UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Flávia da Silva

Orientador(a): Pedro Luiz Rosalen

Ano de Conclusão do Curso: 2005

Assinatura do(a) Orientador(a)

TCC 240

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA

Flávia da Silva

Efeito antimicrobiano *in vitro* dos compostos isolados da *Mikania glomerata* sobre os patógenos orais.

Monografia apresentada ao Curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/ UNICAMP, para obtenção do Diploma de Cirurgião-Dentista. Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

Piracicaba / SP

2005

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, pela habilidade com que orientou nosso trabalho.

À Prof. Vera L. G. Rehder pela co-orientação.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, e ao PIBIC/Cnpq, órgão financiador desse projeto.

A todos que trabalham no Departamento de Ciências Fisiológicas,por de alguma forma colaborarem com a realização do trabalho.

À minha acima de tudo amiga, e "mãe" Regiane Yatsuda, que foi a responsável pela minha permanência nos longos dias de laboratórios, pela elaboração de todo projeto e pela ajuda na execução do mesmo.

A minha FAMILIA e amigos, que com todo carinho, paciência e compreensão me apoiaram não só nesse trabalho, mas em toda minha jornada acadêmica.

A todos os funcionários dessa instituição que proporcionam todos os dias condições para que a mesma abrigue os estudantes em formação.

E à Base de tudo, Deus, que é o responsável pela minha vida e O qual me guia por ela.

Índice

Agradecimentos 2

Listas de Tabelas 4

Resumo 5

1. Introdução 6

1.1. Objetivos Específicos 7

2.0. Desenvolvimento - Material e Métodos 7

2.1. Preparação dos extratos da M. glomerata Spreng 7

2.2. Microrganismos 11

2.3. Determinação da Atividade Antimicrobiana 11

2.3.1. Preparo do inóculo 11

2.3.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) 11

2.3.3. Determinação da aderência celular in vitro 12

3.0. Resultados e Discussão 12

4.0. Conclusões 15

Referências 16

Listas de Tabelas

Fluxograma 1: Fracionamento do Extrato I e purificação dos ácidos diterpênicos. Pág 8

Tabela 1 : Tabela 1: CIM e CBM expressas em µg/mL. As concentrações dos extratos variaram de 3,125 a 800 µg/mL. Pág 9

Tabela 2 :Compostos isolados e identificados da Mikania laevigata e Mikania glomerata. Pág 10

Tabela 3: CIM e CBM expressas em µg/mL. As concentrações dos extratos variaram de 3,125 a 800 µg/mL. Pág 13

Tabela 4: CIM e ADE expressas em µg/mL. As concentrações dos extratos variaram de 3,125 a 800 µg/mL. Pág 14

Resumo

O objetivo deste estudo foi analisar *in vitro* os compostos isolados e identificados da *Mikania glomerata* quanto as suas propriedades antimicrobianas nos testes de concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e inibição da aderência celular sobre a superfície de vidro (ADE) contra alguns patógenos orais, KOO *et al.* (2000). Os compostos isolados testados foram o espatulenol, caurenol e os ácidos diterpênico, cupressênico, caurenóico e grandiflórico (concentrações variando entre 80 a 1,25 μg/mL) e etanol 80% (v/v) como controle negativo. Foram realizados os testes de concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e teste de aderência celular (Adh) para *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600, *S. mutans* UA 159, *S. sobrinus* 6715 e 2 cepas clínicas isoladas de cada microorganismos, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Actinomyces naeslundii* ATCC 19246. Os tubos foram incubados em 10% CO_2, a 37 ^{0}C, por 24h (CIM e CBM) e a 18h (Adh) num ângulo de 30^0 (Adh). Foram feitos seis replicatas para cada experiência. O ácido grandiflórico, espatulenol e o caurenol não apresentaram atividade antimicrobiana nos testes de CIM, CBM e Adh, sendo efetivos os ácidos diterpênico, cupressênico e caurenóico, em baixos valores. Os ácidos cupressênico e caurenóico foram os compostos mais efetivos, apresentando os valores mais baixos de CIM, CBM (2,5 μg/mL e 5 μg/mL). A Adh de todos microrganismos foi inibida em valores sub-CIM, ácidos cupressêncio e caurenóico 2,5 μg/mL. Concluímos que os compostos inibiram o crescimento bacteriano e a aderência celular dos microrganismos testados, sugerindo que esses possuem potencial anticariogênico.

O ácido cupressênico e caurenóico foram os compostos mais efetivos para *S. mutans* Ingbritt 1600 (CIM e CBM de 5 μg/mL e 20 μg/mL), *S. mutans* UA 159 (CIM e CBM de 5 μg/mL), *S. sobrinus* 6715 (CIM e CBM de 2,5 μg/mL e 5 μg/mL). A aderência celular de todos microrganismos testados foi inibida em valores sub-CIM, sendo a menor concentração a dos ácidos cupressêncio e caurenóico (2,5 μg/mL) para *S. mutans* UA 159.

1. Introdução

As plantas medicinais têm sido utilizadas em diversas áreas da saúde como formas alternativas de tratamento e prevenção das doenças, destacando-se o uso terapêutico como agentes antimicrobianos. As plantas do gênero *Mikania*, conhecidas como "guaco" ou "guaco cheiroso", são utilizadas pela medicina popular pela sua ação expectorante, broncodilatadora, antimicrobiana, antifúngica, antiúlcera, analgésica, antiinflamatória, antiasmática, cicatrizante e anti-reumática. Estudos prévios realizados com o extrato bruto e frações da *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata* em nosso laboratório (Yatsuda, 2001, 2002) apresentaram resultados promissores com a determinação do CIM, do CBM e da inibição da aderência celular dos microrganismos do grupo mutans. A fração hexânica de ambas *Mikania* apresentou os melhores resultados entre todas as frações testadas sugerindo que os compostos farmacologicamente ativos possuem características apolares. Deste modo, estão sendo isolados e identificados os compostos presentes nessa fração para serem testados quanto as suas atividades antimicrobianas. Assim, neste estudo serão avaliados os compostos isolados e quimicamente identificados da *Mikania glomerata* quanto as suas propriedades antimicrobianas através dos testes de concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e inibição da aderência celular sobre a superfície de vidro (ADE) sobre alguns patógenos orais, como descrito por KOO *et al.* (2000).

Deste modo, dois pontos devem ser enfatizados:

1. Carência de informação do potencial antimicrobiano da *M. glomerata* sobre os patógenos bucais (com destaque para os estreptococos do grupo mutans), principalmente com relação à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM).
2. Os resultados obtidos com a *M. glomerata*, com a avaliação da sua efetividade antimicrobiana contra patógenos bucais *in vitro*, fornecerá base para estudos futuros *in vivo*.

Portanto considerando os estudos feitos até o presente, a grande biodiversidade do Brasil e o baixo custo desses produtos naturais, o objetivo geral deste projeto foi avaliar o efeito antimicrobiano *in vitro* dos compostos isolados da *Mikania glomerata* sobre os patógenos orais.

1.1. Objetivos Específicos

Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos dos compostos isolados da *M. glomerata*, caracterizada quimicamente e pré-selecionada através de ensaios biológicos, realizados por pesquisadores da CPQBA/UNICAMP*, a qual será analisada sobre os patógenos bucais envolvidos na cárie dental e doença periodontal por meio da:

1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM).
2. Determinação da inibição da aderência celular em superfície de vidro

2. Desenvolvimento - Material e Métodos

2.1. Preparação da fração hexânica e seus compostos isolados da M. glomerata Spreng.

As partes aéreas de *M. glomerata* foram coletadas no campo experimental do CPQBA/UNICAMP. A planta provém de um cultivo a partir de população clonada, realizado desde 1996 pela Divisão de Agrotecnologia do CPQBA.

Exsicata da *M. glomerata* está depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob número UEC 102047.

O extrato hidroalcoólico foi preparado a partir da planta seca e moída com uma solução de etanol: água (80:20), sob agitação mecânica por um período de duas horas. Após filtração, o processo acima foi repetido e o extrato foi concentrado em evaporador rotativo até eliminação de todo etanol e em seguida foi liofilizado, fornecendo o extrato bruto (Extrato I).

- Fracionamento do Extrato I com hexano *(Fluxograma 1)*

A fração hexânica foi preparada a partir de 40 g do EXTRATO I adicionando 300 mL de hexano, extraindo 3 vezes de 1minuto em dispersor (Polytron) a temperatura ambiente. A fração foi filtrada e o resíduo reextraído novamente com o mesmo volume de hexano. As frações hexânicas foram agrupadas e evaporadas a vácuo em evaporador rotativo até a eliminação de todo solvente, obtendo-se a 9 g da fração hexânica.

Fluxograma 1: Fracionamento do Extrato I e purificação dos ácidos diterpênicos.

A fração hexânica (apolar) foi re-fracionada em coluna seca, utilizando tripa de celulose de 2 cm de diâmetro, e 30 cm de altura. A coluna foi empacotada com sílica gel 60 Merck (70-230 Mesh) e a fase móvel foi selecionada após análise da fração por Cromatografia em Camada Delgada, utilizando-se diferentes eluentes.

Após eluição, a coluna foi cortada em quatro partes e as frações foram extraídas com acetato de etila e analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), após metilação de uma alíquota.

As frações 1, 2, 3, 4 e resíduo (papa) foram submetidas aos ensaios de atividade antimicrobiana contra os estreptococos do grupo mutans. Foram realizados os testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para determinar qual a fração mais ativa onde serão isolados e identificados os compostos nela presente.

Utilizou-se a fração hexânica e suas frações da *M. glomerata*, variando as concentrações de 1,25 a 800 µg/mL, em razão 2. Foram feitas 3 triplicatas. Os microrganismos testados foram o *S. mutans* UA 159 e *S. sobrinus* 6715 para os dois testes.

Todo material utilizado no experimento foi cuidadosamente esterilizado, o que é de fundamental importância para evitar contaminação, além disso, todos os procedimentos foram realizados dentro de uma câmara de fluxo laminar e na zona asséptica da chama de um bico de bulsem. O preparo do inóculo bacteriano foi realizado como descrito no projeto original. Para

todos os testes foram feitos controles tanto positivos (meio de cultura + bactéria + etanol), quanto negativos (meio de cultura + etanol).

1. Para a CIM, foi distribuída uma quantidade de 4960 µL do meio de cultura já inoculado em cada tubo de vidro previamente esterilizado e, em seguida, foram adicionados 40 µL da fração hexânica ou dos compostos isolados. Os tubos foram incubados em estufa à 37°C em atmosfera parcial de 10% de CO_2, por 24 h. Após o tempo de incubação foi feita a leitura em espectrofotômetro a 660 nm de comprimento de onda. A CIM foi considerada a concentração do extrato referente à leitura de absorbância menor que 0.05.
2. Para determinação da CBM, foram inoculadas uma alíquota de 50 µL de todos os tubos da CIM (sem crescimento aparente) em placas de BHI ágar suplementado com 5% de sangue de carneiro. Posteriormente as placas foram incubadas e a CBM foi considerada a menor concentração do extrato onde não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado (99,9% de morte microbiana).

Os resultados de CIM e CBM das frações hexânica, 1, 2, 3, 4 e a papa estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1: CIM e CBM expressas em µg/mL. As concentrações dos extratos variaram de 3,125 a 800 µg/mL.

	S. mutans UA159		***S. sobrinus 6715***	
Extratos	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**
Fração Hexânica	12,5	50	12,5	25
Fração 1	>800	> 800	>800	> 800
Fração 2	6,25	12,5	6,25	25
Fração 3	50	200	25	50
Fração 4	> 800	> 800	> 800	> 800
Resíduo (papa)	> 800	> 800	> 800	> 800

Três triplicatas (n=9) foram realizadas para cada microrganismo e frações.

As frações 2 e 3 foram as mais ativas, inibindo o crescimento de *S. mutans UA159* (6,25 μg/mL) e *S. sobrinus 6715* (50 μg/mL). Assim, a fração bioativa 2 foi purificada em coluna cromatográfica – flash. Utilizou-se coluna de vidro com 45 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro. A coluna foi empacotada com solvente apropriado sob pressão de ar comprimido até a sílica gel 60 (230- 400 Mesh) atingir a altura de 20 cm.

Após adição da "papa" iniciou-se a eluição recolhendo-se as frações que foram analisadas por CCD e/ou CG-EM. As frações semelhantes foram agrupadas e concentradas em evaporador rotativo até eliminação do solvente, obtendo-se as respectivas massas das frações.

As frações e compostos isolados da *M. glomerata* foram analisados através dos seguintes métodos cromatográficos:

- Cromatografia em Camada Delgada (CCD);
- Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM);
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A determinação estrutural dos compostos isolados foi feita por métodos espectroscópicos utilizando técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono 13 (RMN-^{1}H e RMN-^{13} C), Infravermelho (IV) e Espectrometria de Massas (EM). Todos estes testes já foram descritos no projeto original.

Foram isolados e identificados das frações 1 e 2 os seguintes compostos:

Compostos isolados e identificados da Mikania laevigata e Mikania glomerata
Ácido diterpênico
Ácido caurenóico
Ácido cupressênico
Ácido grandiflórico
Espatulenol
Caurenol

2.2. Microrganismos

Os microrganismos testados contra os compostos isolados da *M. glomerata* foram:

- *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600;
- *Streptococcus mutans UA 159* e 2 isolados clínicos recentes;
- *Streptococcus sobrinus* 6715 e 2 isolados clínicos recentes;
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e
- *Actinomyces naeslundii* ATCC 19246.

2.3 Determinação da Atividade Antimicrobiana

2.3.1. Preparo da suspensão bacteriana.

Os microrganismos serão inicialmente reativados a partir das suas culturas originais (mantidas em meio líquido BHI contendo 20% de glicerol a -80^0C ou liofilizadas) e posteriormente cultivadas em placas de BHI ágar.

2.3.2. Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

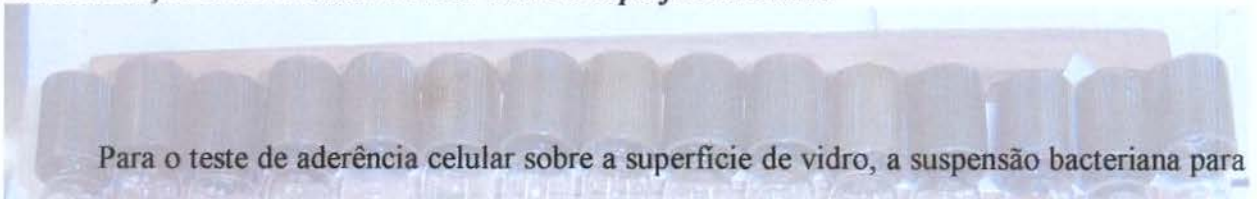
- A determinação da CIM foi realizada em meio líquido, através da técnica de macro-diluição[7,8]. Uma suspensão bacteriana foi homogeneizada com meio líquido BHI na proporção 1:1000 (v/v) obtendo uma concentração bacteriana em torno de 1-2 x 10^5 ufc/mL. Uma alíquota de 4960 µL foram transferidos em tubos de vidro de rosca esterilizados sendo posteriormente adicionados 40 µL dos extratos dos compostos isolados da *M. glomerata (ácido diterpênico, ácido caurenóico, ácido cupressênico, grandiflórico e espatulenol)*, variando a concentração final de 3,125 a 800 µg/mL, em razão 2, ou controle (80% etanol, v/v, ou absoluto, v/v), sendo incubados nas condições 2.3.1. Após a incubação, foi realizada a leitura no espectrofotômetro (λ=660nm). A CIM foi considerada a menor concentração do extrato onde não houve crescimento bacteriano visível, ou seja, uma leitura menor que 0,05 (absorbância).

Para determinação da CBM, foram inoculadas uma alíquota de 50 µL de todos os tubos da CIM (sem crescimento aparente), com o auxílio da máquina "Spiral-plater" (Whittley Automatic Spiral Plater da DW Scientific), em placas de BHI ágar suplementado com 5% de sangue de carneiro. Posteriormente as placas foram incubadas e a CBM foi considerada a menor

7 7 2004

concentração do extrato onde não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado (99,9% de morte microbiana).

2.3.4. Inibição da Aderência celular sobre a superfície de vidro



Para o teste de aderência celular sobre a superfície de vidro, a suspensão bacteriana para os microrganismos testados foi homogeneizada com meio líquido BHI enriquecido com sacarose a 10% na proporção 1:1000 (v/v), obtendo uma concentração bacteriana em torno de 1-2 x 10^5 ufc/mL. Uma alíquota de 2480 µL foram transferidos para os tubos de vidro, sendo adicionados posteriormente 20 µL do dos compostos isolados de *M. glomerata* (*ácido diterpênico, ácido caurenóico, ácido cupressênico, grandiflórico e espatulenol*), variando concentração final de 1,5 a 800 µg/mL, em razão 2, ou controle (80% etanol, v/v, ou absoluto, v/v), sendo incubados nas condições 2.3.1., num ângulo de 30°, segundo descrito por Hamada e Torii (1978). Após incubação, as células aderidas foram lavadas e suspensas em 5 mL de tampão fosfato de potássio 0.05M, pH 6.8. Foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 550 nm.

3.0. Resultados e Discussão

Como já foi dito anteriormente no relatório parcial de todos os compostos testados, o ácido grandiflórico, espatulenol e o caurenol não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações testadas , sendo apresentado na tabela somente os resultados dos compostos que apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados. Desta forma, somente três compostos testados foram efetivos, sendo eles o ácido diterpênico, ácido cupressênico e ácido caurenóico, que inibiram tanto o crescimento celular quanto a morte celular dos estreptococos testados.

Dentre os três compostos testados o ácido cupressênico foi o composto que apresentou os menores valores de CIM e CBM (2,5 µg/ml para ambos os testes) e o ácido diterpênico apresentou os maiores valores de CIM e CBM (20 µg/ml e 40 µg/ml, respectivamente) entre os compostos testados.

Os compostos ácidos caurenóico, diterpênico e cupressênico, identificados da fração hexânica (fração apolar) de ambos os tipos de *Mikania* podem ser os responsáveis pela grande atividade antimicrobiana demonstrada pelos baixos valores de CIM e CBM obtidos contra os estreptococos do grupo mutans. Davino *et al.* (1989) descreveu que dois ácidos caurenóicos (ácido caurenóico e ácido cinamoilgrandiflórico) demonstraram atividades antimicrobiana e antifúngica contra alguns patógenos. Os diterpênicos isolados das folhas de *Rabdosia trichocarpa* têm sido responsabilizados pela atividade antimicrobiana contra alguns microrganismos orais (Osawa *et al.*, 1992). Entretanto, alguns compostos identificados da *Mikania*, como o ácido cupressênico, ainda não foram investigados, e pouco se sabe da sua atividade antimicrobiana contra os microrganismos orais ou sobre seu efeito na formação de placa dental *in vitro*.

Os resultados obtidos nos teste de MIC e MBC seguem na tabela 3.

Tabela 3: CIM e CBM expressas em μg/mL. As concentrações dos extratos variaram de 3,125 a 800 μg/mL.

	Fr. Hexânica		***Ác. Cupressênico***		***Ác. Caurenóico***		***Ác. Diterpênico***	
Microrganismos	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**
***S. mutans* UA 159**	12,5	25	5	5	5	5	20	20
***S. mutans* Ingbritt 1600**	25	50	5	20	5	20	10	40
***S. mutans* D 1**	25	50	5	10	5	5	10	10
***S. mutans* P 20**	25	50	2,5	5	5	5	10	20
***S. sobrinus* 6715**	25	25	2,5	2,5	5	5	10	10
***S. sobrinus* S 2**	25	50	5	5	5	10	20	20
S. sobrinus P7	25	50	5	5	5	10	10	20
Actinomyces naeslundii ATCC 19246	12,5	25	2,5	5	2,5	5	5	5
Enterococcus faecalis ATCC 29212	25	50	5	5	5	10	20	20

Após a realização dos teste de MIC e MBC para os microrganismos propostos no projeto original do trabalho, foi dada continuação ao mesmo realizando o teste de aderência celular sobre superfície de vidro, e os resultados obtidos serão expressos na tabela 4; podendo ser

observado na mesma que os resultados positivos foram os que se expressam em valores sub-CIM como pode ser visto em todos os compostos para o *S. mutans Ingbritt 1600,* e para o *S. sobrinus 6715.*

Tabela 4: CIM e ADE expressas em µg/mL. As concentrações dos extratos variaram de 3,125 a 800 µg/mL.

Microrganismos	Fração hexânica µg/mL		Ácido caurenóico µg/mL		Ácido diterpênico µg/mL		Ácido cupressênico µg/mL	
	MIC	Adh	MIC	Adh	MIC	Adh	MIC	Adh
***S. mutans* UA 159**	12,5	12,5	5	5	5	2,5	10	2,5
***S. mutans* Ingbritt 1600**	25	12,5	5	2,5	10	5	5	1,25
***S. mutans* D 1**	25	25	5	5	5	2,5	10	5
***S. mutans* P 20**	25	25	2,5	2,5	5	5	10	2,5
***S. sobrinus* 6715**	25	12,5	5	2,5	10	5	5	1,25
***S. sobrinus* S 2**	25	25	5	5	5	5	20	5
S. sobrinus P7	25	12,5	5	5	5	5	10	5
Actinomyces naeslundii ATCC 19246	12,5	12,5	12,5	12,5	5	5	2,5	2,5
Enterococcus faecalis ATCC 29212	25	25	5	5	10	10	5	2,5

4.0. Conclusões

Além dos resultados de atividade antimicrobiana obtidos e discutidos até o presente momento para os três compostos identificados e isolados da *Mikania,* observa-se com o termino dos testes realizados que estes compostos apresentam também ação sobre o mecanismo de aderência dos microrganismos do grupo mutans. Apresentando para os microrganismos S. mutans Ingbritt 1600, e S. sobrinus 6715, valores Sub-CIM para todos os extratos testados comprovando assim sua ação.

Deve-se salientar entretanto que o ácido cupressênico, que apresentou maior efetividade para os testes de CIM e CBM, foi o composto que realizou a inibição do mecanismo de aderência celular sobre todos os microganismos testados, comprovando assim sua eficácia como agente antimicrobiano.

Os resultados dos testes microbiológicos também sugerem que os isolados clínicos possuem uma certa uniformidade de comportamento microbiano entre eles, porém diferem, em geral, dos seus correspondentes de coleção, que são mais sensíveis à ação dos extratos estudados que os isolados clínicos recentes.

Desta forma, pode-se concluir com o estudo realizado que os três compostos analisados podem ser promissores agentes antimicrobianos no controle dos microrganismos aqui estudados.

Referências

1. MARSH, P.D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv Dent Res**, Washington, **8**: 263-71, 1994.

2. CASTRO, V., JAKUPOVICc, J., BOHLMANN, F. (1986) Sesquiterpene lactones from *Mikania* Species; *Phytochemistry* **25**: (7) 1750-1752.

3. CECANHO, R.; KOO, H.; ROSALEN, P. L. J. A.; PIEROBON, C. N.; PARK, Y. K.; REHDER, V. L. G.; FOGLIO, M. A. ; QUEIROGA, C. L., XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil - 14-17 de outubro de 1998 - Águas de Lindóia-SP. "Atividades antimicrobianas de extratos de plantas medicinais sobre patógenos bucais ".

4. CECANHO, R.; KOO, H.; ROSALEN, P. L. J. A.; PARK, Y. K.; CURY, J.A. "Efeito do extrato hidroetanólico de *Mikania laevigata* sobre o crescimento bacteriano e a produção de glucanos por estreptococos do grupo *mutans*". Anais da XIV Reunião Anual da FESBE (Federação da Sociedade de Biologia Experimental), v.14, p.290 (resumo #12.095), 25/28 /agosto/ 1999. Caxambu, 1999.

5. ISRAELSON, L. The role of natural products in oral health care. **J. Clin. Dent., (Spec. Iss)**: 5-6, 1991.

6. LEWIS H. & ELVIN- LEWIS M.P.F IN: Medical Botany. New York, Wiley & Sons, 1977.

7. PHILLIPS, I. A guide to sensitivity testing. **J Antimicrob Chemother**, London, **27**: 1-50, 1991.

8. PIDDOCK, L.J.V. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. **J Appl Bacteriol**, Oxford, **68**: 307-18, 1990.

9. PEREIRA, N. A.; PEREIRA, B. M. R.; do NASCIMENTO, M. C.; PARENTE, J. P. e MORS, W. B. (1994). Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antifotes, IV. Protection against jararaca venom by isolated constituints. ***Planta Med.*** **60**, 99-100.

10. PIO CORRÊA, M. (1942); Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, Vol. 3, pp. 517-520. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro.

11. KOO, H. et al. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. **Curr Microbiol**, **41**: 192-8, 2000b.

12. HAMADA, S. & TORI, M. Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. **Infect. Immun., 20:** 592-599, 1978.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA