



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluna: Maira Gisele Fujita

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

Ano de conclusão do curso: 2005.

Assinatura do Orientador

Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

TCC 204



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DO KAEMPFEROL, DA
QUERCETINA E DO TT-FARNESOL SOBRE O BIOFILME DENTAL
– INIBIÇÃO BACTERIANA E QUEDA DE PH**

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), como Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Odontologia da Aluna **Maira Gisele Fujita**, sob orientação do Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen**.

Piracicaba

2005

Índice

1. Resumo.....	5
2. Introdução.....	6
2.1. Justificativas.....	10
3. Desenvolvimento.....	10
3.1. Material e Métodos.....	10
3.1.1. Agentes Antimicrobianos.....	10
3.1.2. Microrganismo utilizado.....	11
3.1.3. Inibição de formação do biofilme.....	11
3.1.4. Teste de queda de pH em biofilme.....	13
3.1.5. Teste de reversibilidade de pH em biofilme.....	14
3.2. Resultados e Discussão.....	14
3.2.1. Inibição de formação do biofilme.....	14
3.2.2. Teste de queda de pH em biofilme.....	16
3.2.3 Teste de reversibilidade de pH em biofilme.....	18
4. Conclusão.....	20
5. Referências bibliográficas.....	21

Dedico este trabalho,

**Aos meus pais Mario e Teresinha, pelo exemplo de caráter e de luta na
conquista de um ideal;**

**E por não medirem esforços para realizar meus sonhos e por apoiarem as
minhas escolhas na vida.**

**Ao meu irmão Murilo
Pelo apoio incondicional, afeto e
incentivo na luta pelos meus
objetivos.**

**Ao Gustavo,
Pelo amor, companheirismo
compreensão, dedicação e amizade
que foram fortalecidos nestes quatro anos.**

Agradecimentos

À Deus, por sempre estar presente em meus caminhos;

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen pelo apoio, orientação e exemplo de profissionalismo na carreira acadêmica;

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio necessário para a realização deste trabalho e do curso de graduação;

À Bolsa Pesquisa UNICAMP (Pró-Reitoria de Graduação - Serviço de Apoio ao Estudante – SAE) - (Bolsa de Iniciação Científica SAE), pelo apoio financeiro, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho;

Ao doutorando Ramiro Mendonça Murata, pelos ensinamentos transmitidos e pela amizade;

A todos os pesquisadores da área de farmacologia pela colaboração e convívio;

Aos amigos de graduação ou não por sempre estarem presentes nestes quatro anos;

Aos funcionários da área de farmacologia Eliane M. Franco, Maria Eliza dos Santos e José Carlos Gregório, pela amizade e pelo auxílio recebido para a realização deste trabalho.

Listas

Lista de gráficos:

Gráfico 1. Resultados da inibição de formação de biofilme de <i>S. mutans</i> UA 159, tratados com kaempferol, quercetina e associações..	15
Gráfico 2. Resultados do teste de queda de pH em biofilme de <i>S. mutans</i> UA 159, tratados com kaempferol, quercetina, tt-famesol e associações.....	17
Gráfico 3. Resultados do teste de reversibilidade de queda de pH em biofilme de <i>S. mutans</i> UA 159, tratados com kaempferol, quercetina, tt-famesol e associações.....	19

Lista de figuras:

Figura 1. Caixa e suporte para a formação de biofilmes.....	11
Figura 2. Tratamento dos biofilmes.....	12
Figura 3. Raspagem dos biofilmes.....	13

1. Resumo

Sabe-se que o desenvolvimento da cárie está intimamente associado a microrganismos de origem bacteriana, que se aderem à superfície dos dentes, formando o biofilme acidificado com conseqüente desmineralização dental. Desta forma, a inibição do biofilme dental seria importante na prevenção da cárie, quer seja impedindo o crescimento dos estreptococos do grupo mutans na cavidade oral ou evitando a aderência destas bactérias às superfícies dos dentes ou ainda inibindo a produção de ácidos pelos microrganismos. Alguns compostos isolados da própolis têm demonstrado ação biológica contra bactérias orais em modelo de biofilme, porém é desconhecido o seu mecanismo de ação. Assim, o objetivo do presente projeto foi avaliar *in vitro* o efeito isolado e em associação dos compostos: kaempferol, quercetina, *tt*-farnesol e clorexidina sobre a inibição do biofilme de *S. mutans* e sobre a produção de ácidos na presença de glicose. O kaempferol e a quercetina não inibiram o desenvolvimento do biofilme formado por *S. mutans*. Os BFs tratados com *tt*-farnesol, quercetina e kaempferol respectivamente apresentaram redução máxima de pH para 5,8 ($\pm 0,2$), 4,2 ($\pm 0,04$) e 4,5 ($\pm 0,16$), enquanto que no BF controle o pH final foi de 4,1 ($\pm 0,06$). Concluímos que o kaempferol e a quercetina, testados em modelo de biofilme, não apresentaram efeitos bactericidas, mas que o *tt*-farnesol inibe a produção glicolítica de ácidos pelo biofilme, podendo ser um promissor agente anticariogênico.

2. Introdução

Sabe-se que o desenvolvimento da cárie está intimamente associado a microrganismos de origem bacteriana, que se aderem à superfície dos dentes, formando o biofilme dental (FITZGERALD & KEYES, 1960; HAMADA & SLADE, 1980; GIBBONS, 1984). A constituição do biofilme inicia-se com a formação da película adquirida, através da interação entre proteínas salivares e glicoproteínas sobre a superfície do dente (HAY & MORENO, 1993). Posteriormente, ocorre a colonização de bactérias sob a película adquirida, proporcionando a formação e o crescimento do biofilme dental (GIBBONS & VAN HOUTE, 1975).

Alguns microrganismos, como os estreptococos do grupo mutans possuem características acidúrica e acidogênica, tendo aumento em proporção na presença de sacarose. O acúmulo de estreptococos na superfície dental é considerado um dos fatores críticos no desenvolvimento do biofilme cariogênico, devido à produção de ácidos que proporcionam a queda do pH do biofilme dental, havendo maiores possibilidades de desmineralização dos tecidos dentais (LOESCHE, 1986).

Além disso, os *Streptococcus mutans* têm a capacidade de se aderirem à película adquirida presente sobre os dentes, através da síntese de polissacarídeos extracelulares produzidos a partir da sacarose (DE STOPELAAR et al., 1971; GIBBONS & VAN ROUTE, 1975; HAMADA & SLATE, 1980). A aderência é facilitada através de glucanos, principalmente os insolúveis em água, que são sintetizados por enzimas chamadas

glucosiltransferases, (HAMADA & SLADE, 1980; RÖLLA et al., 1983; TANZER et al., 1985; SCHILLING & BOWEN, 1992), produzidas principalmente pelas bactérias do grupo mutans no biofilme dental (LOESCHE, 1986; HANADA & KURAMITSU, 1989). Atualmente, a tentativa de inibir as atividades das glucosiltransferases é uma das estratégias que visa o controle da formação de um biofilme dental cariogênico (IKENO et al., 1991; PARK et al., 1998a; KOO et al., 1999). Tem sido também demonstrado que estes glucanos aumentam a porosidade e mudanças na composição inorgânica da matriz do biofilme tornando-o ainda mais cariogênico (VAN HOUTE, 1994; CURY et al., 1997).

Em acréscimo, como relatado até então, a formação do biofilme dental bacteriano é bastante complexa, sendo que vários modelos de estudo para reproduzir este biofilme têm sido propostos. Pesquisas têm demonstrado que esses modelos estão mais próximos de reproduzir as condições reais da cavidade oral, pois em comparação com o modelo de células planctônicas, vastamente utilizado (KOO et al., 1999; Duarte et al., 2003), as células do biofilme possuem crescimento diferenciado e metabolismo alterado devido à alta densidade populacional. A maior resistência encontrada nos biofilmes aos agentes antimicrobianos é relacionado às barreiras de difusão, além disso, as células do biofilme possuem mais tempo para se adaptarem ao estresse aplicados por esses agentes (BURNE et al., 1999; SVENSATER, G., 2001).

Deste modo, a inibição do biofilme dental seria importante na prevenção de cárie, seja inibindo o crescimento dos estreptococos do grupo

mutans na cavidade bucal, ou inibindo a aderência destas bactérias às superfícies dos dentes através da inibição da atividade das glucosiltransferases ou ainda através da inibição da produção de ácidos.

Muitos agentes de origem natural vêm sendo explorados nas últimas décadas (IKENO et al., 1991; OTAKE et al., 1991; OOSHIMA ET AL., 1993; KOO, H. et al., 2002), devido as suas possíveis ações farmacológicas. Deste modo, tem sido descobertos novos compostos naturais com atividade anti-glucosiltransferase e/ou antibacteriana. Um dos produtos naturais que vêm se destacando é a própolis, composto resinoso produzido pelas abelhas *Apis mellifera*. Foi demonstrado que o extrato etanólico bruto da própolis (EEP) apresenta atividade antimicrobiana contra estreptococos do grupo mutans e inibe a atividade das glucosiltransferases (IKENO et al., 1991; KOO et al., 1999; DUARTE et al., 2003).

Sabe-se que a composição química da própolis é complexa (TOMÁS-BARBERAN et al., 1993; PARK et al., 1997; BANKOVA et al., 1999; KUJUMGIEV et al., 1999; KOO et al., 1999; MURATA et al., 2001; DUARTE et al., 2003) e formada por compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, que têm sido considerados substâncias biologicamente ativas da própolis (GHISALBERTI, 1979; BONHEVI et al., 1994; KOO et al., 1999). Vários desses flavonóides já foram identificados, e dentre estes, o kampferol e a quercetina têm demonstrado atividade anti-glucosiltransferase e antimicrobiana em células planctônicas (KOO et al.; 2000; 2002).

Os mecanismos de ação do kampferol, da quercetina e do tt-femesol não estão bem estabelecidos (ELLIOT et.al.,1992; BRAVO, 1998). PACE et

al. (1995), sugere que a quercetina age competindo com a enzima glucosiltransferase, embora mais estudos sejam necessários antes que seja possível chegar a alguma conclusão.

Por outro lado, está bem estabelecido que a clorexidina, outro potente agente antimicrobiano, vem sendo utilizado visando o controle da formação de um biofilme dental. Esta substância parece ser o mais eficiente agente na redução do biofilme bacteriano supragengival (LOE, H. & SCHIOTT, C. R, 1970).

Entretanto, a clorexidina apresenta efeitos indesejáveis, como a pigmentação dos dentes, da língua, das restaurações e próteses, distúrbios do paladar, sensação de queimação na língua e descamação da mucosa oral. Esses efeitos, no entanto, podem ser minimizados com a redução da concentração de clorexidina, o que, por sua vez pode reduzir sua atividade sobre o biofilme (FLOTRA, 1971; ERIKSEN, 1985; LANG, 1988; ADDY & MORAM, 1995; CURY, 2000). No entanto, nenhum trabalho relata o efeito associado dos inibidores da glucosiltransferase com a clorexidina, visando a redução da concentração a ser administrada e conseqüentemente a diminuição dos seus efeitos adversos.

Assim, o objetivo principal do presente projeto foi de avaliar *in vitro* o efeito isolado do kaempferol, quercetina e tt-famesole e as associações destes compostos entre si e com a clorexidina sobre a inibição da formação do biofilme de patógenos e na inibição da produção de ácidos pelos

microrganismos formadores do biofilme, conseqüente inibição na queda do pH na presença de glicose.

2. 1. Justificativas

Carência de informações: há escassez de informações na literatura a respeito da ação antimicrobiana de compostos isolados da própolis sobre patógenos bucais em modelo de biofilme.

Efeito da associação: poucos trabalhos observaram o efeito dos compostos isolados da própolis em comparação com seus efeitos associados em modelos de biofilme.

3. Desenvolvimento

3. 1. Material e Métodos

3.1 .1. Agentes Antimicrobianos

Foram utilizados compostos identificados na própolis como: kaempferol (Extrasynthese®, França), quercetina (Aldrich®, Chem. Co., E.U.A.) (KOO *et al.*, 2000; 2002; PARK *et al.*, 2000), tt-famesol (Extrasynthese®, França) e a clorexidina (Sigma®, Chem. Co., E.U.A.), isoladamente nas concentrações de 1,33 mM e 0,665 mM.

Além de agentes preparados isoladamente, foram feitas as seguintes combinações:

- quercetina + kaempferol;
- quercetina + tt-farnesol;
- quercetina + clorexidina;
- kaempferol + tt-farnesol;
- kaempferol + clorexidina;
- tt-farnesol + clorexidina.

3.1.2. Microrganismo utilizado

Foi utilizada a bactéria *Streptococcus mutans* UA 159, rotineiramente mantida em freezer a -70°C , em meio BHI (Difco®), contendo solução de glicerol a 50% (em v/v).

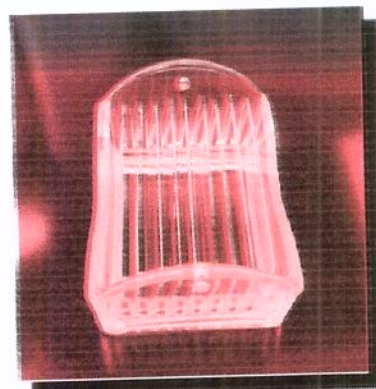
3.1.3. Inibição de Formação do Biofilme

Os biofilmes de *Streptococcus mutans* UA 159 foram formados sobre lâminas padronizadas cobertas com meio tryptone-yeast-extract (TSA, Difco®), acrescidas de 1% de sacarose. Estas lâminas foram introduzidas em uma caixa de vidro contendo o meio de crescimento com culturas ativas dos respectivos microrganismos (Fig. 1). A caixa foi incubada a 37°C , em atmosfera contendo 10% de CO_2 , por 48 h, como descrito por MA *et al.*, 1999 e KOO *et. al*, 2003.

Figura 1. Caixa e suporte para a formação de biofilmes.



Caixa para formação dos biofilmes



Suporte para as lâminas de vidro

A partir do 2º dia de formação do biofilme, estes foram tratados com as amostras de kaempferol, quercetina e clorexidina isoladamente e em associação, duas vezes ao dia, por 1 minuto e imediatamente recolocados no meio de crescimento fresco, idêntico ao utilizado anteriormente. Este procedimento foi repetido no 3º, 4º e 5º dia de formação dos biofilmes.

Figura 2. Tratamento dos biofilmes

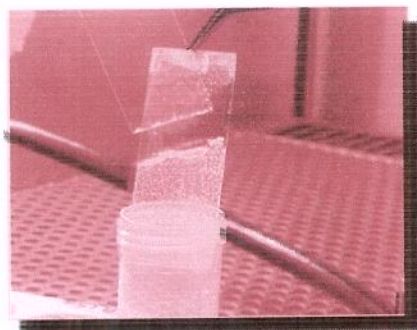


Biofilmes tratados duas vezes ao dia, por 1 minuto.

No 5º dia de experimento, as lâminas foram raspadas (Fig. 3), os biofilmes dispersos por ultrassom a baixa temperatura, com sonicador VibraCell (Sonics & Materials Inc.) utilizando 6 pulsos de 10 segundos com intervalos de 5 segundos e 40 watts de potência. Em seguida, foram diluídos em uma solução de *salt solution* (50mM KCl e 1mM MgCl₂, pH7.0) e cultivados em placas de Tryptic-Soy-Agar (TSA, Difco®) a 37°C, 10% CO₂, por 48 horas, os quais foram utilizado para contagem das unidades formadoras de colônias – ufc/biofilme, sendo os resultados expressos em

Log ufc/biofilme. O efeito bactericida é definido como uma diminuição > 1 log ufc/biofilme da contagem de ufc dos biofilmes tratados em relação ao controle negativo.

Figura 3. Raspagem dos biofilmes



Biofilmes raspados com auxílio de lâmina de vidro esterilizada.

3.1.4. Teste de queda de pH em biofilme

Os biofilmes de *Streptococcus mutans* UA 159 foram formados sobre lâminas padronizadas, introduzidas em uma caixa de vidro com suporte interno, para que estas lâminas fossem posicionadas sem haver contato físico entre as mesmas. A esta caixa foi adicionado o meio de crescimento (Tryptone-Yeast-Extract - Difco - com 1% de sacarose) com culturas ativas do *Streptococcus mutans* UA 159. As caixas com as lâminas foram incubadas a 37°C, em atmosfera contendo 10% de CO₂, por 48 h, como descrito por BELLI *et al.*, 1995. Após este período, cada lâmina foi transferida diariamente para um meio de cultura fresco e esta operação foi processada por um período de 3 dias, ocasião em que o biofilme se encontrava denso e maduro (MA *et al.*, 1999).

Cada lâmina de biofilme, após os 5 dias de formação, foi transferida para tubos contendo uma solução de *salt solution*, adicionada dos compostos testes, kaempferol, quercetina, tt-farnesol isoladamente e em associação, com suas respectivas concentrações finais, foi adicionado 5 ml de glicose em cada tudo e o pH inicial ajustado para 7,2. Então, foram realizadas as medidas de pH nos tempos de 0, 30 min., 1, 2, 3, 4 e 5 horas da solução contendo o biofilme e o agente antimicrobiano (BELLI *et al*, 1995).

3.1.5. Teste de reversibilidade de pH em biofilme

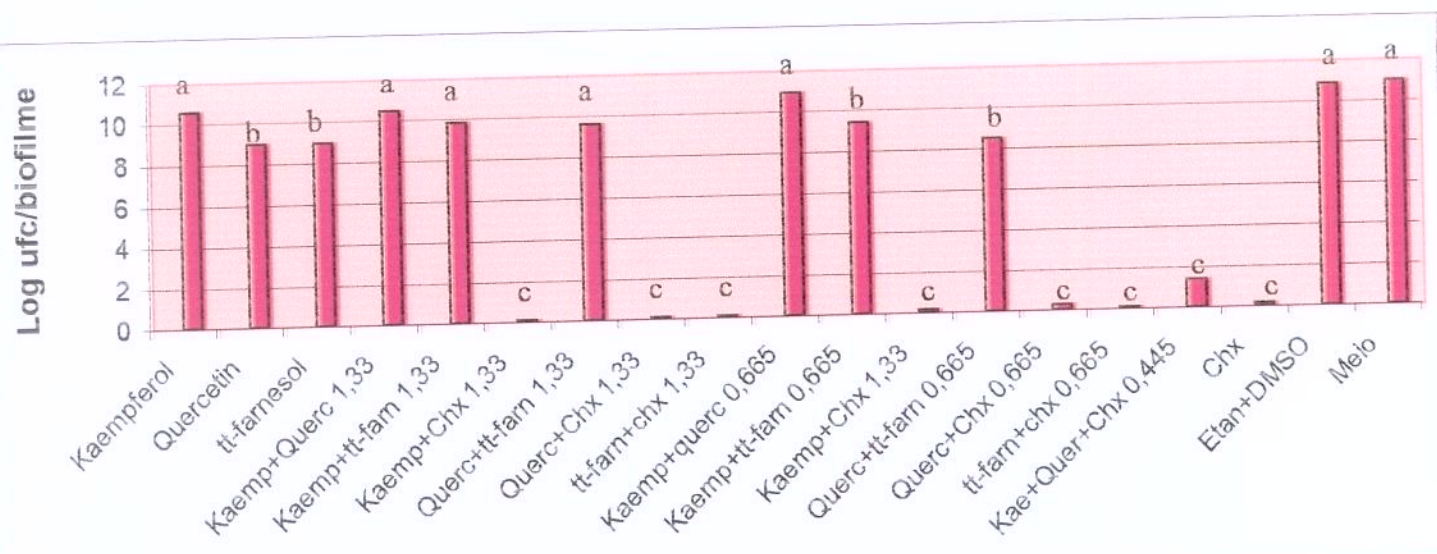
Ao término desta fase experimental do item 3.1.5, cada lâmina de biofilme foi lavada com *salt solution*, para remover os agentes testes e a lâmina foi introduzida em um outro tubo contendo apenas *salt solution* e novamente o pH foi ajustado para 7,2. Novas medidas de pH foram realizadas nos tempos de 0 hora, 30 minutos, 1, 2, 3, 4 e 5 horas, para verificar se o agente teste causou efeito irreversível sobre a produção de ácidos do microrganismo em biofilme (Belli *et al.*, 1995).

3.2. Resultados e Discussão

3.2.1 Inibição de Formação do Biofilme

Os resultados de inibição de formação dos biofilmes formados por *S. mutans* UA 159 estão expressos no Gráfico 1. Os resultados de inibição de formação foram expressos em log ufc/biofilme.

Gráfico 1. Resultados da inibição de formação de biofilme de *S. mutans* UA 159, tratados com kaempferol, quercetina e associações.



Valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes dos outros ($P < 0,05$, teste F, Anova, comparação em pares usando o teste Tukey-Kramer teste, $n=9$)

Os resultados da inibição de formação do biofilme com kaempferol e as associações entre: kaempferol + quercetina nas concentrações de 0,665 mM e a 1,33 mM, kaempferol + tt-farnesol e quercetina + tt-farnesol a 0,665 mM (Gráfico 1) não apresentaram efeito inibitório estatisticamente significativo na formação do biofilme de *S. mutans*, quando comparados ao controle negativo. Estes resultados estão de acordo com o estudo realizado por KOO *et al.*, 2002, na qual foi demonstrado que o kaempferol não apresentou efeito antimicrobiano nos testes de CIM e CBM, mas apresentou efeito inibitório sobre GTFs B, C e D.

A quercetina, o tt-farnesol a 1,33 mM e as associações entre kaempferol + tt-farnesol, quercetina + tt-farnesol a 1,33 mM (Gráfico 1)

apresentaram efeito inibitório sobre a formação de biofilme diferenciando estatisticamente do controle negativo. Estes resultados podem ser atribuídos à ação destes compostos da própolis sobre a diminuição de aderência bacteriana ao biofilme ou devido à sua ação antimicrobiana. A diminuição da aderência pode estar associada à diminuição da atividade das glicosiltransferase (KOO *et al*, 2002). Os resultados também estão em concordância com estudo recente, que demonstrou atividade antimicrobiana da quercetina sobre *Micrococcus luteus* e *Shigella sonnei* (MARTINI *et al.*, 2004) e com a atividade antimicrobiana apresentada pelo tt-farnesol e quercetina sobre células planctônicas de *S. mutans* (KOO *et al*, 2000, 2002), sendo reafirmada no presente estudo.

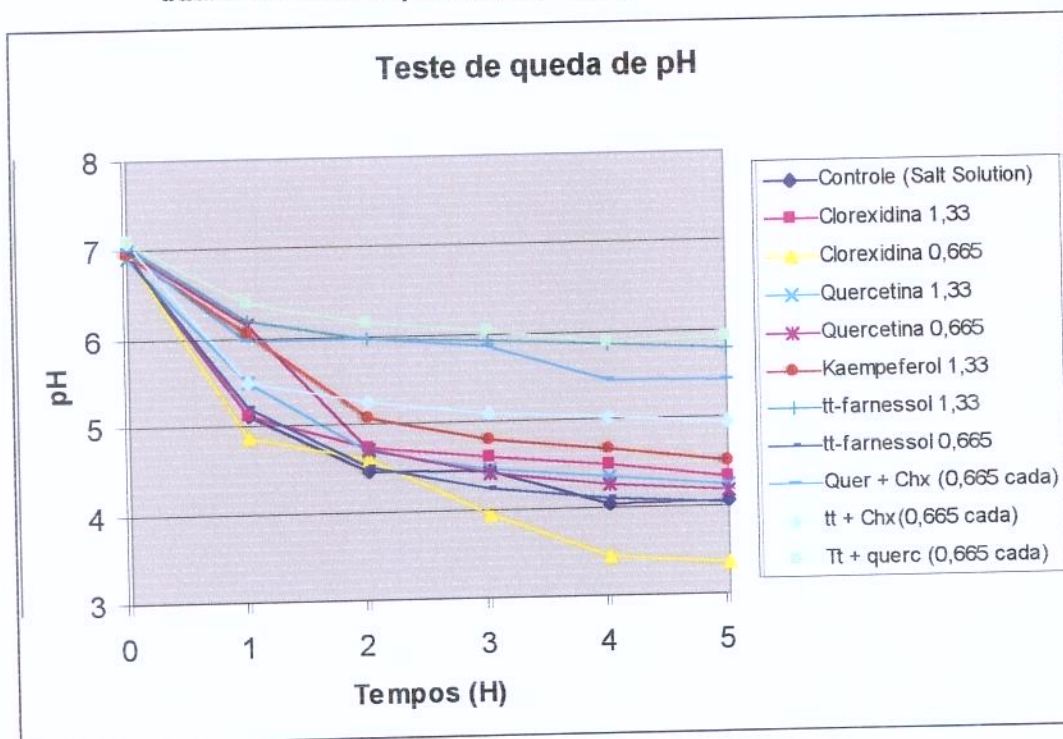
Foi comprovado que as associações dos compostos isolados da própolis com a clorexidina, nas concentrações de 0,665 mM e a 0,445 mM (Gráfico 1) apresentaram inibição de formação sobre o modelo de biofilme, não diferindo estatisticamente do controle positivo. Sendo provável que, este efeito seja obtido através da clorexidina, que proporciona um amplo espectro de ação, atuando sobre Gram positivo e Gram negativo, agindo como um bacteriostático, devido à maior permeabilidade celular e pela sua ação bactericida, promovendo a precipitação do citoplasma (LINDHE, 1999).

3.2.2. Teste de queda de pH em biofilme

A associação entre tt-farnesol + quercetina na concentração de 0,665 mM, conforme observado no gráfico 2, apresentou um eficiente poder inibitório na queda de pH em biofilme. Este dado sugere a existência de um

efeito aditivo entre estes dois compostos, pois quando associados apresentaram melhor poder inibitório da queda de pH, do que quando testados isoladamente.

Gráfico 2. Resultados do teste de queda de pH em biofilme de *S. mutans* UA 159, tratados com kaempferol, quercetina, tt-farnesol e associações.



O tt-farnesol, além de um potente agente antimicrobiano (KOO *et al.*, 2002), na concentração de 1,33 mM, apresentou também um eficiente poder inibitório na queda de pH (Gráfico 2), podendo ser atribuído este resultado à inibição da produção glicolítica de ácidos e/ou a extrusão de prótons para fora de célula. Estas atividades devem estar relacionadas a sua ação sobre a membrana celular bacteriana, demonstrada por RAMAGE *et al.*, 2002.

O tt-farnesol na concentração de 0,665 mM, a quercetina a 1,33 mM e a 0,665 mM e as respectivas associações destes compostos com a clorexidina (Gráfico 2), não foram eficazes na inibição de queda de pH,

apresentando valores de pH abaixo de 5,5. Estes resultados podem estar associados à baixa atividade antimicrobiana do tt-famesol, a concentração de 0,665 mM, sobre modelo de biofilme. Além do mais, a clorexidina não inibe a queda de pH na concentração de 1,33 mM, havendo relatos em estudos prévios em humanos, que afirmam a existência de uma adaptação de microrganismos quando os mesmos estão em contato com a clorexidina em baixas concentrações (MCDERMID, *et al.*, 1987).

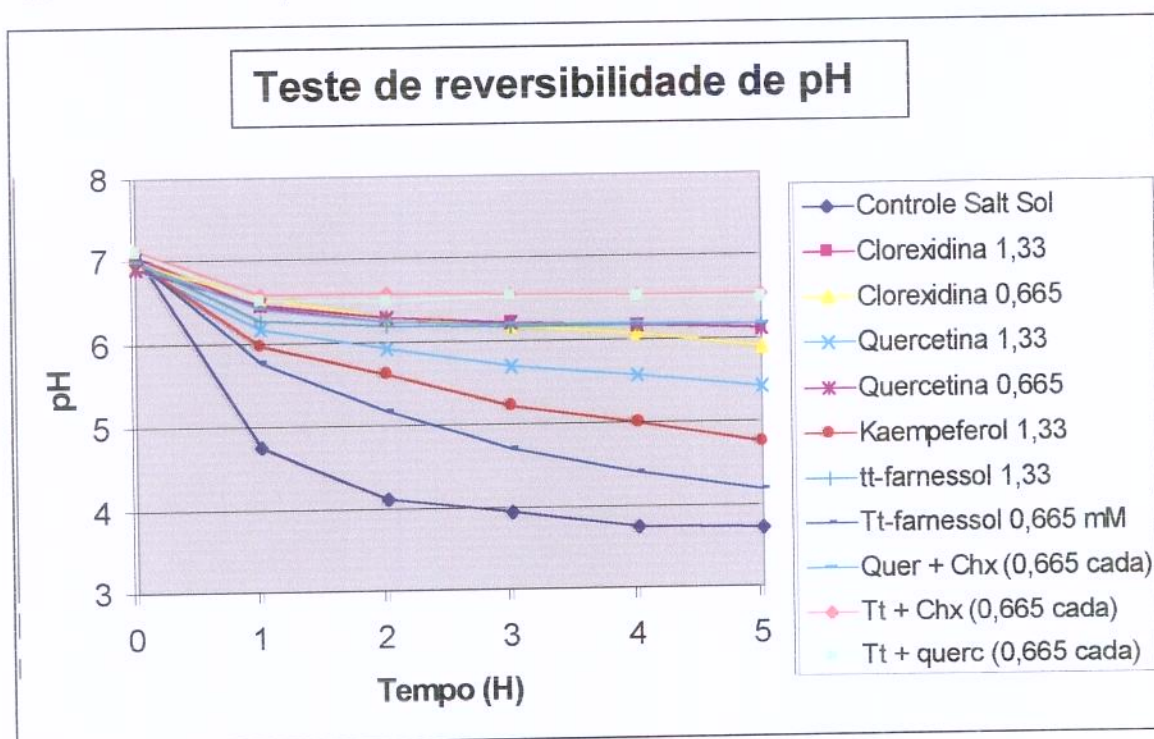
Considerando que o pH crítico bucal é de 5,5 e que esta promove a desmineralização dental, pode-se afirmar que o tt-famesol e suas associações com a quercetina são promissores agentes na inibição da queda de pH, produzidos por microrganismos do grupo mutans, já que estas substâncias mantiveram o mesmo acima do crítico (FEJERSKOV, O., THYLSTRUP, A., 2001).

3.2.3. Teste de reversibilidade de pH em biofilme

No teste de reversibilidade da queda de pH foi observado (Gráfico 3), nas associações entre tt-famesol + quercetina (0,665 mM cada) e tt-famesol + clorexidina (0,665 mM cada), uma discreta queda de pH durante a primeira hora, logo após, o pH manteve-se pouco ácido e constante. Este fato pode ser devido ao efeito bactericida do tt-famesol sobre os microrganismos (KOO *et al.*, 2002; MURATA, 2004) e/ou ainda ao efeito sobre a inibição permanente da extrusão de prótons. Sendo observado que o tt-famesol possui efeitos maiores quando associado a outros compostos, como quercetina e clorexidina. Este fato pode ser atribuído a uma possível ação

aditiva proporcionada pela associação entre os mesmos. Sendo, então, ao tt-farnesol e suas associações com quercetina e clorexidina, compostos promissores no controle de queda de pH.

Gráfico 3. Resultados do teste de reversibilidade de queda de pH em biofilme de *S. mutans* UA 159, tratados com kaempferol, quercetina, tt-farnesol e associações.



As associações entre quercetina e clorexidina a 0,665 mM cada, quercetina a 0,665 mM e o tt-farnesol a 1,33 mM (Gráfico 3) apresentaram também pequena queda de pH, obtendo-se um valor de pH, ao final do tempo de 5 horas, acima do valor apresentado pelo controle negativo. Havendo assim, discreta interferência destes compostos e suas associações sobre a reversibilidade de produção de ácidos pelos microrganismos em modelo de biofilme.

A quercetina a 1,33 mM , o kaempferol a 1,33 mM e o tt-farnesol a 0,665 mM (Gráfico 3) foram, nesta ordem, os grupos que menos apresentaram poder inibitório na queda de pH ao verificar reversibilidade. Não havendo, portanto, mecanismo de ação eficaz destes compostos. Nestas concentrações, sobre a inibição de produção de ácidos pelos microrganismos.

4. Conclusão

- kaempferol isoladamente ou em associação não apresentou efeito bactericida sobre biofilme de microrganismos do grupo mutans.
- A quercetina, o tt-farnesol a 1,33mM e as associações entre kaempferol + tt-farnesol, quercetina + tt-farnesol a 0,665 mM apresentaram um pequeno efeito inibitório sobre a formação de biofilme.
- O tt-farnesol apresentou um eficiente poder inibitório na queda de pH, provavelmente agindo sobre a produção glicolítica de ácidos e/ou a extrusão de prótons das células, quando comparado aos demais compostos testados.
- O tt-farnesol pode ainda, possuir efeitos maiores quando associado a outros compostos, como quercetina e clorexidina. Este fato pode ser atribuído a uma possível ação aditiva proporcionada pela associação entre os mesmos.

5. Referências Bibliográficas

2. ADDY, M.; MORAM, J. Extrinsic tooth discoloration by metals and chlorhexidine clinical staining procedure by chlorhexidine gluconate. **J Clinical Periodont**, 159, 331-4, 1985.
3. BANKOVA, V.S. et. Al., Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. **Z. Naturforsch**, Tubingen, v.54c, n.5-6, p.401-405, May/June, 1999.
4. BELLI, W.A.; BUCKLEY, D.H.; MARQUIS, R.E. Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. **Can J Microbiol**, Ottawa, v.41, n.9, p.785-91, Sept. 1995.
5. BONHEVI, J.S.; COLL, F.V.; JORDA, R.E. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **J Am Oil Chem Soc**, Chicago, 71: 529-32, 1994.
6. BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr. Res.** 56: 317-333, 1988.
7. BURNE, R.A. et. al. Physiologic Homeostasis and Stress Responses in Oral Biofilms. **Methods in enzymology**, vol.30: 441-460, 1999.
8. CURY, JA; REBELLO MAB; DEL BEL CURY AA. *In situ* relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Res**, Basel, 31:356-360, 1997.
9. CURY, J.A et. al. Effect of saccharin on antibacterial activity of chlorhexidine gel. **Braz Dent J.** 11(1):29-34, 2000.

10. DE STOPPELAAR, J.D., et. al. Decreased cariogenicity of a mutant of *Streptococcus mutans*. **Arch. Oral Biol.**, **16**, 971-975, 1971.
11. DUARTE et. al. Effects of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of *Streptococcus mutans*. **Biol Pharm Bull**, Apr.26 (4): 527-531, 2003.
12. ELLIOT, A.J., SCHEIBER, S.A., TOMAS, C., PARDINI, R.S. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. A structure-activity study. **Biochem. Pharmacol** **44**: 1603-1608, 1992.
13. ERIKSEN, H. M.; NORDBO, H.; KANTANEN, H.; ELLINGSEN, J. E. Chemical plaque control and extrinsic tooth discoloration. **J Clinical Periodont**, **12**, 345-50, 1985.
14. FEJERSKOV, O.; THYLSTRUP, A. **Cariologia Clínica** São Paulo: Santos, Cap. 11. 2001.
15. FITZGERALD, R.J.; KEYS, P.H. Demonstration of etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. **J. Am Dent Assoc**, Chicago, v.76, p.301-304, *Apud* GIBBONS, R.J. *Op. Cit.* Ref. 28. 1960.
16. FLOTRA, L.; GJERMO, P.; RÖLA, G.; WAERHAUG, J. Side effects of chlorhexidine mouthwashes. **Scan J Dent Res**, **79**:119-25, 1971.
17. GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. **Bee World**, Berson, **60**: 59-84, 1979.
18. GIBBONS, R.J.; VAN HOUTE, J. Bacterial adherence in oral microbial ecology. **Ann Rev Microbiol**, Palo Alto, **29**: 19-44, 1975.
19. GIBBONS, R.J., Adherence interactions that may affect microbial ecology in the mouth. **J. Dent. Res.**, **63**: 378-385, 1984.

20. HAMADA, S. & SLADE, H.D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **J Dent Res**, Washington, **63**: 407-11, 1980.
21. HAMADA, S.; KURAMITSU, H.K. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* gtfD gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. **Infect Immun**, Washington, v.57, n.7, p.2079-2085, July 1989.
22. HAY, D.I., & MORENO, E.C. Hydroxyapatite-Interactive Proteins. **IN: Cariology for the nineties**. Eds. Bowen, W.H. & Tabak, L.A., Rochester, NY, University of Rochester Press, pp. 71-84, 1993.
23. IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries Res**, Basel, **25**: 347-51, 1991.
24. KOO, H. et al. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. **Arch Oral Biol**, Oxford[in press]. 1999.
25. KOO, H. et al. Effects of *Apis mellifera* propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxiapatite. **Caries Res**, Basel, v.34, n.5, p.418-426, Sept./Oct., 2000.
26. KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y.K.; BOWEN, W. H. Effect of compounds found in propolis on *Strptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrobial Agents Chemother**, **46**, 1302-09, 2002.

27. KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J. Ethnopharmacol**, Limerick, **64**: 235-40, 1999.
28. LANG, N. P.; CATALANOTTO, F. A.; KNOPFLI, R. U.; ANTCZAK, A. A. A. quality specific taste impairment following the application of chlorhexidine gluconate mouthrinses. **J Clinical Periodont**, 15, 43-8, 1988.
29. LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.342-7.
30. LOE, H. and SCHIOTT, C. R. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental and gingivitis in man. *J.Periodont. Res.*, 5: 79-83, 1970.
31. LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbial. Rev.**, **50**; 353-380 1986.
32. MA, Y. et al. Membrane locus and pH sensitivity of paraben inhibition of alkali production by oral streptococci. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.14, p.244-9, 1999.
33. MARTINI, N.D.; KATERERE, D.R.; ELOFF, J.N. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **J Ethnopharmacol**, Lausanne, v.93, n.2/3, p.207-12, Aug. 2004.
34. MCDERMITE, A.S.; MCKEE, A.S.; MARSH, P.D. A mixed-culture chemostat system to predict the effect of anti-microbial agents on the oral flora: preliminary studies using chlorhexidine. **J Dent Res**, Washington, v.66, n.8, p.1315-20, Aug. 1987.

35. MURATA, RM; KOO, H; GONÇALVES, RB; CURY, JA; YATSUDA, R; ROSALEN, PL . Potencial antimicrobiano da própolis de várias regiões brasileiras. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 18, 2001, Águas de Lindóia, Brasil. Anais. São Paulo. 15:35. 2001.
36. OOSHIMA, T. et. al. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. **Caries Res.**, 27: 124-129, 1993.
37. OTAKE, S. et. al. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. **Caries Res.**, 25: 438-443, 1991.
38. PACE, M. et. al. High-performance liquid chromatography assay of glycosyltransferase using flavonoids as substance. **J. Chromat. A** 691: 331-336, 1995.
39. PARK, Y.K.; KOO, H.; IKEGAKI, M.; CONTADO, J.L. Investigations of the flavonoid aglycones of propolis collected by *Apis mellifera* in Brazil. **Arq Biol Tecnol**, Curitiba, **40**: 97-106, 1997.
40. PARK, Y.K. et al. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Curr Microbiol**, New York, **36 (1)**: 24-8, 1998.
41. RAMAGE, G. et al. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.68, n.11, p.5459-63, Nov. 2002.
42. RÖLLA, G. et al. Free glucosyl- and fructosyltransferase in human saliva and adsorption of these enzymes to teeth *in vivo*. In: DOYLE, R.J. & CIARDI, J.E. (ed.) **Glucosyltransferases, glucans, sucrose, and dental**

- caries.** Washington, IRL Press, p.21-30, [Chemical Sense, Sp. Suppl.] 1983.
43. SCHILLING , K.M. & BOWEN, W.H. Glucans synthesized *in situ* in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. **Infect. Immun.**, **60**: 284-295, 1992.
44. SVENSATER, G. Protein expression by planctonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans* **Frem's Microbiol Letters** 205: 139-146, 2001
45. TANZER, J.M.; FEEDMAN, M.L.; FITZGERALD, R.J. Virulence of mutans defective in glucosyltransferase, dextran-mediated aggregation, or dextrase activity. *In*: MERGENHAGEN, S.E. & ROSAN, B. **Molecular basis of oral microbial adhesion.** Washington, p.1477-1479, 1998.
46. TOMÁS-BARBERAN, F.A. et al. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, Oxford, v.34, n.1, p.191-196, 1993.
47. VAN HOTE, J. Role of microorganisms in the caries etiology. **J. Dent Res**, Washington, v.73, n.3, p.672-681, Mar. 1994.