentarem concentrações abaixo de 100 µg/mL podem ter grande potencial antimicrobiano, desde que os componentes ativos possam ser isolados e usados em baixas concentrações.

6.2. Avaliação da atividade de frações purificadas e/ou de extratos marinhos sobre características fenotípicas de virulência de *S. mutans*

6.2.1. Detecção da atividade inibitória sobre células planctônicas e sobre a formação de biofilme *"in vitro"*

Como já bem definido na literatura, biofilmes são muito mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que células planctônicas (Alviano *et al.*, 2005), ainda, no ambiente oral os tratamentos fracassados com antimicrobianos, ocorrem por especialmente a atividade biocida ser sobre as bactérias das camadas internas, sem que a comunidade nas camadas externas sejam atingidas (Dunne, 2002).

Em adição, o uso repetido de agentes antimicrobianos no biofilme pode selecionar microrganismos resistentes (Alviano *et al.*, 2005). Neste contexto, novos agentes que possam inibir o crescimento de microrganismos associados a biofilmes são extremamente necessários e poderá aumentar o número de terapias efetivas alternativas.

Existem atualmente, sistemas diversos que servem de modelos utilizados nos estudos de adesão dos estreptococos. O nosso estudo utilizou um modelo que visava à avaliação da atividade antimicrobiana das frações e do extrato sobre as células planctônicas, contundo, procurando utilizar uma concentração sub-CIM, sem que ocorresse a inibição da cultura planctônica (CIB), avaliando principalmente se essas concentrações eram capazes de atuar sobre essas células impedindo a sua aderência para formação de biofilme microbiano.

Estudos de formação de biofilme de *S. mutans* com produtos naturais, vêm sendo realizado por diversos pesquisadores: Alviano *et al.*, 2005; Song *et al.*,

2006; Wei *et al*., 2006; Beckloff *et al*., 2007; Song *et al*., 2007; Xiao *et al*., 2007; Almeida *et al*., 2008; procurando por mecanismos capazes de inibir este fator de virulência.

No presente estudo, demonstramos que ambas as cepas de *S. mutans* foram sensíveis à atuação dos antimicrobianos, mostramos que as substâncias testadas afetam as suspensões bacterianas em culturas planctônicas impedindo a formação de biofilmes. Ademais, diminuíram significativamente a formação de biofilmes nas concentrações sub-CIM (UFC/mL). Portanto, demonstraram serem promessas como agentes efetivos para o controle do biofilme. Resultados falsos positivos devido à atividade bacteriolítica e bacteriostática das substâncias testadas foram eliminados devido ao uso de concentrações abaixo das encontradas para CIM (Song *et al*., 2007).

Somente nos estudos com o extrato bruto DR(M3)6, nos poços com aparente inibição do biofilme, ao adicionar-se salina e passar pelo ultrassom, foi possível comprovar por contagens de UFC/mL a presença de células viáveis aderidas ao biofilme. Esses resultados são atribuídos ao fato de que o extrato bruto não estar purificado em agentes antimicrobianos, constando de um *pool* de substâncias, em que provavelmente o composto bioativo esteja em menor quantidade do que o realmente testado. Mesmo assim, as concentrações (CIM e CBM) encontradas para este extrato estão dentro da normalidade de possível fonte para uso na pesquisa antimicrobiana encontrados na literatura.

Em resumo, o extrato e frações poderiam ter agido como bacteriostáticos em células planctônicas, demonstrados em UFC/mL (tabelas 6 e 7), impedindo que estas se aderissem aos poços, e pela densidade óptica do biofilme, a maior intensidade observada no controle pode ser atribuída às células mortas ou inviáveis (que não apareceram na contagem). Provavelmente no controle, como o metabolismo celular estava mais acelerado (este sem a presença do antimicrobiano), as células podem ter morrido mais cedo do que as células tratadas. Em adição, conforme resultados apresentados (tabelas 6 e 7) sugere-se que as frações purificadas foram bactericidas sobre células do biofilme, nas CIB.

De acordo com Song e colaboradores (2007), quando antimicrobianos são administrados topicamente pela boca ou por dentifrícios, os agentes na cavidade oral podem inicialmente estar presentes relativamente em altas concentrações (≥ CIM), mas a concentração destes agentes será posteriormente rebaixada devido à expectoração e deglutição (Marsh, 1992). A concentração resultante pode ser inferior a CIM.

Assim sendo, pode-se concluir que as frações purificadas aqui estudadas, que apresentaram efeitos inibitórios sobre a viabilidade bacteriana em maiores concentrações (≥ CIM) e sobre a formação de biofilmes nas concentrações mais baixas (<CIM), são potencialmente úteis para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos para o controle do biofilme (Song *et al.*, 2007), principalmente pela atividade apresentada comparando-se ao antibiótico Doxiciclina, de uso comercial. É importante mencionar que o mecanismo exato para o efeito inibitório dessas frações e extrato na formação do biofilme ainda é desconhecida.

Contudo, uma vez que *Streptococcus mutans* não ocorrem em monocultura em vivo, mas sim em um consórcio microbiano composto de diversas espécies de bactérias, atualmente citado como mais de 100 espécies, os efeitos das substâncias testadas sobre o biofilme têm a necessidade de serem avaliados em modelos de biofilmes multi-espécies ou em modelo de biofilme *in vivo.*

6.3. Avaliação da atividade de frações purificadas e/ou de extratos marinhos sobre a expressão de genes de virulência de *S. mutans*

O gene 16SRNA foi selecionado como gene de referência para o presente estudo, este gene é essencial para a sobrevivência bacteriana, pois faz parte do complexo ribossômico que irá realizar a tradução protéica. Em procariotos, a concentração de RNAs ribossômicos é fator limitante na síntese ribossomal, e a concentração de ribossomos são proporcionais a síntese total de proteínas e então ao metabolismo celular (Lamond & Travers, 1985). Assim, enquanto houver

metabolismo celular, o gene *16SRNA* é constitutivamente expresso. Em recente estudo, realizado por Stipp *et al.*, 2008, o gene 16SRNA também apresentou menor variação da expressão em diferentes cepas e diferentes condições de crescimento, sendo um excelente gene para ser empregado como de referência para normalizações de expressão em bactérias, em especial, *S. mutans.*

Para as concentrações testadas nos experimentos RT-PCR semi-quantitativo, pudemos observar diferenças estatisticamente significativas após tratamentos de 30 minutos com o extrato e frações purificadas. Este período de tratamento de 30 minutos foi empregado com base em estudos anteriores de (Koo *et al.*, 2006). Segundo os autores, este período é suficiente para analisar possíveis alterações de antimicrobianos na expressão gênica e/ou no metabolismo celular de *S. mutans,* ao qual apresenta tempo de geração curto. A exposição de bactérias, em crescimento *in vitro*, aos antimicrobianos por longos períodos de tempo resultaria em possível degradação e perda de atividade do antimicrobiano, acúmulo de metabólitos secundários das próprias bactérias e aumento da densidade celular, fatores que conseqüentemente afetariam na análise da expressão gênica. Em adição, resultados satisfatórios foram obtidos com a Doxiciclina, utilizada como parâmetro, neste estudo, validando nossos resultados obtidos.

A expressão do gene *gtfB* obteve reduções diferentes para as cepas, na UA159 reduziu 45% e no isolado clínico 70%, enquanto que *gtfC* reduziu aproximadamente 45% para ambas as cepas, valores semelhantes ao encontrado no trabalho de Koo e colaboradores (2006), em estudos com o produto natural apigenina.

É notável e descrito na literatura, que o perfil de inibição da expressão de genes *gtf* é coerente com a sua disposição no cromossomo de *S. mutans*: tanto *gtfB* e *gtfC* podem ser co-transcritos e submetidas aos mesmos mecanismos de regulação (operon), lembrando que *gtfD* não está ligada ao loci *gtfBC* (Koo *et al.*, 2006). Entretanto a notável diferença nos níveis transcricionais de *gtfB* e *gtfC* (figuras 17, 19, 20 e 21) foi detectado. Alternativamente, é possível que as

divergências sejam resultado de diferenças na estabilidade do RNA. De acordo com Stipp e colaboradores (2008) dada a elevada homologia desses genes, é mais provável que as variações nos seus níveis de transcritos são resultado de diferenças nas atividades gênicas e não na estabilidade das transcrições. Regulações independentes de *gtfB* e *gtfC* foi sugerida em alguns estudos (Goodman & Gao, 2000; Fujiwara *et al.*, 2002), mas existem dados conflitantes, descritos por Yoshida & Kuramitsu, 2002, que podem resultar, em parte, das diferenças entre cepas. Padrões independentes de *gtfB* e *gtfC* observadas em algumas cepas também poderiam ter implicações para a nossa compreensão dos mecanismos de regulação transcricional (Sttip *et al.*, 2008).

A capacidade de *S. mutans* aderir à superfície do dente ocorre por vários mecanismos, incluindo a alta afinidade de adesinas e sítios de afinidade de glucanos. A síntese de glucanos por enzimas GTF é fundamental tanto para a adesão dos organismos a superfície do dente, quanto para a sua acumulação e persistência.

Os mecanismos envolvidos na regulação dos genes que codificam enzimas GTF parecem ser complexos e continuam a ser plenamente explorado. Existem vários fatores que podem influenciar transcrição e tradução dos genes *gtf*, tais como a disponibilidade e a fonte de carboidratos, pH ambiental, e taxa / fase de crescimento. Por exemplo, a redução do pH após adição de hidratos de carbono, leva a um aumento da disponibilidade de carboidratos metabolizáveis detectados através do sistema fosfotransferase (PTS), ou a produção de intermediários da via glicolítica pode regular a expressão desses genes. O genes *gtfBC* podem ser induzidos em resposta à acidificação dos biofilmes ou em resposta à presença de um excesso de uma metabolizável de carboidratos (glicose ou sacarose) (Shemesh *et al.,* 2007).

É evidente que a influência dos antimicrobianos na expressão gênica de *gtf*, nos parâmetros desse estudo de exposição ao mesmo em tempo reduzido, não é resultado de um efeito indireto sobre a fisiologia de *S. mutans*, como a taxa de crescimento e da produção de ácido ou pH ambiental e disponibilidade de

carboidratos, contudo, a inibição ou redução nos níveis de transcrição dessas enzimas, podem resultar na inibição de polissacarídeos extracelulares e conseqüentemente do biofilme.

Outro gene estudado, *gbpB*, demonstrou redução de 70% a 80% em sua expressão gênica. GbpB vem sendo descrito como um importante fator de virulência de *S. mutans*, entretanto, os mecanismos que regulam sua expressão não são conhecidos. Ainda, aparece com funções essenciais para a viabilidade da espécie (Mattos-Granner *et al.*, 2006).

Esta proteína também tem sido descrita como uma proteína de resposta ao estresse (Chia *et al*., 2001), mas a indução da expressão de *gbpB* por condições de estresse parece ser também um fenômeno variável dependendo da cepa estudada (Mattos-Granner *et al*., 2006).

Trabalhos com *pcsB* (homólogo de *gbpB*) de *Streptococcus pneumoniae* demonstraram que redução na expressão desse gene afeta consideravelmente a célula, tornando-a mais sensível a diversos antibióticos (Reinscheid *et al.,* 2001).

As diferenças nos padrões transcrição de *gtfBC* e *gbpB* observadas dentre as amostras analisadas, pode ser o resultado da ausência e / ou diferentes padrões de expressão de reguladores transcricionais destes genes de virulência de biofilme em formação, ainda não esclarecidos.

Os níveis de expressão gênica de *ldh* se mantiveram semelhantes em ambas as cepas da espécie cariogênica (redução de ~50%). Este gene se refere à enzima lactato desidrogenase, já descrita como essencial para a espécie, participando da via glicolítica, mas encontrada em quase todos os animais e plantas caracterizados por sua função essencial em moléculas da cadeia respiratória.

São nulos os trabalhos que relacionam os níveis da expressão gênica dessa enzima com antimicrobianos (produtos naturais). Em trabalhos que avaliam os níveis dessa enzima em *Streptococcus bovis*, após aumento de pH (neutralidade), demonstraram que na expressão pós estresses, os níveis diminuem consideravelmente quando comparados a outras enzimas de

funcionalidade semelhante. Relacionando a influência da resposta ao estresse do pH como parte de regulação de sua síntese e níveis transcricionais respectivamente (Asanuma *et al.*, 1997 e 1999).

O aumento ou diminuição da expressão de *ldh* vem sendo bastante relacionada com a taxa de crescimento e aumento de disponibilidade de glicose no meio. Todavia, o problema de saber se a transcrição é regulada pela taxa de crescimento ou a abundância de glicose para fermentação continua não esclarecida (Asanuma *et al.*, 1997). Alguns estudos, a exemplo de Mattos-Granner *et al.*, 2006, utilizaram *ldh* como gene de referência para normalização dos dados de RT-PCR sem quantitativo, sendo este considerado um gene constitutivamente expresso. Entretanto, já foi descrito que os níveis de expressão obtidos variavam cerca de 25% entre as replicatas (Stipp *et al.*, 2008).

Outra característica de virulência marcante de *S. mutans* é a aciduricidade (resistência a baixos pHs) que está associada ao aumento da atividade de enzimas F-ATPases de membrana, capazes de manter o pH citoplasmático estável (Smith *et al.,* 1996). Quando culturas de *S. mutans* tornam-se acidificadas, esses organismos aumentam os níveis de produção e atividade destas enzimas, a fim de remover prótons do seu citoplasma e proteger enzimas glicolíticas e ácido-sensíveis presentes na célula (Kuhnert *et al.,* 2004).

Em nossos estudos de atividade antimicrobiana, o gene *ATPase* demonstrou significativa redução nos níveis transcricionais, de 80% para a cepa UA159 e de 55% para a cepa de isolado clínico. Muitos trabalhos descrevem que o aumento da expressão gênica, está bem definido com relação à regulação do operon desse gene, em resposta à gradientes de pH (Kuhnert, *et al.*, 2004, Hasona *et al.*, 2007).

Streptococcus mutans evoluíram com várias adaptações fisiológicas e genéticas para aperfeiçoar seu crescimento sob condições dinâmicas, incluindo a capacidade para metabolizar uma grande variedade de hidratos de carbono e de se adaptar a uma ampla gama de tensões, especialmente em baixos pHs. As

respostas rápidas e eficientes em nível de estímulos ambientais são consideradas críticos para a persistência e virulência deste organismo.

Para tanto, os esforços têm sido centrados na pesquisa molecular do controle das respostas ao baixo pH, entre outros estresses, como fluxo de nutrientes. Através desses estudos, surgiu a expressão da classe I de proteínas de choque térmico de *S. mutans*, que são altamente responsivas, intermitentes e persistente a exposição a tensões ambientais relevantes (Lemos *et al.,* 2001).

As proteínas de estresse distribuídos na classe I, GroEL e DnaK, envolvidas no presente estudo, são chaperonas moleculares, centrais para a tolerância a pressões ambientais e participam em uma variedade de processos celulares, incluindo dobramentos de proteínas, translocação protéica, e montagem e desmontagem de complexos protéicos (Lemos *et al.,* 2001).

Assim sendo, o uso de antimicrobianos capazes de reduzir os níveis dessas proteínas, parece uma alternativa como recurso na prevenção da doença cárie. Os níveis do gene groEL, aqui estudados, não tiveram diferença significante (figuras 17 à 22), com $p > 0,05$ para todas as amostras testadas. Entretanto, os níveis de expressão gênica de *dnaK* merecem ser enfatizados. Na cepa UA159, para todos os antimicrobianos, houve redução de 45% dos níveis de expressão, mas para o isolado clínico 2.M7/4 a inibição foi de 100%.

Estudos prévios com *S. mutans* mostraram que a reparação de dano celular induzidos por ambiente ácido, eram feitas pela DnaK, entretanto, pouco se sabe sobre mecanismos moleculares de reparo em *S. mutans*, principalmente de reparo de DNA (Hanna *et al*., 2007). Ainda, Len *et al.,* 2004a, 2004b, demonstraram que os níveis protéicos de DnaK foram reduzidos no meio extracelular pós choque de estresse ácido em cepas selvagens de *S. mutans*. Enquanto que os níveis intracelulares foram aumentados sugerindo que as diferenças na translocação, assim como níveis de expressão global, podem variar sob diferentes condições ambientais (Hasona *et al.,* 2007).

Futuros estudos moleculares dos genes utilizados neste estudo, poderão contribuir para o melhor entendimento destes mecanismos reguladores e de seus efeitos na expressão gênica sob influência de antimicrobianos.

Concluindo, em geral o extrato e as frações empregadas no presente estudo reduziram a expressão da maioria dos genes de virulência testados, sugerindo que a redução generalizada da expressão desses genes de poderia estar relacionada com a necessidade de se economizar energia para expressar somente genes essenciais, quando as bactérias foram expostas aos antimicrobianos.

Os resultados divergentes entre as cepas analisadas sugerem que os mecanismos que controlam expressão gênica são variáveis entre os genótipos, sugerindo que a diversidade genética de *S. mutans* pode ter implicações importantes para se compreender os mecanismos que regulam a expressão de genes de virulência desta espécie.

Ainda, os dados obtidos nessa pesquisa demonstraram um efetivo potencial antimicrobiano de extratos e produtos naturais marinhos sobre os principais fatores de virulência de *S. mutans*. O isolamento de compostos bioativos, sua ação antimicrobiana, o conhecimento de seu mecanismo de ação, principalmente *in vivo,* bem como sobre a regulação dos genes de virulência e resistência a antimicrobianos, poderão ampliar consideravelmente o campo de novas estratégias de tratamento e prevenção da cárie dental.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados neste trabalho podemos concluir que:

1. Produtos naturais de invertebrados e microrganismos marinhos possuem potencial atividade antimicrobiana sobre estreptococos orais;
2. Em determinadas concentrações, as frações PcS2d, DR-MSP-10d-P3 e o extrato DR(M3)6, inibiram a formação do biofilme sem interferir no crescimento planctônico das cepas de *S. mutans* analisadas;
3. As frações PcS2d, DR-MSP-10d-P3 e o extrato DR(M3)6 reduziram a expressão dos genes de virulência, principalmente, *gtfB, gbpB, dnaK* e *ATPase* em proporções diferentes entre as cepas analisadas.

REFERÊNCIAS

Abel U, Koch C, Speitling M, Hansske FG. Modern methods toh produce natural-product libraries. Current. Opinion in Chemical Biology. 2002; 6: 453-8.

Alviano WS, Mendonça-Filho RR, Alviano DS, Bizzo HR, Souto-Padron T, Rodrigues Ml, Bolognese Am, Alviano Cs, Souza Mm. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. Oral Microbiol. Immunol. 2005; 20(2):101-5.

Almeida LSB, Murata RM, Yatsuda R, Dos Santos MH, Nagem TJ, Alencar SM, Koo H, Rosalen PL. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans.* Phytomed. 2008; 15:886-91.

Ambaye A, Kohner PC, Wollan PC, Roberts KL, Roberts GD, Cockerill FR 3^{RD}. Comparison of agar dilution, broth microdilution, disk diffusion, E-test, and BACTEC radiometric methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates of the *Nocardia asteroides* complex. 1997; J. Clin. Microbiol. 35(4):847-52.

Asanuma N, Iwamoto M, Hino T. Structure and transcriptional regulation of the gene encoding pyruvate formate-lyase of a ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*. Microbiology. 1999;145(1):151-7.

Badria FA, Zidan, OA. Natural products for dental caries prevention. J. Med. Food. 2004; 7:381-4.

Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. Crit Rev Oral Biol Biol.2003; 14:89-99.

Bakri IM, Douglas CW. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. Arc. Oral. Biol. 2005; 50(7):645-51.

Barbour CK, Sharif M, Sagherian VK, Habre AN, Talhouk RS, Talhouk SN. Sreening of selected indigenous of Lebanon for antimicrobial activity. 2004; J Ethnopharm. 93: 1-7.

Beckloff N, Laube D, Castro T, Furgang D, Park S, Perlin D, Clements D, *et al.* Activity of an antimicrobial peptide mimetic against planktonic and biofilm cultures of oral pathogens. Antim Ag Chem. 2007; 5(11):4125-32.

Berlinck RGS, Hajdu E, Rocha RM, Oliveira JHHL, Hernández ILC, Seleghim MHR, *et al.* Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil. J. Nat. Prod.2004; 67: 510-22.

Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR. Marine Natural Products. Nat. Prod. Rep. 2005; 22:15-61.

Bochniak M, Sadlak J. Periodontitis and cardiovascular diseases--review of publications. Przegl Lek. 2004;61(5):518-22.

Bowden GH, Hamilton IR. Survival of oral bacteria. Crit Rev Oral Biol Med. 1998; 9:54-85.

Bowden G, Edwardsson S. Ecologia oral e a cárie dentária. In: Cariologia Clínica Ed Santos. 1995; 45-62.

Brennan MB. Drug Discovery: Filtering out failures early in the game. 2000; Chem Engin News. 5:63-73.

Butler MS. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. 2005; Nat. Prod. Rep. 22:162-95.

Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. 2004; J. Nat. Prod. 67: 2141-53.

Caufield PW. Dental Caries – a transmissible and infectious disease revisited: a position paper. Pediatric Dentistry. 1997; 8(19):491-7.

Chen L, Cheng X, Shi W, Lu Q, Go VL, Heber D *et al.* Inhibition of growth of *Streptococcus mutans,* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus,* and vancomycin-resistant Enterococci by kurarinone, a bioactive flavonoid isolated from *Sopohora flavescens.* 2005; J Clin Microbiol. 7:3574-5.

Chen A, Hillman JD, Duncan M. L-(+)-lactate dehydrogenase deficiency is lethal in *Streptococcus mutans*. J Bacteriol. 1994; 176(5):1542-5.

Chia J-S, Lee Y-Y, Huang P-T & Chen J-Y. Identification of stress-responsive genes in *Streptococcus mutans* by differential display reverse transcription-PCR. Infect. Immun. 2001; 69:2493-2501.

Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. Science. 1992; 257:1050-55.

Consterton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu Rev Microbiol. 1987; 41:435-64.

Coykendall AL. Classification and identification of the viridans streptococci. Clin Microbiol Rev. 1989; 2(3):315-28.

Cragg GM, Newman DJ. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. Pure Appl. Chem. 2005; 77:7-24.

Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural Products in Drug Discovery and Development. 1997; J Nat Prod. 60: 52-60.

Donoghue HD, Tyler JE. Antagonism among streptococci isolated from the humam oral cavity. 1975; Archs Oral Microbiol. 20: 381-7.

Duarte S, Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Schaich K, Bowen WH *et al.* Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. FEMS Microbiol. 2006; 257:50-6.

Duarte S, Koo H, Bowen WR, Hayacibara MF, Cury JA, Ikegaki M, Rosalen PL. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. 2003; Bio. Pharm. Bull. 2003; 26(4)527-31.

Dunne WM Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? Clin MIcrobiol Rev. 2002; 15:155-66.

Fani MM, Kohanteb J, Dayaghi M. Inhibitory activity of garlic (*Allium sativum*) extract on multidrug-resistant *Streptococcus mutans.* J Indian Soc Pedod Prevent Dent. 2007; 164-8.

Fujiwara T, Tamesada M, Bian Z, Kawabata S, Kimura S, Hamada S. Deletion and reintroduction of glucosyltransferase genes of *Streptococcus mutans* and role of their gene products in sucrose dependent cellular adherence. Microb Pathog 1996; 20:225-33.

Goodman SD, Gao Q. Characterization of the *gtfB and gtfC* promoters from *Streptococcus mutans* GS-5. Plasmid. 2000; 43(1): 85-98.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microbiol. 2004; 2:95-8.

Hamada S, Torii M, Kotani S, Tsuchitani Y. Adherence of *Streptococcus sanguis* clinical

isolates to smooth surfaces and interactions of the isolates with *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. Infect. Immun. 1981; 32(1): 364-72.

Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol. Rev. 1980; (44): 331–384.

Hanada N, Kuramitsu NK. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtfC* gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. Infect Immun. 1988; 56:1999-2005.

Handwerger S, Tomasz A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. Rev Infec Dis. 1985; 7(3):368-86.

Hanna MN, Fergunson RJ, Li Y-H, Cvitkovitch. *uvrA* is an acid-inducible gene involved in the adaptive response to low pH in *Streptococcus mutans*. J Bacteriol. 2001; 183(20):5964-73.

Hardie, JM. Genus Streptococcus, 1986; 1043-1071. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology. The Williams & Wilkins Co, Baltimore, Md.

Harvey A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. 2000; Drug Discov Today. 5:294-300.

Hasona A, Zuobi-Hasona K, Crowley PJ, Abranches J, Ruelf MA, Bleiweis AS, Brady LJ. Membrane Composition Changes and Physiological Adaptation by *Streptococcus mutans* Signal Recognition Particle Pathway Mutants. J Bacteriol. 2007; 189(4):1219-30.

Hillman JD, Duncan MJ, Stashenko DKP. Cloning and Expression of the Gene Encoding theFructose-1,6-Diphosphate-Dependent L-(+)-Lactate Dehydrogenase of *Streptococcus mutans.* Infect Immun. 1990; 58(5):1290-95.

Hudson MC, Curtis R,III. Regulation of expression of *Streptococcus mutans* genes important to virulence. Infect Immun. 1990; 58: 464-70.

Jarvinen H, Tenovuo J, Huovinen P. In Vitro Susceptibility of *Streptococcus mutans* to Chlorhexidine and Six Other Antimicrobial Agentis. Antim Ag Chem. 1993, 37(5): 1158-59.

Johnson DM, Jones RN, Erwin ME. Quality control study group: anti-streptococcal acitivity of SB-265805 (LB20304), a novel fluoronaphthyridone, compared with five other

compounds, incluing quality control guidelines. Diag Microbioly & Infect Dis. 1999; 33, 87-91.

Kamiya RU, Hofling JF, Gonçalves RB. Frequency and expression of mutacin biosynthesis genes in isolates of *Streptococcus mutans* with different mutacin-producing phenotypes. J Med Microbiol. 2008; 57:626-35.

Katsura H, Tsukiyama RI, Suzuki A, Kobayashi M. In vitro antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms. Antimicrob. Agents. Chemother. 2001; 45(11): 3009-13.

Keys, PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. *Arch* Oral Biol. 1960; Oxford, (1):304-20.

Kiska DL, Macrina FL. Genetic regulation of fructosyltransferase in *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 1994; 62:1241-51.

Kochhar S, Hunziker PE, Leong-Morgenthaler P, Hottinger H. Evolutionary relationship of NAD(+)-dependent D-lactate dehydrogenase: comparison of primary structure of 2-hydroxy acid dehydrogenases. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992; 184(1): 60-6.

Kolenbrander, P. Oral Microbial Communities: Biofilms, Interactions, and Genetic Systems. Ann. Rev. Microbiol. 2000; 54:415-25.

Koo H, Seils J, Abranches J, Burne RA, Bowen WH, Quivey RG Jr. Influence of apigenin on gtf gene expression in *Streptococcus mutans* UA159. Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50(2): 542-6.

Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA, Rosalen PL, Park YK. Apigenin and tt-Farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. J Dent Res. 2005; 84(11):1016-20.

Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. Arch. Oral. Biol. 2000; 45(2): 141-8.

Kossuga MH, Lira SP, Mchugh S, Torres YR, Lima BA, Gonçalves RB, Veloso K, Ferreira AG, Rocha RM, Berlinck RGS. Antibacterial Modified Diketopiperazines from two Ascidians of the Genus *Didemnum.* Submetido em 2008.

Kossuga MH, Macmillan JB, Rogers EW, Molinski TF, Nascimento GG, Rocha RM,

Berlinck RG. (2S,3R)-2-Aminodecan-3-ol, a new antifungal agent from the ascidian *Clavelina oblonga*. J. Nat. Prod. 2004; 67: 1879-81.

Kuhnert WL, Zheng G, Faustoferri RC, Quivey RG Jr. The F-ATPase operon promoter of Streptococcus mutans is transcriptionally regulated in response to external pH. J. Bacteriol. 2004; 186(24): 8524-28.

Kuramitsu HK. Virulence properties of oral bacteria: impact of molecular biology. Curr Issues Mol. 2001; 3: 35-6.

Kuramitsu HK. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. Crit Rev Oral Biol Med. 1993; 4:159-176.

Lamond AI, Travers AA. Stringent control of bacterial transcription. Cell. 1985; 41(1).

Lee SF, Progulske-Fox A, Erdos GW, Piacentini DA, Ayakawa GY, Crowley PJ, Bleiweis AS. Construction and characterization of isogenic mutants of *Streptococcus mutans* deficient in major surface protein antigen P1. Infect Immun. 1989; 57:3306-13.

Lemos JA, Burne RA. Regulation and physiological significance of CplC and ClpP in *Streptococcus mutans*. J Bacteriol. 2002; 184: 6357-66.

Lemos JA, Chen YY, Burne RA. Genetic and physiologic analysis of the groEL operon and role of the HrcA repressor in stress gene regulation and acid tolerance in *Streptococcus mutans.* J. Bacteriol. 2001; 183(20): 6074-84.

Len AC, Harty DW, Jacques NA. Proteome analysis of *Streptococcus mutans* metabolic phenotype during acid tolerance. Microbiology. 2004a; 150:1353–66.

Len AC, Harty DW, Jacques NA. Stress-responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance. Microbiology. 2004b; 150:1339–51.

Li Y, Burne RA. Regulation of the *gtfBC* and *ftf* genes of *Streptococcus mutans* in biofilms in response to pH and carbohydrate. Microbiology. 2001; 147:2841-48.

Li Y-H, Lau PCY, Tang N, Svensater G, Ellen RP, Cvitkovitch DG. Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans* .J. Bacteriol. 2002; 184(2): 6333-42.

Liñares J, Martín-Herrero JE. Bases farmacomicrobiológicas del tratamiento antibiótico de las enfermedades periodontales y periimplatarias. Avances. 2003; 15(3):139-47.

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol. Rev.

1986; 50: 353–80.

Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. J Clin Periodontol. 2005; 32(6): 7-15.

Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. J. Dent. Res. 1992; 71:1431-38.

Marsh PD, Martin MV. Oral microbiology, In Aspects of microbiology 2nd ed. Edited by Cole JA, Knowles CJ, Schlessinger D. American Society for Microbiology, Washington, 1984.

Mattos-Graner RO, Porter KA, Smith DJ, Hosogi Y, Duncan MJ. Functional analysis of glucan binding protein B from *Streptococcus mutans.* J. Bacteriol 2006; 188(11): 3813–25.

Mattos-Graner RO, Jin S, King WF, Chen T, Smith DJ, Duncan MJ. Cloning of the *Streptococcus mutans g*ene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. Infect. Immun. 2001; (69)11: 6931-41.

Merritt J, Kreth J, Qi F, Sullivan R, Shi W. Non-disruptive, real-time analyses of the metabolic status and viability of *Streptococcus mutans* cells in response to antimicrobial treatments. J Microbiol Met. 2005; 61:161-70.

Napimoga MH, Kamiya RU, Rosa RT, Rosa EAR, Hofling JF, Mattos-Graner RO, Gonçalves RB. Genotypic diversity and virulene traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. J Med Microbiol. 2004; 53: 697-703.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada – Segunda Edição. NormaM27-A2. 2002. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. (Atual CLSI).

NCCLS. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição paraBactéria de Crescimento Aeróbio; Norma Aprovada – Sexta Edição. Norma M7-A6. 2003. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. (Atual CLSI).

Newman DJ, Cragg GM. Marine Natural products and Related Compounds in Clinical and Advanced Preclinical Trials. J. Nat. Prod. 2004; 67:1216-38.

Nicholas GM, Phillips AJ. Marine natural products: synthetic aspects. Nat. Prod. Rep. 2005; 22:144.

Oliveira JH, Seleghim MH, Timm C, Grube A, Kock M, Nascimento GG, Martins AC, Silva EG, Souza AO, Minarini PR, Galetti FC, Silva CL, Hadju E, Berlinck RG. Antimicrobial and antimycobacterial Activity of Cyclostelletamine Alkaloids from Sponge *Pachychalina sp.* Marine Drugs. 2006; 4: 1-8.

Ooshima T, Osaka Y, Sasaki H, Osawa K, Yasuda H, Matsumura W *et al.* Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in *in vitro* and animals experiments. Arch Oral Biol. 2000; 45:639-45.

O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol. Microbiol. 1998; 28(3): 449-61.

Page C, Curtis M, Sutter M, Walker M, Hoffman B. Farmacologia integrada. 2ª ed. Barueri: Manole, 2004.

Park YK, Koo MH, Abreu JA, Ikegaki M, Cury JA, Rosalen PL. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. Curr. Microbiol. 1998; 36(1): 24-8.

Pereira EM, Machado TB, Leal ICR, Jesus DM, Damaso CRA, Pinto AV *et al. Tabebuia avellanedae* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. Ann Clin Microbiol Antimicrobial. 2006; 5(5):1-7.

Phongpaichit S, Subhadhirasakul S, Wattanapiromsakul C. Antifungal activities of extracts from Thai medicinal plants against opportunistic fungal pathogens associated with AIDS patients. Mycoses. 2005; 48:333-38.

Reinscheid DJ, Gottschalk B, Schubert A, Eikmanns BJ, Chhatwal BG. Identification and molecular analysis of PcsB, a protein required for cell wall separation of group B streptococcus. J. Bacteriol. 2001; 183:1175–83.

Rios JL, Recio MC, Villar A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. J. Ethnopharm. 1988; 23:127.

Ryan MP, Rea MC, Hill C, Ross RP. An aplication in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147.

Appl Env Microbiol. 1996; 62: 612-19.

Sanders CC, Sanders WE. Enocin: an antibiotic produced by *Streptococcus salivarius* that may contribute to protection against infections due to group A streptococci. J Infect Dis. 1982; 146(5): 683-90.

Sato Y, Yamamoto Y, Kizaki K. Cloning and sequence analysis of the gbpC gene encoding a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 1997; 65(2): 668-75.

Senadheera MD, Guggenheim B, Spatafora GA, Huag YC, Choi J, Hung DC, Treglown JS, Goodman SD, Ellen RP, Cvitkovitch DG. A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects *gtfBCD*, *gbpB* and *ftf* expression, biofilm formation, and genetic competence development. J Bacteriol. 2005; 147:4064-76.

Shemesh M, Tam A, Steinberg D. Expression of biofilm-associated genes of *Streptococcus mutans* in response to glucose and sucrose. J Med Microbiol. 2007; 56:1528-35.

Shemesh M, Steinberg D. *In vitro* binding interactions of oral bacteria with immobilized fructosyltransferase. J Appl Microbiol. 2006; 100:871-77.

Smith DJ, King WF, Barnes LA, Peacock Z, Taubman MA. Immunogenicity and protective immunity induced by synthetic peptides associated with putative immunodominant regions of *Streptococcus mutans* glucano-binding protein B. Infect Immun. 2003; 71(3):1179-84.

Smith AJ, Quivey RG Jr, Faustoferri RC. Cloning and nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus mutans* membrane-bound, proton-translocating ATPase operon. Gene. 1996; 183(1-2): 87-96.

Smith DJ, Akita H, King WF, Taubman MA. Purification and antigenicity of a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans.* Infect. Immun. 1994; 62(6): 2545-52.

Smullen J, Koutsou GA, Foster HA, Zumbe A, Storey DM. The antibacterial activity of plants extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. Caries Res. 2007; 41(5):342.

Song JH, Yang TC, Chang KW, Han SK, Yi HK, Jeon JG. *In vitro* effects of a fraction separated from *Polygonum cuspidatum* root on the viability, in suspension and biofilms,

and biofilm formation of mutans streptococci. J Ethnopharm. 2007; 112:419-25.

Song J, Kim S, Chang K, Han S, Yi H, Jeon J. In vitro inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Arch. Oral Biol. 2006; 51(12): 1131-40.

Steinberg D. Studying plaque biofilms on various dental surfaces. In *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications.* Pp. 353-370. NJ: Humana Press.

Stipp RN, Goncalves RB, Hofling JF, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Transcriptional analysis of *gtfB, gtfC*, and *gbpB* and their putative response regulators in several isolates of *Streptococcus mutans.*Oral Microbiol Immunol. 2008; 23:466–73.

Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K. Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. Oral Microbiol. Immunol. 2004; 19(1): 61-4.

Teng LJ, Hsueh PR, Chen YC, Ho SW, Luh KT*.* Antimicrobial susceptibility of viridans group streptococci in Taiwan with an emphasis on the high rates of resistence to penicillin and macrolides in *Streptococcus oralis.* J Antimicrobial Chem.1998; 41:621-7.

Tichy J, Novak J. Extraction, assay, and analysis of antimicrobials from plants with activity against dental pathogens (Streptococcus sp.). J. Altern. Complement. Med. 1998; 4:39-45.

Torres YR, Berlinck RG, Nascimento GG, Fortier SC, Pessoa C, Moraes MO. Antimicrobial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis.* Toxicon. 2002, 40: 885-91.

Tsuda H, Yamashita Y, Shibata Y, Nakano Y, Koga T. Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 3756-64.

Wei GX, Campagna AN, Bobek LA. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. J Antimicrob Chemother. 2006; 1-10.

Westergren G, Krasse B. Evaluation of a Micromethod for Determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* Infection. J Clin Microb. 1978; 82-3.

Whiley RA, Beighton D. Current classification of the oral streptococci. Oral Microbiol. 1998; 13(4): 195-216.

Xiao J, Zuo YL, Liu Y, Li JY, Hao YQ, Zhou XD. Effects of *Nidus Vespae* extract and chemical fractions on glucosyltransferases, adherence and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. Arch. Oral Biol. 2007; 52:869-75.

Yang DQ, Liu TJ, Li SY, Qi GZ, Zhang H, Lou JG. A study of genetic diversity in lactate dehydrogenase of *Streptococcus mutans* from clinical isolates. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2003; 21(5): 381-4.

Yang DQ, Liu TJ, Zhou XD, He KF, Li S, Zhu CH. Study on lactate dehydorgenase activity of *Streptococcus mutans* isolates derived from caries-active and caries-free individuals. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2005; 23(2): 116-8.

Yatsuda R, Rosalen PL, Cury JA, Murata RM, Rehder VLG, Melo LV, Koo H. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. J

Ethnopharm. 2005; 97:183-9.

Yoshida A, Kuramitsu HK. *Streptococcus mutans* biofilm formation: utilization of a gtfB promoter-green fluorescent protein (*PgtfB::gfp*) constructs to monitor development. Microbiology. 2002; 148:3385-94.