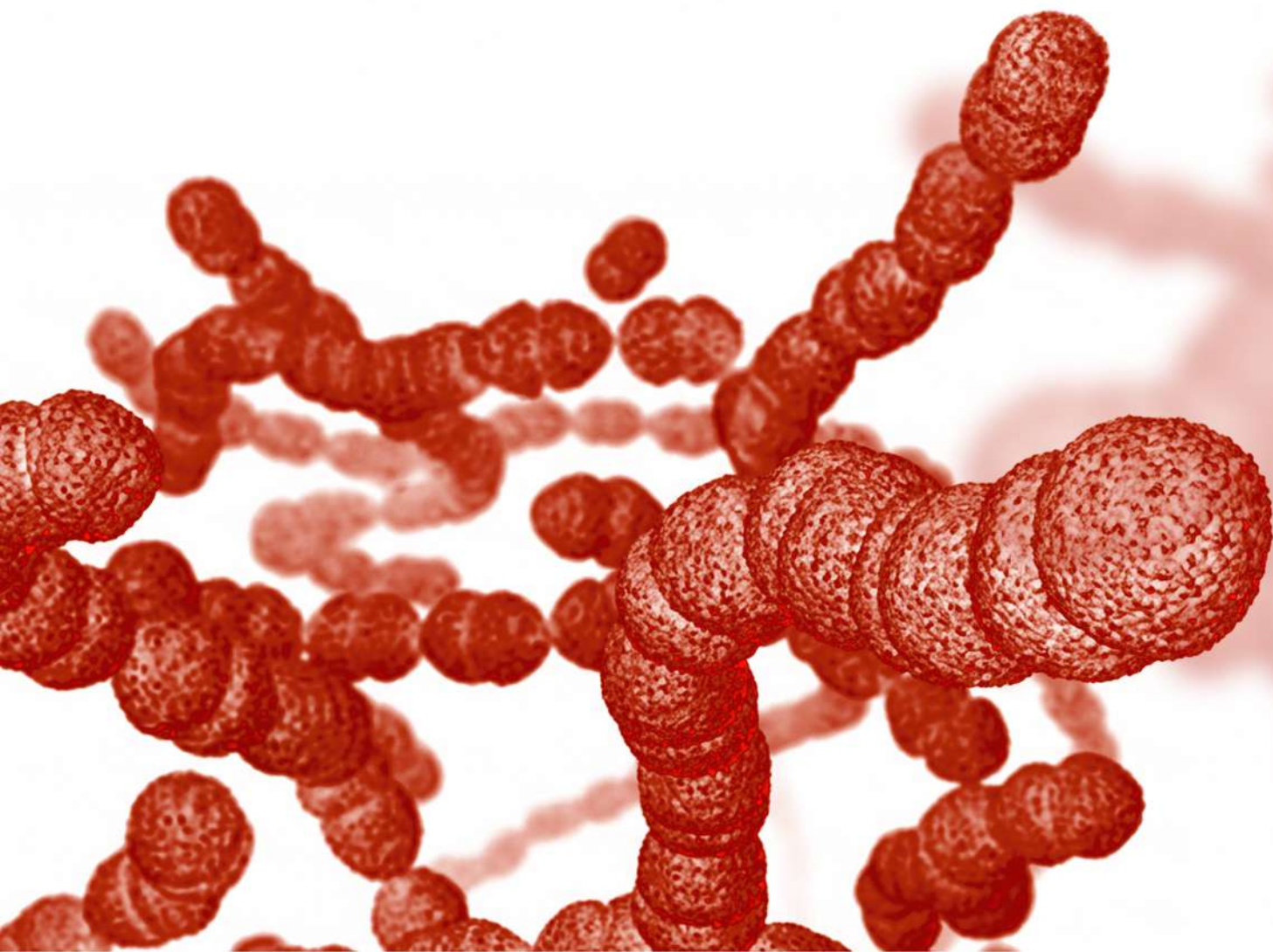





SEVEN

EDITORA
2026

MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL
DE DITERPENOS NATURAIS
E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA FRENTE ÀS BACTÉRIAS
CARIOGÊNICAS E PERIODONTAIS



Larissa Costa Keles de Almeida, Douglas Henrique Ferreira Amaral,
Maria Eduarda da Silva, Sharlles Batista Martins
Carlos Henrique Gomes Martins, Vladimir Constantino Gomes Heleno



EDITORA CHEFE

Prof^o Me. Isabele de Souza Carvalho

EDITOR EXECUTIVO

Nathan Albano Valente

AUTORES DO LIVRO

Larissa Costa Keles De Almeida

Douglas Ferreira Do Amaral

Maria Eduarda da Silva

Sharlles Batista Martins

Carlos Henrique Gomes Martins

Vladimir Constantino Gomes Heleno

2026 by Seven Editora

Copyright © Seven Editora

Copyright do Texto © 2026 Os Autores

Copyright da Edição © 2026 Seven Editora

PRODUÇÃO EDITORIAL

Seven Publicações Ltda

EDIÇÃO DE ARTE

Evellyn Thais de Souza

EDIÇÃO DE TEXTO

Stephanie Caroline Meyer de Quadros

BIBLIOTECÁRIA

Bruna Heller

IMAGENS DE CAPA

Evellyn Thais de Souza

O conteúdo do texto e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Seven Publicações Ltda. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Seven Publicações Ltda é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação.

Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.



O conteúdo deste Livro foi enviado pelos autores para publicação de acesso aberto, sob os termos e condições da Licença de Atribuição Creative Commons 4.0 Internacional

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

M692

Modificação Estrutural de Diterpenos Naturais e Avaliação da Atividade Antimicrobiana frente às Bactérias Cariogênicas e Periodontais [recurso eletrônico] / Larissa Costa Keles De Almeida ... [et al.]. – São José dos Pinhais, PR: Editora Seven, 2026.

Dados eletrônicos (1 PDF).

ISBN 978-65-6109-293-7

1. Diterpenos. 2. Antimicrobiano. 3. Bactérias.
4. Biotecnologia. I. Almeida, Larissa Costa Keles de. I
I. Amaral, Douglas Ferreira do. III. Silva, Maria Eduarda da.
IV. Martins, Sharlles Batista. V. Título.

CDU 616-008.87

Bruna Heller - Bibliotecária - CRB10/2348

Índices para catálogo sistemático:

1 Bactérias 616-008.87

DOI: 10.56238/livrosindi202621-001

Seven Publications Company
CNPJ: 43.789.355/0001-14
editora@sevenevents.com.br
São José dos Pinhais/PR

AUTORES DO LIVRO

Larissa Costa Keles De Almeida

Douglas Ferreira Do Amaral

Maria Eduarda da Silva

Sharlles Batista Martins

Carlos Henrique Gomes Martins

Vladimir Constantino Gomes Heleno

RESUMO

A obtenção de substâncias novas com potencial biológico de interesse pode ser alcançada através do isolamento de substâncias naturais abundantes e subsequente realização de modificação estrutural pelo método de semissíntese. Isto é feito por reisolamento de substâncias mais abundantes já conhecidas, de fontes botânicas também já estudadas e que podem ser transformadas quimicamente para fornecer novas estruturas. Desta forma, pode-se obter uma variedade de substâncias que podem apresentar novas atividades, maior potencial em uma dada atividade ou menor toxicidade. Vale ressaltar que o estudo de novas espécies forneceria um número bem mais limitado de novas estruturas para serem testadas. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi investigar a atividade de 31 diterpenos obtidos por semissíntese frente a sete bactérias cariogênicas e cinco bactérias periodontais pelo método de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e comparar os resultados obtidos com os já descritos na literatura. No levantamento bibliográfico realizado foram encontrados 18 artigos sobre a atividade antibacteriana de 53 moléculas de diterpenos frente aos mesmos microrganismos. A maior parte delas pertencente às classes dos labdanos (14 compostos, 26,42%), cauranos (13 compostos, 24,52%) e dos pimaranos (13 compostos, 24,52%). Além disso, foram encontrados 6 compostos diterpênicos da classe dos abietanos (11,32%), 3 compostos do tipo traquilobanos (5,66%), 2 compostos do tipo rosano (3,77%), 1 (1,89%) casbeno e 1 (1,89%) beyerano. Não foi encontrada literatura científica relatando a avaliação biológica de diterpenos das demais classes existentes. Os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana das 31 substâncias frente a 12 bactérias mostraram que o menor valor de CIM contra o conjunto de microrganismos testados foi de 50 µg/mL e dessas, as substâncias 28, 29 e 31 foram as mais efetivas frente aos microrganismos cariogênicos e periodontais. O grande volume de resultados apresentados (372 resultados, 97,64% em relação ao total de 381 já descritos na literatura) contribui de maneira significativa para ampliar o conhecimento do potencial antimicrobiano dos diterpenos, aumentando as informações para um estudo da relação estrutura-atividade (SAR).

Palavras-chave: Diterpenos; Bactérias Cariogênicas; Bactérias Periodontais.

LISTA DE SÍMBOLOS, FÓRMULAS QUÍMICAS E ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
A	Abietano
AAS	Ácido acetilsalicílico
ATCC	American Type Culture Collection
B	Beyerano
e	Caurano
Cb	Casbeno
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCC	Coluna cromatográfica clássica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CEO-D	Dentição decídua
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CLV	Cromatografia Líquida à Vácuo
CPI	Índice Periodontal Comunitário
CPOD	Cariados perdidos e obturados/dente
CPO-D médio	Dentição permanente
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
FDA	Food and Drug Administration
FPP	Famesil difosfato
g	Grama
GPNUF	Grupo de Produtos Naturais da Universidade de Franca
GPP	Geranil difosfato
GGPP	Geranilgeranil difosfato
HBD	Grupo hidrofílico doador de ligação de hidrogênio
Hz	Hertz
IPP	Isopentenil difosfato

L	Labdano
LaPeMA	Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada
MEP	Metileritritol fosfato
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NCE	Novas entidades químicas aprovadas
ND	Derivados de produtos naturais produzidos por semissíntese
nm	Nanômetro
p	Pimarano
PA	Diterpeno ácido ent-pimara- 8(14), 15-dien-19-óico
R	Rosano
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SAR	Relação estrutura-atividade
SNC	Sistema nervoso central
T	Traquilobano
TSB	Caldo Triptona soja
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	11
1.1 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE FÁRMACOS OU DE PROTÓTIPOS.....	11
1.2 PLANTAS MEDICINAIS E PROBLEMAS BUCAIS.....	19
1.2.1 Terpenoides.....	21
1.2.1.1 Diterpenos.....	23
<i>1.2.1.1.1 Atividades Biológicas de Diterpenos.....</i>	<i>26</i>
1.2.2 Problemas bucais: cárie e periodontite.....	35
1.2.2.1 A cavidade bucal e a formação de placa bacteriana.....	35
1.2.2.2 Cárie dental.....	37
1.2.2.3 Doença periodontal.....	40
1.2.2.4 Controle da placa dental.....	43
2 OBJETIVOS.....	46
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO.....	47
3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	47
3.3 REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS.....	47
3.4 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS NOS ENSAIOS.....	48
3.4.1 Obtenção das substâncias.....	52
3.4.1.1 Reisolamento e Purificação de ácido caurenóico de <i>M glomerata</i>	52

3.4.1.2	Reação do ácido caurenóico com bromobutano.....	53
3.4.1.3	Reação do ácido caurenóico com MeOH e ácido sulfúrico.....	53
3.4.1.4	Modificações estruturais a partir do ácido caurenóico metoxilado.....	54
3.4.1.4.1	<i>Reação ácido caurenóico metoxilado com brometo de 4-clorobenzila.....</i>	<i>54</i>
3.4.1.4.2	<i>Reação ácido caurenóico metoxilado com brometo de benzila.....</i>	<i>55</i>
3.4.1.4.3	<i>Reação ácido caurenóico metoxilado com iodometano.....</i>	<i>56</i>
3.4.1.5	Reação do ácido pimaradienóico hidrogenado com brometo de benzila.....	56
3.4.2	Identificação do material de partida e dos produtos obtidos.....	57
3.5	AVALIAÇÃO DA ATNIDADE ANTIMICROBIANA.....	57
3.5.1	Equipamentos e materiais utilizados.....	57
3.5.2	Meios de cultura e reagentes utilizados.....	58
3.5.3	Atividade antimicrobiana frente aos microrganismos cariogênicos.....	59
3.5.3.1	Microrganismos utilizados.....	59
3.5.3.2	Preparo das soluções, meios de cultura e inóculos.....	59
3.5.3.2.1	<i>Preparo do ágar sangue BD®.....</i>	<i>59</i>
3.5.3.2.2	<i>Preparo do caldo triptona soja BD®.....</i>	<i>59</i>
3.5.3.2.3	<i>Preparo das amostras.....</i>	<i>60</i>
3.5.3.2.4	<i>Preparo dos inóculos.....</i>	<i>60</i>
3.5.3.2.5	<i>Preparo do controle positivo.....</i>	<i>60</i>
3.5.3.2.6	<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo usando microplacas.....</i>	<i>61</i>

3.5.4 Atividade antimicrobiana frente aos microrganismos endodônticos.....	64
3.5.4.1 Microrganismos utilizados.....	64
3.5.4.2 Preparo das soluções, meios de cultura e inóculos.....	64
3.5.4.2.1 Preparo da solução de hemina.....	64
3.5.4.2.2 Preparo da solução de menadione.....	64
3.5.4.2.3 Preparo do caldo Brucella (Difco).....	64
3.5.4.2.4 Preparo do Ágar Schaedler (Difco).....	65
3.5.4.2.5 Preparo das amostras.....	66
3.5.4.2.6 Preparo do controle positivo.....	66
3.5.4.2.7 Padronização da densidade do inóculo.....	66
3.5.4.2.8 Preparo da suspensão bacteriana.....	67
3.5.4.2.9 Distribuição das amostras na microplaca pelo método da microdiluição em caldo para determinação da CIM.....	67
3.5.5 Leitura dos resultados.....	70
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.1 IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL DE PARTIDA E DOS PRODUTOS OBTIDOS.....	71
4.1.1 Identificação do ácido caurenóico.....	71
4.1.2 Identificação do caurenato de butila.....	73
4.1.3 Identificação do ácido caurenóico metoxilado.....	73
4.1.4 Identificação do caurenato de 4-clorobenzila metoxilado.....	74
4.1.5 Identificação do caurenato de benzila metoxilado.....	75

4.1.6 Identificação do caurenoato de metila metoxilado.....	76
4.1.7 Identificação do pimaradieonato de benzila hidrogenado.....	76
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A MICRORGANISMOS CARIOGÊNICOS E PERIODONTAIS.....	79
4.2.1 Revisão de Literatura.....	79
4.2.2 Resultados Experimentais obtidos neste Trabalho.....	96
CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS.....	109

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

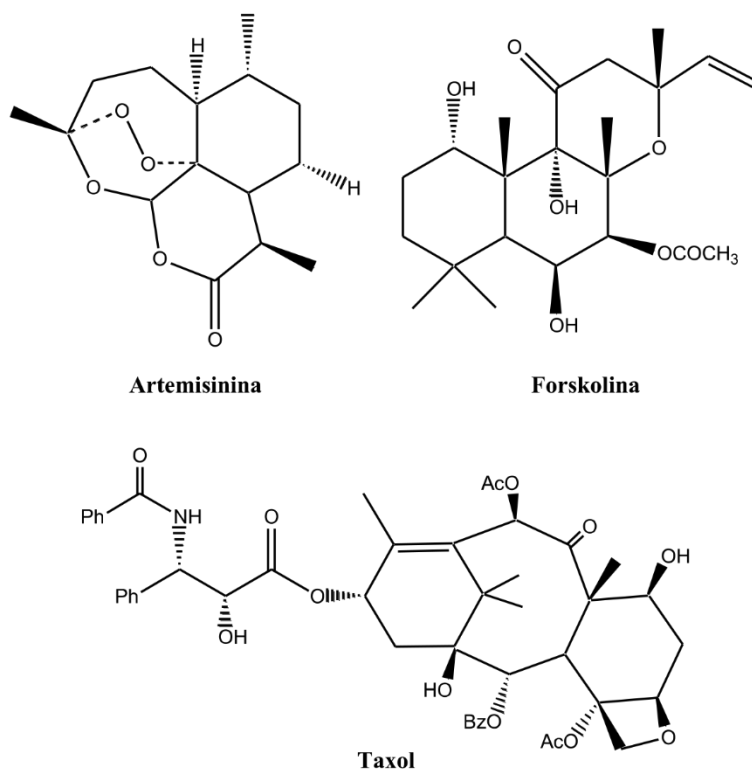
1.1 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE FÁRMACOS OU DE PROTÓTIPOS

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas (MONTANARI, et al., 2001) através de plantas, insetos, microrganismos e organismos marinhos que por exibirem complexa interação com o meio ambiente, produzem metabólitos utilizados para a sua sobrevivência (PUPO, 2006; MONTANARI, et al., 2001).

Uma vez que os metabólitos podem exibir amplo espectro de aplicações biológicas (ALMEIDA, 2010) e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico (CARRIJO, 2013), podendo ser utilizados no processo de desenvolvimento e descoberta de novos fármacos (PUPO, 2006; ALMEIDA, 2010; AMBROSIO, et al., 2011; BARRETO, 2011), têm atraído grandes investimentos em pesquisas com o objetivo de se obter novas entidades químicas farmacologicamente ativas (PUPO, 2006; MONTANARI et al., 2001).

Ganesan (2008) relatou a descoberta de 24 fármacos inovativos derivados de produtos naturais após 1970 e com aprovação no período de 1981-2006. Destes, 5 foram isolados de plantas (taxol (anticâncer, Figura 1) , arglabina (anticâncer), artemisinina (antimalárico, Figura 1), forskolina (bronco e vasodilatador, Figura 1) e flaunotol (antiúlcera) e 19 foram produzidos por microrganismos (13 de actinobactérias, 2 de bactérias e 4 de fungos). Os fármacos derivados de bactérias foram ácido pseudomônico (antibacteriano) e spergualina (imunossupressor). Os fármacos derivados de fungos foram compactina (hipolipêmico), echinocandina B (antifúngico), mizoribina (imunossupressor oral) e ciclosporina A (imunossupressor). Os fármacos derivados de actinobactérias foram midecamicina (antibiótico), cefamicina (antibiótico), tienamicina (antibiótico), SQ26, 180 (antibiótico), daptomicina (antibiótico), cofomicina (anticâncer), bestatina (anticâncer), calicheamicina (anticâncer), rapamicina (imunossupressor), FK506 (imunossupressor), a vermetina B1a (antiparasitário), lipstatina (antiobesidade) e validamicina (antidiabético) (GANESAN, 2008).

Figura 1 - Alguns produtos naturais aprovados como fármacos (1970-2006).



Fonte: ALMEIDA, 2010.

A literatura relata que em 2008 havia mais de 100 compostos derivados de produtos naturais em fase de desenvolvimento clínico, sendo a maioria destes compostos produzidos por plantas e microrganismos. Esses novos compostos eram especialmente anticancerígenos e anti-infecciosos (COSTA-LOTUFO, 2010; HARVEY, 2008).

Newman e Cragg (2012) fizeram uma revisão sobre todos os agentes terapêuticos aprovados entre 1 de janeiro de 1981 a 31 de dezembro de 2010 em relação a todas as doenças e a partir de 1950 até 2010 para os fármacos antitumorais aprovados no mundo. Relataram que entre 2006 e 2010, seis novos antimicrobianos foram aprovados, sendo 3 deles produzidos por semissíntese (retapamulina, cefalosporina e telavancina) e três produzidos por síntese (garenoxacina, sitafloxacina e besifloxacina). Além disso foi desenvolvido um antifúngico (anidulafungina) e sete fármacos foram aprovados para uma variedade de doenças virais.

O mesmo trabalho também mostrou que técnicas de química combinatória têm sido usadas com sucesso na otimização de novas estruturas relacionadas com muitos dos agentes aprovados recentemente. Além disso, os dados mostraram que os produtos naturais estão fortemente relacionados ao fornecimento de novas estruturas. O trabalho mostrou que em 2009, os produtos naturais relacionavam-se com 20,8% de novas entidades químicas

aprovadas (NCE) e houve um aumento para 50,0% de NCE em 2010 (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Dados mostram também que as principais áreas relacionadas com a produção de novas entidades químicas na indústria farmacêutica são doenças infecciosas (antibacterianos -118 NCE, antifúngicos- 28NCE e antivirais -110 NCE), câncer (128 NCE), hipertensão (79 NCE) e inflamação (51 NCE) e diabetes (37 NCE). Considerou-se B como produtos biológicos, N como produtos naturais, NB como produtos naturais botânicos, ND como derivados de produtos naturais produzidos por semissíntese, S como um fármaco totalmente sintético, S* como um fármaco sintético com grupo farmacofórico baseado em um produto natural, V como vacina e NM como um mímico de produto natural. Do total de 1130 substâncias, 144 são B, 47 são N, 3 são NB, 247 são ND, 325 são S, 130 são S/NM, 50 são S*, 116 são S*/NM e 68 são V (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Apesar de os metabólitos secundários de plantas serem considerados uma rica fonte de novos agentes potenciais terapêuticos, somente um pequeno número de avaliações farmacológicas tem sido realizadas (AGUIAR, 2009; ALMEIDA, 2010; PORTO, 2009a). Diante disso e relacionando com os dados anteriormente mostrados, os produtos naturais devem ser cada vez mais valorizados como fontes de moléculas promissoras devido aos avanços em sínteses e tecnologias biossintéticas que permitem oferecer novos caminhos para a otimização da química medicinal a partir de metabólitos secundários biologicamente ativos (CARTER, 2011).

O estudo para a descoberta de produtos naturais bioativos é importante não apenas pela necessidade de caracterização das propriedades farmacológicas das moléculas em questão, mas também pelo conhecimento de novas substâncias que possam servir de modelos (protótipos) para originar análogos estruturais com propriedades farmacológicas mais promissoras (MONTANARI, 2001; PORTO, 2009a; VUORELA et al., 2004).

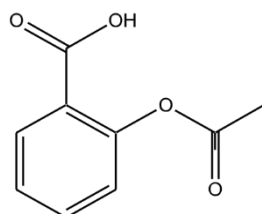
A obtenção de substâncias novas com potencial pode ser realizada através do estudo de novas espécies pelo isolamento de substâncias ativas de produtos naturais; através do método de síntese ou pelo método de semissíntese, que se trata do reisolamento de substâncias já conhecidas de fontes botânicas também já estudadas e que podem ser transformadas quimicamente em novas estruturas. Todas as formas possibilitam obter novas substâncias que podem apresentar novas atividades, maior potencial em uma dada atividade ou menor toxicidade.

A síntese de fármacos é uma importante área da química orgânica, uma vez que permite a construção de moléculas, em seus diversos níveis de complexidade. Apresenta

características particulares, pois além de racionalizar uma sequência de etapas sintéticas visando obter os melhores rendimentos possíveis, é necessário também dispensar atenção ao grau de pureza e à escala da reação (MENEGATTI, 2001).

O ácido acetilsalicílico (AAS) foi o primeiro fármaco sintético empregado na terapêutica (Figura 2).

Figura 2 - Fórmula estrutural do ácido acetilsalicílico.

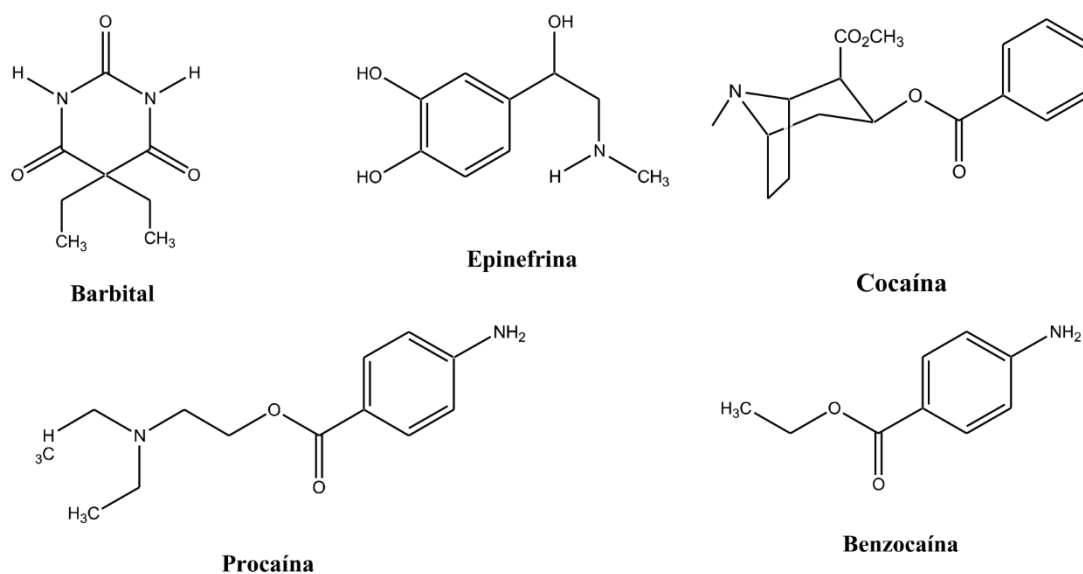


Fonte: ALMEIDA, 2010.

As propriedades terapêuticas do AAS levaram os laboratórios de pesquisa da Bayer a o elegerem como um novo produto a ser lançado no mercado para competir com os salicilatos naturais, o que ocorreu a partir de 1897 sob o nome de Aspirina®. Após mais de 100 anos de sua descoberta, o AAS continua sendo alvo de inúmeras pesquisas sobre sua aplicação terapêutica como analgésico e anti-inflamatório, atuando no controle da febre, na artrite reumatóide e na inibição da agregação plaquetária (VIEGAS JR et al., 2006).

Outros marcos relacionados ao desenvolvimento de novos fármacos pelo método de síntese foram o surgimento do barbital (ácido 5,5-dietilbarbitúrico), em 1903, indicado como agente hipnótico; da epinefrina (broncodilatador e descongestionante nasal), em 1904, seguida da procaína e da benzocaína, dois anestésicos locais pertencentes à classe dos ésteres do ácido para-aminobenzóicos, sintetizados a partir da estrutura da cocaína (Figura 3).

Figura 3 - Alguns fármacos produzidos por síntese e a cocaína.



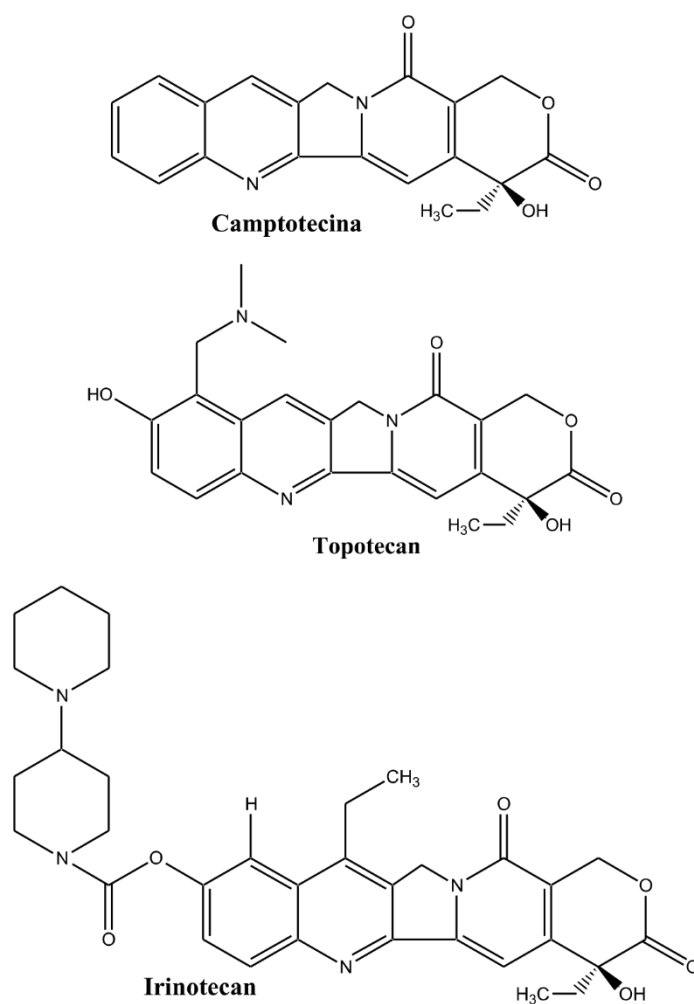
Fonte: VIEGAS JR et al., 2006.

Já a semissíntese surgiu como uma ferramenta para promover modificações estruturais a fim de modular as propriedades biológicas dos produtos puramente naturais, uma vez que frequentemente, produtos naturais apresentam problemas relacionados às suas características físico-químicas implicando em parâmetros farmacocinéticos deficientes (OLIVEIRA, 2012).

Um exemplo clássico é a camptotecina (Figura 4), isolada a partir de uma árvore chinesa, *Camptotheca acuminata* em 1966. Quase 20 anos depois, o único mecanismo de ação identificado para este potente agente citotóxico foi a inibição da topoisomerase I no DNA (VIEGAS JR et al., 2006). A baixa solubilidade em água e a dificuldade na obtenção de sal estável da molécula inviabilizam o uso na forma injetável.

A solução surgiu com o desenvolvimento dos derivados semissintéticos Irinotecan (CPT-11, Camptosar®, Figura 4) e Topotecan (Hycantina®, Figura 4) (VIEGAS JR et al., 2006, OLIVEIRA, 2012), ambos solúveis em água na forma de sais que foram preparados preservando a subunidade iridídica farmacofórica, representada pelo anel lactônico hidroxilado, devido à introdução de grupos básicos em suas estruturas. Estas duas substâncias foram aprovadas pelo "Food and Drug Administration" (FDA) dos EUA, em 1996, e atualmente são comercializadas pela GlaxoSmithKline e Pfizer (Farmácia), respectivamente, para tratamento de câncer de cólon e de ovário (OLIVEIRA et al., 2012).

Figura 4 - Fármacos derivados da camptotecina e a camptotecina.



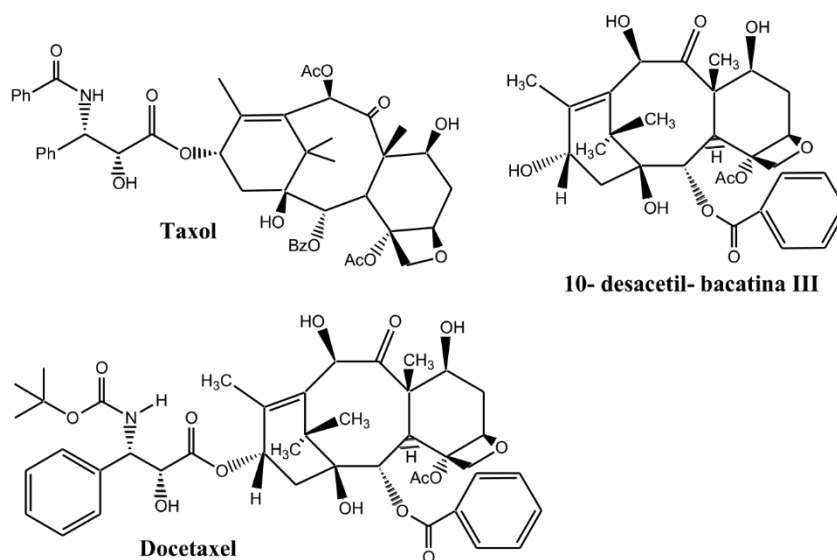
Fonte: VIEGAS JR et al., 2006.

Em alguns casos a obtenção de grandes quantidades de um produto de origem natural inviabiliza o seu uso para a produção do fármaco, quer seja pelo custo ou pela escassez de fontes renováveis, como aconteceu com o taxol (Figura 5) (OLIVEIRA et al., 2012; MONTANARI, 2001). Para se extrair 1 kg de taxol, precisava-se de 10 t de cascas de *T brevifolia*, o que representa cerca de 3000 árvores (VIEGAS JR et al., 2006).

A alternativa encontrada foi a obtenção desse antitumoral semissinteticamente a partir de um molécula também natural desprovida de atividade, mas de fácil obtenção, a 10-desacetil-bacatina III (Figura 5) (OLIVEIRA et ai., 2012). A 10-desacetil-bacatina III pode ser obtida em rendimento de 0,1% a partir das folhas de *Taxus baccata* cultivada, o que representou um rendimento 5 vezes superior ao do taxol. A rota semissintética empregada para a produção do taxol a partir da mesma consiste em 4 etapas sintéticas consecutivas, fornecendo o taxol em rendimentos de 52% (VIEGAS JR et al., 2006). Outro produto obtido por semissíntese a partir da 10-desacetil-bacatina III é o taxotere (docetaxel,

Figura 5), análogo duas vezes mais ativo que o próprio taxol (Figura 5), produzido pelo grupo Greene em 1994 (VIEGAS JR et al., 2006).

Figura 5 - Fármacos antineoplásicos derivados da 10- desacetil-bacatina III e a 10- desacetil- bacatina III.

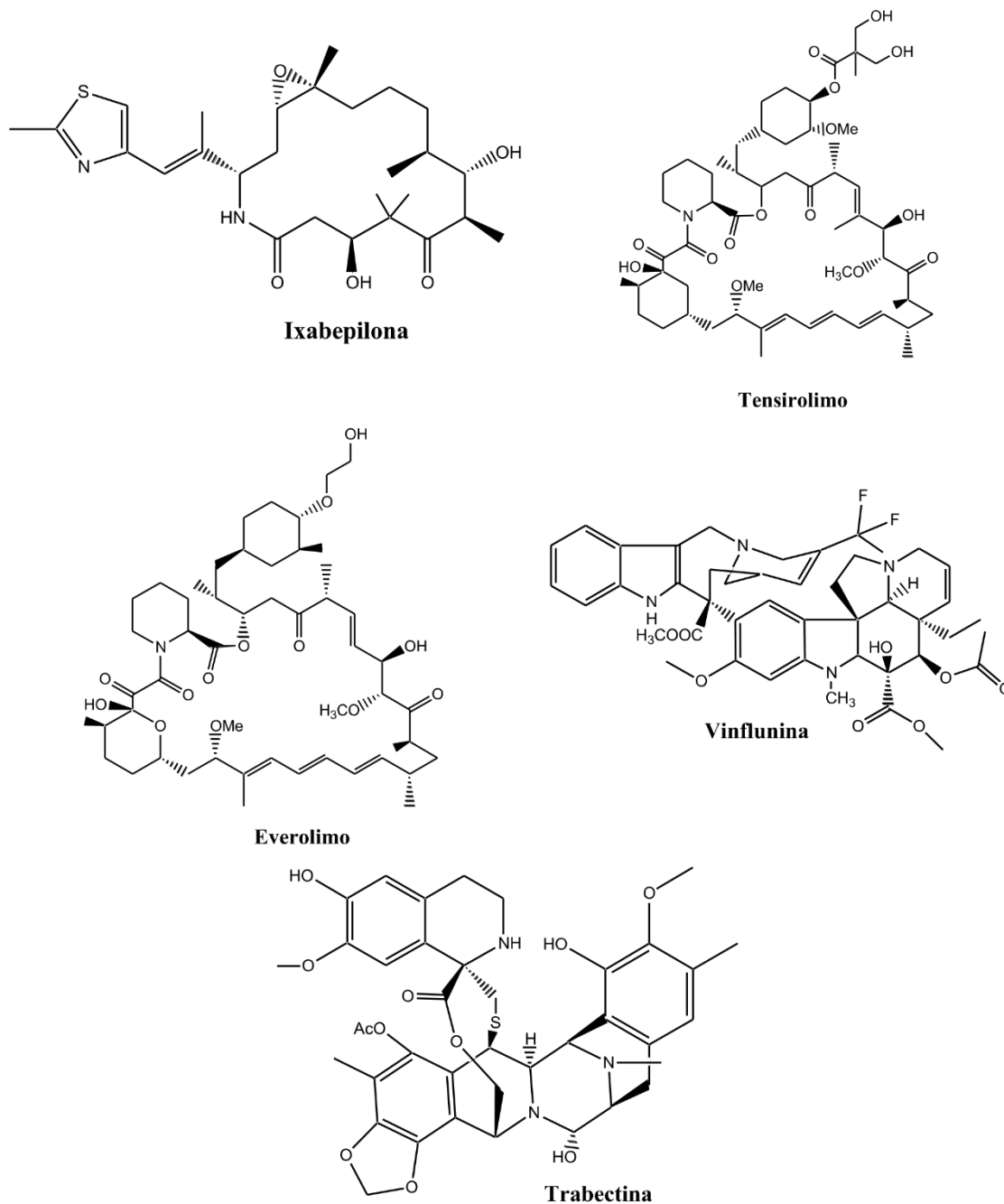


Fonte: VIEGAS JR et al., 2006.

Outros exemplos de fármacos desenvolvidos por semissíntese são também anticancerígenos, que se tratam de fármacos amplamente estudados a fim de serem obtidas terapias alternativas contra essa doença de alta prevalência mundial. A ixabepilona (Figura 6), assim como o tensirolimo (Figura 6) e o everolimo (Figura 6) são derivados semissintéticos que foram desenvolvidos para resolver problemas farmacocinéticos dos seus precursores naturais ativos (OLIVEIRA et al., 2012).

Já a vinflunina (Figura 6) foi semissintetizada com a intenção de aumentar o espectro de atividade em relação ao seu precursor e a trabectina (Figura 6) foi desenvolvida para contornar os baixos rendimentos na extração da matéria-prima. Assim, modificações estruturais nas moléculas originais resultaram em fármacos mais eficazes para o tratamento desta doença (Figura 6) (OLIVEIRA et al., 2012).

Figura 6 - Fármacos antineoplásicos produzidos por semissíntese.

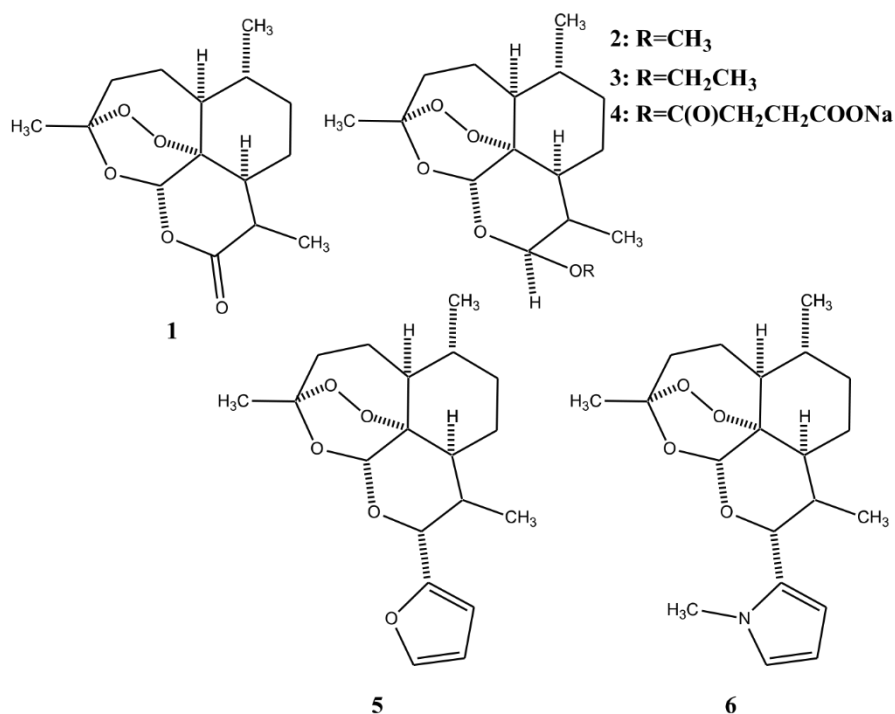


Fonte: OLIVEIRA et al., 2012.

Outra substância natural que apresenta originalidade e complexidade estruturais capazes de inspirar novos fármacos úteis para tratamento da malária, importante doença tropical negligenciada, é a artemisinina (1, Figura 7), importante protótipo- natural antimalárico, isolado de *Artemisia annua*, planta muito conhecida e utilizada na medicina chinesa. Entretanto, devido à sua baixa solubilidade e propriedades farmacocinéticas inadequadas ao uso terapêutico, vários análogos modificados foram sintetizados (VIEGAS JR et al., 2006).

Estudos de relação estrutura-atividade (SAR) revelaram que a função endoperóxido, contida no sistema trioxânico é a subunidade farmacofórica. Dentre os derivados ativos, obtidos por semissíntese, encontra-se o β -arteméter (2, Figura 7), o arte-éter (3, Figura 7) e o artesunato de sódio (4, Figura 7). As limitações de biodisponibilidade foram contornadas mantendo-se a unidade farmacofórica trioxânica e modificando-se os substituintes em C- 10, o que deu origem ao análogo furânico (5, Figura 7) e seu isômero N-metil-pirrólico (6, Figura 7), que se constituem nos primeiros compostos trioxânicos ativos, por via oral, contra o *Plasmodium falciparum*, o mais letal agente causador da malária (VIEGAS JR et al., 2006).

Figura 7 - Artemisinina e derivados semissintéticos antimaláricos.



Fonte: VIEGAS JR et al., 2006.

1.2 PLANTAS MEDICINAIS E PROBLEMAS BUCAIS

O Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento da fitoterapia aplicada, inclusive ligado à Odontologia, pois possui a maior diversidade vegetal do mundo, além de ampla sociodiversidade e vinculação do uso de plantas medicinais ao conhecimento tradicional, bem como tecnologia para validar cientificamente esse conhecimento (ALBUQUERQUE et al., 2006). Além disso, apresenta cerca de 20% das 250 mil espécies medicinais catalogadas pelas Organizações das Nações Unidas (ONU), o que facilita o

aproveitamento do potencial terapêutico dos vegetais para o tratamento de diversas doenças (DRUMOND, 2004).

Apesar da utilização de plantas medicinais para tratar doenças bucais ou para tratar doenças sistêmicas com manifestações bucais ainda serem pouco exploradas, nos últimos anos as pesquisas relacionadas aos produtos naturais cresceram significativamente com objetivo de se buscar produtos com menor toxicidade, biocompatíveis, com maior atividade farmacológica e com custos mais acessíveis à população (MACHADO; OLIVEIRA, 2014).

Além disso, o uso indiscriminado de plantas que são desconhecidas pelos cirurgiões-dentistas, o maior acesso aos serviços e medicamentos sintéticos, o aumento de resistência bacteriana, o maior consumo de antibióticos, o uso de plantas sem a correta identificação botânica, a necessidade de identificação de plantas medicinais eficazes com reduzidos efeitos colaterais e que possam ser identificadas com segurança na odontologia tornam o estudo das plantas medicinais aplicadas à odontologia relevante (SINGH et al., 2007; NIERO et al., 2003; CAVALCANTE, 2010).

Cientificamente, o uso de plantas medicinais na Odontologia, relaciona-se com a necessidade de integração de vários campos de pesquisa: farmacologia, microbiologia, botânica, geologia, patologia de plantas, nutrição animal e humana (CAVALCANTE, 2010).

Estudos relatam a utilização de plantas medicinais na inibição do crescimento bacteriano e da aderência nas superfícies dentais assim como na redução na produção de ácidos e polissacarídeos extracelulares, dentre outros. Espécies como cravo da Índia, romã, malva, tanchagem, amoreira, sálvia, camomila, entre outras, são indicadas nos casos de gengivite, abscesso na boca, inflamação e aftas. Essas plantas tem apresentado ação bactericida e bacteriostática sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas constituintes do biofilme bacteriano (MACHADO; OLIVEIRA, 2014; OLIVEIRA et al., 2007).

Feres e colaboradores (2005) avaliaram o efeito de própolis em amostras de saliva de 25 pacientes com doença periodontal e 25 pacientes saudáveis. Segundo os pesquisadores, a própolis mostrou uma propriedade antimicrobiana significativa frente à periodontopatógenos, sugerindo que esta substância poderia ser usada terapêuticamente no controle do crescimento da microbiota oral (JUIZ et al., 2010). Os mesmos autores relatam o mecanismo de ação da própolis por bacteriolise parcial devido à ruptura da parede celular e desorganização da membrana plasmática bacteriana, bem a como inibição de síntese proteica.

Segundo Gebara e colaboradores (2002), a própolis também mostrou atividade antimicrobiana em cepas de *A. actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. gingivalis*, *Capnocytophaga gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, microrganismos envolvidos no desenvolvimento da periodontite (GEBARA et al., 2002; JUIZ et al., 2010).

Outro produto natural com atividade interessante na Odontologia é o alho (*Allium sativum*), que tem mostrado conhecida propriedade antibacteriana, antifúngica e antiviral (JUIZ et al., 2010; MACHADO; OLIVEIRA, 2014). Bakri e colaboradores testaram o efeito desta planta sobre o crescimento e enzimas proteolíticas de *Porphyromonas gingivalis*, apresentando valores de CIM e CBM interessantes. Ainda, a atividade proteolítica da protease de *P. gingivalis* foi inibida em 94,88%. Estes dados sugerem que esta planta pode ser um importante coadjuvante no tratamento de pacientes portadores de periodontite (BAKRI et al., 2005; JUIZ et al., 2010).

1.2.1 Terpenoides

Os terpenos compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural, com aproximadamente 35.000 diferentes substâncias identificadas. Quando submetidos a altas temperaturas podem se decompor em isoprenos, podendo ser chamados de isoprenoides. São classificados quanto ao número dessas unidades isopropênicas pentacarbonadas e átomos de carbonos (C) em sua estrutura: como monoterpenos (2 unidades e 10 C), sesquiterpenos (3 unidades e 15 C), diterpenos (4 unidades e 20 C), triterpenos (6 unidades e 30 C) e carotenoides (8 unidades e 40 C) (DEWICK, 2009; TAIZ, L. et al., 2004; JAKIEMIU, 2008).

São biossintetizados a partir de metabólitos primários por no mínimo duas rotas diferentes, conforme mostra a Figura 8, p.13 (JAKIEMIU, 2008; TAIZ, L. et al., 2004). Na rota do ácido mevalônico (Rota 1- Figura 9, p.14), três moléculas de acetil

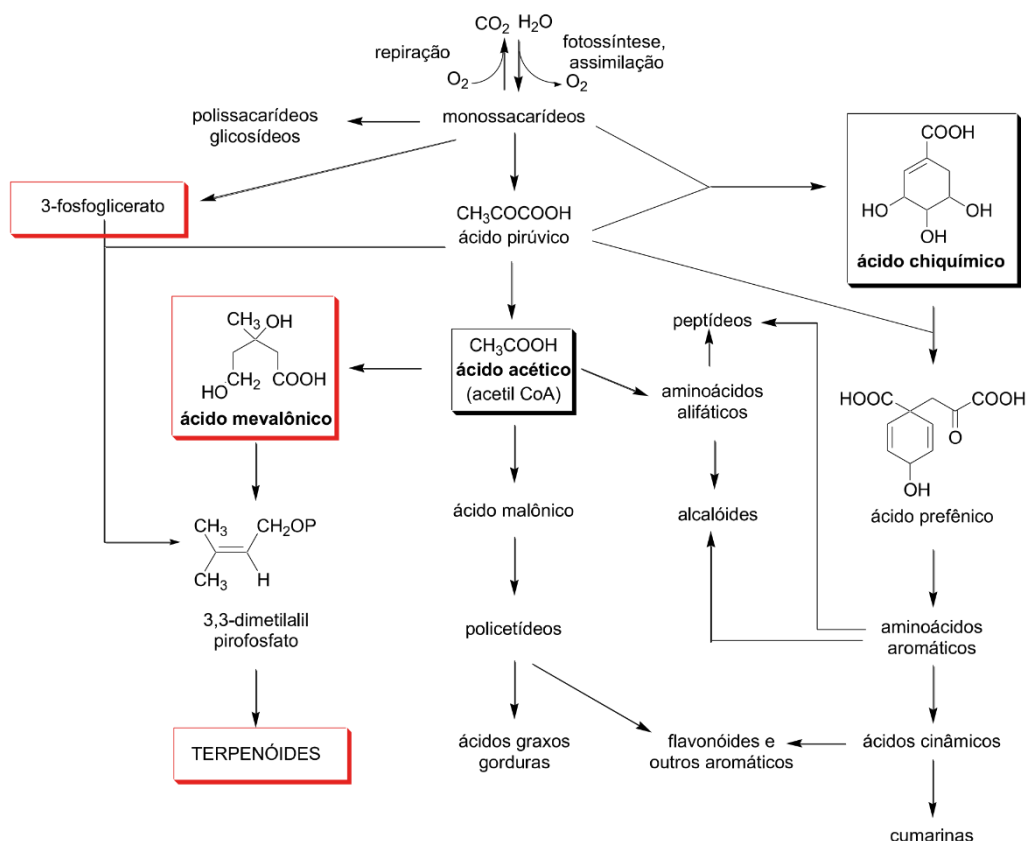
CoA são ligadas, a partir de uma série de etapas, para formar o ácido mevalônico. Esse importante intermediário de seis átomos de carbono é então pirofosforilado, descarboxilado e desidratado para produzir o isopentenil pirofosfato (IPP), que é a unidade básica na formação dos terpenos (JAKIEMIU, 2008; TAIZ, L. et al., 2004).

O IPP também pode ser formado a partir de intermediário da glicose ou do ciclo de redução fotossintética do carbono, através de um conjunto de reações denominado de rota do metileritritol fosfato (MEP) (Rota 2- Figura 9, p.14), que ocorre nos cloroplastos e outros plastídeos. O gliceraldeído-3-fosfato e dois átomos de carbono derivados do

piruvato se combinam para formar um intermediário que é convertido em IPP (TAIZ, L. et al., 2004; ; JAKIEMIU, 2008).

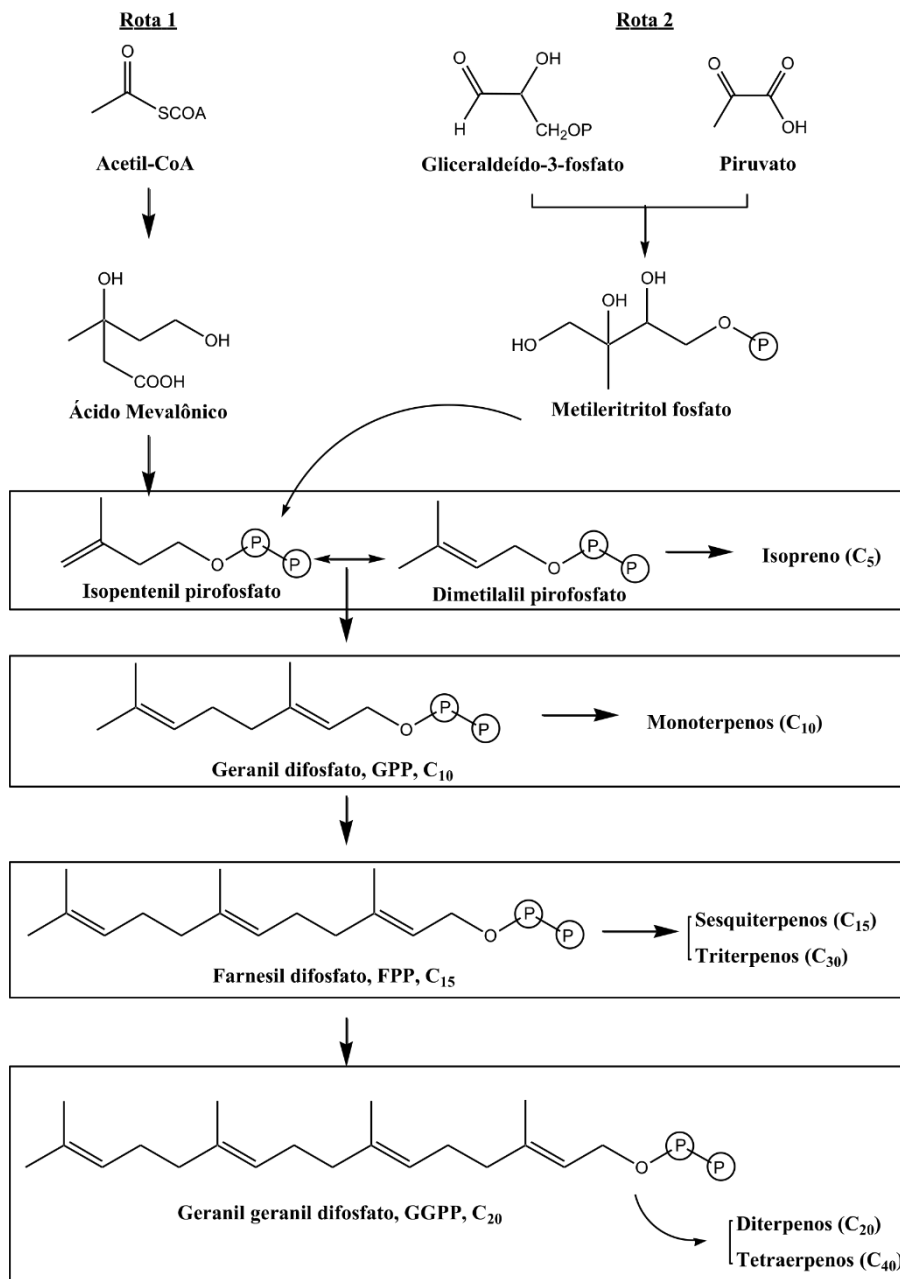
O isopentenil pirofosfato e seu isômero, o dimetilalil pirofosfato (DMAPP) são as unidades pentacarbonadas ativas na biossíntese dos terpenos que se unem para formar moléculas maiores. Inicialmente o IPP e o DMAPP reagem e formam o geranyl difosfato (GPP), uma molécula de 10 átomos de carbono, a partir da qual são formados os monoterpenos. O GPP pode, então, ligar-se a outra molécula de IPP, formando um composto de 15 átomos de carbono, farnesil difosfato (FPP), precursor da maioria dos sesquiterpenos (TAIZ, L. et al., 2004; JAKIEMIU, 2008). A adição de outra molécula de IPP forma o geranylgeranyl difosfato (GGPP), composto de 20 carbonos precursor dos diterpenos (JAJIEMIU, 2008; RIJO, 2013). Finalmente, FPP e GGPP podem dimerizar para formar triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40), respectivamente (JAKIEMIU, 2008).

Figura 8 - Esquema com a biossíntese dos terpenos.



Fonte: TAIZ; ZEIGER, 2004.

Figura 9 - Esquema com a biossíntese dos terpenos.



Fonte: TAIZ; ZEIGER, 2004.

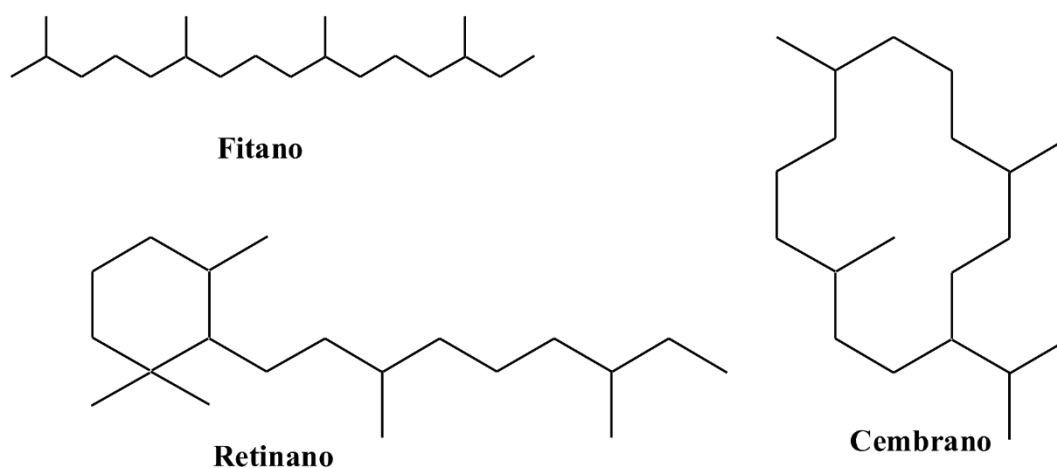
1.2.1.1 Diterpenos

Os diterpenos são o segundo maior grupo dos terpenos, com mais de dois mil compostos com estruturas básicas distintas (RIJO, 2013). Compreendem um grande grupo de compostos não voláteis (COSTA, 2012; JAKIEMIU, 2008) de baixo peso molecular e insolúvel em água (COSTA, 2012). Apesar de serem constituintes típicos de plantas e fungos, podem também ser sintetizados por certos organismos marinhos e insetos (SANTOS, 2011).

Suas propriedades físico-químicas são decorrentes do tipo de esqueleto e dos grupos funcionais presentes (COSTA, 2012). A maior parte dos compostos é cíclica e apresentam variabilidade química elevada associada à ciclização (bicíclico, tricíclico, tetracíclico ou pentacíclico) (Figuras 10-13) do esqueleto de hidrocarboneto aliada a uma vasta gama de grupos funcionais de oxigênio (por exemplo, hidroxilas, carbonilas, epóxidos, quinonas, ácidos e derivados do ácido) que define a multiplicidade de habilidades farmacológicas dos diterpenos (AMBROSIO et al., 2010; RIJO, 2013).

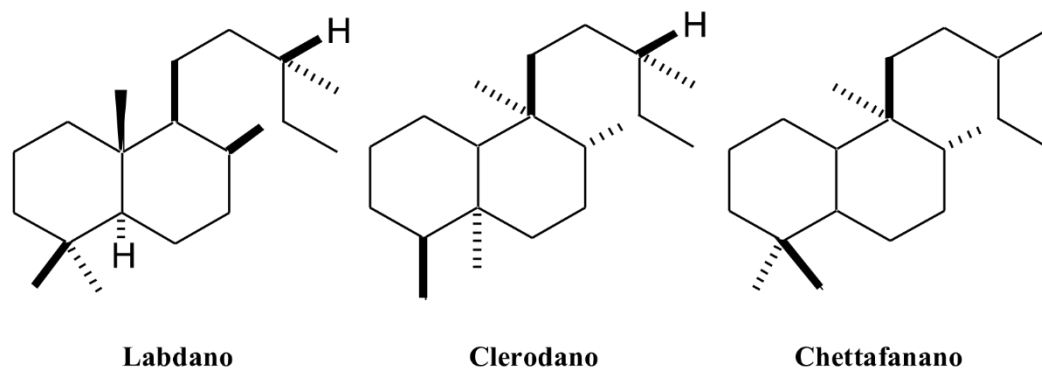
A partir dessa classificação, outra subdivisão para os diterpenos é baseada segundo o tipo de esqueleto diterpênico: como labdano, caurano, pimarano, clerodano, taxano, entre outros (HANSON, 2004), conforme descrito nas Figuras 10-13 a seguir.

Figura 10 - Tipos de diterpenos acíclico e monocíclicos.



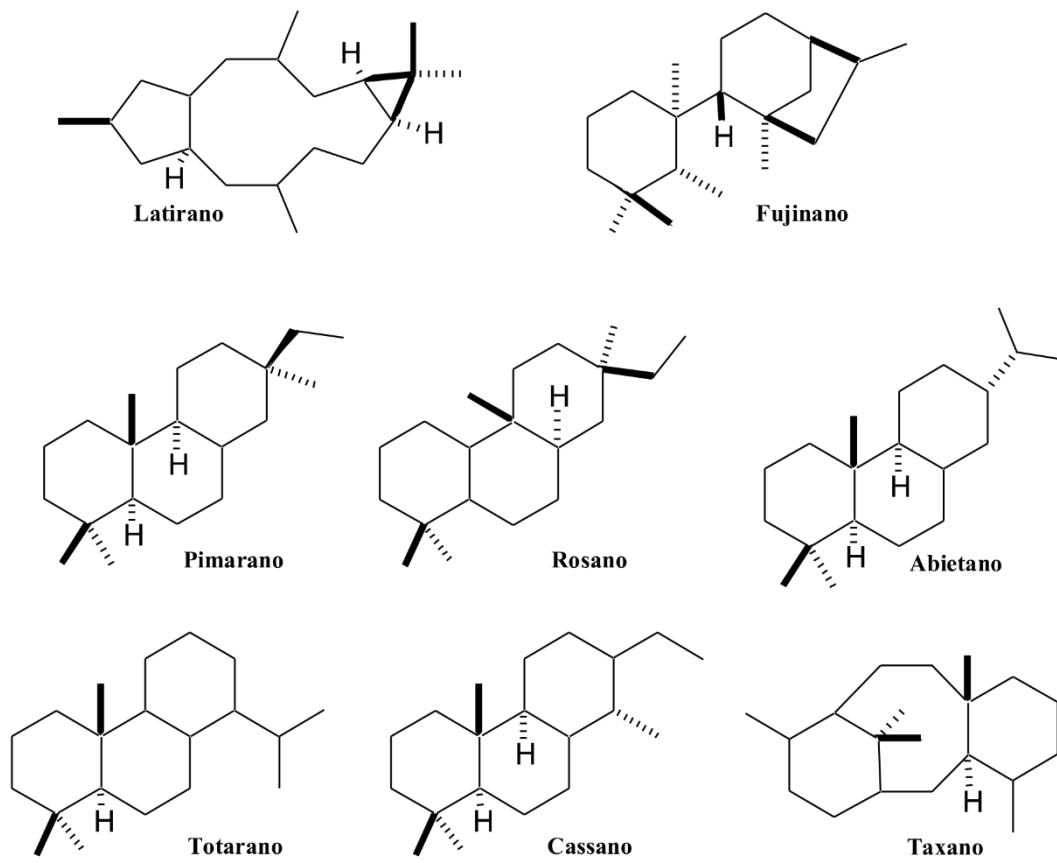
Fonte: AMBROSIO et al., 2010.

Figura 11- Tipos de diterpenos bicíclicos.



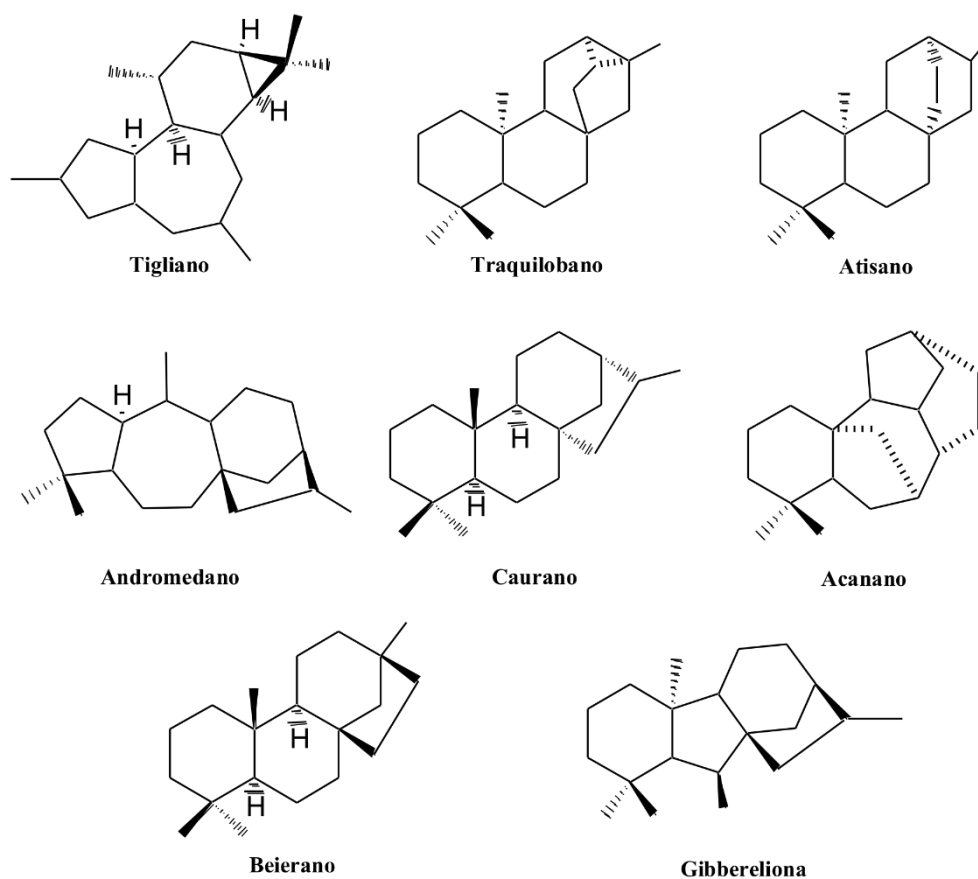
Fonte: AMBROSIO et al., 2010.

Figura 12 - Tipos de diterpenos tricíclicos.



Fonte: AMBROSIO et al., 2010.

Figura 13 - Tipos de diterpenos tetracíclicos e pentacíclicos.



Fonte: AMBROSIO et al., 2010.

1.2.1.1.1 Atividades Biológicas de Diterpenos

Trabalhos têm relatado que os diterpenos apresentam várias propriedades farmacológicas (COSTA, 2012; PORTO et al., 2009a; SÁ et al., 2012), dentre as quais pode-se citar algumas delas no sistema nervoso central (SNC) como agentes antioxidantes e moduladores de muitos sistemas neurotransmissores (MACLENNAN et al., 2002), alucinógenos (SHEFFLER et al., 2003), neuroprotetores (XU et al., 2011), ansiolíticos (MARDER, 2011), antidepressivos (NESTEROV A et al., 2011) e anticonvulsivantes (COSTA, 2012; DALO et al., 2007).

Muitos estudos mostram que esta classe de metabólitos secundários apresentam efeitos antiparasitários, analgésicos, anti-inflamatórios, atuam na inibição da contração do músculo liso vascular (PORTO et al., 2009a), apresentam atividade citotóxica frente a células leucêmicas (URZÚA, et al., 2008) e apresentam significativas atividades antimicrobianas frente a bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos (ALI et al., 2011; AMBROSIO et al., 2008; ANDRADE et al., 2011; BERNARDES et al., 2009; CABRAL, 2014; CARRIJO, 2013; CARVALHO et al., 2011; HERNANDEZ et al., 2012;

LIU et al., 2007; LIU et al., 2009; MONTEIRO et al., 2010; PORTO et al., 2007; PORTO et al., 2009a; PORTO et al., 2009b; RANGEL., 2009; SEVERIANO et al., 2010; SOUZA et al., 2011a; SOUZA et al., 2011b; ULUBELEN et al., 2001; URZÚA, et al., 2008).

Estudos mostraram que os diterpenos do tipo caurano podem ser importantes no desenvolvimento de agentes anticáries e antiperiodontais. O entendimento da relação estrutura-atividade desses metabólitos tem sido pontuado, uma vez que mínimas alterações estruturais podem aumentar a atividade frente a bactérias orais (PORTO et al., 2009b). Similarmente, é possível verificar que diterpenos do tipo pimaranos são outro importante grupo de metabólitos secundários de plantas com potencial para o desenvolvimento de novos efetivos agentes contra microrganismos responsáveis por cáries dentais (PORTO et al., 2009b).

Urzúa e seus colaboradores (2008) mostraram que a presença de sistema de anéis decalina lipofílicos, com um grupo hidrofílico doador de ligação de hidrogênio (HBD) é muito importante para a atividade antimicrobiana exibida por diterpenos. Os mesmos autores relataram que a adição de um segundo grupo HBD no sistema de anel decalina leva a uma redução ou supressão da atividade. Eles argumentaram que existem basicamente duas razões que podem explicar a redução da atividade antibacteriana exibida pelos diterpenoides que contêm dois grupos doadores de ligação de hidrogênio. A primeira razão é que a presença de dois grupos HBDs reduz a lipofilicidade da parte hidrofóbica, impedindo a interação com a membrana bacteriana. A segunda razão é que interações intramoleculares entre os grupos HBDs competem com as interações intermoleculares entre cada HBD e a membrana celular.

Porto e seus colaboradores (2009b) mostraram o potencial de diterpenos do tipo pimarano isolados de *Viguiera arenaria* na inibição do crescimento de *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis* e *L. casei*. As substâncias ácido ent-pimara-8(14),15-dien-19-óico (PA); ent-8(14),15-pimaradien-3 β -ol; ent-15-pimarene-8 β ,19- diol; ent-8(14),15-pimaradien-3 β -acetoxi e um sal sódico derivado de PA foram os mais ativos apresentando valores de CIM entre 2 e 8 $\mu\text{g/mL}$ (PORTO et al., 2009b).

Severiano e seus colaboradores demonstraram que o diterpeno ácido ent-pimara-8(14),15-dien-19-óico (PA) é capaz que inibir o crescimento de microrganismos responsáveis por formar a cárie dental com valores de concentrações inibitórias mínimas entre 2,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$.

Ali e seus colaboradores (2012) avaliaram a atividade do ácido 4-epi-pimárico frente a *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*,

Staphylococcus aureus, *Streptococcus epidermidis*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus sanguis*, *Porphyromonas gingivalis*, e *Prevotella intermedia*. Os resultados encontrados para CIM variaram de 4 a 8 µg/mL e para MBC de 8 a 16 µg/mL.

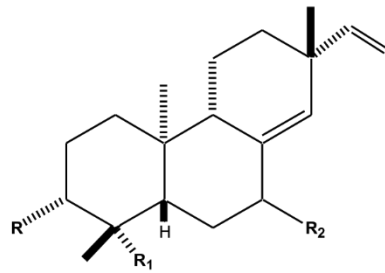
Considerando os trabalhos relevantes acima descritos referentes à atividade antimicrobiana de compostos diterpenos e considerando o grande uso de plantas na medicina popular brasileira, a investigação de suas propriedades químicas e biológicas toma-se de grande importância, uma vez que se pode levar a um melhor entendimento de seus potenciais terapêuticos ou mesmo ao desenvolvimento de agentes farmacológicos mais efetivos (YATSUDA et al., 2005).

De acordo com vários autores, compostos derivados de produtos naturais podem servir não somente para a obtenção de novos fármacos, mas também podem ser utilizados para modificação química formando derivados com melhores atividades e propriedades farmacocinéticas, novos mecanismos de ação e menores efeitos adversos (SEVERIANO et al., 2010).

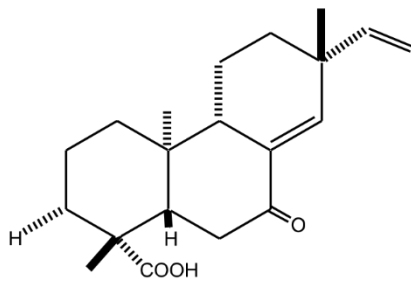
Além disso, doenças infecciosas bacterianas são um sério problema de saúde pública e o aumento da resistência e o rápido aparecimento de novas infecções tem diminuído a eficácia de fármacos empregados no tratamento de patologias causadas por certos microrganismos (PORTO et al., 2009a). Portanto, dados referentes à atividade antibacteriana de extratos vegetais e compostos químicos isolados avaliados frente a microrganismos são de grande interesse (CORDEIRO et al., 2006).

Com base nisso, foi realizado um levantamento sobre trabalhos existentes referentes aos diterpenos, cáries bucais e periodontites. Foram encontrados 18 artigos referentes aos assuntos abordados. As estruturas químicas dos diterpenos encontrados nos trabalhos encontram-se numeradas e agrupadas por classe (Figuras 14-23). Os resultados foram tabelados para melhor análise dos dados (Tabela 1, p.26).

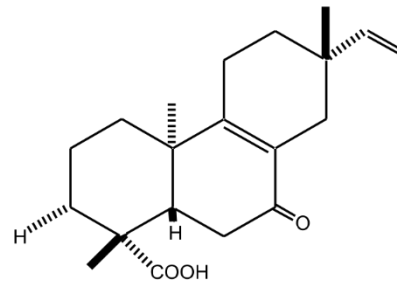
Figura 14 - Diterpenos do tipo pimarano.



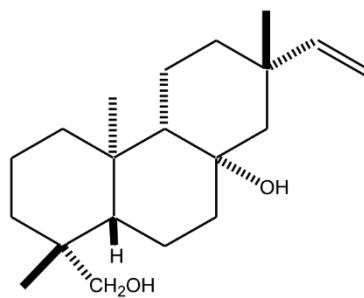
	1	2	3	4	5	6	7	8
R	H	H	OH	OH	CH ₃	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCCH}_3 \end{array}$	H	H
R₁	CH ₃	COOH	CH ₃	CH ₂ OH	COOH	CH ₃	COO ⁻ Na ⁺	CH ₂ OH
R₂	H	H	H	H	OH	H	H	H



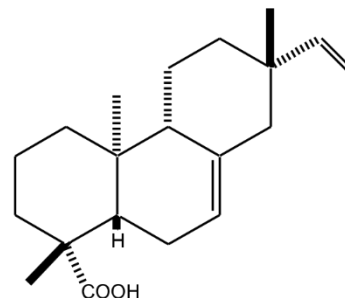
9



10



11



12

Figura 15 - Diterpenos do tipo rosano.

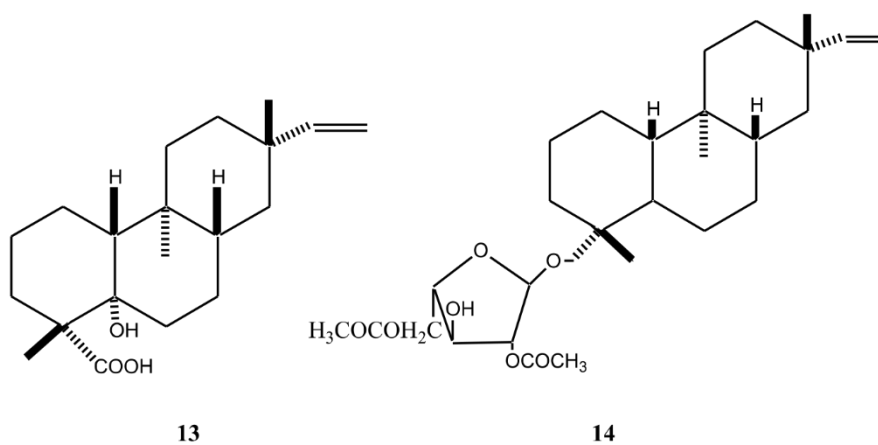


Figura 16 - Diterpenos do tipo beyerano.

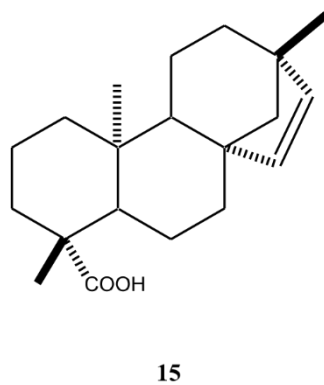
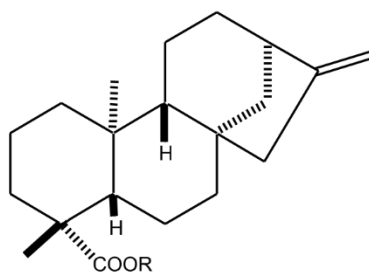
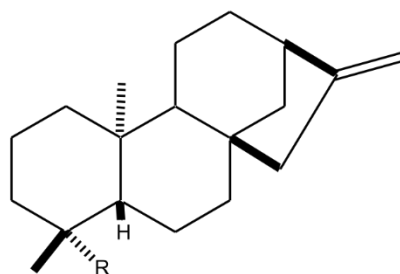
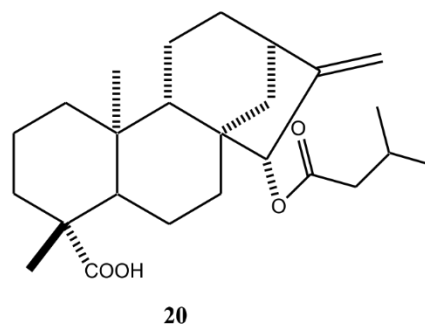
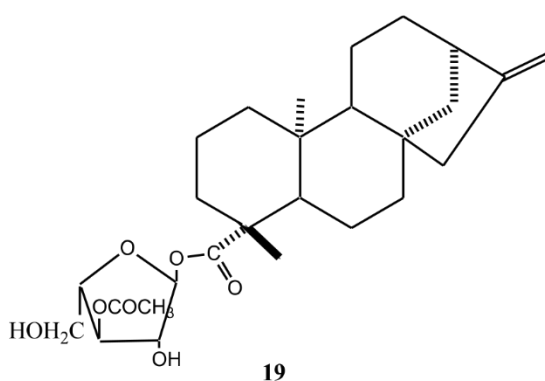


Figura 17 - Diterpenos do tipo caurano.



- 16 R: 3' 4' -diacetoxilopiranosila
 17 R: 3' 5' -diacetoxiarabinofuranosila
 18 R: 3' 6' -diacetoxiglucopiranosila



21 22 23 24

R: COOH COO⁻Na⁺ COOMe CH₂OH

Figura 18 - Diterpenos do tipo caurano.

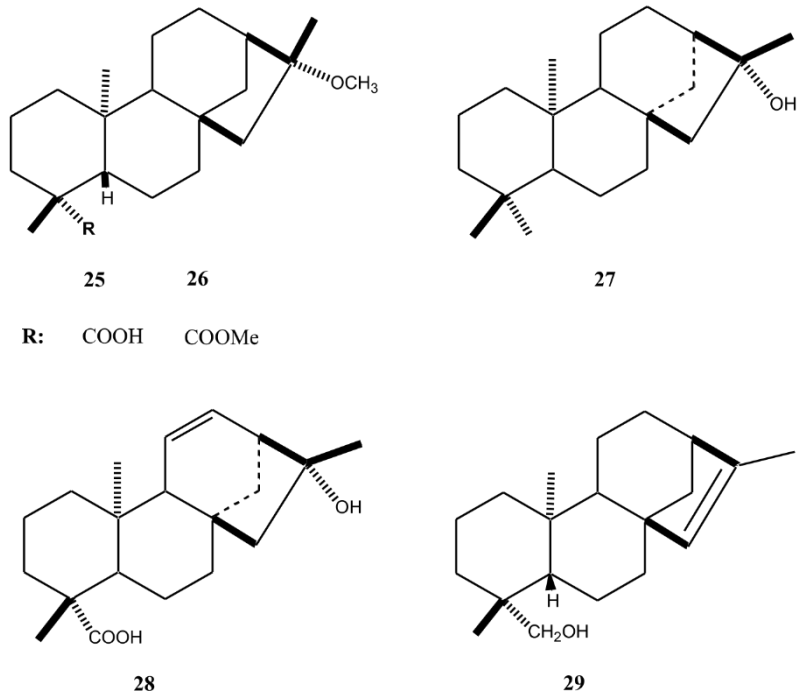


Figura 19 - Diterpenos do tipo abietano.

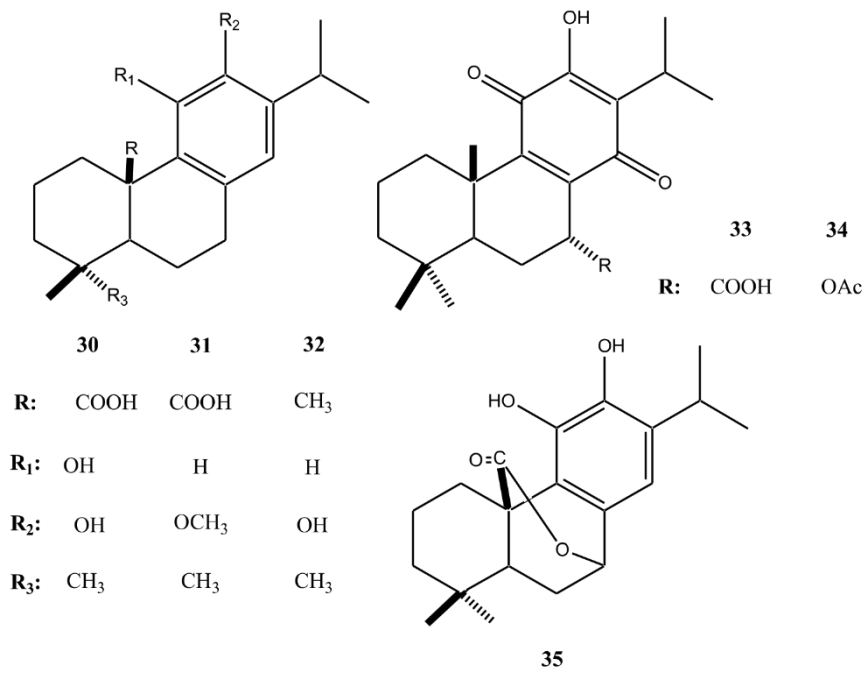
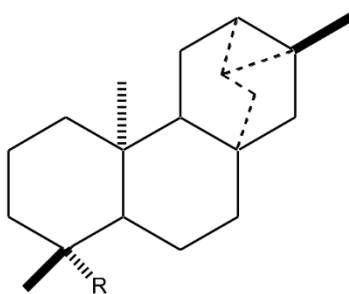


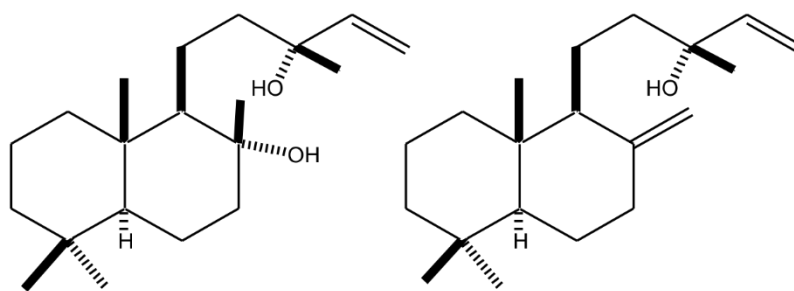
Figura 20 - Diterpenos do tipo traquilobano.



36 37 38

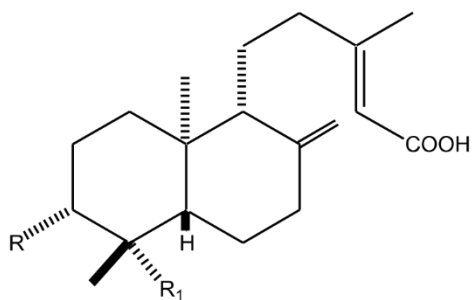
R: COOH COOCH₃ CH₂OH

Figura 21 - Diterpenos do tipo labdano.



39

40

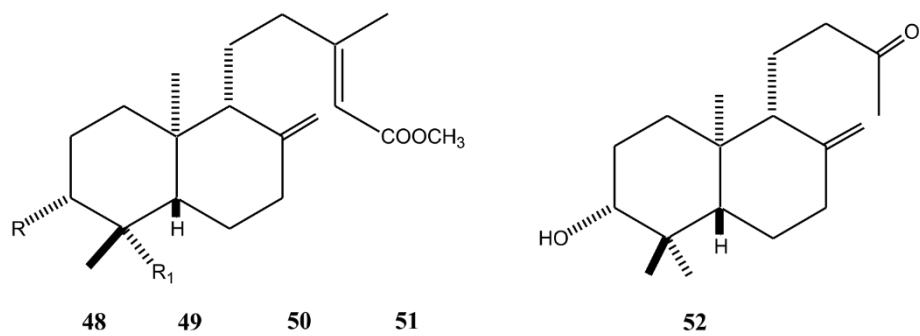


41 42 43 44 45 46 47

R: H OCOCH₃ OCOCH₃ OH H OH H

R₁: CH₃ CH₃ H CH₃ H H COOH

Figura 22 - Diterpenos do tipo labdano.



R: H OCOCH₃ H OH

R₁: H H COOCH₃ H

Figura 23 - Diterpeno do tipo casbeno.

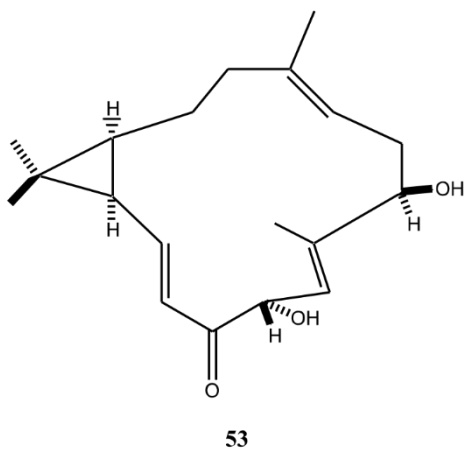


Tabela 1- Atividade antimicrobiana de diterpenos frente a microrganismos bucais.

Composto (classe)	Microrganismo (CIM: Concentrações (µg/mL))	Referências
1(P)	a(>100); b(>100); c(>100); d(>100); e(>100); f(>100); g(>80; >100); h(>80,0); i(>80); j(>80); k(>80); l(>80)	PORTO et al, 2009a; PORTO et al, 2009b; CARVALHO et al, 2011; RANGEL, 2009
2(P)	a(5,0; 8,0); b(4,0; 8,0); c(4,5; 8,0; 40,0; 125,0); d(4,0; 40,0); e(2,5; 8,0; 10,0); f(3,0; 40,0); g(8,0,15,0; >80); h(1,25; 2,0; 8,0); i(1,25; >80); j(2,0); k(>80); l(2,0)	PORTO et al, 2009a; ALI et al., 2012; PORTO et al, 2009b; SEVERIANO et al, 2010; CARVALHO et al, 2011; MONTEIRO, 2010; LIU et al., 2007; PORTO et al., 2007; RANGEL, 2009.
3(P)	a(4,0); b(6,0); c(2,5); d(4,0); e(4,5); f(2,5); g(20, >80, 0); h(10,0); i(5,0; >80,0); j(10,0); k(>80); l(2,5)	PORTO et al, 2009a; PORTO et al, 2009b; CARVALHO et al, 2011; RANGEL, 2009.
4(P)	a(>80,0); b(>80,0); c(>80,0); d(>80,0); e(>80,0); f(>80,0); g(>80); h(40,0, >80,0); i(12,0, >80,0); j(50,0); k(>80); l(40,0)	PORTO et al, 2009a; PORTO et al, 2009b; CARVALHO et al, 2011; RANGEL, 2009.
5(P)	a(>80); b(16,0); c(20,0); d(16,0); e(>80,0); f(>80,0); g(>80,0, >100); h(>80,0); i(60,0, >80,0); j(60,0); k(>80,0); l(18,0)	PORTO et al, 2009a; PORTO et al, 2009b; 7, 26
6(P)	a(8,0); b(6,0); c(6,0); d(8,0); e(6,0); f(6,0); g(>100,0, >80,0); h(>80,0); i(40,0, >80,0); j(40,0); k(>80); l(16,0)	PORTO et al, 2009a; PORTO et al, 2009b; CARVALHO et al, 2011; RANGEL, 2009.
7(P)	g(10,0; >80,0); a(3,5); b(4,0); c(2,5); d(3,0); e(2,5); f(2,0); h(1,0; 1,25); i(5,0; >80,0); j(1,5); k(>80,0); l(10,0)	PORTO et al, 2009a; PORTO et al, 2009b; CARVALHO et al, 2011; RANGEL, 2009.
8(P)	a(3,5); b(4,0); c(1,5); d(1,5); e(3,5); f(2,5)	SEVERIANO et al, 2010
9(P)	g(>100,0); a(>100,0); b(>100,0); c(>100,0); d(>100,0); e(>100,0); f(>100,0)	PORTO et al, 2009a; PORTO et al, 2009b; RANGEL, 2009.
10(P)	a(180,0); b(200,0); c(200,0); d(200,0); e(120,0); f(160,0)	SEVERIANO et al, 2010
11(P)	a(3,0); b(4,0); c(6,0); d(4,0); e(6,0); f(6,0); g(>80,0, >100,0); h(>80,0); i(60,0; >80,0); j(60,0); k(>80,0); l(40,0)	PORTO et al, 2009a; PORTO et al, 2009b; CARVALHO et al, 2011; RANGEL, 2009.
12(P)	a(5,0); b(7,5); c(6,0); d(4,0); e(8,0); f(5,0)	SEVERIANO et al, 2010
13(R)	c(125,0)	LIU et al., 2007
14(R)	c(15,8); i(62,5)	LIU et al., 2009
15(B)	Não ativa.	HERNÁNDEZ et al., 2012
16(C)	c(>250,0)	LIU et al., 2007
17(C)	c(15,6)	LIU et al., 2007
18(C)	c(250,0)	LIU et al., 2007
19(C)	c(15,6)	LIU et al., 2009
20(C)	a(>200,0); b(>200,0); c(>200,0); d(>200,0); e(50,0); f(200,0); g(>200,0)	AMBROSIO et al., 2008
21(C)	a(100,0); b(10,0); c(10,0); d(10,0); e(10,0); f(10,0); g(200,0)	HERNÁNDEZ et al., 2012; ANDRADE et al., 2011; AMBROSIO et al., 2008
22(C)	a(6,0); b(6,0); c(8,0); d(6,0); e(40,0); f(6,0)	ANDRADE et al., 2011
23(C)	a(>100,0; >200,0); b(>100,0; >200,0); c(>100,0; >200,0); d(>100,0; >200,0); e(>100,0; >200,0); f(>100,0; 100,0); g(>200,0)	ANDRADE et al., 2011; AMBROSIO et al., 2008
24(C)	a(>100,0); b(>100,0); c(>100,0); d(>100,0); e(>100,0); f(>100,0)	ANDRADE et al., 2011
25(C)	a(>100,0); b(>100,0); c(>100,0); d(>100,0); e(>100,0); f(>100,0)	ANDRADE et al., 2011
26(C)	a(>100,0); b(>100,0); c(>100,0); d(>100,0); e(>100,0); f(>100,0)	ANDRADE et al., 2011
27(C)	c(>1000,0); h(>1000,0)	HERNÁNDEZ et al., 2012
28(C)	c(125,0); h(>1000,0)	HERNÁNDEZ et al., 2012
29(C)	a(>100,0); b(>100,0); c(>100,0); d(>100,0); e(>100,0); f(>100,0)	ANDRADE et al., 2011
30(A)	a(30,0); b(40,0); c(30,0); d(20,0); e(50,0); f(50,0); g(70,0)	BERNARDES et al, 2009
31(A)	-	ULUBELEN et al, 2001
32(A)	-	ULUBELEN et al, 2001
33(A)	g(14,0)	ULUBELEN et al, 2001
34(A)	Não ativa-método de difusão de disco	ULUBELEN et al, 2001
35(A)	a(35,0); b(50,0); c(75,0); d(35,0); e(35,0); f(50,0); g(100,0)	BERNARDES et al, 2010
36(T)	e(8,9); h(87,6)	HERNÁNDEZ et al., 2012
37(T)	c(>1000,0); h(>1000,0)	HERNÁNDEZ et al., 2012
38(T)	c(70,5); h(125,0)	HERNÁNDEZ et al., 2012
39(L)	h(6,2); i(12,5); j(400,0); k(400,0); l(>400,0)	SOUZA et al, 2011a
40(L)	h(6,2); i(25,0); j(200,0); k(50,0); l(25,0)	SOUZA et al, 2011a
41(L)	h(3,1); i(6,2); j(200,0); k(200,0); l(25,0)	SOUZA et al, 2011a
42(L)	h(25,0); i(25,0); j(200,0); k(200,0); l(100,0)	SOUZA et al, 2011a
43(L)	a(12,0); b(40,0); c(40,0); d(60,0); e(60,0); f(50,0)	SOUZA et al, 2011b
44(L)	h(25,0); i(100,0); j(200,0); k(200,0); l(400,0)	SOUZA et al, 2011a
45(L)	a(2,0); b(3,0); c(3,0); d(5,0); e(6,0); f(4,0)	SOUZA et al, 2011b
46(L)	a(>200,0); b(>200,0); c(>200,0); d(>200,0); e(>200,0); f(>200,0)	SOUZA et al, 2011b
47(L)	a(>200,0); b(>200,0); c(>200,0); d(>200,0); e(>200,0); f(>200,0); h(50,0); i(50,0); j(200,0); k(200,0); l(400,0)	SOUZA et al, 2011a
48(L)	a(120,0); b(150,0); c(100,0); d(80,0); e(60,0); f(80,0)	SOUZA et al, 2011b
49(L)	a(180,0); b(100,0); c(150,0); d(120,0); e(80,0); f(150,0)	SOUZA et al, 2011b
50(L)	a(120,0); b(120,0); c(100,0); d(80,0); e(100,0); f(80,0)	SOUZA et al, 2011b
51(L)	a(200,0); b(180,0); c(200,0); d(150,0); e(120,0); f(150,0)	SOUZA et al, 2011b
52(L)	a(80,0); b(40,0); c(60,0); d(80,0); e(40,0); f(60,0)	SOUZA et al, 2011b
53(Cb)	a(250,0); b(500,0); c(250,0); d(125,0); e(250,0)	SÁ et al., 2012

- **A:** Abietano; **B:** Beyerano; **C:** Caurano; **Cb:** Casbeno; **L:** Labdano; **P:** Pimarano; **R:** Rosano; **T:** Trachylobano.
- **a:** *Streptococcus salivarius*; **b:** *Streptococcus sobrinus*; **c:** *Streptococcus mutans*; **d:** *Streptococcus mitis*; **e:** *Streptococcus sanguinis*; **f:** *Lactobacillus casei*; **g:** *Enterococcus faecalis*; **h:** *P. gingivalis*; **i:** *A. naeslundii*; **j:** *P. nigrescens*; **k:** *F. nucleatum*; **l:** *B. fragilis*.
- **Compostos escritos em negrito:** testados frente a isolados clínicos.

1.2.2 Problemas bucais: cárie e periodontite

1.2.2.1 A cavidade bucal e a formação de placa bacteriana

A cavidade bucal compreende superfícies distintas e específicas (JORGE, 1995; OLIVEIRA, 2010), sendo formada pelo epitélio bucal, dorso da língua, superfície supragengival, superfície subgengival e epitélio do sulco gengival. Este ecossistema abriga

mais de 700 diferentes espécies de microrganismos (ANDRADE et al., 2011). A quantidade de bactérias é de 1.011 em 1g de biofilme dental. Fazem parte da ecologia oral microrganismos anaeróbios, aeróbios, facultativos e microaerofílicos (MARINHO et al., 2007).

Condições anaeróbicas são também propiciadas pela capacidade de redução dos próprios microrganismos, que são em sua maioria anaeróbicos estritos ou facultativos; e também pela morfologia da superfície das estruturas bucais, que limitam a penetração de oxigênio (OLIVEIRA, 2010; MARCOTTE et al., 1998).

Os níveis das populações bacterianas que se desenvolvem na cavidade bucal são também controlados pela temperatura do meio bucal, entre 34 e 36°C, e o pH, mantido próximo da neutralidade (entre 6,7 e 7,3) pela saliva, além de substratos particulares, que podem ser endógenos (saliva) ou exógenos (provenientes da dieta, principalmente carboidratos e proteínas). Estes substratos servem como nutrientes para os microrganismos que habitam o meio supragengival, exercendo assim grande influência sobre a composição da microbiota bucal (MARCOTTE et al., 1998).

Dependendo de fatores tais como a dieta e a remoção regular da placa, o tipo de microbiota predominante na cavidade bucal pode variar. Em indivíduos que mantêm uma adequada higiene oral e fazem uso comedido da sacarose, a microbiota predominante pode ser menos patogênica, podendo o indivíduo possuir placa, e ainda assim ter saúde. Todavia, quando a remoção da placa é deficiente e a utilização da sacarose é frequente, ocorre uma seleção para certos organismos patogênicos, torna-se mais virulenta, podendo resultar tanto em lesões de tecido duro, quanto de tecido mole (MARINHO et al., 2007).

A placa bacteriana ou biofilme resulta da colonização e do crescimento de microrganismos nas superfícies dos dentes e nos tecidos bucais moles. Esses microrganismos são apontados como os principais agentes etiológicos para a instalação da cárie dental e periodontite, as duas doenças humanas mais comuns associadas com infecções na cavidade oral (ALI et al., 2012; AMBROSIO et al., 2008; PEREIRA, 2011; PORTO et al., 2009b; ROSAS-PÍNÓN et al., 2012; WONG et al., 2010; YATSUDA et al., 2005).

Embora essas doenças não sejam consideradas uma ameaça à vida, ambas são dolorosas e apresentam tratamento oneroso. No entanto, relatos recentes mostram a relação das infecções periodontais com doenças sistêmicas mais graves incluindo doenças cardiovasculares, infecções respiratórias, diabetes, dentre outras (ALI et al., 2012).

O processo de formação da placa pode ser dividido em três fases. Na primeira fase, ocorre a formação da película dental, representando a fase inicial, onde as superfícies da cavidade oral são cobertas por uma película de glicoproteína derivada de componentes salivares e do fluído gengival, bem como de produção de células bacterianas e dos tecidos do hospedeiro (ALI et al., 2012; MARINHO et al., 2007).

Na segunda fase, ocorre a colonização inicial das superfícies dentárias, predominantemente por microrganismos facultativos gram-positivos. Essa placa amadurece e ocorre uma transição do ambiente aeróbico para um meio altamente privado de oxigênio, onde prevalecerão as bactérias gram-negativas anaeróbias. Na terceira fase, ocorre a colonização secundária e a maturação da placa, onde microrganismos que não iniciaram a colonização das superfícies limpas dos dentes aderem a células de bactérias que já estão na massa da placa, através de um processo conhecido como co-agregação (MARINHO et al., 2007).

1.2.2.2 Cárie dental

A cárie dental é uma doença infecciosa do tecido duro, caracterizada por uma desintegração localizada e progressiva da estrutura do dente, causada por ácidos orgânicos produzidos pela fermentação bacteriana a partir de carboidratos presentes na dieta (ANDRADE et al., 2011; PORTO et al, 2009b) (Figura 24).

Figura 24 - Cárie dental.



Fonte: www.lookk:fordiagnosis.com

Esta doença tem sido associada com espécies de *Streptococcus* principalmente *Streptococcus mutans* (DAGLIA et al, 2011; MORE et al., 2008; PORTO et al, 2009b; PORTO et al, 2009b; ROSAS-PÍNÓN et al, 2012) e *S. sobrinus* (DAGLIA et al, 2011; KELES, 2008), e espécies de *Lactobacillus* como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* e outros como *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces*

viscosus, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *S. criteus*, *S. rattus* e *Enterococcus faecalis* (ASKUN et al., 2009; HERNÁNDEZ et al., 2012; KELES, 2008; PORTO et al, 2009a; PORTO et al, 2009b; SEVERIANO et al., 2010). Espécies de *Streptococcus* constituem cerca de 60 a 80 % dessas bactérias, enquanto que espécies de *Actinomyces* aparecem na proporção aproximada de 5 a 30 % (KELES, 2008).

Estudos mostram que *Streptococcus mutans* é o principal agente etiológico relacionado com a patogênese da cárie dental em seres humanos (ALI et al., 2012; ANDRADE et al., 2011, ROSAS-PÍNÓN et al, 2012; SAMOT et al., 2013; SOUZA et al., 2001b). O único habitat natural conhecido de *S. mutans* é a superfície dentária, não sendo encontrados na cavidade bucal antes da erupção dos dentes (MARINHO et al., 2007).

Os glucanos produzidos por essas bactérias a partir da sacarose (MARINHO et al., 2007; YATSUDA et al., 2005) utilizando enzimas chamadas glicosiltransferases (ROSAS-PÍNÓN et al, 2012) facilitam a aderência e o acúmulo de microrganismos, estabelecendo uma matriz extracelular resistente às forças mecânicas normais de remoção presentes no hospedeiro, e proporcionando alguma proteção contra o sistema imune e defesas não imunes (MARINHO et al., 2007; YATSUDA et al., 2005).

Além de promoverem sítios de ligação de *S. mutans* aos dentes, os glucanos insolúveis contribuem significativamente para a composição polissacarídica da placa dental (BROWN et al., 2005; KOO et al., 2002; WATANABE, 2000). Outros estreptococos bucais, tais como *S. sanguinis* e *S. salivarius*, também podem sintetizar estes polissacarídeos, mas apenas os estreptococos do grupo mutans apresentam aumento de colonização induzido pela sacarose. Portanto, a proporção da progressão da lesão depende da natureza e abundância de organismos acidúricos e acidogênicos e a continuada disponibilidade de carboidratos fermentáveis na dieta (CHHOUR et al., 2005).

Streptococcus mutans e *Lactobacillus* são particularmente eficazes para atuarem na transformação de açúcar em ácido (ALI et al., 2012; MARINHO et al., 2007) graças à sua capacidade de viverem e de se multiplicarem no meio ácido que originam, sendo consideradas bactérias acidófilas (MARINHO et al., 2007). Como consequência desse processo, tem-se a desmineralização do esmalte e a cavitação do dente (ALI et al., 2012;).

A cárie é uma doença que atinge precocemente a população. Sua ocorrência é importante causa de dor, perda dentária, problemas na escola e absenteísmo no trabalho (PEREIRA, 2010).

Nas últimas décadas, tem-se observado um importante declínio na prevalência da cárie dentária (NARVAL et al., 2006). Do levantamento em saúde bucal aos 12 anos,

realizado no Brasil no ano de 2003 (SB BRASIL, 2003) comparado ao levantamento realizado no ano de 2010 (SB BRASIL, 2010), o índice de CPOD (cariados perdidos e obturados/dente) que mede a ocorrência de cárie na população caiu 26% (SANTIN, 2012).

Dados da Pesquisa Nacional de Saúde Bucal do Ministério da Saúde realizada em 2010 mostram que a proporção de indivíduos livres de cárie (CEO/CPO = O) diminui em função da idade, um fenômeno que é comum, considerando-se o caráter cumulativo dos índices utilizados. Aos 5 anos de idade, 46,6% das crianças brasileiras estão livres de cárie na dentição decídua e, aos 12 anos, 43,5% apresentam a mesma condição na dentição permanente. Nas idades de 15 a 19, 35 a 44 e 65 a 74 anos, os percentuais foram 23,9%, 0,9% e 0,2%, respectivamente (BRASIL, 2012).

Além disso, dados mostram também que ocorrem grandes diversidades regionais entre as capitais e os municípios do interior e, também são percebidas em todas as idades. Percentuais de CPO-D/CEO-D = O são sempre inferiores nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste quando comparados com os das regiões Sul e Sudeste. A situação é variada quando se compara os municípios do interior com as capitais em cada região. Nas regiões Sul e Centro-Oeste, por exemplo, os percentuais de crianças e adolescentes livres de cárie são mais elevados nas capitais do que no interior, enquanto em adultos e idosos algumas capitais apresentam percentuais mais baixos do que os municípios do interior (BRASIL, 2012).

Os dados mostram que a cárie dentária é um sério problema de saúde pública (SANTIN, 2012; PEREIRA, 2010). Diversos são os fatores que influenciam, potencializam ou amenizam a ocorrência da doença cárie, sendo a placa bacteriana o principal agente etiológico local. Outros fatores determinantes e condicionantes que influenciam na ocorrência da doença são os fatores sociais, econômicos e culturais, determinantes dos hábitos e estilo de vida (PEREIRA, 2010).

Os países que, com o passar dos anos, apresentaram certa redução em seus índices de cárie, obtiveram melhoria nas condições globais de saúde e também de qualidade de vida. A condição social tem sido apresentada como importante determinante da situação de saúde bucal. Ao analisar os fatores socioeconômicos relacionados com a cárie dentária devem-se considerar as desigualdades sociais, como a baixa renda, desemprego e os elevados índices de analfabetismo (PEREIRA, 2010).

1.2.2.3 Doença periodontal

O periodonto (peio=em tomo de e donto=dente- conjunto de tecidos que circundam e sustentam os dentes) é um complexo tecidual que forma uma unidade estrutural e funcional constituída pela gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar. Sua função é proteger e envolver o órgão dental. A gengiva constitui o periodonto de proteção e, as demais estruturas, o periodonto de sustentação (PETERSEN et al., 2005; MONTEIRO, 2010).

A doença periodontal trata-se de uma doença inflamatória e infecciosa produzida por bactérias gram-negativas anaeróbicas presentes no biofilme dental que afetam o periodonto (ROSAS-PÍNÓN, 2012; LINDHE et al., 2003). É caracterizada por intenso infiltrado inflamatório causando perda progressiva da inserção conjuntiva. É definida como uma doença sujeito e sítio-específica, que evolui continuamente com períodos de destruição e de homeostase, resultando em resposta inflamatória e imune do hospedeiro à presença de bactérias e seus produtos que podem levar eventualmente a perda dos dentes (ALMEIDA et ai., 2006; MONTEIRO, 2010).

A doença periodontal divide-se em gengivite e periodontite. A gengivite inicia-se, frequentemente, pela inadequada higiene bucal, que leva à inflamação gengival pelo acúmulo de placa bacteriana na superfície dentária, o que torna a gengiva hiperemiada, edemaciada e com sangramento. Neste estágio a doença é reversível com correta higienização e tratamento (SANTOS, 2010). Quando a gengivite não é tratada, pode evoluir para uma inflamação crônica, em que o tecido de suporte é destruído e separa-se do dente, formando a bolsa periodontal, caracterizada como periodontite (Figura 25) (SANTOS, 2010; SOUZA et al., 2010).

Figura 25 - Periodontite.



Fonte: www.ortodontiacarte.blogspot.com

Está bem estabelecido que as bactérias presentes no biofilme dental sejam a causa da inflamação. Porém, pesquisas têm mostrado que muitos indivíduos podem abrigar os microrganismos sem manifestar destruição periodontal progressiva (PAGE et al., 1997; MONTEIRO, 2010). Com base nisso, dados relacionados ao hospedeiro, incluindo características genéticas e mecanismos de resposta imune são importantes (SANTOS, 2010; MONTEIRO, 2010). Outros fatores podem contribuir para o início e progressão da doença, como sexo, idade, raça, escolaridade, tipo de trabalho, condição social, hábitos de higiene bucal, realização de tratamento odontológico, diabetes, tabagismo, consumo de álcool, entre outros (SANTOS, 2010).

Segundo a American Academy of Periodontology as formas mais comuns de periodontites são: a) agressiva, caracterizada pela perda de inserção e destruição do osso de suporte de forma rápida e ocorre em pacientes clinicamente saudáveis; b) crônica, que apresenta inflamação do tecido biológico que circunda o dente, com progressiva perda de inserção e perda óssea, sendo a mais frequente e comum das periodontites em adultos, mas pode ocorrer em qualquer idade; c) periodontite associada a manifestações de doenças sistêmicas, geralmente inicia-se na idade jovem, e está associada à doenças cardíacas, doenças respiratórias e diabetes; d) doença periodontal necrosante, caracterizada pela necrose do tecido gengival, ligamento periodontal e osso alveolar, é mais observada em pacientes com HIV, com má nutrição ou com imunossupressão (SANTOS, 2010).

As várias formas de periodontite estão associadas com distintas microbiotas subgengivais (ROSAS-PÍNÓN et al., 2012). O processo inflamatório é desencadeado e perpetuado por bactérias Gram-negativas como *Porphyromonas gingivalis* (JUIZ et al., 2010; ROSAS-PÍNÓN et al., 2012; SAMOT, 2013), *Tannerella forsythensis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* (JUIZ et al., 2010; ROSAS-PÍNÓN et al., 2012), *Fusobacterium nucleatum* (JUIZ et al., 2010; ROSAS-PÍNÓN et al., 2012; SAMOT, 2001), *Campylobacter rectus* e *Eikenella corrodens*, Gram-positivas como *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius* e bactérias espiraladas como o *Treponema denticola* que colonizam o biofilme dental subgengival e estimulam uma resposta imune, cuja consequência é a destruição da matriz extracelular e reabsorção do ossoalveolar, o que pode acarretar na perda do elemento dental (JUIZ, 2010).

Destas, *Fusobacterium nucleatum* é a mais abundante bactéria anaeróbia gram-negativa na placa subgengival e apresenta importância na sua formação. Já a *Porphyromonas gingivalis* é a bactéria mais patogênica que ocorre na periodontite adulta severa e na doença periodontal aguda (SAMOT et al., 2013).

A periodontite é uma das patologias mais prevalente no mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, onde os cuidados básicos de saúde oral não atingem a população de forma homogênea. Trata-se, portanto, de um dos principais problemas de saúde pública existente (ANGELIS, 2011).

Com relação à etiologia das doenças periodontais, tem-se como fator de risco primordial a presença de placa bacteriana específica (fator biológico). Contudo, atualmente, o processo saúde/doença não pode ser desvinculado dos fatores sociais, econômicos e culturais. Tais fatores determinam o comportamento dos indivíduos, assim como a sua percepção sobre a sua saúde (PEREIRA, 2010).

Em se tratando do impacto da condição periodontal sobre a qualidade de vida, a doença periodontal pode dificultar o contato do paciente com o seu grupo, devido à presença de mau hálito e dor. Portanto, as enfermidades do periodonto podem causar prejuízos estéticos, funcionais e psicossociais para o indivíduo, interferindo na sua qualidade de vida (PEREIRA, 2010).

Uma pesquisa sobre Saúde Bucal realizada pelo Ministério da Saúde (Projeto SB Brasil 2010) foi realizada em 2010 através de análise de dados de CPI (Índice Periodontal Comunitário), utilizado para identificar a presença de sangramento e cálculo na idade de 12 anos; além de sangramento, cálculo e bolsas periodontais rasas (de 3mm a 5mm) e profundas (6mm ou mais) nos grupos representativos dos adolescentes (de 15 a 19 anos), dos adultos (de 35 a 44 anos) e dos idosos. Para a pesquisa foi utilizado como referência o exame por sextante (grupos de seis dentes entre os 32 da arcada dentária) (BRASIL, 2012).

A partir da análise da prevalência de cada condição isoladamente, pôde-se observar que a prevalência de sangramento gengival aumenta dos 12 anos até a vida adulta, decrescendo nos idosos. Para o País, cerca de um quarto dos adolescentes de 12 anos de idade, um terço dos adolescentes de 15 a 19 anos, aproximadamente a metade dos adultos de 35 a 44 anos de idade e menos de um quinto dos idosos apresentaram sangramento gengival. A presença de cálculo dentário aumenta com a idade, atingindo a maior prevalência entre adultos, aproximadamente 64%, declinando nos idosos. Bolsas periodontais rasas acometem aproximadamente 10% dos jovens entre 15 a 19 anos, 25% dos adultos entre 35 a 44 anos e 14% dos idosos. Bolsas profundas são ainda mais raras, pois atingem menos de 1% dos jovens de 15 a 19 anos, menos de 7% dos adultos e aproximadamente 3% dos idosos (BRASIL, 2012).

Os resultados do Projeto SB Brasil 2010 indicam que o percentual de indivíduos sem nenhum problema periodontal foi de 63% para a idade de 12 anos, 50,9% para a faixa de 15 a 19 anos, 17,8% para os adultos de 35 a 44 anos e somente 1,8% nos idosos de 65 a 74 anos. As formas mais graves da doença periodontal aparecem de modo mais significativo nos adultos (de 35 a 44 anos), em que se observa uma prevalência de 19,4%. Nos idosos, os problemas gengivais têm pequena expressão em termos populacionais, em decorrência do reduzido número de dentes presentes (BRASIL, 2012).

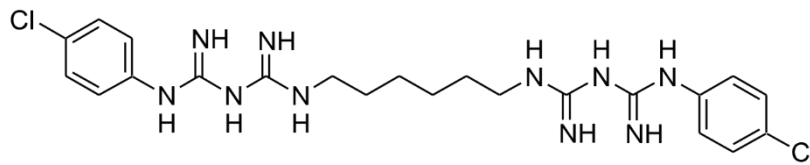
1.2.2.4 Controle da placa dental

Diante do exposto, métodos coadjuvantes no controle do crescimento do biofilme dental são essenciais para a prevenção e o controle da cárie dental e da doença periodontal (JUIZ et al., 2010; KELES, 2008; MARINHO et al., 2007). Relacionado a isso, a remoção da placa bacteriana é um fator importante (MARINHO et al., 2007; PEREIRA, 2011; PORTO et al., 2009b). Frente às limitações dos métodos mecânicos de higiene, agentes antimicrobianos em forma de enxaguatórios bucais são amplamente utilizados no controle dessa placa, auxiliando os métodos mecânicos de remoção e diminuindo o número de microrganismos patogênicos na cavidade oral (MARINHO et al., 2007, PEREIRA, 2011).

Para se obter ação antiplaca, o agente enxaguatório antimicrobiano deve: reduzir a adesividade das bactérias à superfície dental, inibir o crescimento e proliferação dos microrganismos, inibir a formação da matriz intercelular da placa, modificar a bioquímica bacteriana para reduzir a formação de produtos citotóxicos e, modificar a ecologia do biofilme para desenvolvimento de uma flora menos patogênica (MARINHO et al., 2007; MOREIRA et al., 2001).

Entre os compostos ativos mais utilizados em antissépticos bucais destaca-se a clorexidina (Figura 26) (MARINHO et al., 2007, PEREIRA, 2011, WONG et al., 2010), que se trata de um dos biocidas mais utilizados em formulações antissépticas. É uma biguanida catiônica (MARINHO et al., 2007; MCBAIN et al., 2003) disponível na forma de sais de digluconato, gluconato ou cloridrato, cuja toxicidade em mamíferos é baixa (MCBAIN et al., 2003). O seu espectro de ação antibacteriano é amplo englobando bactérias gram-positivas, gram-negativas, além de leveduras e dermatófitos (MARINHO et al., 2007; MCBAIN et al., 2003). Por se tratar de uma substância catiônica, a clorexidina apresenta uma capacidade acentuada de se adsorver aos dentes, língua e mucosa oral (KELES, 2008).

Figura 26 - Fórmula estrutural da clorexidina.



Fonte: www.ortodontiaecarte.blogspot.com

A clorexidina pode reagir com agentes aniônicos presentes em formulações levando a uma redução de sua atividade. Além disso, efeitos adversos, como o surgimento de manchas nos dentes (JONES, 1997; JUIZ et al., 2010), presença de gosto amargo na boca, queimação na língua e perda de paladar associada a uma redução da capacidade de distinguir possíveis agentes tóxicos, diminuição de apetite (GUIMARÃES et al., 2006), inativação na presença de sulfatos e hiperplasia de papilas linguais (JUIZ et al., 2010) comprometem o uso de clorexidina como agente antimicrobiano. Outra limitação do seu uso é a pequena eficácia frente à *Lactobacillus* sp., que se tratam de microrganismos fortemente relacionados às cáries dentais (ANDRADE et al., 2011; PEREIRA, 2011; SEVERIANO et al., 2010).

Vários antibióticos, tais como ampicilina, sanguinarina, metronidazol e quaternários de amônio-sépticos, entre outros, têm sido muito eficazes em prevenção da cárie dentária. No entanto, vários efeitos adversos, tais como coloração de dente e de restauração, crescente formação de cálculos, diarreia e desarranjos da flora intestinal e oral têm sido associados com o uso destes produtos químicos. Estas desvantagens justificam a busca por novos compostos anticariogênicos eficazes que poderiam ser empregados na prevenção da cárie (PORTO et al., 2009b).

Estudos mostram também que após a realização de terapia periodontal convencional feita com sucesso, pode haver a recolonização da área subgingival pelos periodontopatógenos resultado de uma terapia preventiva de manutenção falha, podendo acarretar uma doença recorrente. Nesse contexto, os produtos naturais poderiam ser utilizados como uma medida auxiliar de controle do crescimento do biofilme dental subgingival (JUIZ et al., 2010).

Diante do exposto acima, a procura por produtos naturais com atividade antibacteriana no combate a doenças que afetam o elemento dental tem merecido destaque (ANDRADE et al., 2011; JUIZ et al., 2010), principalmente com o advento de cepas multirresistentes a antibióticos e os efeitos colaterais (ANDRADE et al., 2011; JUIZ et al.,

2010; PEREIRA, 2011; SEVERIANO et al., 2010; WONG et al., 2010) associados ao uso da clorexidina, que é aclamada como padrão ouro no controle da placa bacteriana (ANDRADE et al., 2011; JUIZ et al., 2010, PEREIRA, 2011; SEVERIANO et al., 2010) e de outros compostos químicos (PORTO et al., 2009b).

Os resultados de pesquisas realizadas com plantas e seus metabólitos sugerem que tais compostos químicos podem ser utilizados como apoio à terapia das cáries e doenças periodontais e como profilaxia de rotina (JUIZ et al., 2010). Neste sentido, esforços extensivos têm sido feitos para a busca de compostos que podem ser incorporados em produtos odontológicos com o objetivo de complementar a remoção mecânica dos biofilmes da cavidade oral e reduzir a incidência de doenças bucais em humanos (KROL et al., 2013; PORTO et al., 2009b).

Além disso, o tratamento dentário muitas vezes apresenta custo elevado e dificuldade de acesso, especialmente nos países em desenvolvimento (KROL et al., 2013). A utilização dos produtos naturais, economicamente mais viáveis, mostra-se como uma alternativa interessante, contribuindo para melhorar o acesso da população aos cuidados com a prevenção e tratamento de doenças bucais (MARINHO et al., 2007).

Considerando ainda o grande potencial dos diterpenos no desenvolvimento de agentes anticáries e periodontais e ainda que o entendimento da relação estrutura-atividade desses metabólitos é bastante relevante, uma vez que mínimas alterações estruturais podem aumentar a atividade frente a bactérias bucais, justifica-se o presente trabalho que se trata da investigação da atividade antibacteriana de 31 substâncias frente a 12 bactérias causadoras de cáries e doenças periodontais com objetivo de se aumentar o número de informações a respeito da atuação dessas moléculas.

2 OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo foram:

- Fazer uma Revisão Bibliográfica referente aos dados de atividade antibacteriana de diterpenos frente aos microrganismos cariogênicos e periodontais e realizar a análise desses dados.
- Avaliar a atividade antimicrobiana de 31 diterpenos das classes dos pimaranos, cauranos e traquilobanos frente à 7 bactérias cariogênicas e 5 periodontais pelo método de Concentração Inibitória Mínima (CIM).
- Comparar os dados encontrados na Revisão Bibliográfica com os obtidos no presente trabalho.
- Avaliar a relação entre a estrutura e a atividade apresentada pelos diterpenos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

Foram realizadas pesquisas nos bancos de dados da Web of science isiknowledge.c e do PubMed pubmed.c. Foram também utilizados os dados obtidos através da busca usando-se o software SciFinder®. Todas as buscas foram realizadas utilizando-se "diterpenos" e "microrganismos bucais" como palavras-chave.

3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- Balança analítica (marca Shimadzu, modelo AY220);
- Banho ultra-termostatizado (marca Fischer Scientific Pittsburgh PA 1519 U.S.A Isotemp 3016, modelo MA 184).
- Capela (marca Lafaiete®);
- Chapa aquecedora (marca Marconi®, modelo MA 239);
- Destilador (marca Marconi®);
- Espectrômetro de RMN de ¹H a 400 MHz e ¹³C a 100 MHz Bruker DPX 400 (9,4 tesla). Como solvente foi utilizado, principalmente, CDCh 98,9% e como padrão de referência interno foi utilizado nas amostras o TMS;
- Estufa para secagem de vidrarias (marca Solab, modelo SLIO0);
- Evaporador rotativo (marca Buchi Switzerland, modelo Rotavapor R-215);
- Manta aquecedora (marca Fisatom, modelo 202);
- Mufla (marca Quimis, modelo Q318-024).

3.3 REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS

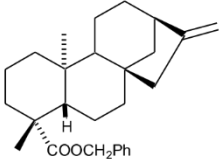
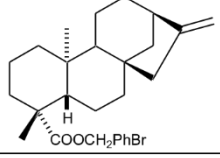
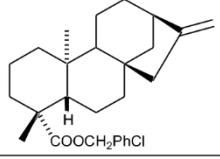
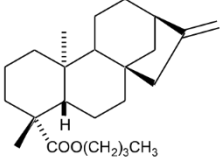
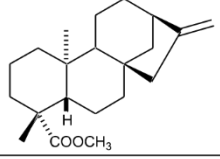
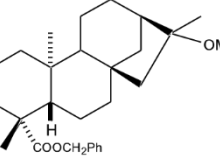
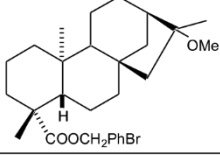
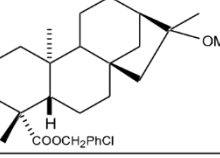
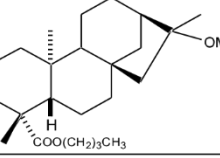
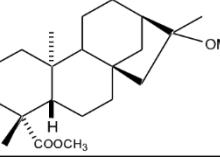
- Acetato de etila (Synth, Diadema, SP, Brasil);
- Acetona anidra (Synth, Diadema, SP, Brasil);
- Ácido sulfúrico (Synth, Diadema, SP, Brasil);
- Brometo de benzila (Synth, Diadema, SP, Brasil);
- Brometo de 4-clorobenzila (Synth, Diadema, SP, Brasil);
- Bromobutano (Synth, Diadema, SP, Brasil);
- Etanol (Synth, Diadema, SP, Brasil);
- Hexano (Synth, Diadema, SP, Brasil);
- Hidróxido de potássio (Synth, Diadema, SP, Brasil);

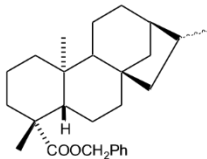
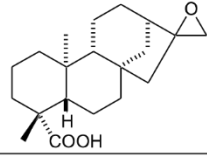
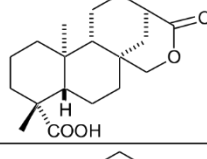
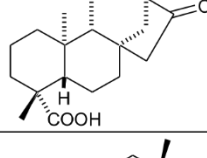
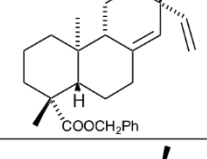
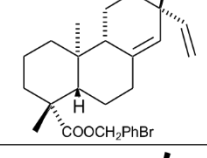
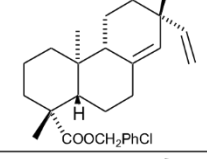
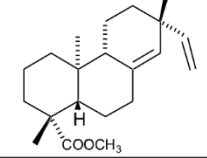
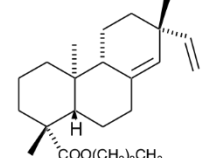
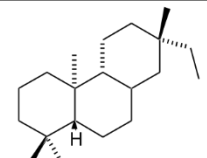
- Iodometano (Synth, Diadema, SP, Brasil);
- Metanol (Synth, Diadema, SP, Brasil);
- Sílica gel 60 -código 1.07734, 0,063-0,200nm (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha);
- Sílica gel 60 GF₂₅₄ - código 1.07730 (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha);
- Sílica gel 60H - código 1.07736 (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha);
- Sulfato de magnésio (Synth, Diadema, SP, Brasil).

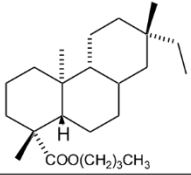
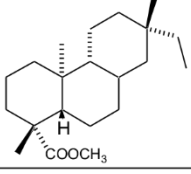
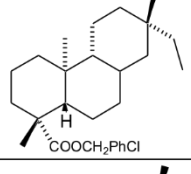
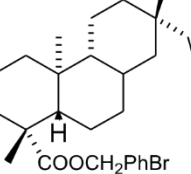
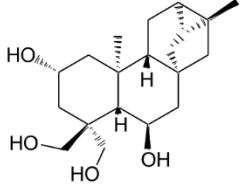
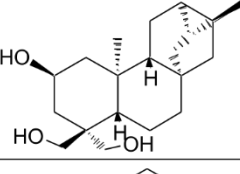
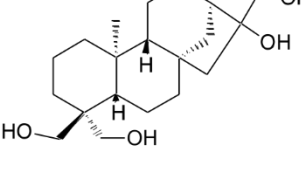
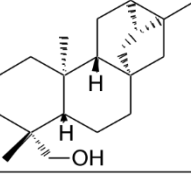
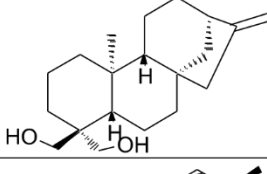
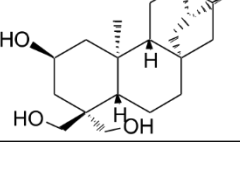
3.4 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS NOS ENSAIOS

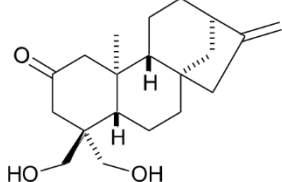
A Tabela 2 a seguir mostra a relação de substâncias utilizadas nos ensaios biológicos, os códigos para identificação das mesmas e as estruturas químicas.

Tabela 2 - Substâncias, códigos e fórmulas estruturais.

Número	Nome da substância	Fórmula estrutural
1	Caurenoato de benzila	
2	Caurenoato de 4-bromobenzila	
3	Caurenoato de 4-clorobenzila	
4	Caurenoato de butila	
5	Caurenoato de metila	
6	Caurenoato de benzila metoxilado	
7	Caurenoato de 4-bromo-benzila metoxilado	
8	Caurenoato de 4-clorobenzila metoxilado	
9	Caurenoato de butila metoxilado	
10	Caurenoato de metila metoxilado	

11	Caurenoato de benzila hidrogenado	
12	Epóxido do ácido caurenóico	
13	Lactona do ácido caurenóico	
14	Cetona do ácido caurenóico	
15	Pimaradienoato de benzila	
16	Pimaradienoato de 4-bromobenzila	
17	Pimaradienoato de 4-clorobenzila	
18	Pimaradienoato de metila	
19	Pimaradienoato de butila	
20	Pimaradienoato de benzila hidrogenado	

21	Pimaradienoato de butila hidrogenado	
22	Pimaradienoato de metila hidrogenado	
23	Pimaradienoato de 4-clorobenzila hidrogenado	
24	Pimaradienoato de 4-bromobenzila hidrogenado	
25	JM 609-Pp	
26	JM 610-Pp	
27	JM 614-Pp	
28	JM 616-Pp	
29	JM 617-Pp	
30	JM 618-Pp	

31	JM 620-Pp	
----	-----------	---

3.4.1 Obtenção das substâncias

Para os ensaios, as substâncias foram adquiridas de 2 grupos de pesquisa diferentes. Quase todas as substâncias do grupo das substâncias 1 a 24 foram preparadas pelos demais estudantes do grupo de pesquisa do professor Dr. Vladimir Constantino Gomes Heleno, na Universidade de Franca. Estes estudantes desenvolvem diferentes projetos de isolamento e modificação estrutural destes produtos naturais, com a finalidade de submeter os derivados a testes de atividade biológica. Com isso, essas substâncias foram cedidas gentilmente pelos mesmos para a realização do presente trabalho. Deste grupo de substâncias, as substâncias 4, 6, 8, 10 e 20 tiveram que ser preparadas neste trabalho para a realização dos ensaios. Logo, a preparação delas está descrita em Materiais e Métodos.

As substâncias 25-31 foram gentilmente cedidas por um grupo de pesquisa do Quênia, sob a coordenação do Professor Dr. Jacob Midiwo, na Universidade de Nairobi. O Prof. Midiwo é colaborador de nosso grupo de pesquisa e tem cedido amostras de produtos naturais de plantas africanas para a realização de ensaios biológicos.

3.4.1.1 Reisolamento e Purificação de ácido caurenóico de *M glomerata*

O reisolamento e a purificação do ácido caurenóico foram realizados pelo grupo de pesquisa do prof. Dr. Vladimir Constantino Gomes Heleno, na Universidade de Franca. Neste caso, como se trata de um reisolamento direcionado à substância majoritária, não havia interesse de análise detalhada de todas as frações, apenas daquelas nas quais foi detectada a presença de ácido caurenóico. Tal detecção foi realizada por comparação com padrão da substância desejada através de cromatografia em camada delgada (CCD).

Porções das partes aéreas de *Mikania glomerata* (3 kg) previamente secas e moídas foram colocadas no ultrassom com diclorometano por 15 minutos. Em seguida, uma filtração foi realizada e o solvente foi removido utilizando evaporador rotativo à pressão reduzida. Foram obtidos 130 g de extrato bruto. O extrato foi suspenso em 300 mL de uma mistura de MeOH/H₂O 9:1 (v/v) e filtrado em papel de filtro. A parte solúvel foi particionada com hexano (4 x 300 mL) e diclorometano (2 x 300 mL). Após análise por

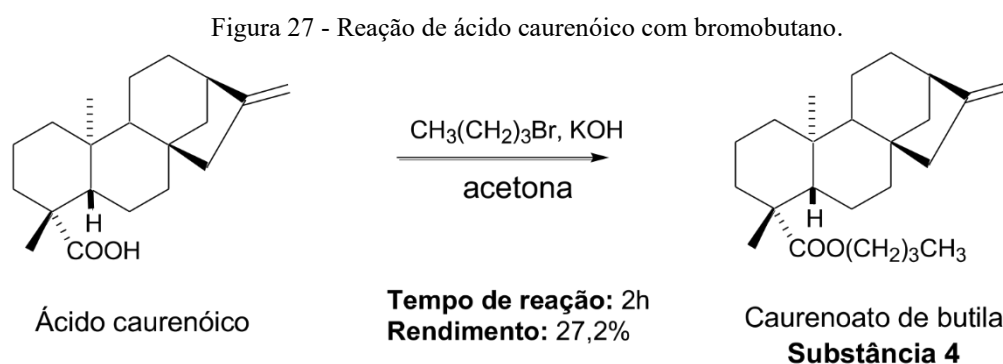
CCD das frações obtidas com padrão de ácido caurenóico, verificou-se que a fração hexânica (41,6 g) continha grande quantidade desta substância. Com isso, esta foi submetida a uma CLV e, em seguida, as subfrações foram purificadas por CCC (coluna cromatográfica clássica) (Hex/AcOEt 9:1), resultando em 3,5 g de ácido caurenóico.

3.4.1.2 Reação do ácido caurenóico com bromobutano

Em um balão de 10 mL contendo 43,5 mg de KOH em pastilhas foram adicionados 2 mL de acetona anidra, e a mistura foi mantida sob agitação por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram colocados 68,0 mg de ácido caurenóico e 0,026 mL de bromobutano. A mistura foi mantida a temperatura ambiente e sob agitação por mais 2 horas.

Ao final deste tempo a mistura reacional foi colocada em um funil de separação ao qual foram adicionados 20 mL de água destilada. A fase aquosa foi extraída com 3 porções de 20 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e, em seguida, o solvente foi retirado por evaporação rotativa (BOECK, et al., 2005).

O resíduo foi purificado através de CCC, utilizando-se como fase móvel hexano: acetato de etila (9:1) e 23,3g de sílica. Foram obtidas 23 frações, que foram reunidas utilizando CCD. Como fase móvel, foi utilizada uma mistura de hexano e acetato de etila (9:1) nas frações 2-6 e 11-23. O produto formado (21,9 mg de caurenóico de butila) foi obtido das frações 2-6 (Figura 27).

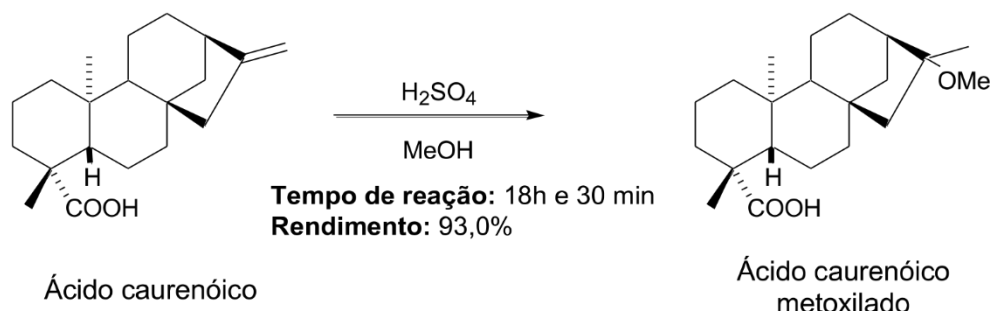


3.4.1.3 Reação do ácido caurenóico com MeOH e ácido sulfúrico

Em um balão de 15 mL, foi preparada uma solução de 150 mg de ácido caurenóico em 4 mL de metanol. Em seguida, 4 gotas de ácido sulfúrico foram adicionadas, lentamente à esta solução sob agitação mantendo-a assim em temperatura ambiente por 18 horas e 30 minutos.

A mistura reacional foi, então, colocada em um funil de separação contendo 40 mL de água destilada e esta mistura foi extraída, utilizando-se de 3 porções de 20 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e o solvente foi retirado por evaporação rotativa (BOECK, et al., 2005). Com um rendimento acima de 90%, obteve-se 150 mg de ácido caurenóico metoxilado (Figura 28).

Figura 28 - Reação de ácido caurenóico com MeOH e H₂SO₄.



3.4.1.4 Modificações estruturais a partir do ácido caurenóico metoxilado

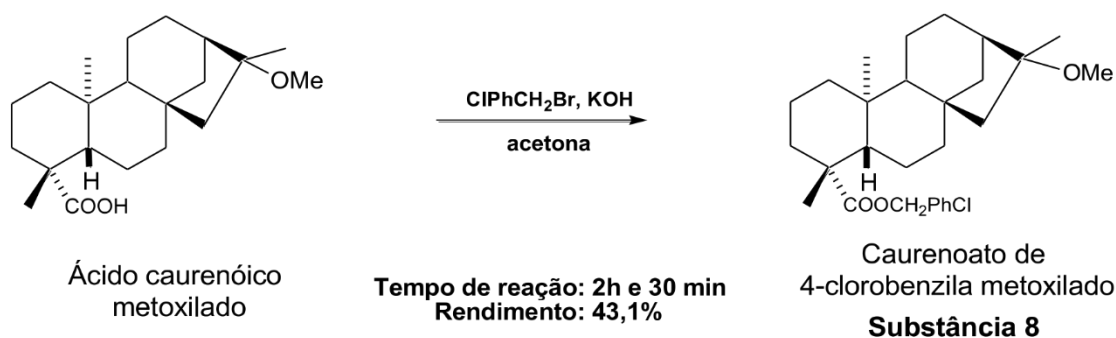
3.4.1.4.1 Reação ácido caurenóico metoxilado com brometo de 4-clorobenzila

Em um balão de 10 mL foram colocados 38,5 mg de KOH em pastilhas e 2,0 mL de acetona anidra. A mistura foi deixada em agitação por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados a esta mistura, 60 mg de ácido caurenóico metoxilado seguido de 50,6 mg de brometo de 4-clorobenzila. A mistura foi mantida a temperatura ambiente por 2 horas e 30 minutos.

Após este tempo, a mistura reacional foi colocada em um funil de separação e foram adicionados 20 mL de água destilada. A fase aquosa foi extraída com 3 porções de 20 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com água, 3 porções de 10 mL, seca com MgSO₄, filtrada e teve o seu solvente retirado por evaporação rotativa.

O resíduo foi purificado através de CCC, utilizando-se como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila (9:1) e, como fase estacionária, 23,4g de sílica. Foram obtidas 26 frações, que foram reunidas conforme as comparações por CCD, durante as quais foi utilizada a fase móvel; hexano/acetato de etila (9:1). Foram reunidas as frações nas frações 4-8, 9-13 e 14-26. O produto formado (35,5 mg de caurenato de 4-clorobenzila metoxilado) foi obtido das frações 4-8 (Figura 29) (BOECK, et al., 2005).

Figura 29 - Reação de ácido caurenóico metoxilado com brometo de 4-clorobenzila.



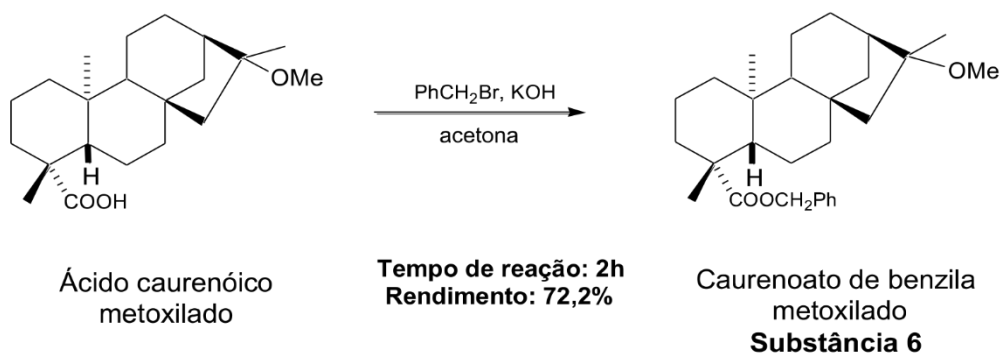
3.4.1.4.2 Reação ácido caurenóico metoxilado com brometo de benzila

Em um balão de 10 mL foram colocados 19,2 mg de KOH em pastilha e 2,0 mL de acetona anidra. A mistura foi mantida sob agitação por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 30 mg de ácido caurenóico metoxilado seguido de 0,0124 mL de brometo de benzila. A mistura final permaneceu a temperatura ambiente por 2 horas.

Após este tempo reacional, a mistura obtida foi colocada em um funil de separação no qual foram adicionados 20 mL de água destilada. A fase aquosa foi extraída com 3 porções de 20 mL de acetato de etila e a fase orgânica foi lavada com água, 3 porções de 10 mL. A fase orgânica foi, então, seca com MgSO₄, filtrada e teve seu solvente retirado por evaporação rotativa.

O resíduo foi purificado através de CCC, utilizando-se como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila (9:1) e, como fase estacionária, 23,0g de sílica. Foram obtidas 30 frações, que foram reunidas por CCD, resultando nas frações: 5-8, 9-14 e 15-30. O produto obtido (27,5 mg de caurenato de benzila metoxilado) foi isolado das frações 5-8 (Figura 30) (BOECK, et al., 2005).

Figura 30 - Reação de ácido caurenóico metoxilado com brometo de benzila.

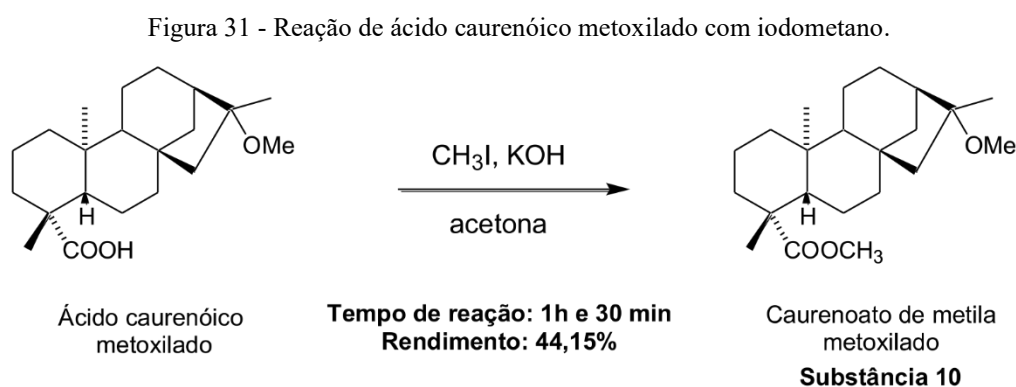


3.4.1.4.3 Reação ácido caurenóico metoxilado com iodometano

Em um balão de 10 mL contendo 19,2 mg de KOH em pastilhas foram adicionados 2,0 mL de acetona anidra e a mistura foi agitada por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram colocados 30 mg de ácido caurenóico metoxilado e 0,0064 mL de iodometano, mantendo-se a mistura sob agitação por 1 hora e 30 minutos, acompanhada por CCD.

Terminada a reação, a mistura reacional foi colocada em um funil de separação ao qual foram adicionados 20 mL de água destilada. A fase aquosa foi extraída com 3 porções de 20 mL de acetato de etila e a fase orgânica foi lavada com água (3 porções de 10 mL). A fase orgânica foi, então, seca com MgSO₄, filtrada e teve seu solvente retirado por evaporação rotativa.

O resíduo foi purificado através de CCC, utilizando-se como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila (9:1) e, como fase estacionária, 23,0g de sílica. Foram obtidas 30 frações, que foram reunidas através de CCD, utilizando-se como fase móvel hexano/acetato de etila (9:1), nas frações 2-4, 5-11 e 12-30. O produto formado (13,8mg de caurenato de metila metoxilado) foi obtido das frações 5-11 (Figura 31) (BOECK, et al., 2005).



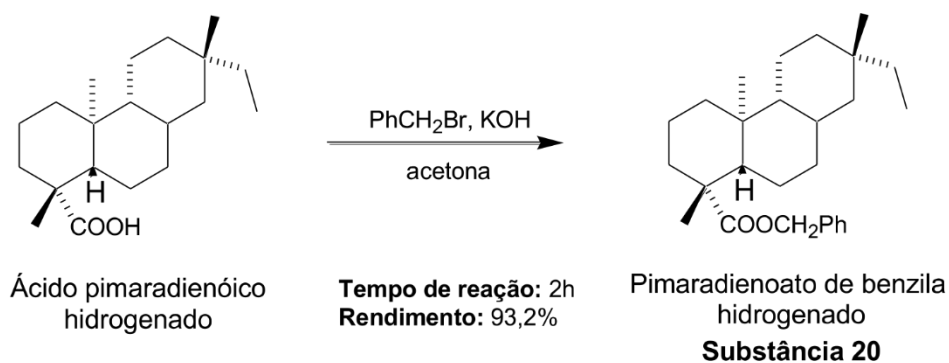
3.4.1.5 Reação do ácido pimaradienóico hidrogenado com brometo de benzila

Em um balão de 10 mL foram colocados 0,018 g de KOH em pastilha e 2 mL de acetona anidra. A mistura foi mantida em agitação por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 27 mg do material de partida e, aproximadamente, 0,0112 mL do brometo de benzila. A mistura reacional foi mantida em agitação à temperatura ambiente por 2 horas, tendo sido acompanhada por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) utilizando-se como fase móvel hexano: acetato de etila (9:1).

A mistura reacional foi, então, colocada em um funil de separação contendo 20 mL de água destilada e esta mistura foi extraída com acetato de etila (3 porções de 20 mL). A fase orgânica foi lavada com água (3 porções de 10 mL) e seca com MgSO₄. A fase orgânica foi filtrada e seu solvente foi retirado por evaporação rotativa.

O resíduo foi purificado através de CCC, utilizando-se como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila (9:1), com uma fase estacionária de 23,0g de sílica. Foram obtidas 12 frações, que foram reunidas utilizando CCD utilizando-se a mesma fase móvel. O produto formado (32,6 mg de pimaradienoato de benzila hidrogenado) foi obtido das frações 4-8 (Figura 32) (BOECK, et al., 2005).

Figura 32 - Reação de ácido pimaradienóico hidrogenado com brometo de benzila.



3.4.2 Identificação do material de partida e dos produtos obtidos

Foram obtidas 6 substâncias como produtos de reações no presente trabalho. Para a identificação destas substâncias, foi utilizada a técnica de Ressonância Magnética Nuclear através de experimentos 1D, espectros de RMN de ¹H e de ¹³C, e comparados com os espectros dos seus respectivos padrões, percebendo-se assim os sinais correspondentes às novas estruturas formadas (item 4.1, p.67).

Através dessa análise, foi possível também avaliar a pureza dos compostos obtidos como produtos das reações descritas anteriormente.

3.5 AVALIAÇÃO DA ATNIDADE ANTIMICROBIANA

3.5.1 Equipamentos e materiais utilizados

- Agitador de tubos (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil);
- Autoclave (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil);
- Balança analítica digital (Satorius AG, Goettingem, R.F.; Alemanha);
- Câmara de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford, U.K);

- Capela de fluxo laminar (Veco VL FS-09M, Campinas, SP, Brasil);
- Escala de McFarland (Probac, São Paulo, SP, Brasil);
- Espectrofotômetro (Femto, São Paulo, SP, Brasil);
- Estufa bacteriológica (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil);
- Geladeira (Springer®);
- Leitora de Microplacas Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido);
- Membrana filtrante de 0,22µm (Millipore, Massachusetts, USA);
- Micropipetas automáticas (Gilson, Midleton, WI, USA);
- Microplacas com 96 poços - (Costar, Massachusetts, USA);
- Microseringa graduada de 10µL - The Hamilton Company®;
- Placa de Petri (Pleion, Barueri, SP, Brasil);
- Ponteiras (Gilson, Midleton, WI, USA);
- Sistema de purificação de água MilliQ (Millipore, Billerica, MA, USA);
- Ultrassom (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil);

3.5.2 Meios de cultura e reagentes utilizados

- Ágar sangue BD®;
- Ágar Schaedler (Difco Labs, Detroit, Michigan, USA);
- Água MiliQ (Millipore, Billerica, MA, USA);
- Caldo Brucella (Difco Labs, Detroit, Michigan, USA) suplementado;
- Caldo triptona soja (TSB) BD®;
- Cloreto de Sódio -(Synth, Diadema, SP, Brasil);
- Dicloridrato de clorexidina (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Dimetil sulfóxido -DMSO ((Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha);
- Hemina (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Menadione (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Resazurina (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Sangue desfibrinado estéril de carneiro, (Biotério Bio Boa Vista, Campinas, SP, Brasil);
- Solução salina 0,9%.

3.5.3 Atividade antimicrobiana frente aos microrganismos cariogênicos

3.5.3.1 Microrganismos utilizados

As cepas foram provenientes da American Type Culture Collection (ATCC) mantidas na coleção de cultura do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA/UNIFRAN), sob criopreservação a - 80°C. Para os ensaios frente a bactérias cariogênicas foram utilizadas cepas padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082), *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) e *Lactobacillus casei* (ATCC 11578).

3.5.3.2 Preparo das soluções, meios de cultura e inóculos

3.5.3.2.1 Preparo do ágar sangue BD®

Foram adicionados 40,0 g de ágar sangue BD® (Tabela 3) a 1,0 L de água destilada. A solução resultante foi esterilizada em autoclave a 121°C durante 15 min. Em seguida foram adicionados à solução de ágar 5% de sangue desfibrinado estéril de carneiro, resultando em uma solução de pH $7,3 \pm 0,2$.

Tabela 3 - Composição do ágar sangue BD®.

Constituintes	Quantidade (g)
Músculo cardíaco de carneiro infundido a partir de sólidos	2,0
Caseína digerida por enzimas pancreáticas	13,0
Extrato de levedura	5,0
Ágar	15,0

3.5.3.2.2 Preparo do caldo triptona soja BD®

Foram adicionados 30,0 g de caldo triptona soja BD®(Tabela 4) a 1,0 L de água destilada. A solução resultante foi esterilizada em autoclave a 121 °C durante 15 min, sendo em seguida adicionados 5% de sangue desfibrinado estéril de carneiro, resultando em uma solução de pH $7,3 \pm 0,2$.

Tabela 4 - Composição do caldo triptona soja BD®.

Constituintes	Quantidade (g)
Digerido pancreático de caseína	17,0
Digerido enzimático de soja	3,0
Dextrose	2,5
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato de potássio	2,5

3.5.3.2.3 Preparo das amostras

Soluções dos extratos brutos, frações e substâncias isoladas foram preparadas pela adição de 1 mg a 125 µL de **DMSO**. Após completa solubilização, foram adicionados 1850 µL de caldo triptona soja.

3.5.3.2.4 Preparo dos inóculos

Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, as culturas dos microrganismos indicadores, desenvolvidas durante 24 h em ágar sangue, foram transferidas para tubos contendo 5,0 mL de solução aquosa de NaCl 9,0 g.L⁻¹ previamente esterilizada.

A quantidade do inóculo foi padronizada a fim de assegurar a reprodutibilidade dos ensaios, pois a densidade do inóculo influencia no resultado dos experimentos. Primeiramente foi preparada a escala 0,5 de McFarland segundo Bier (1981). Em seguida foram transferidos 2 mL dessa suspensão para uma cubeta espectrofotométrica. Para calibrar a transmitância a 100% em um espectrofotômetro a um comprimento de onda 625 nm, foi utilizada água destilada. Em seguida foi colocada a suspensão do tubo 0,5 de McFarland, obtendo-se uma transmitância de 81%. Todas as suspensões bacterianas foram ajustadas na mesma transmitância.

As suspensões padronizadas foram então diluídas em solução salina esterilizada (1,0 mL de suspensão em 9,0 mL de solução salina), fornecendo inóculos de $1,5 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹. Em seguida, os inóculos foram diluídos em caldo triptona soja (2,0 mL de suspensão em 10,0 mL de caldo), obtendo-se assim inóculos de $2,5 \times 10^6$ UFC. mL⁻¹ e uma concentração final no poço de inóculo de 5×10^5 UFC/mL.

3.5.3.2.5 Preparo do controle positivo

Para a validação da técnica foi utilizado o dicloridrato de clorexidina como controle positivo (droga padrão). Informa-se que no decorrer do texto, o controle positivo será

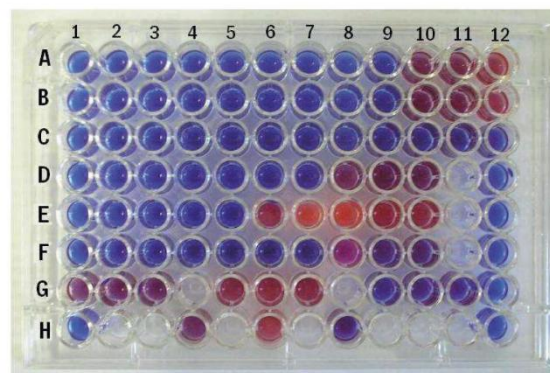
denominado somente por clorexidina. Sendo assim, a partir de uma solução estoque da droga a 10 mg/mL mantida em tubos eppendorf a - 20°C, uma alíquota de 47,2 µL foi retirada para ser adicionada em tubo contendo 1952,8 µL de caldo triptona soja. Tal solução-mãe à 236 µg/mL, permitiu avaliar a clorexidina nas concentrações de 0,115 a 59 µg/mL.

3.5.3.2.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo usando microplacas

A CIM é definida como a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento bacteriano. O método aplicado segue a metodologia preconizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009), com adaptações, empregando a resazurina como revelador do crescimento bacteriano.

Em microplacas esterilizadas de 96 orifícios (Figura 33) foram adicionados o caldo triptona soja, as soluções das amostras (substâncias puras) e as suspensões padronizadas dos microrganismos, totalizando 100 µL. As amostras foram avaliadas nas seguintes concentrações: 0,195 a 400 µg.mL⁻¹. Estas concentrações foram obtidas através do método de microdiluição em microplaca (Figura 34, p.58), sendo que a solução de menor concentração onde ocorreu a inibição do crescimento microbiano, detectada após a adição de resazurina, corresponde o valor de concentração inibitória mínima (CIM). Todos os experimentos foram realizados em capela de fluxo laminar, tomando-se os cuidados necessários e empregando-se vidrarias, ponteiros e meios de cultura previamente esterilizados.

Figura 33 - Microplaca utilizada nos ensaios biológicos.



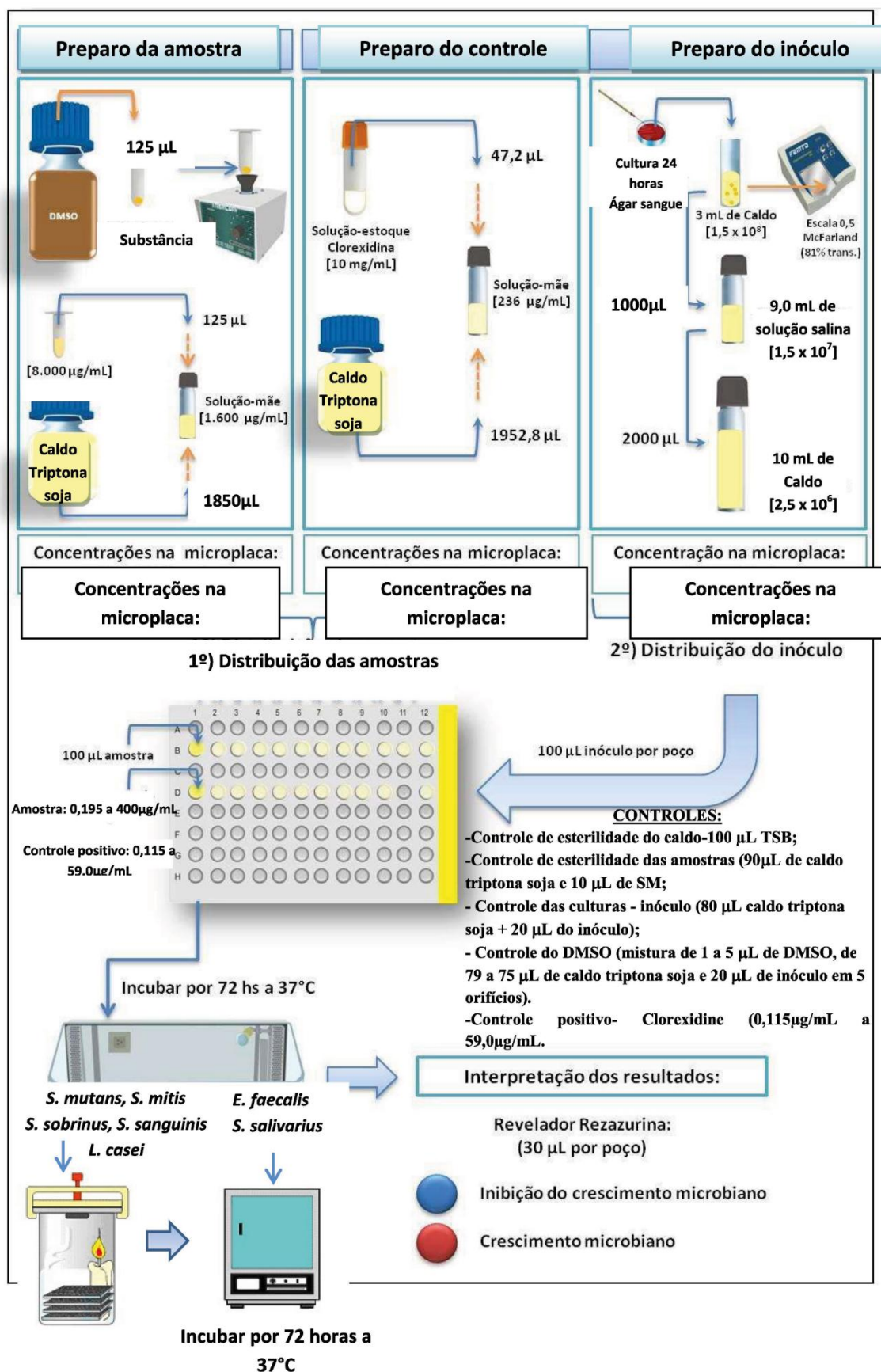
Fonte: KELES, 2008

Foram realizados os seguintes controles: controle de esterilidade do caldo (TSB) (100 µL de caldo triptona soja), controle de esterilidade do sistema solvente utilizado na solubilização dos extratos e das substâncias isoladas (99µL de caldo triptona soja e 1 µL de DMSO) e, controle de esterilidade das amostras (90µL de caldo triptona soja e 10 µL de SM) que devem apresentar ausência de crescimento microbiano. Realizou-se também controle das culturas - inóculo (80 µL caldo triptona soja + 20 µL do inóculo), que devem apresentar crescimento microbiano, devido à ausência de agentes antimicrobianos. Além disso, foi realizado também o controle do DMSO (mistura de 1 a 5 µL de DMSO, de 79 a 75 µL de caldo triptona soja e 20 µL de inóculo em 5 orifícios), que devem apresentar crescimento bacteriano, indicando a ausência de interferência do DMSO no crescimento dos microrganismos.

Como controle positivo frente aos microrganismos indicadores utilizou-se a clorexidina. Conforme mencionado anteriormente, as atividades foram avaliadas para concentrações finais da clorexidina (nos poços das microplacas) na faixa de 0,115µg/mL a 59,0µg/mL.

As microplacas permaneceram incubadas em aerobiose a 37 °C durante 24 h. *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus* e *L. casei* foram incubados em microaerofilia (5% CO₂), enquanto *S. salivarius* e *E. faecalis* foram incubados em aerofilia. Posteriormente, foram adicionados em cada orifício 30 µL de solução aquosa de resazurina a 0,02 %. A manutenção da cor azul nos orifícios é interpretada como ausência de crescimento microbiano (microrganismo sensível à substância avaliada).

Figura 34 - Procedimentos para determinação da CIM pelo método da microdiluição em caldo.



Fonte: adaptado de CARRIJO, 2013.

3.5.4 Atividade antimicrobiana frente aos microrganismos endodônticos

3.5.4.1 Microrganismos utilizados

As cepas foram provenientes da American Type Culture Collection (ATCC) mantidas na coleção de cultura do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA/UNIFRAN), sob criopreservação a - 80°C. Para os ensaios frente a bactérias endodônticas foram utilizadas cepas padrão de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039), *Prevotella nigrescens* (ATCC 33563), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) e *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285).

3.5.4.2 Preparo das soluções, meios de cultura e inóculos

Os meios de cultura utilizados nos ensaios de atividade antibacteriana foram Caldo Brucella suplementado (Difco Labs, Detroit, Michigan, USA) e Ágar Schaedler suplementado (Difco Labs, Detroit, Michigan, USA) adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro para bactérias anaeróbias e as soluções utilizadas foram solução de hemina e solução de menadione, descritos a seguir.

3.5.4.2.1 Preparo da solução de hemina

Após a solubilização de 0,05 g de hemina em 10 mL de NaOH a 1N, 90mL de água destilada esterilizada foram adicionados para se obter uma solução com concentração final de 5 mg/mL. Para garantir a esterilidade da solução preparada, procedeu-se a filtração em membrana filtrante de 0,22 µm para um tubo de vidro esterilizado. Para suplementar o meio de cultura anaeróbio (caldo ou ágar), 1 mL da solução de hemina foi adicionada para 1L de meio esterilizado (CLSI, 2007).

3.5.4.2.2 Preparo da solução de menadione

Para o preparo da solução à 1 mg/mL, foram dissolvidos 0,01 g de menadione em 10 mL de etanol absoluto em tubo de vidro esterilizado. Conforme o item anterior, a mesma proporção da solução é adicionada ao meio de cultura esterilizado: 1 mL da solução de menadione para 1 L de meio esterilizado (CLSI, 2007).

3.5.4.2.3 Preparo do caldo Brucella (Difco)

Foram dissolvidos 28,4g do pó (Tabela 5) em 1000,0 mL de água destilada, procedendo em seguida, a homogeneização do meio e esterilização por 15 minutos a 121°C

na autoclave. Após a autoclavação foi suplementado com 1mL de solução de hemina a 5,0 mg/mL e 1,0 mL de solução de menadione a 1,0 mg/mL.

Tabela 5 - Composição do caldo Brucella.

Constituintes	Quantidade (g)
Digestão Pancreática de Caseína	8,1
Digestão Peptídica de Tecido Animal	2,5
Digestão Papaínica de farelo de soja	1,0
Dextrose	5,82
Extrato de Levedura	5,0
Cloreto de Sódio	1,7
Fosfato dipotássico	0,082
Hemina	0,01
L-Cystina	0,4
TRIS (hidroximetil) aminometano	3,0

3.5.4.2.4 Preparo do Ágar Schaedler (Difco)

Após a solubilização de 41,9 g do pó (Tabela 6) em 1000,0mL de água destilada, o meio de cultura foi aquecido e homogeneizado até a completa dissolução do pó. Em seguida, o meio foi autoclavado por 15 minutos a 121 °C. Após a esterilização, foi suplementado com 1,0 mL de solução de Hemina a 5mg/mL, 1,0 mL de solução de menadione a 1,0 mg/mL e 5% de sangue desfibrinado de carneiro e distribuídos 25,0 mL em placas de Petri (90 x 15 mm) (CLSI, 2007).

Tabela 6 - Composição do Ágar Schaedler.

Constituintes	Quantidade (g)
Digestão Pancreática de Caseína	8,2
Digestão Peptídica de Tecido Animal	2,5
Digestão Papáinica de farelo de soja	1,0
Dextrose	5,8
Extrato de Levedura	5,0
Cloreto de Sódio	1,7
Fosfato dipotássico	0,8
Hemina	0,01
L-Cystina	0,4
TRIS (hidroximetil) aminometano	3,0
Ágar	13,5

3.5.4.2.5 Preparo das amostras

Amostras de 1,0 mg das substâncias testadas foram pesadas em balança analítica digital, e solubilizadas em 125,0 μL de DMSO. O DMSO foi considerado o melhor solvente por ser pouco volátil e não permitir a precipitação da amostra antes mesmo de diluída. A partir desta solução a 8.000 $\mu\text{g/mL}$, alíquotas de 125,0 μL foram adicionadas em 500 μL de caldo Brucella previamente suplementado para se obter uma solução-mãe a 1.600 $\mu\text{g/mL}$. Esta concentração foi definida para avaliar a CIM da substância por diluição seriada em microplacas de 96 poços entre as concentrações de 400 e 0,195 $\mu\text{g/mL}$.

3.5.4.2.6 Preparo do controle positivo

Como controle positivo, foi utilizado o metronidazol, segundo preconizado pelo CLSI (2007), frente às cepas de referência para o controle de qualidade *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) e *Bacteroides thetaiotaomicron* (ATCC 29741) nas concentrações de 5,9 a 0,0115 $\mu\text{g/mL}$.

3.5.4.2.7 Padronização da densidade do inóculo

Para a obtenção do inóculo das bactérias anaeróbias, as cepas armazenadas em freezer à -80 $^{\circ}\text{C}$ foram ressuspensas em caldo Brucella suplementado. Para a confirmação da pureza das cepas, as bactérias avaliadas no ensaio, foram repicadas em ágar Schaedler acrescido de sangue desfibrinado de carneiro 5%, hemina (5,0 mg/mL) e menadione (1,0

mg/mL). Procedeu-se a incubação em temperatura de 36 °C em câmara de anaerobiose durante 72 horas em uma atmosfera contendo 5-10% de H₂, 10% de CO e 80-85% de N₂.

Após a confirmação, as cepas foram então utilizadas para os ensaios de determinação da CIM.

A quantidade do inóculo foi padronizada a fim de assegurar a reprodutibilidade dos ensaios, pois a densidade do inóculo influencia no resultado dos experimentos. Primeiramente foi preparada a escala 0,5 de McFarland segundo Bier (1981). Em seguida foram transferidos 2 mL dessa suspensão para uma cubeta espectrofotométrica. Para calibrar a transmitância a 100% em um espectrofotômetro a um comprimento de onda 625 nm, foi utilizada água destilada. Em seguida foi colocada a suspensão do tubo 0,5 de McFarland, obtendo-se uma transmitância de 81%. Todas as suspensões bacterianas foram ajustadas na mesma transmitância.

3.5.4.2.8 Preparo da suspensão bacteriana

Com o auxílio de uma alça de inoculação esterilizada, foram transferidas culturas de 72 horas das bactérias para os tubos contendo 3,0 mL de caldo Brucella suplementado. As suspensões foram padronizadas com escala 0,5 McFarland (1,5 x 10⁸ UFC/mL) em espectrofotômetro de acordo com o item 3.5.4.2.7.

Após a padronização, foram realizadas diluições de cada suspensão bacteriana transferindo inicialmente 500 µL para um tubo contendo 4,5 mL de caldo Brucella suplementado (1,5 x 10⁷ UFC/mL). A partir deste tubo, 2 mL foram transferidos para um outro tubo contendo 13 mL de caldo Brucella suplementado obtendo uma concentração final de 2 x 10⁶ UFC/mL. Acrescentou-se 100,0 µL da suspensão bacteriana nas microplacas, obtendo-se um volume final de 200 µL nos poços, resultando em uma concentração de 10⁶ UFC/ml por poço.

3.5.4.2.9 Distribuição das amostras na microplaca pelo método da microdiluição em caldo para determinação da CIM

Após o preparo das soluções das substâncias teste do controle positivo (metronidazol) e das suspensões bacterianas conforme os itens anteriores foi aplicado o método da microdiluição em caldo para determinação da CIM.

Inicialmente em microplacas de 96 poços, foram depositados 100,0 µL de caldo Brucella suplementado para possibilitar a diluição seriada das soluções. Para tal diluição, alíquotas de 100,0 µL das soluções da substância teste e do controle positivo foram

acrescentadas nos seus respectivos poços, sendo homogeneizadas e transferidas na mesma quantidade (100,0 µL) para o poço seguinte e assim sucessivamente até completar todas as diluições. Posteriormente, com adição de 100,0 µL das suspensões bacterianas em todos em poços obtém-se um volume final de 200,0 µL por poço, atingindo finalmente as concentrações desejadas de 0,195 µg/mL a 400,0 µg/mL para a substância teste e as concentrações de 0,115 a 59,0 µg/mL para o controle positivo.

Para validação do método, foram realizados os controles de esterilidade do caldo, do solvente (DMSO) e das soluções-mãe da substância teste e do controle positivo, bem como, os controles da cultura e da interferência do solvente na atividade antibacteriana.

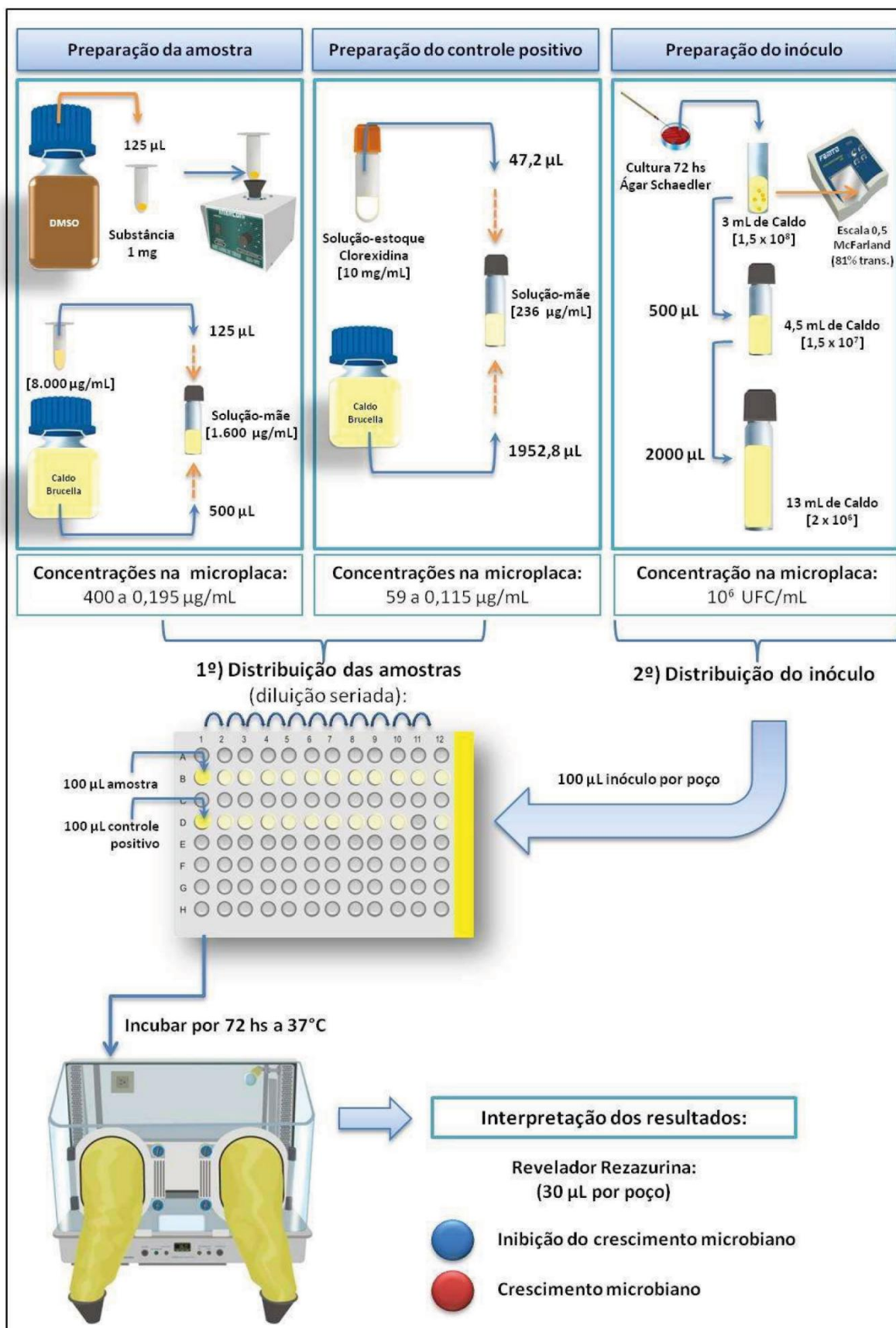
Quanto aos controles de esterilidade, inicialmente 200,0 µL do meio de cultura líquido foram adicionados em um dos poços da microplaca para confirmar a ausência de micro-organismos contaminantes no caldo. Para o controle do solvente, foram acrescentados 2,0 µL de DMSO em 198,0 µL de caldo. Em outro orifício contendo 190,0 µL de caldo, uma alíquota de 10,0 µL da solução-mãe da substância teste foi adicionada para confirmar a sua esterilidade. O controle positivo foi avaliado adicionando 100,0 µL da solução-mãe em 100,0 µL de caldo.

Para o controle da cultura foram adicionados 100,0 µL de caldo *Brucella* suplementado e 100,0 µL da suspensão bacteriana em um dos poços da microplaca para confirmar o crescimento bacteriano. Também foi avaliado se o solvente nas concentrações de 1 a 5% apresenta efeito inibitório sobre crescimento bacteriano, o que poderia interferir na atividade antibacteriana da substância teste. Para este controle, foram adicionados o caldo *Brucella*, concentrações de 1 a 5 % de DMSO por poço e a suspensão bacteriana.

As microplacas foram incubadas em temperatura de 36°C em câmara de anaerobiose durante 72 horas em uma atmosfera contendo 5-10% de H₂, 10% de CO₂ e 80-85% de N₂. Todos os procedimentos relatados nos itens anteriores para a determinação da CIM estão representados na Figura 35, p.65.

Todos os experimentos foram realizados em capela de fluxo laminar, tomando-se os cuidados necessários e empregando-se vidrarias, ponteiros e meios de cultura previamente esterilizados.

Figura 35 - Procedimentos para determinação da CIM pelo método de microdiluição em caldo.

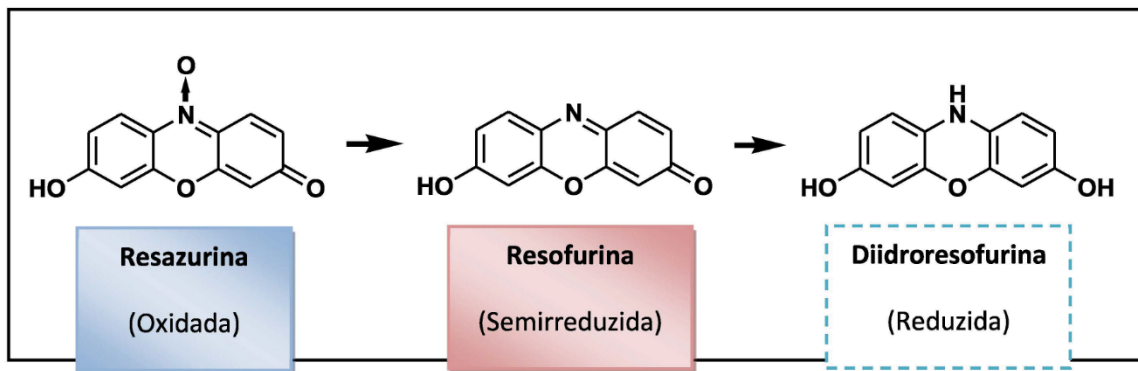


Fonte: CARRIJO, 2013

3.5.5 Leitura dos resultados

Realizada a técnica da CIM, procedeu-se a leitura da CIM adicionando 30 µL do revelador resazurina a 0,02% em cada poço da microplaca. Para interpretação dos resultados, aguardou-se a viragem da cor por aproximadamente 30 minutos. Por apresentar bons resultados e ser considerado um método rápido e de baixo custo, a revelação colorimétrica empregando a resazurina um corante azul indicador de reações de oxirredução, tem sido bastante utilizada em testes de viabilidade celular (ESCOBAR & ARISTIZABAL, 2010) e atividade antibacteriana (NATECHE et al., 2006; PALOMINO et al., 2002; SARKER et al., 2007). A resazurina é azul em seu estado oxidado, tomando-se rosa quando semireduzido a resofurina pela atividade metabólica enzimática das células viáveis. A completa reação de oxirredução está ilustrada na Figura 36.

Figura 36 - Reações de oxirredução da resazurina.



Fonte: Adaptado de FUKUSHIMA et al, 2003

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL DE PARTIDA E DOS PRODUTOS OBTIDOS

A identificação das substâncias obtidas como produtos das reações foi feita através de experimentos de Ressonância Magnética Nuclear e posterior comparação dos dados obtidos nos espectros das mesmas com os dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do ácido caurenóico e do ácido pimaradienóico, percebendo-se assim os sinais das novas estruturas formadas. Foram identificadas seis substâncias obtidas em reações de semissíntese.

Como se tratam de repetições de reações químicas para o preparo de derivados dos diterpenos da classe dos pimaranos e cauranos, a caracterização dos que já foram preparados anteriormente foi realizada também por comparação de dados de RMN com aqueles previamente publicados na literatura (DA COSTA et al., 1996; SOUZA, 2011).

Primeiramente serão apresentados e discutidos os dados dos materiais de partida, ácido caurenóico, ácido caurenóico metoxilado, ácido pimaradienóico e ácido pimaradienóico hidrogenado. Em seguida, serão apresentados os espectros dos produtos das reações e os mesmos serão comparados com dados presentes na literatura e com os espectros dos materiais de partida.

Vale ressaltar que, no caso dos diterpenos, o excesso de sobreposição dos sinais dificulta bastante o estudo detalhado dos sinais dos espectros de RMN. Todos os vários grupos CH_2 das moléculas acabam resultando em sinais muito complexos e numa região, o que causa sobreposição. É por isso que é muito comum serem analisados apenas os sinais de hidrogênios olefinicos, carbinólicos e de metilas.

4.1.1 Identificação do ácido caurenóico

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do ácido caurenóico estão apresentados nas Figuras 37 e 38.

Figura 37 - Espectro de RMN de ^1H da amostra obtida de ácido caurenóico.

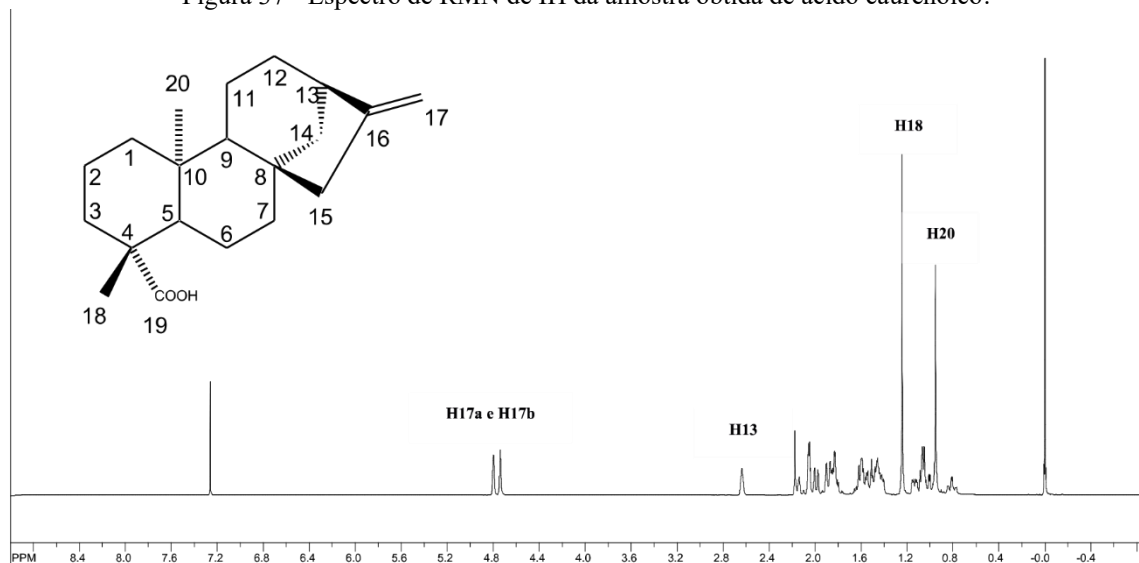
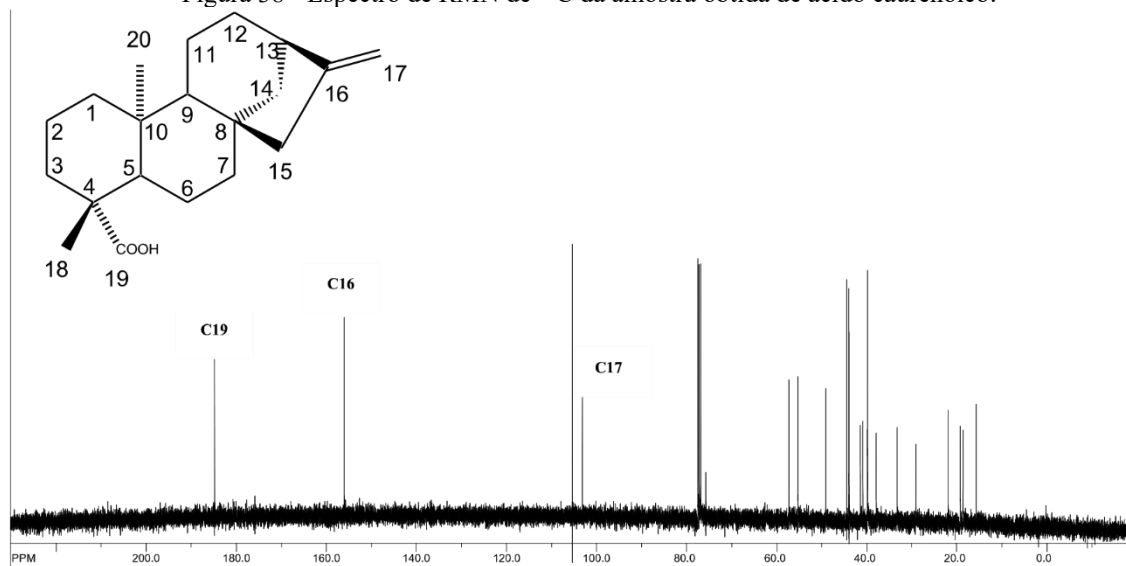


Figura 38 - Espectro de RMN de ^{13}C da amostra obtida de ácido caurenóico.



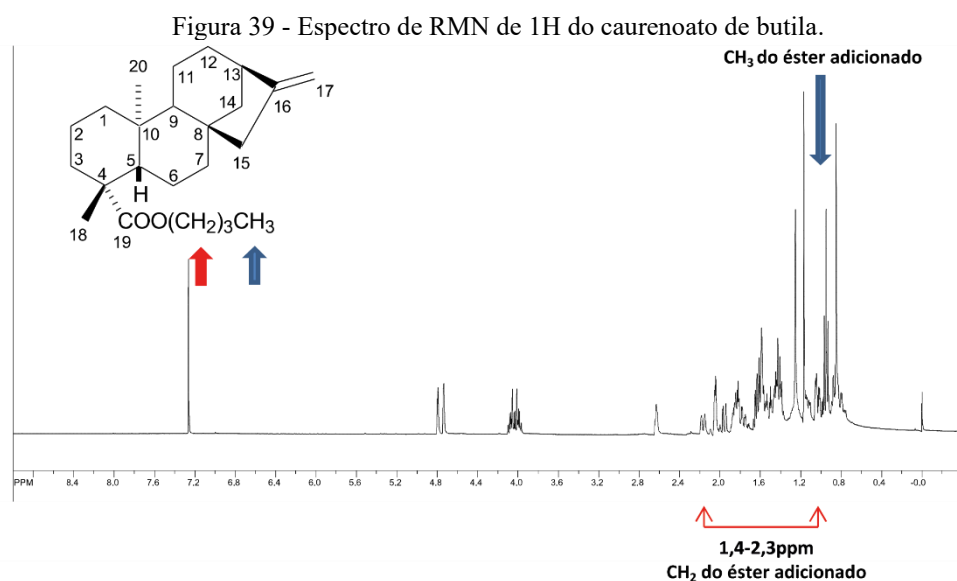
A identificação de ácido caurenóico foi feita por comparação de dados de RMN obtidos para a substância isolada com os dados de RMN da literatura (NASCIMENTO, 2001; SOUZA, 2011).

O espectro de RMN de ^1H para o ácido caurenóico mostra diferentes sinais na região de 0,97 e 2,20 ppm, indicando pouca oxigenação e/ou instauração. Observam-se dois singletos em 1,20 e 0,85 ppm, integrados para 3H cada, referentes aos grupos metílicos da molécula. Pode-se observar ainda a presença de dois singletos em 4,73 e 4,79 ppm, integrados para 1H cada e que são atribuídos aos dois hidrogênios da ligação dupla exocíclica. Há também um singlete em 2,65 ppm (^1H) referente ao hidrogênio do CH na cabeça de ponte.

O RMN de ^{13}C mostra a presença de 20 sinais, destacando-se o carbono da carboxila em 185,5 ppm, o carbono olefínico quaternário (sp^2) em 156,3 ppm e o carbono metilênico em 103,6 ppm.

4.1.2 Identificação do caurenato de butila

A estrutura deste derivado foi confirmada após a análise de RMN de ^1H . O espectro para esta substância encontra-se na Figura 39.



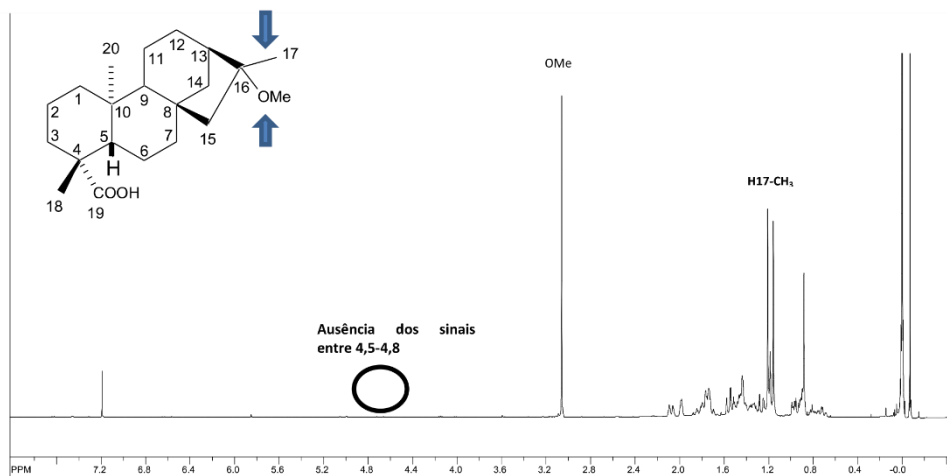
Na comparação do espectro do caurenato de butila (Figura 39) com o espectro de ácido caurenóico (Figura 37), além da semelhança entre os valores dos sinais correspondentes aos grupos comuns às duas moléculas, nota-se um sinal em 0,94 ppm, referente a metila da cadeia do éster apresentando multiplicidade definida como tripleto, o que é esperado por apresentar um CH_2 como vizinho. O espectro mostra ainda uma intensificação de sinais na região entre 1,40 - 2,30 ppm o que provavelmente deve ser atribuído aos outros sinais de CH_2 do éster acrescentados à molécula.

Além disso, há um novo sinal em 4,05 ppm, integrando para dois, atribuído ao CH_2 ligado diretamente ao oxigênio do éster formado, o que explica o deslocamento deste.

4.1.3 Identificação do ácido caurenóico metoxilado

O espectro de RMN de ^1H do ácido caurenóico metoxilado obtido no presente trabalho está apresentado na Figura 40.

Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H do ácido caurenóico metoxilado.



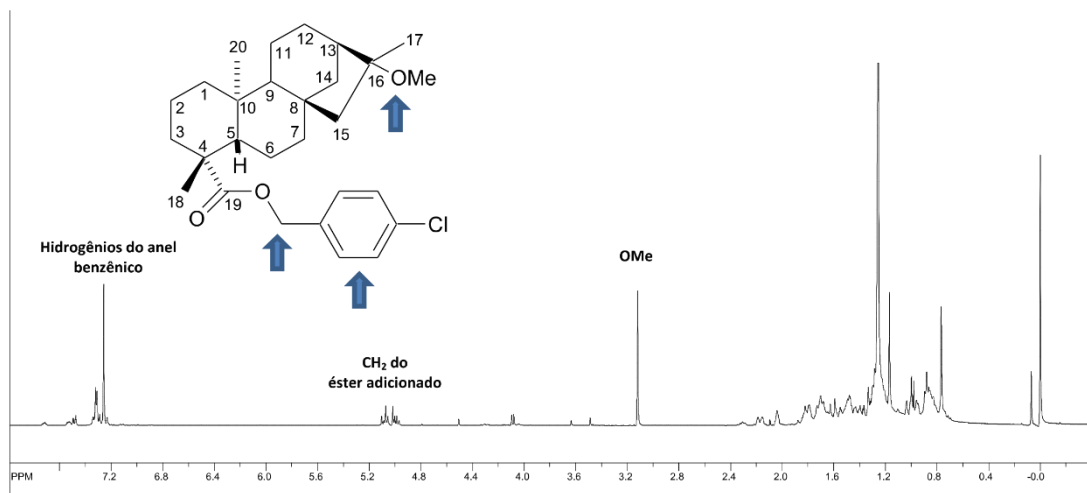
Através da comparação do espectro do ácido caurenóico metoxilado (Figura 40) com o espectro do ácido caurenóico (Figura 37), pode-se observar a ausência dos sinais de hidrogênios de dupla ligação na região de 4,50 a 4,80 ppm, o que confirma o sucesso da reação para metoxilação do ácido caurenóico, uma vez que o produto não tem hidrogênios ligados a carbonos com dupla ligação. Além do mais, existe um sinal novo na região entre 0,8 e 1,4 ppm referente à nova metíla da molécula. Nota-se ainda, na Figura 40, a presença de um sinal próximo a 3,00 ppm, que é bem característico de um grupo metoxila, exatamente o que foi adicionado no substrato.

Todos os dados descritos acima identificam a estrutura proposta para o produto esperado.

4.1.4 Identificação do caurenato de 4-clorobenzila metoxilado

O espectro de RMN de ^1H obtido no presente trabalho para a substância citada abaixo está apresentado na Figura 41.

Figura 41 - Espectro de RMN de ^1H do caurenoato de 4-clorobenzila metoxilado.

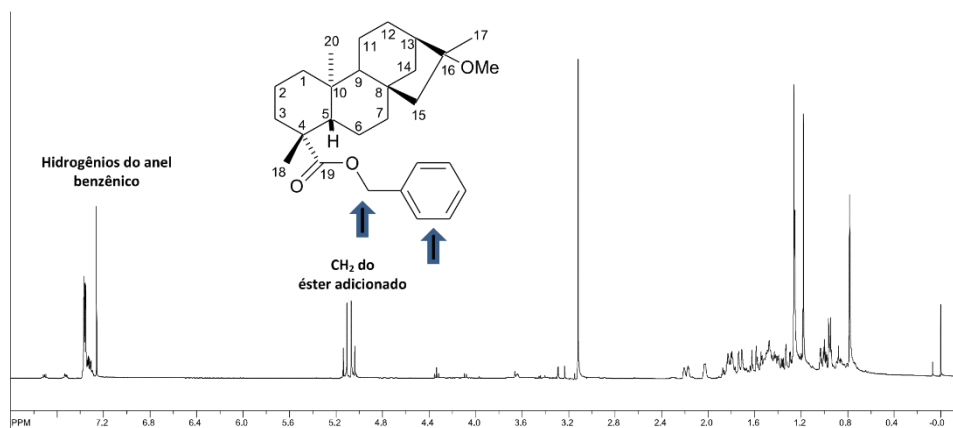


Através da comparação com o espectro de ácido caurenóico metoxilado (Figura 40) com o espectro da Figura 41, nota-se um novo sinal em 5,04 ppm, integrando para dois, referente ao grupamento CH_2 ligado ao oxigênio do éster formado. Pode-se observar, também, na região entre 7,28-7,34 os sinais dos hidrogênios do anel aromático. Os outros sinais apresentam valores de deslocamento químico semelhantes ao ácido caurenóico metoxilado.

4.1.5 Identificação do caurenoato de benzila metoxilado

O espectro de RMN de ^1H do caurenoato de benzila metoxilado obtido no presente trabalho está apresentado na Figura 42.

Figura 42 - Espectro de RMN de ^1H do caurenoato de benzila metoxilado.



Através da comparação do espectro acima com o espectro de ácido caurenóico metoxilado (Figura 40), nota-se um novo sinal em 5,08 ppm, integrando para dois,

correspondente ao grupo CH^2 ligado ao oxigênio do éster formado, exatamente como na substância anterior que tem um grupo semelhante. Na região entre 7,09-7,41 ppm, pode-se observar os sinais dos hidrogênios do anel aromático. Os outros sinais apresentam valores de deslocamento químico semelhantes ao ácido caurenóico metoxilado.

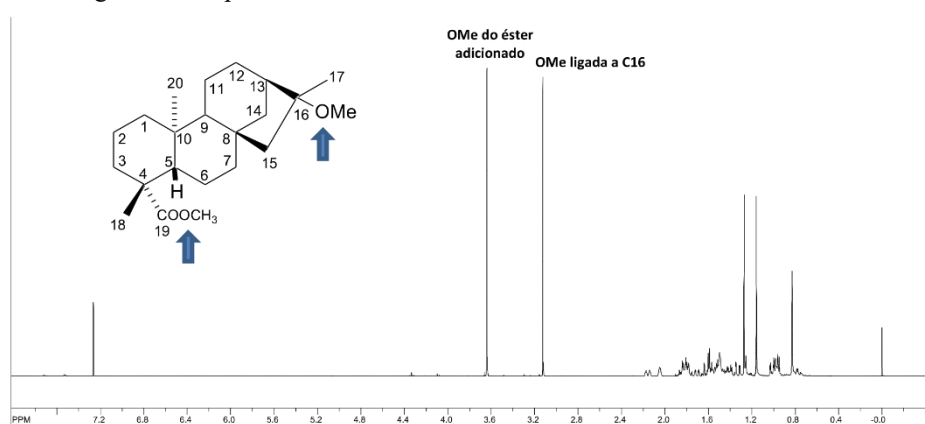
4.1.6 Identificação do caurenato de metila metoxilado

O espectro de RMN de ^1H do caurenato de metila metoxilado obtido no presente trabalho está apresentado na Figura 40.

Pode-se observar na Figura 43 a presença do sinal de metoxila original do material de partida (ácido caurenóico metoxilado) em 3,10 ppm. Observa-se, também, outra metoxila, esta agora do éster metílico formado em 3,60 ppm,. Além disso, as medidas das integrais dos dois grupos metoxila ajudam a confirmar a estrutura.

Os outros sinais apresentaram valores aproximados dos sinais do ácido caurenóico metoxilado (Figura 40), mostrando que a única modificação da molécula trata-se do sinal descrito acima (em 3,60 ppm).

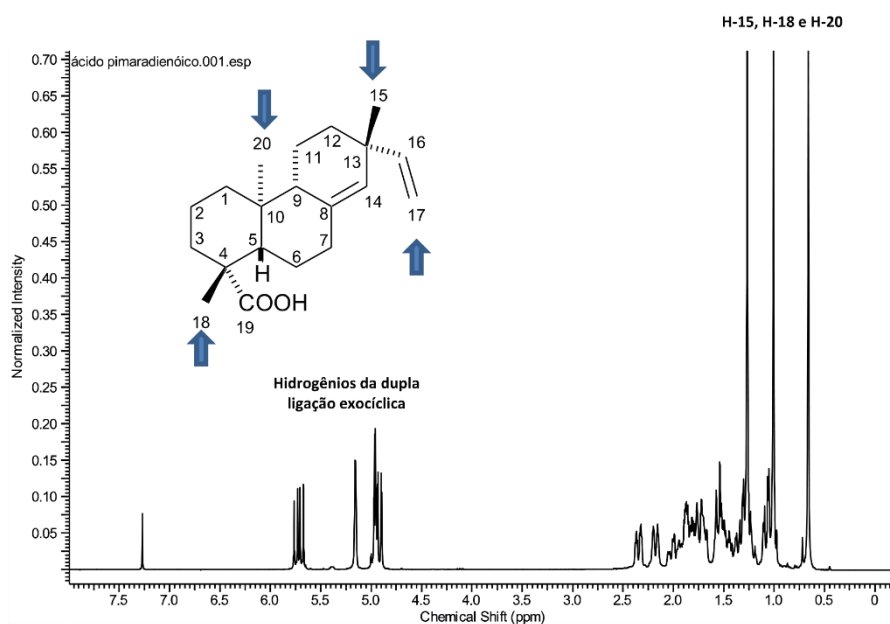
Figura 43 - Espectro de RMN de ^1H do caurenato de metila metoxilado.



4.1.7 Identificação do pimaradionato de benzila hidrogenado

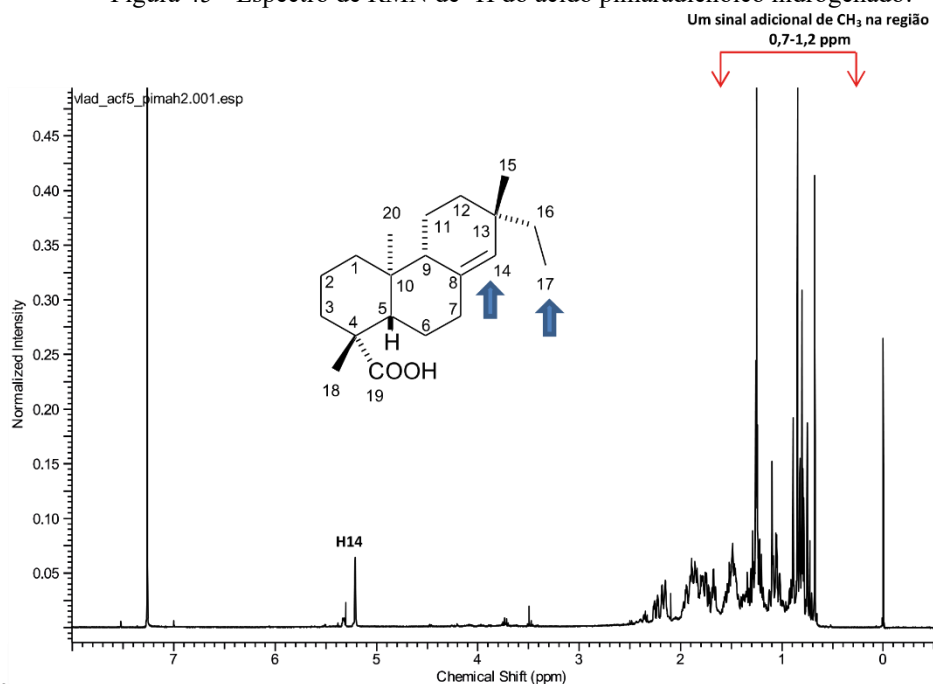
Primeiramente, estão apresentados os espectros de RMN de ^1H dos materiais de partida, do ácido pimaradienóico, e do ácido pimaradienóico hidrogenado, para facilitar a identificação (Figuras 44 e 45).

Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H de ácido pimaradienóico.



No espectro de RMN de ^1H ácido pimaradienóico (Figura 44), observam-se os sinais de seu característico sistema de três hidrogênios em torno da ligação dupla terminal na região de 4,80 a 5,80 ppm. Este sistema é composto de um sinal de hidrogênio tipo duplo-duplete (em 5,70 ppm) que apresenta um J trans de aproximadamente 17Hz e um J eis de aproximadamente 10Hz.; é composto também de dois outros sinais (próximos a 4,90 ppm) que apresentam um J eis de aproximadamente 10Hz e um J gem de aproximadamente 2Hz para um sinal e um J trans de aproximadamente 17Hz e um J gem de aproximadamente 2Hz para outro. Estas características, somadas ao sinal do outro hidrogênio olefinico em 5,20 ppm e os sinais das três metilas (sinais entre 0,70 e 1,20 ppm) confirmam a estrutura do material de partida.

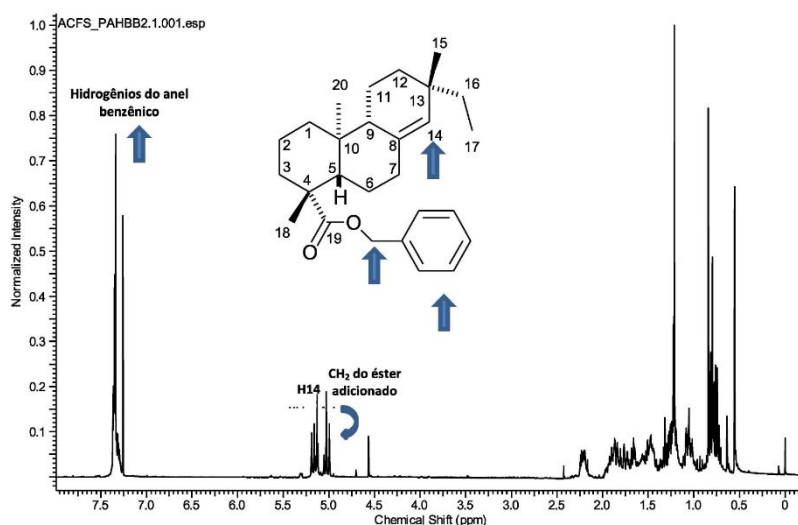
Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H do ácido pimaradienóico hidrogenado.



Após a hidrogenação do ácido pimaradienóico, nota-se no espectro do produto de hidrogenação a ausência dos sinais do sistema de três hidrogênios olefinicos, apesar da manutenção do sinal de hidrogênio olefinico em 5,20 ppm, referente ao hidrogênio da dupla endocíclica. Isso, mais a presença de um sinal a mais de metila na região entre 0,70-1,20 ppm, mostra que a dupla terminal foi hidrogenada. Por outro lado, o sinal em 5,20 ppm mostra que esta dupla não foi hidrogenada na reação química. Estas características confirmam a estrutura da substância.

O ácido pimaradienóico hidrogenado foi utilizado como material de partida para o preparo do pimaradionato de benzila hidrogenado. Ao compararmos o espectro de RMN de ^1H da substância obtida (Figura 46) com o espectro do ácido pimaradienóico hidrogenado (Figura 45) pode-se perceber que existem novos sinais condizentes com a formação de produto. Estes sinais são referentes aos hidrogênios aromáticos (valores de deslocamento químico entre 7,20 e 7,40 ppm), e ao grupamento CH_2 ligado ao oxigênio do éster (valores de deslocamento químico em torno de 5,00 ppm). Este último indica a presença do grupo CH_2 ligado ao anel.

Figura 46 - Espectro de RMN de 1H do pimaradiceonato de benzila hidrogenado.



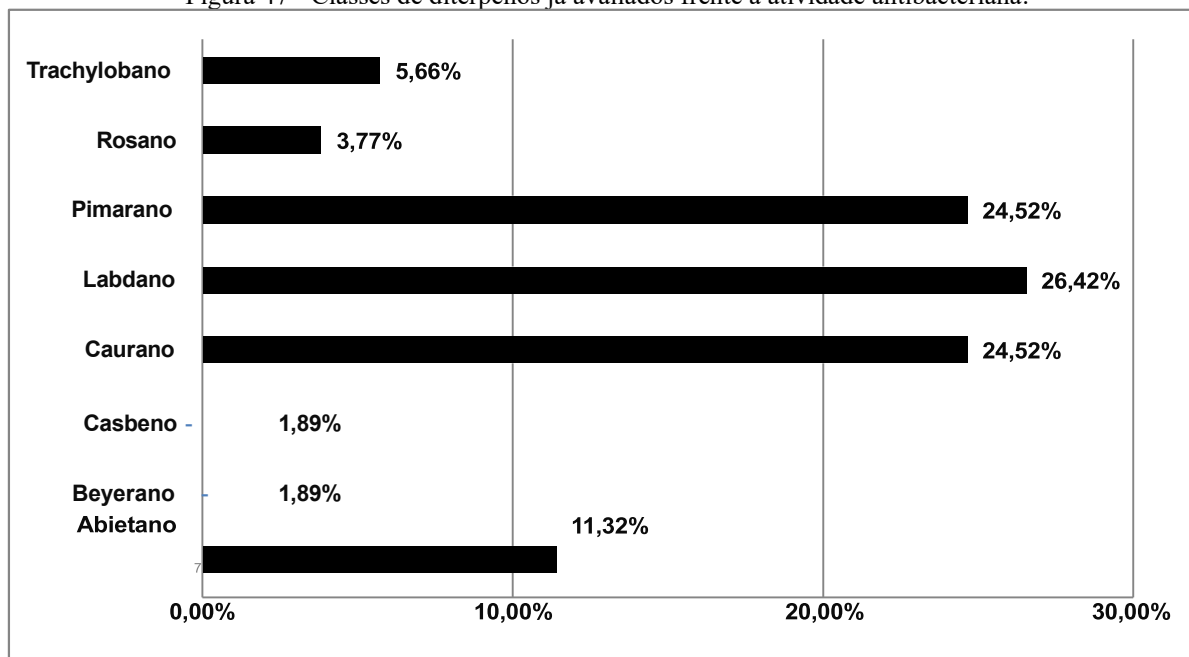
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A MICRORGANISMOS CARIOGÊNICOS E PERIODONTAIS

4.2.1 Revisão de Literatura

No levantamento bibliográfico realizado foram encontrados 18 artigos sobre a atividade antibacteriana de 53 moléculas de diterpenos frente aos microrganismos avaliados no presente estudo (Tabela 1, p. 26). A maior parte delas pertencente às classes dos labdanos (14 compostos, 26,42%), cauranos (13 compostos, 24,52%) e dos pimaranos (13 compostos, 24,52%). Além disso, foram encontrados 6 substâncias diterpênicas da classe dos abietanos (11,32%), 3 compostos do tipo traquilobanos (5,66%), 2 compostos do tipo rosano (3,77%), 1 (1,89%) de cada um dos tipos: casbeno e beyerano (Figura 47).

Vale destacar que não foi encontrada literatura científica relatando a avaliação biológica de nenhum diterpenos de alguma dessas outras classes: phitano, retinano, cembranoclerodano, chetaphanano, lathyrano, fujinano, totarano, cassano, taxano, tigliano, atisano, andromedano, acanano, e gibbereliona.

Figura 47 - Classes de diterpenos já avaliados frente à atividade antibacteriana.



Os compostos descritos foram isolados por maceração nos seguintes solventes hexano (MURTHY et al., 2005), diclorometano (ANDRADE et al., 2011; CARVALHO et al., 2001; HERNÁNDEZ et al., 2012; PORTO et al., 2009a; PORTO et al., 2009b; SEVERIANO et al., 2010; SOUZA et al., 2011a; SOUZA et al., 2011b; VENEZIANI et al., 2011), acetona (ULUBELEN et al., 2001), clorofórmio (AMBROSIO et al., 2008), metanol (ALI et al., 2012), etanol (BERNARDES et al., 2009), etanol a 95% (LIU et al., 2007; LIU et al., 2009), etanol: água (7:3) (YATSUDA et al., 2005) e etanol: água (8:2) (BERNARDES et al., 2010). Além disso, vários compostos relatados foram obtidos por semissíntese a partir dos compostos já isolados anteriormente (CARVALHO et al., 2001; PORTO et al., 2009b; SOUZA et al., 2011b).

Foram identificadas as principais diferenças estruturais das moléculas encontradas na revisão bibliográfica por classe de diterpenos. Em relação à classe dos pimaranos (Figuras 48 e 49) foram encontradas 13 moléculas com mesmo núcleo estrutural, porém diferindo no grau de oxidação. Todas as moléculas apresentaram dupla exocíclica entre C15-C16 (100%) e a maioria apresentou dupla endocíclica entre C8-C14 (75,53%) assim como presença de grupos oxigenados ligados em C19 (74,77%). Vale destacar ainda a presença de grupos oxigenados e não-oxigenados ligados em C3 (30,77%) e em C7 (30,77%), a presença de uma hidroxila ligada em C8 (7,69%), presença de dupla endocíclica entre C8-C9 (7,69%) e presença de dupla endocíclica entre C7-C8 (Figura 50, p.79).

Figura 48 - Estrutura básica dos pimaranos.

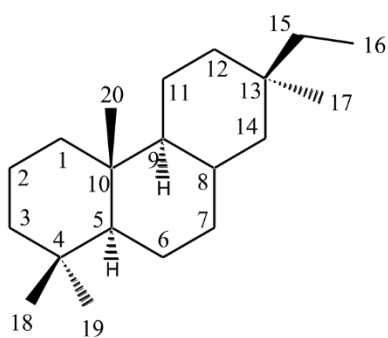
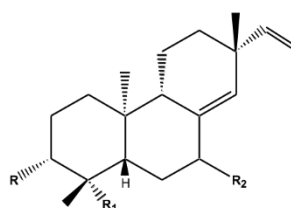
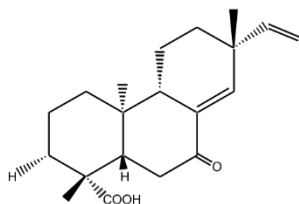


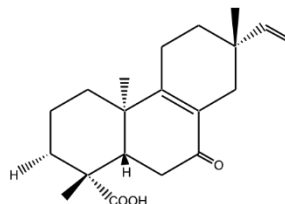
Figura 49 - Diterpenos da classe dos pimaranos encontrados nas referências da revisão.



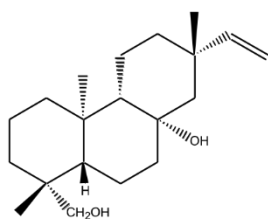
	1	2	3	4	5	6	7	8
R	H	H	OH	OH	CH ₃	$\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCCH}_3 \end{matrix}$	H	H
R₁	CH ₃	COOH	CH ₃	CH ₂ OH	COOH	CH ₃	COO ⁻ Na ⁺	CH ₂ OH
R₂	·····H	·····H	·····H	·····H	·····OH	·····H	·····H	·····H



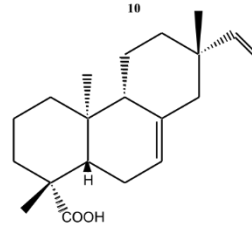
9



10

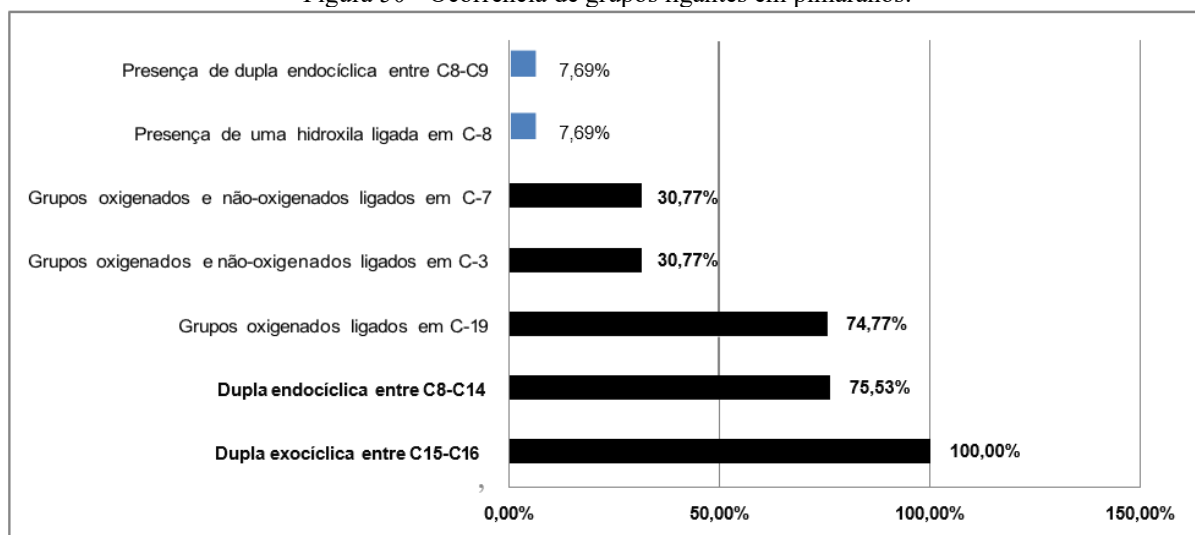


11



12

Figura 50 - Ocorrência de grupos ligantes em pimaranos.



No caso dos cauranos (Figuras 51 e 52), foram encontradas 14 moléculas que apresentaram em sua maioria grupos oxigenados ligados em C19 (92,86%) e dupla ligação entre C15-C16 (64,3%). Além disso, algumas moléculas apresentaram grupos oxigenados ligados em C16 (28,57%) e apenas uma apresentou grupo oxigenado ligado em C15 (7,14%) (Figura 53, p.81).

Figura 51 - Estrutura básica dos cauranos.

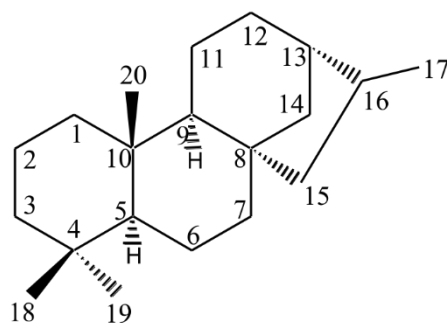
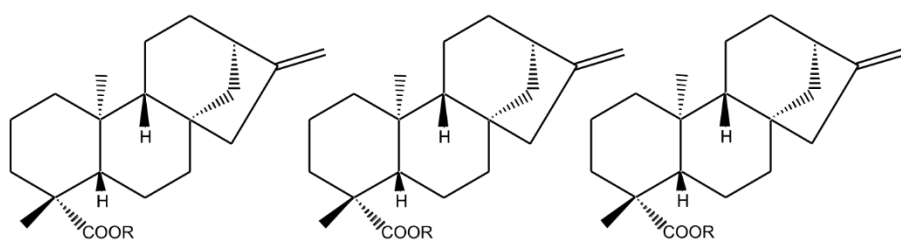


Figura 52 - Diterpenos da classe dos cauranos.

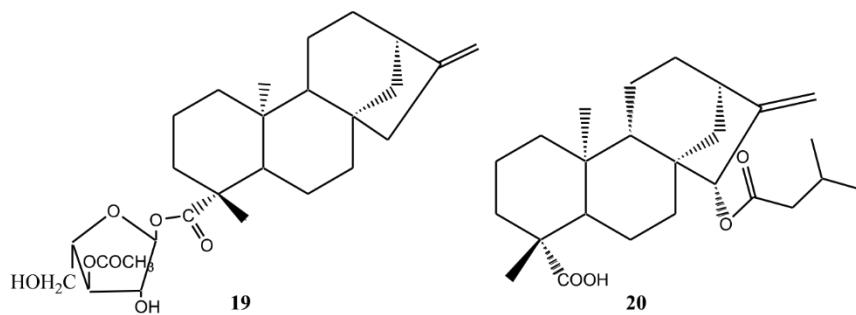


R=3' 4' -diacetoxyxylopyranosyl R=3' 5' -diacetoxyarabinofuranosyl R=3' 6' -diacetoxyglucopyranosyl

16

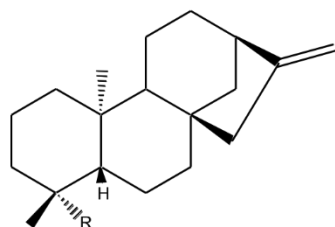
17

18



19

20

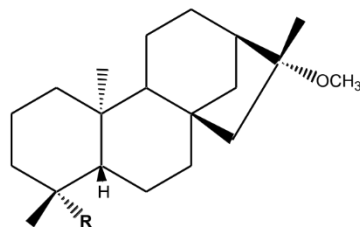


21

22

23

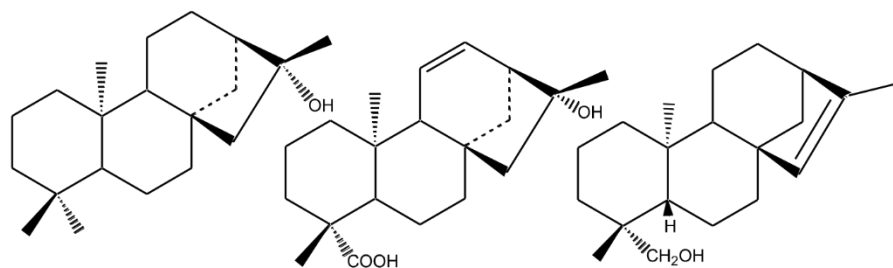
24



25

26

R: COOH COO⁻Na⁺ COOMe CH₂OH COOH COOMe

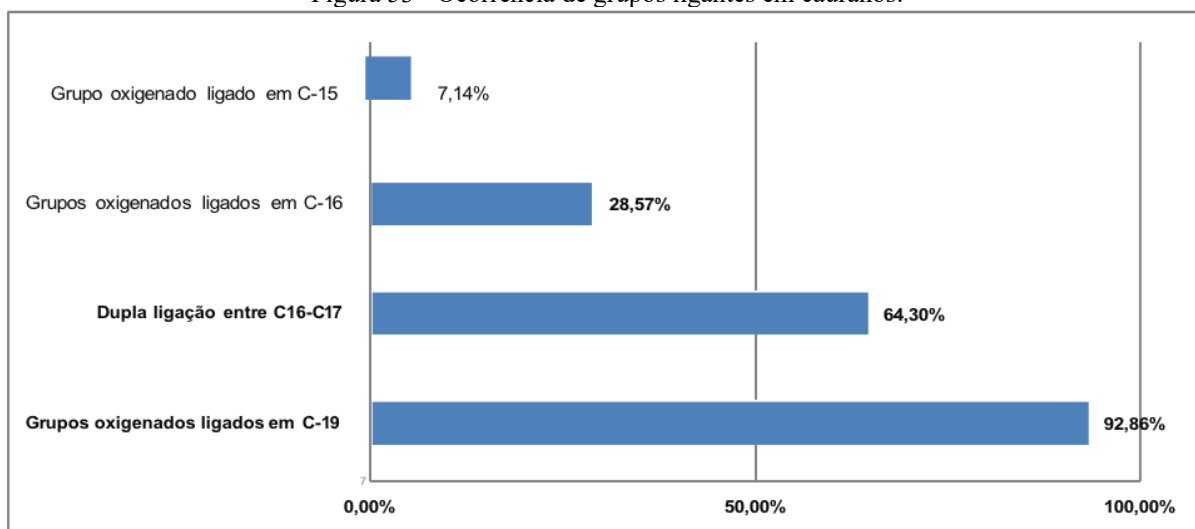


27

28

29

Figura 53 - Ocorrência de grupos ligantes em cauranos.



Já para os labdanos (Figuras 54 e 55), foram identificadas 14 substâncias, em sua maioria, com dupla ligação exocíclica entre C8-C21 (85,71%), dupla ligação entre C13-C14 (78,57%) e ligantes oxigenados em C15 (78,57%). Além disso, 50% das substâncias apresentaram ligantes em C3, 42,86% apresentaram ligantes oxigenados e não oxigenados em C19 e 14,29% apresentaram dupla entre C14-C15 e hidroxilas ligadas em C1 7. Vale destacar ainda que somente uma molécula apresentou um ligante em C22 (OH, 7,14%) e uma não apresentou o C15 (7,14%) (Figura 56, p.83).

Figura 54 - Estrutura básica dos lábdanos.

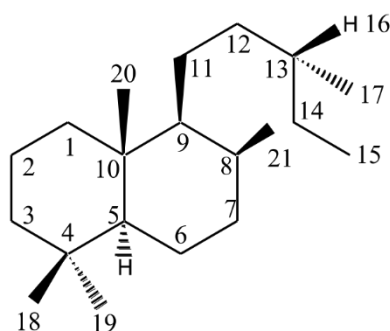
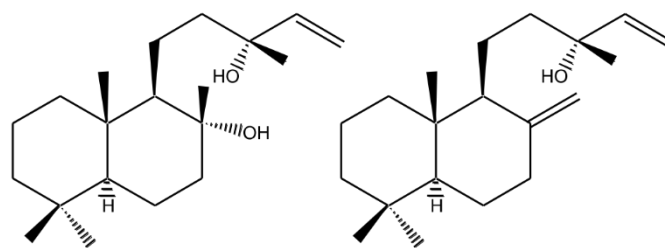
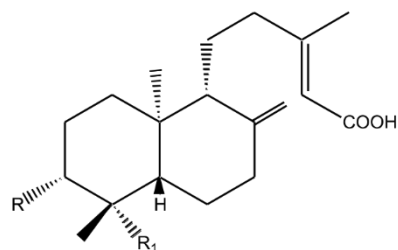


Figura 55 - Diterpenos da classe dos labdanos encontrados nas referências da revisão.



39

40



41

42

43

44

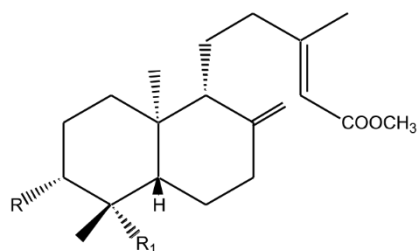
45

46

47

R: H OCOCH₃ OCOCH₃ OH H OH H

R₁: CH₃ CH₃ H CH₃ H H COOH



48

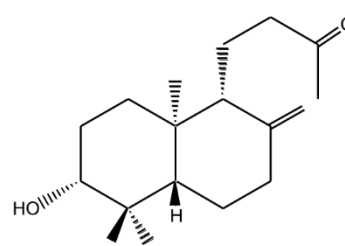
49

50

51

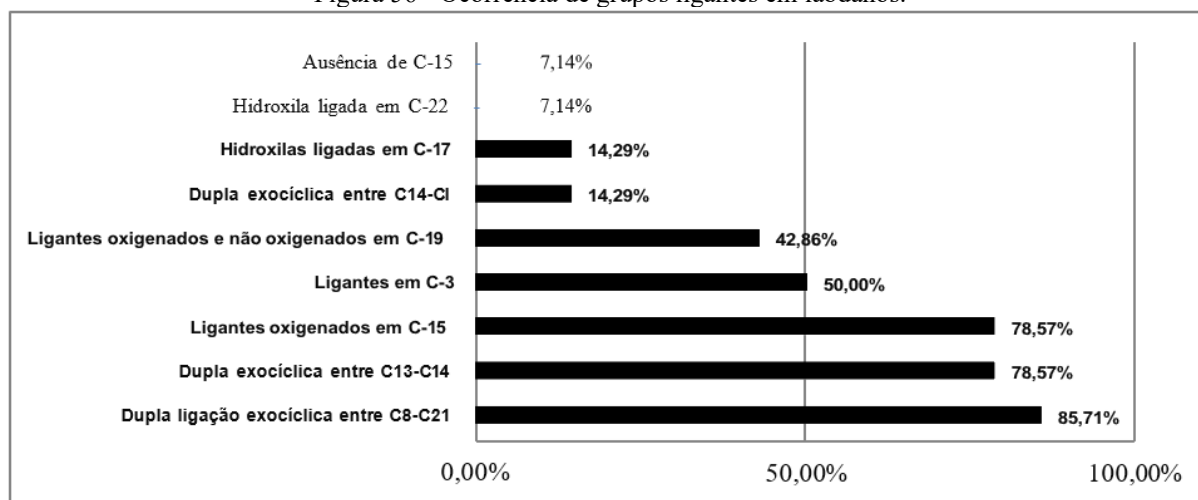
R: H OCOCH₃ H OH

R₁: H H COOCH₃ H



52

Figura 56 - Ocorrência de grupos ligantes em lábdanos.



Em relação à classe dos abietanos (Figuras 57 e 58), foram encontradas 6 moléculas, todas apresentando dupla endocíclica entre C8-C9 (100%) e com ligante oxigenado em C12 (100%), sendo a maior parte hidroxilas (83,33%). Além disso, 66,67% apresentaram anel aromático no terceiro anel; 50% apresentaram ligantes oxigenados em C20 e em C7 e 33,33% apresentaram ligação dupla endocíclica entre C12-C13, carbonila ligada em C14 e hidroxila ligada em C11 (Figura 59).

Figura 57 - Estrutura básica dos abietanos.

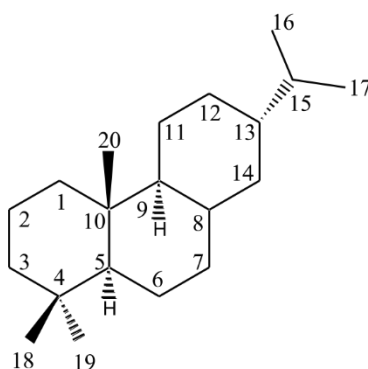


Figura 58 - Diterpenos da classe dos abietanos encontrados nas referências da revisão.

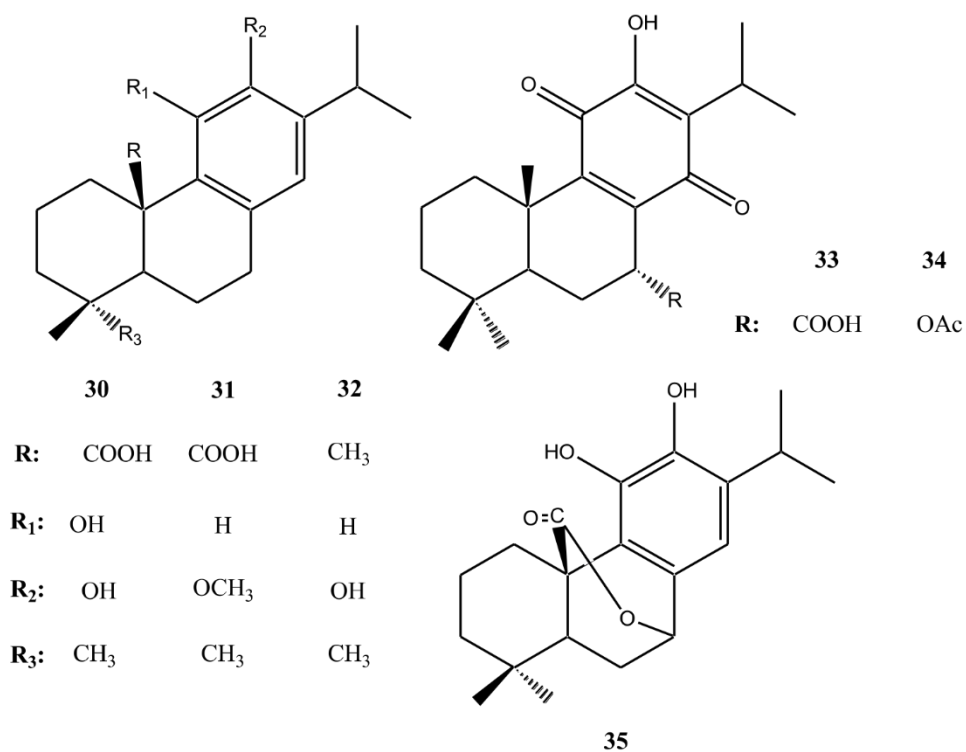
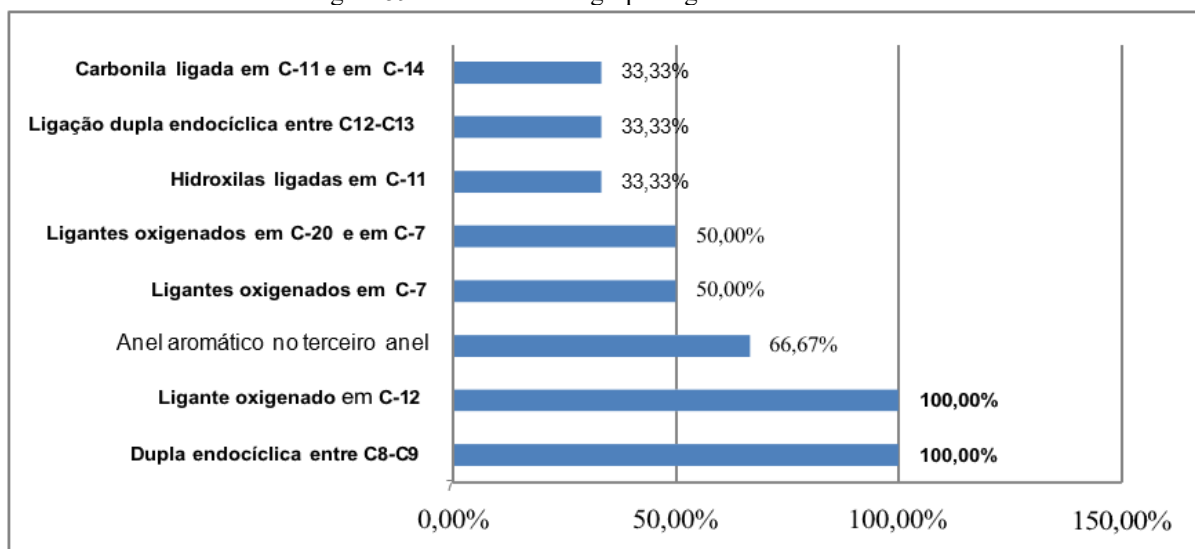


Figura 59 - Ocorrência de grupos ligantes em abietanos.



Foram identificados 3 moléculas da classe dos traquilobanos (Figuras 60 e 61) com mesmo núcleo estrutural, porém diferindo no grupo ligante oxigenado em C19.

Figura 60 - Estrutura básica dos traquilobanos.

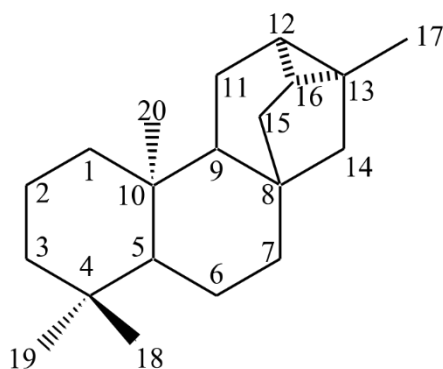
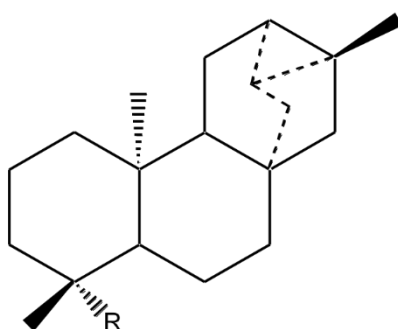


Figura 61 - Diterpenos da classe dos traquilobanos.



36 **37** **38**

R: COOH COOCH₃ CH₂OH

Já para os diterpenos da classe dos rosanos (Figuras 62 e 63), foram encontradas 2 moléculas e ambas apresentaram dupla entre C15-C16 e grupos oxigenados ligados em C19. Além disso, uma delas apresentou hidroxila ligada em C5.

Figura 62 - Estrutura básica dos rosanos.

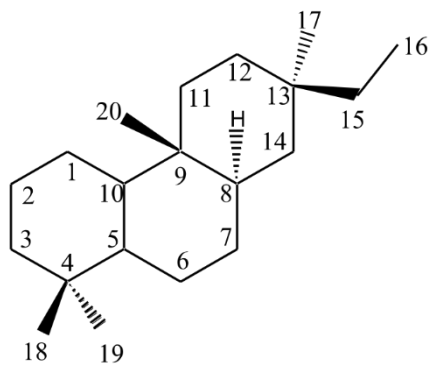
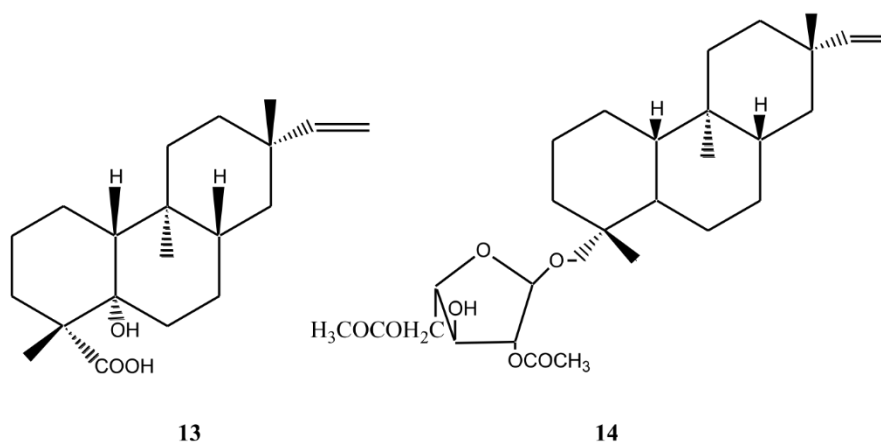


Figura 63 - Diterpenos da classe dos rosanos.



Foi encontrado na revisão realizada um diterpeno da classe dos beyeranos (Figuras 64 e 65) com dupla ligação exocíclica entre C15-C16 e uma carboxila ligada em C19.

Figura 64 - Estrutura básica dos beyeranos.

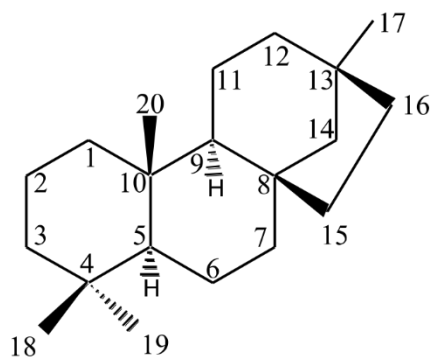
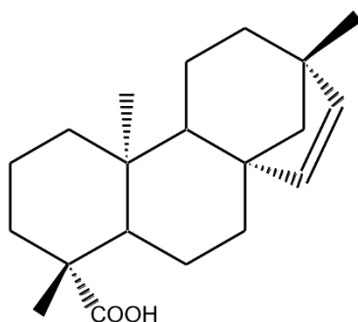


Figura 65 - Diterpeno do tipo beyerano.



15

Os resultados das atividades antimicrobianas (Tabela 1, p.26) foram analisados e comparados com a variação da estrutura química para um melhor entendimento com relação à atividade farmacológica apresentada pelos mesmos.

Urzúa e colaboradores (2008), mostraram que a presença de sistema de anéis decalina lipofílicos com um grupo hidrofílico doador de ligação de hidrogênio (HBD) é muito importante para a atividade antimicrobiana exibida por diterpenos. Os mesmos autores relataram ainda que a adição de um segundo grupo HBD no sistema de anel decalina leva a uma redução ou supressão da atividade.

De acordo com os dados da Tabela 1 (p.26), da Figura 49 (p.78) e da Figura 66 (p.88), os melhores valores de CIM de diterpenos da classe dos pimaranos para os microrganismos cariogênicos testados foram obtidos com as substâncias 2 (P), 3 (P), 6 (P), 7 (P), 8 (P) e 11 (P). As substâncias 2 (P), 3 (P), 6 (P), 7 (P) e 8 (P) apresentaram um grupo HBD ligado ao sistema de anéis decalina lipofílico em C19 e em C3. Já o composto 11, discordando do estabelecido por Urzúa e colaboradores (2008) apresentou dois grupos HBDs ligados ao sistema de anéis em C19 e C8.

Os compostos do tipo pimarano 4 (P), 5 (P), 9 (P) e 10 (P) apresentam dois grupos HBDs, o que pode justificar a redução da atividade em relação aos microrganismos cariogênicos testados.

Em relação aos microrganismos periodontais (Figura 67, p.88), as substâncias mais ativas são a 2 (P), 3 (P) e 7 (P) com valores de CIM menores que 10 µg/mL, exceto para *F. nucleatum* (CIM >80µg/mL) todas apresentando um HBD e corroborando a tese de Urzúa e colaboradores. As substâncias menos ativas foram a 1(P), 4(P), 5(P), 6(P) e 11(P) e todas apresentaram dois grupos HBDs, concordando com Urzúa e colaboradores (2008), exceto a substância 6(P).

Figura 66 - Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g/mL}$) em p1maranos frente aos microrganismos cariogênicos.

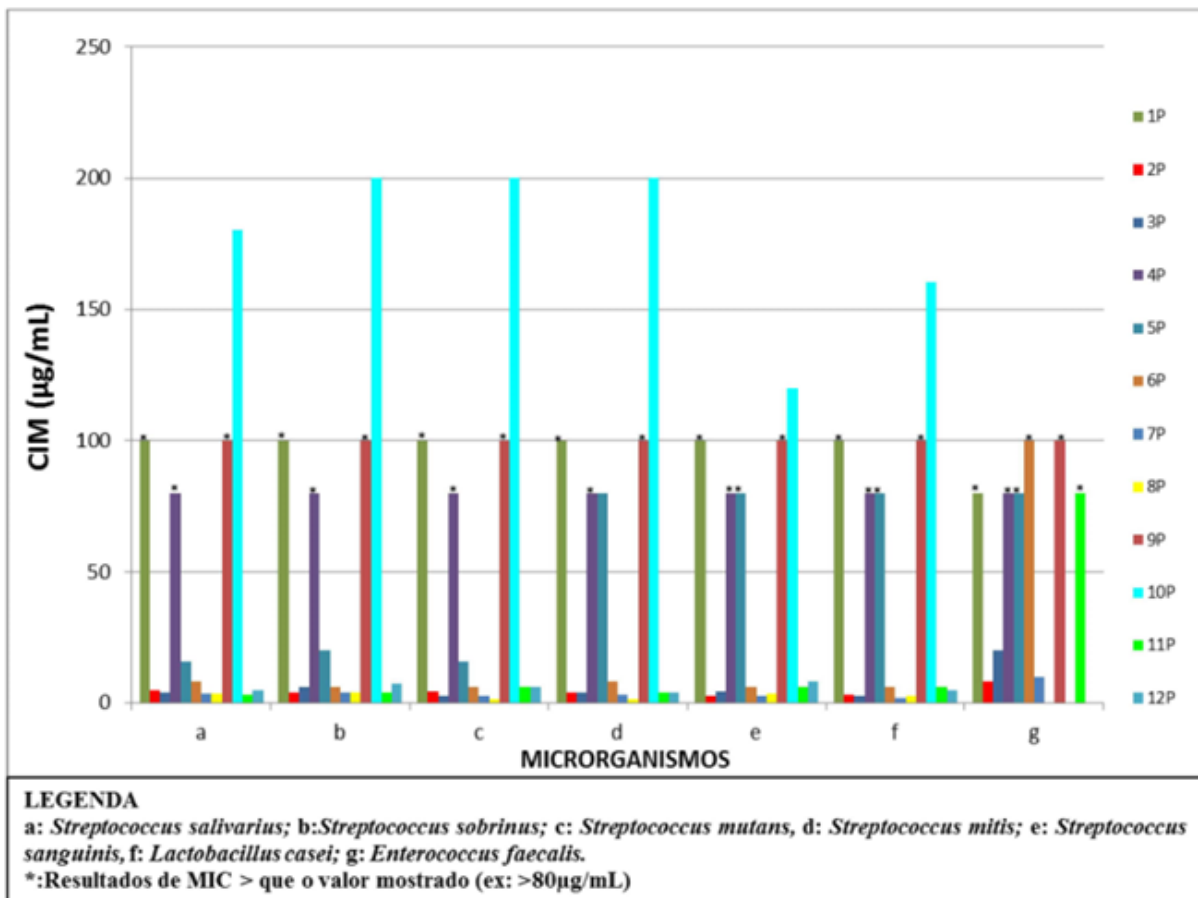
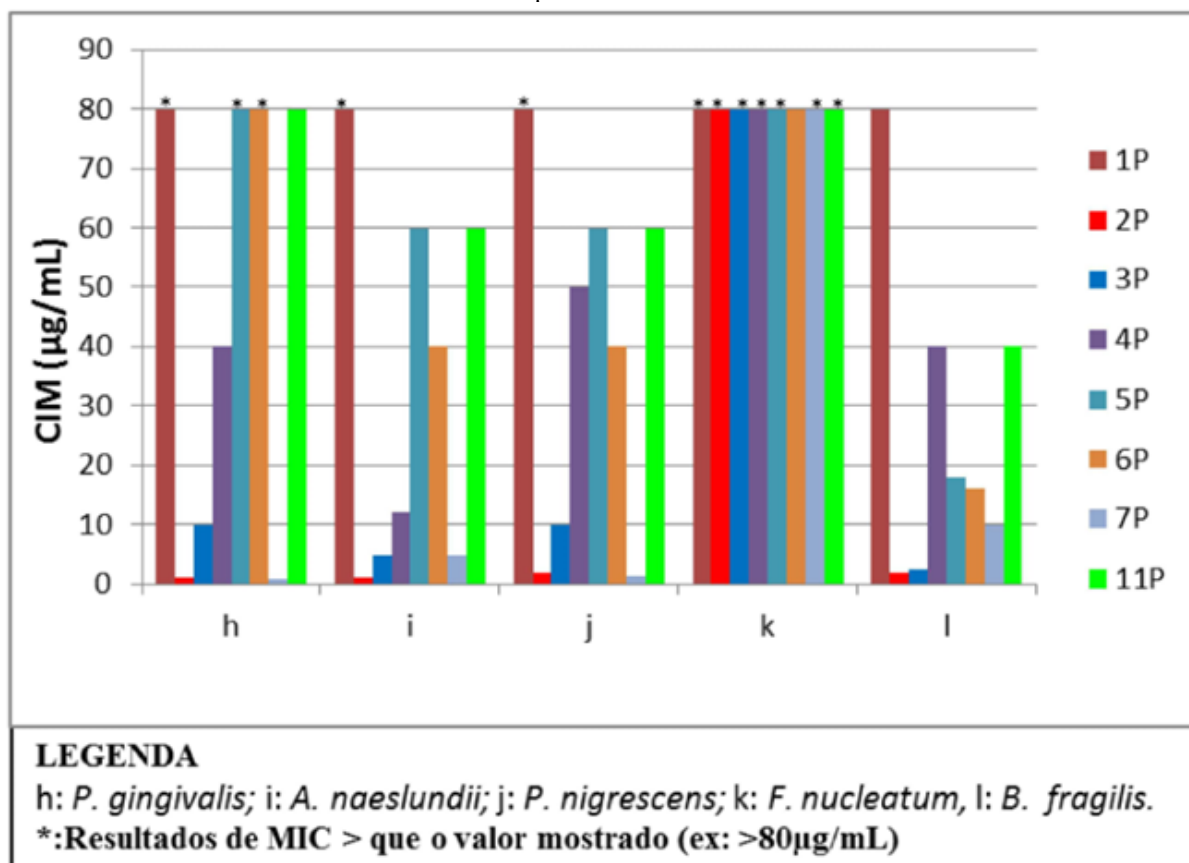


Figura 67 - Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g/mL}$) em plamaranos frente aos microrganismos periodontais.



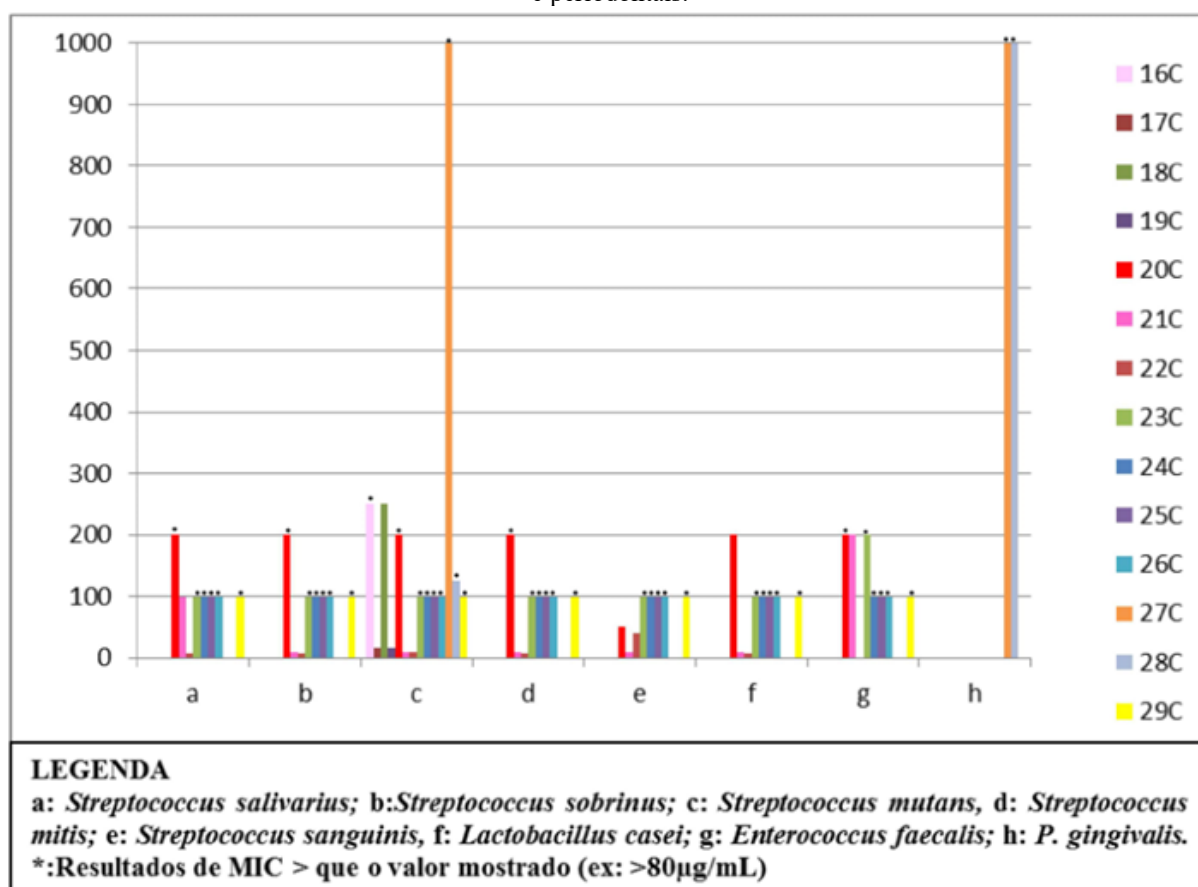
O isopimarano 12(P) (Figura 49, p.78) apresenta um ligante HBD em C19 e valores de CIM menores que $10\mu\text{g/mL}$, concordando com a proposta de Urzúa e colaboradores (2008). Já as substâncias da classe do Rosano (Figura 63, p. 86) também concordam com a proposta uma vez que apresentaram dois grupos HBDs em cada molécula e valores de CIM maiores que $10\mu\text{g/mL}$.

De acordo com os dados da Tabela 1 (p.26), da Figura 52 (p. 80) e da Figura 68 (p.90), vale inicialmente destacar que existe somente um trabalho relatando a atividade antimicrobiana dos cauranos 27 (C) e 28 (C) frente ao microrganismo *P. gingivalis*. Além disso, os melhores valores de CIM de diterpenos da classe dos cauranos para os microrganismos foram 17 (C), 19 (C), 21 (C) e 22 (C) com valores de MIC menores que $16\mu\text{g/mL}$ e todos com grupamentos hidrofílicos ligados em C19. As substâncias 20 (C), 25 (C), 26 (C) e 28 (C) apresentam dois grupos HBD ligantes e valores de CIM maiores que $100\mu\text{g/mL}$ concordando com a proposta de Urzúa e colaboradores (2008). Porém, algumas substâncias (23 (C), 24 (C), 27 (C) e 29 (C)) discordam dos autores, uma vez que apresentam um grupamento HBD ligado ao conjunto de anéis lipofílicos. Apesar de serem

motivo de discórdia na parte da proposta que envolve os grupos HBD, estão dentro do previsto pelos autores que afirmam que, na verdade, a atividade depende também de outros fatores estruturais.

Vale ainda ressaltar que os compostos 16 (C) e 18 (C) apresentam uma diferença mínima na estrutura química e grande nos valores de CIM encontrados, interessante na avaliação da atividade antimicrobiana.

Figura 68 - Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g/mL}$) em cauranos frente aos microrganismos cariogênicos e periodontais.



Foram encontrados somente 3 traquilobanos (Figura 61, p.85) com variação estrutural do ligante na posição C-19. Os dados mostraram que os grupamentos mais polares ligados relacionaram diretamente com valores mais significativos de CIM ($\mu\text{g/mL}$).

Em relação aos 14 labdanos encontrados Tabela 1 (p.26), da Figura 55 (p.82), da Figura 69 (p.91) e da Figura 70 (p.92), a substância mais ativa encontrada foi a 45 (L) com valores de MIC menores que 6,0 $\mu\text{g/mL}$ frente a seis bactérias cariogênicas. Uma das substâncias mais parecidas com 45 (L) é a 41(L), o ácido copálico. Com apenas um HBD como a 45 (L), também demonstrou boa atividade contra dois microrganismos, mas

apresentou-se praticamente inativo contra outros dois. Isso está de acordo com a proposta de Urzúa e colaboradores (2008) se incluirmos suas considerações sobre "outros fatores estruturais". As substâncias 43 (L), 46 (L) e 47 (L) apresentam estruturas gerais muito semelhantes com a molécula 45 (L), diferenciando somente pela presença de um ligante hidrofílico ligado em C3 ou C19. Os resultados de CIM mostraram um aumento pronunciado dos mesmos em relação a 45 (L), o que pode ser explicado pela proposta de Urzúa e colaboradores (2008) que relatou que a presença de dois grupos HBDs reduzem a lipofilicidade da parte hidrofóbica, impedindo a interação com a membrana bacteriana.

Fazendo-se uma nova comparação com a substância 43 (L), apesar de a mesma ter um grupo ligado em C3, o mesmo é menos hidrofílico (acetato) que o presente na substância 46 (L) (hidroxila) ou 47 (L) (carboxila), justificando os menores valores de CIM apresentados frente aos mesmos microrganismos.

Quando se faz a associação entre as substâncias 42 (L) e 41(L), percebe-se que a substância 42 (L) apresenta valores de MIC maiores que a 41 (L), o que pode ser justificado pela presença de um ligante hidrofílico ligado em C3 em 42 (L) e não presente em 41 (L). Pode-se fazer a mesma associação entre 42 (L) e 47 (L) frente aos microrganismos *P. gingivalis*, *A. naeslundii* e *B. fragilis*. Os maiores valores de CIM de 47 (L) podem estar relacionados à maior hidrofílico do ligante em C3 em comparação com 42 (L).

Vale ainda destacar que nenhuma substância da classe dos labdanos foi avaliada frente à *Enterococcus faecalis*.

Figura 69 - Concentração inibitória mmIma (CIM) ($\mu\text{g/mL}$) em labdanos frente aos microrganismos cariogênicos.

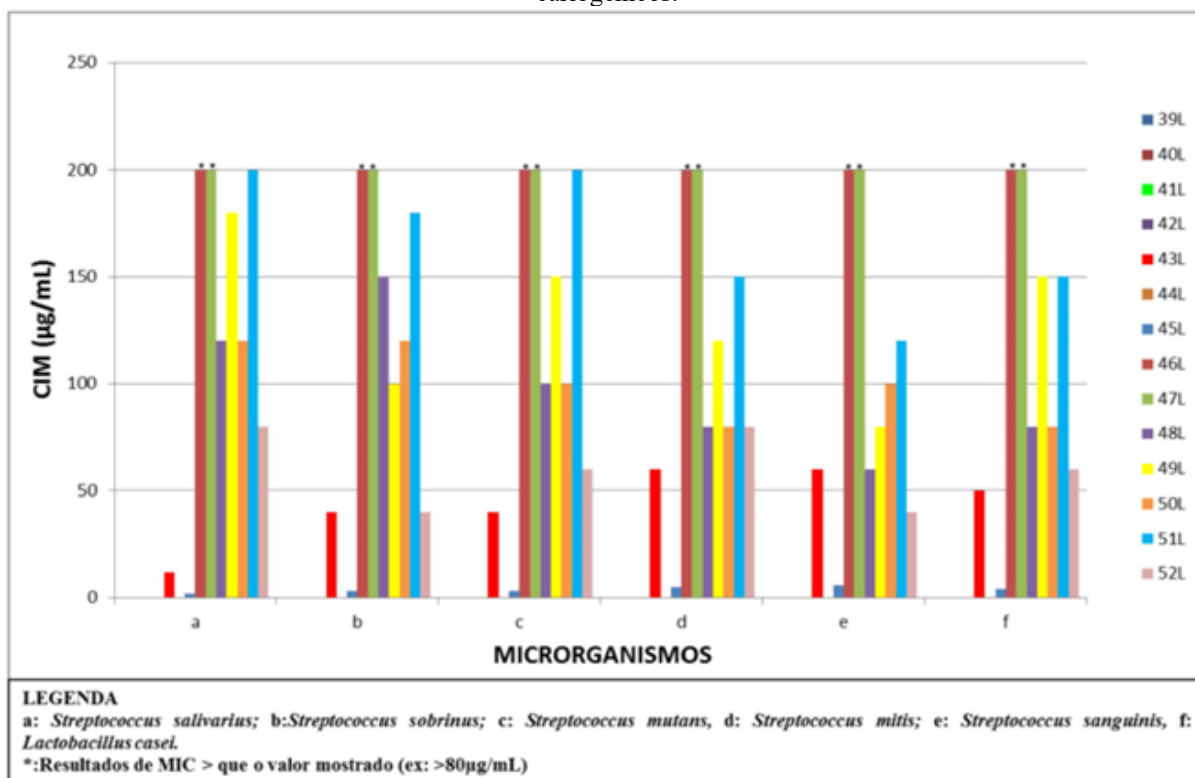
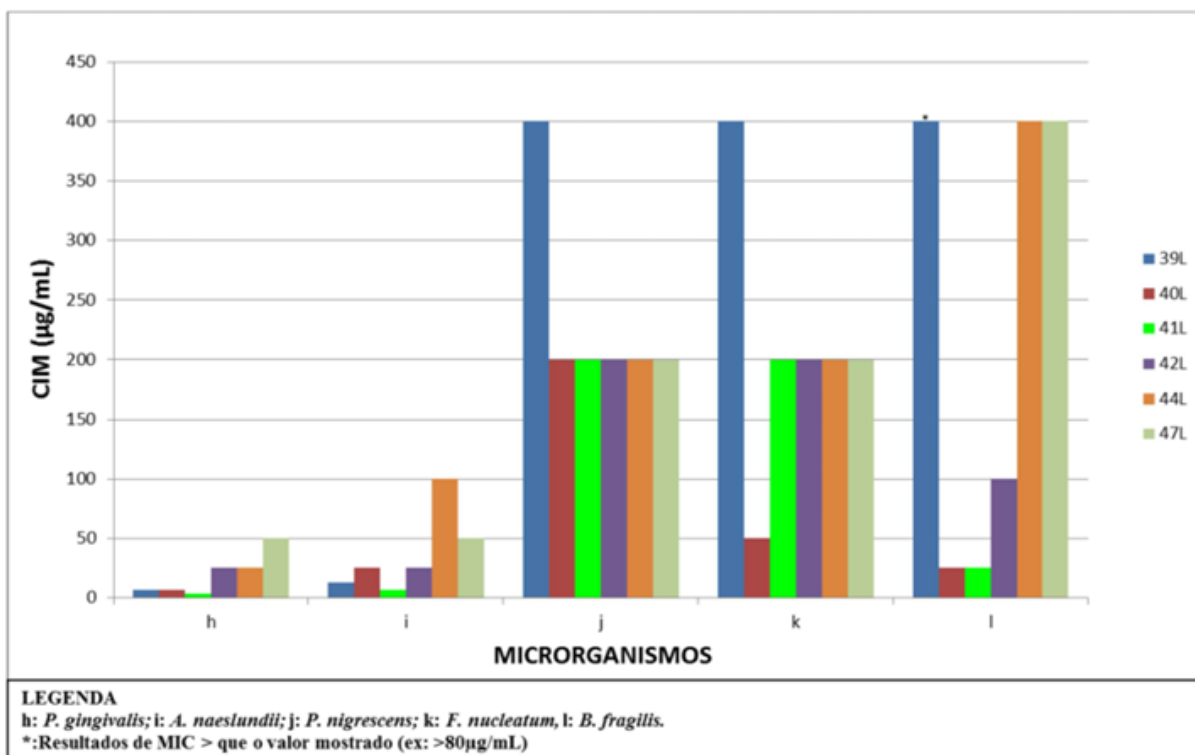


Figura 70 - Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g/mL}$) em labdanos frente aos microrganismos periodontais.

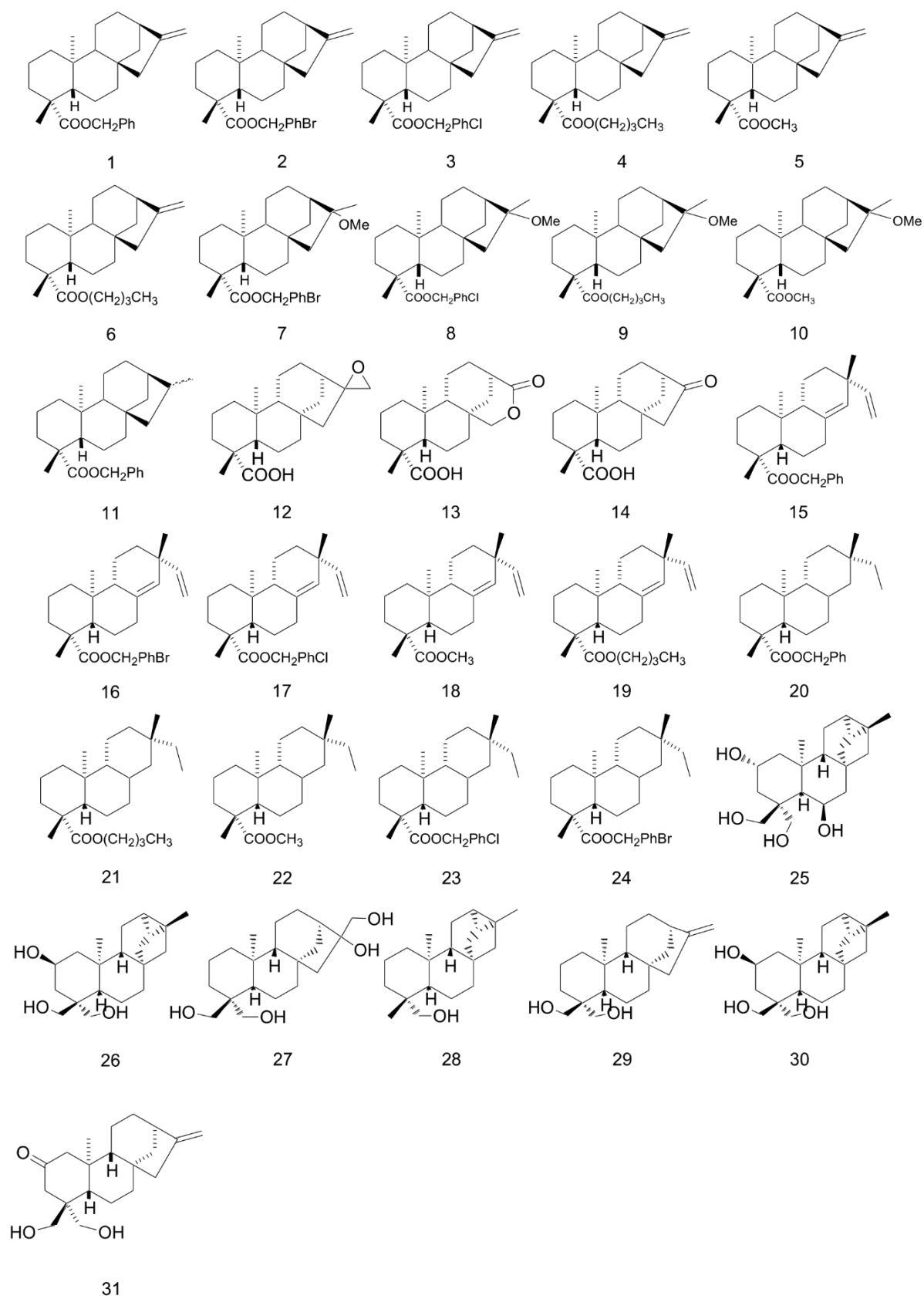


Apesar da existência de um grande número de artigos científicos que evidenciam a capacidade antimicrobiana de diversas classes de diterpenos, há a necessidade de se investigar um maior número dos mesmos para que seja possível relacionar melhor a estrutura química e o potencial antibacteriano desta classe de metabólitos (RANGEL, 2009). Nesse sentido, resultados experimentais podem contribuir para ampliar o conhecimento do potencial antimicrobiano dos diterpenos, aumentando-se consideravelmente as informações para um estudo da relação estrutura-atividade (SAR). Diante disso, optamos por escolher 31 substâncias em que suas atividades não foram testadas por CIM frente aos microrganismos escolhidos no presente estudo.

4.2.2 Resultados Experimentais obtidos neste Trabalho

As 31 substâncias que foram submetidas à avaliação de seu potencial anticariogênico e antiperiodôntico estão apresentadas na Figura 71 a seguir.

Figura 71 - Substâncias avaliadas no presente trabalho.



As substâncias tiveram tais potenciais avaliados frente às bactérias cariogênicas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082), *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) e *Lactobacillus casei* (ATCC 11578) e periodontais: *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039), *Prevotella nigrescens* (ATCC 33563), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) e *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) estão dispostos nas Tabelas 7 (p.95) e 8 (p.96) a seguir.

As concentrações variaram de 0,195 a 400 µg/mL para as substâncias testadas, 0,115 a 59 µg/mL para a clorexidina e 0,0115µg/mL a 5,9µg/MI para o metronidazol.

Os controles de esterilidade realizados para validação da técnica (caldo, solvente, soluções da substância e do controle positivo), inclusive o controle de crescimento da cultura apresentaram-se conforme os padrões estabelecidos. O controle do solvente (DMSO) mostrou que o mesmo não interferiu na atividade antibacteriana.

Tabela 7 - Resultados das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) frente a microrganismos cariogênicos.

BACTÉRIAS CARIOGÊNICAS (Valores em µg/mL)							
Substâncias	<i>E. faecalis</i> 4082 ATCC	<i>S. salivarius</i> 25975 ATCC	<i>S. sanguinis</i> 10556 ATCC	<i>S. mitis</i> 49456 ATCC	<i>S. mutans</i> 25175 ATCC	<i>L. casei</i> 11578 ATCC	<i>S. sobrinus</i> 33478 ATCC
1	*	400	400	100	*	400	400
2	*	*	*	400	*	*	*
3	*	*	*	400	*	*	*
4	*	*	*	400	*	*	*
5	*	400	400	100	*	400	*
6	*	*	*	*	*	*	*
7	*	400	*	*	*	*	*
8	*	*	*	*	*	*	*
9	*	400	*	*	*	*	*
10	*	*	*	400	*	*	*
11	*	400	*	*	*	*	*
12	*	*	100	100	400	400	400
13	*	*	400	400	*	*	*
14	*	400	200	200	*	400	*
15	*	400	400	400	*	400	400
16	*	*	*	400	*	*	*
17	*	400	400	200	400	400	400
18	-	-	-	-	-	-	-
19	*	400	400	200	400	200	400
20	*	400	200	200	400	100	400
21	*	*	400	200	*	400	*
22	*	400	400	100	400	400	*
23	*	*	*	*	*	*	*
24	*	*	*	*	*	*	*
25	*	400	400	400	*	400	400
26	*	*	*	*	*	*	*
27	*	*	400	400	*	*	*
28	*	100	200	100	100	100	100
29	400	100	200	100	100	100	100
30	*	*	*	*	*	*	*
31	200	50	50	50	50	50	50
Clorexidina	7,375	1,844	1,844	3,688	0,922	0,922	1,844

*Valores maiores que 400µg/mL

Tabela 8 - Resultados das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) frente a microrganismos periodontais.

BACTÉRIAS PERIODONTAIS (Valores em µg/mL)							
Substâncias	<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	<i>A. naeslundii</i> ATCC 19039	<i>P. nigrescens</i> ATCC 33563	<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>B.thetaiotaomicron</i> ATCC 29741	
1	200	*	*	*	*		
2	200	*	*	*	*		
3	200	*	*	*	*		
4	400	*	*	*	*		
5	400	*	*	*	*		
6	200	*	*	*	*		
7	400	*	*	*	*		
8	400	*	*	*	*		
9	400	*	*	*	*		
10	200	*	*	*	*		
11	400	*	*	*	*		
12	200	*	*	*	*		
13	200	*	*	*	*		
14	200	*	*	*	*		
15	200	*	*	*	*		
16	200	*	*	*	*		
17	200	*	*	*	*		
18	200	*	*	*	*		
19	-	-	-	-	-		
20	400	*	*	*	*		
21	400	*	*	*	*		
22	200	*	*	*	*		
23	400	*	*	*	*		
24	400	*	*	*	*		
25	200	*	*	*	400		
26	400	*	*	*	*		
27	200	*	*	*	*		
28	100	*	*	200	100		
29	100	*	*	200	100		
30	400	*	*	*	*		
31	100	*	400	200	50		
Metronidazol						1,475	2,95

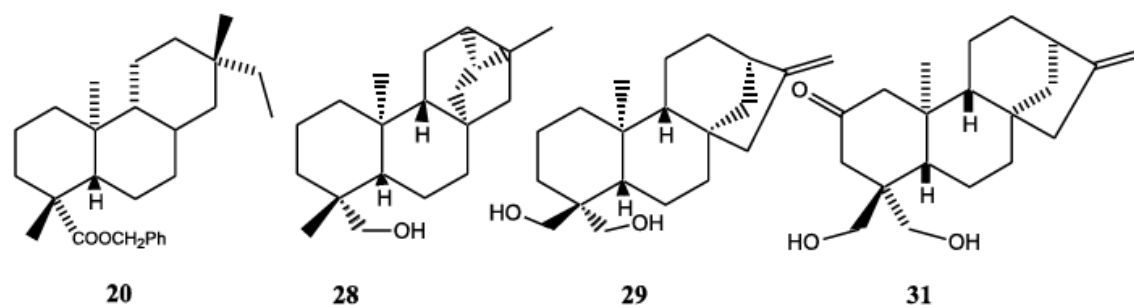
*Valores maiores que 400µg/mL

Analisando de uma maneira geral os valores de CIM frente às bactérias cariogênicas, as substâncias 20, 28, 29 e 31(Figura 72, p.97 e Tabela 7, p.95) foram as mais efetivas em relação ao conjunto de microrganismos testados. A substância 31 apresentou valor de CIM de 50 µg/mL para todos os microrganismos cariogênicos testados, exceto para *E. faecalis* com valor de CIM de 200 µg/mL. As substâncias 28 e 29 apresentaram os mesmos valores de CIM frente aos microrganismos testados, 200 µg/mL para *S. sanguinis* e 100 µg/mL para *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. mitis*, *L. casei* e *S. sobrinus*, exceto para

E.faecalis. A substância 20 apresentou valor de CIM de 200 µg/mL para *S. sanguinis* e *S. mitis* e 100 µg/mL para *L. casei*.

Para os microrganismos periodontais (Tabela 8, p.96), os dados da Revisão Bibliográfica mostram que somente 26,42% das substâncias foram avaliadas contra estas bactérias, ressaltando a importância de se adquirir mais resultados com as mesmas. Quando são avaliados os valores de CIM (µg/mL) as substâncias 28, 29 e 31 foram novamente as mais efetivas em relação ao conjunto de microrganismos testados. A substância 31 apresentou o menor valor de CIM (50 µg/mL) para o *B. fragilis*, 100 µg/mL para *P. gingivalis* e 200 µg/mL para *F. nucleatum*. As substâncias 28 e 29 apresentaram os mesmos valores de CIM para todos os microrganismos testados, 200 µg/mL para *F. nucleatum* e 100 µg/mL para *P. gingivalis* e *B. fragilis*.

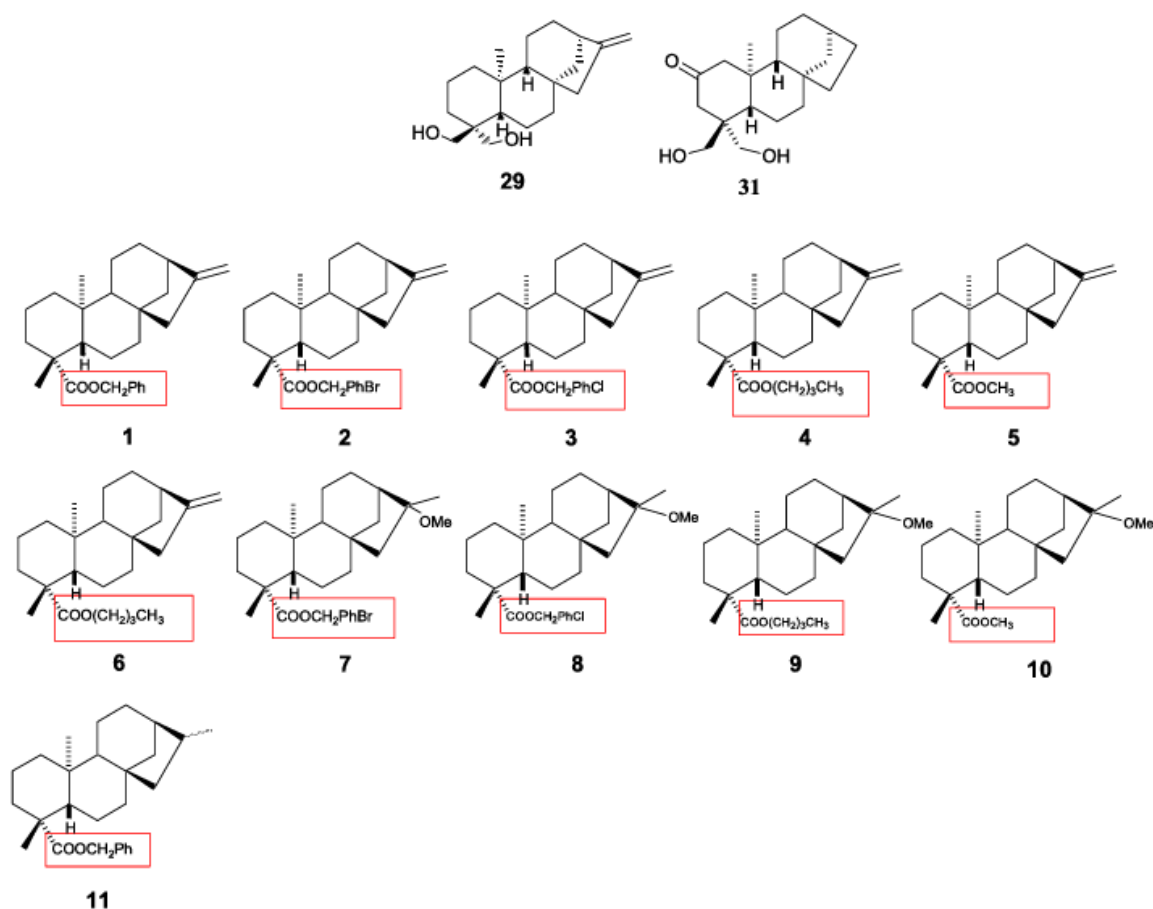
Figura 72 - Substâncias 20, 28, 29 e 31.



Fazendo uma comparação entre as substâncias 29 e 31 que pertencem à classe dos cauranos, podemos sugerir que a presença das hidroxilas em C18 e C19 está relacionada com a atividade antimicrobiana exibida pelas duas substâncias. Pode-se perceber ainda que a única diferença entre as estruturas é a presença da carbonila ligada em C2 na substância 31 e ausente na substância 29 e pode-se então sugerir que a mesma está diretamente ligada à melhoria da atividade antimicrobiana frente aos microrganismos cariogênicos e endodônticos avaliados.

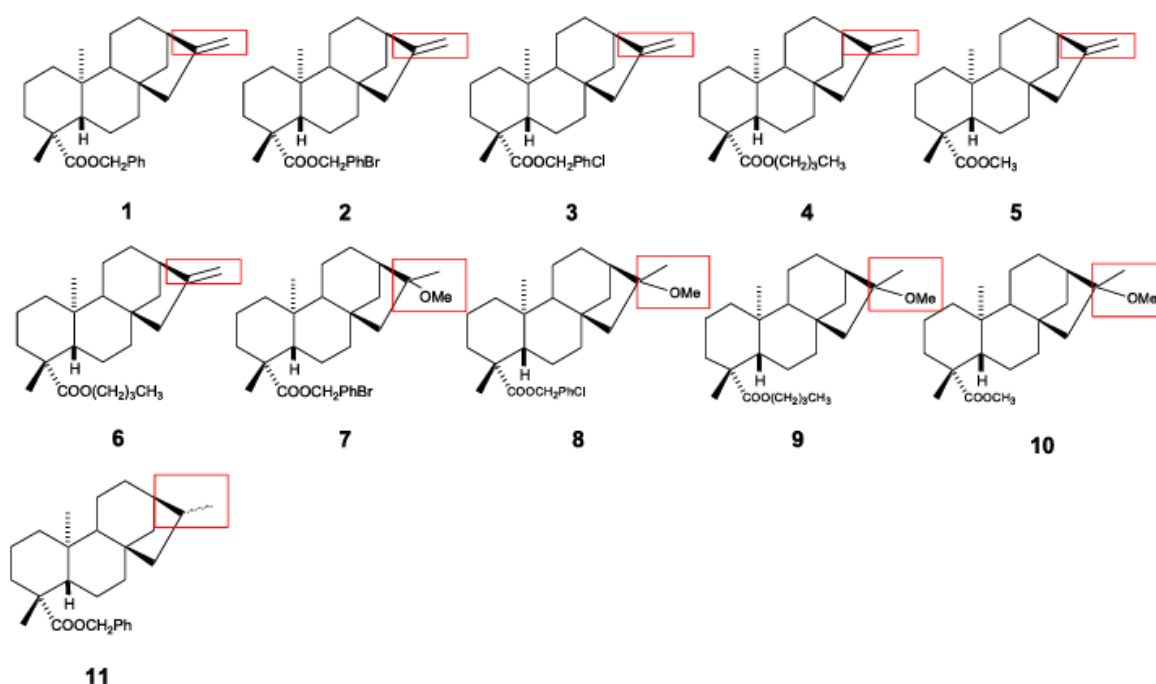
Quando se faz uma comparação entre as estruturas dos cauranos 29 e 31 com os outros cauranos avaliados no presente trabalho (1-11) (Figura 73) e que apresentaram maiores valores de CIM, pode-se perceber que todos os outros apresentam grupamentos menos hidrofílicos ligados em C19, o que corrobora com a sugestão de que os grupamentos hidrofílicos presentes em C19 estão relacionados com a atividade antimicrobiana.

Figura 73 - Substâncias 29, 31 e 1-11.



Quando são comparadas as estruturas dos cauranos 1 a 6 que apresentam dupla ligação entre C16-C17 com as estruturas 7 a 10 que apresentam metoxilas e 11 que apresenta ligação simples nessa posição (Figura 74), os valores de CIM mostram que essa modificação estrutural não está relacionada com melhoria da atividade antimicrobiana, uma vez que os mesmos permanecem próximos e muito elevados (Tabela 7, p.95 e Tabela 8, p.96).

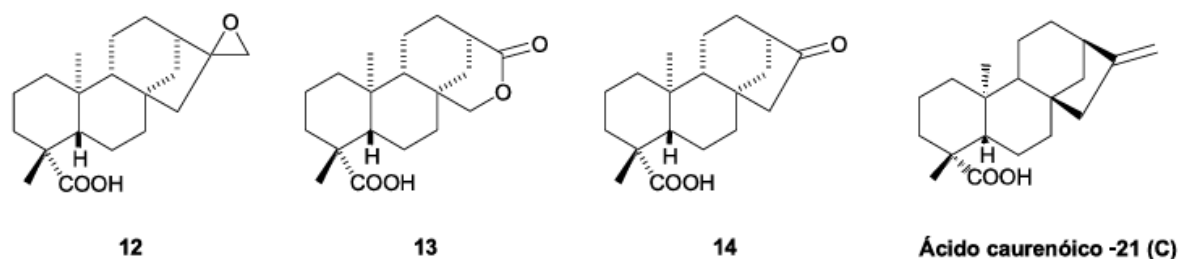
Figura 74 - Substâncias 1-11.



Os cauranos 12, 13 e 14 (Figura 75, Tabela 7, p.95 e Tabela 8, p.96) apresentam carboxilas ligadas em C19 e outros grupos contendo oxigênio presentes em C16. Quando são comparados os valores de CIM apresentados por essa estrutura com os valores CIM do ácido caurenóico (Figura 75, Tabela 1, p.26) verifica-se que o aumento dos valores de CIM frente aos microrganismos cariogênicos está relacionado com a presença dos grupamentos epóxido, éster e cetona presentes em 12, 13 e 14, respectivamente e ausentes no ácido caurenóico. Vale ressaltar que não existem estudos anteriores do ácido caurenóico frente aos microrganismos periodontais estudados para comparação dos resultados.

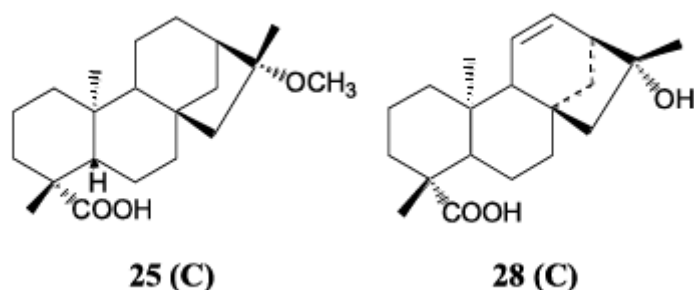
Além disso, é importante destacar que a Revisão Bibliográfica revelou que, entre os cauranos presentes, existe somente dados referentes ao estudo das substâncias 27 (C) e 28 (C) frente ao *P. gingivalis* com valores maiores que 1000,0 μ g/mL.

Figura 75 - Substâncias 12, 13, 14 e 21 (C).



Podemos usar o mesmo raciocínio para as substâncias 25 (C) e 28 (C) (Figura 76, Tabela 1, p.26) da Revisão Bibliográfica que apresentam também carboxilas ligadas em C19, além de metoxila e hidroxila ligadas em C16, respectivamente. Os valores de CIM apresentados por essas substâncias frente aos microrganismos cariogênicos é maior que 100,0 $\mu\text{g/mL}$. Quando comparamos esses resultados com os valores apresentados por 12, 13 e 14 podemos sugerir que a presença de grupamentos oxigenados em C16 está relacionada com os altos valores de CIM apresentados pelas mesmas.

Figura 76 - Substâncias 25 (C) e 28(C).



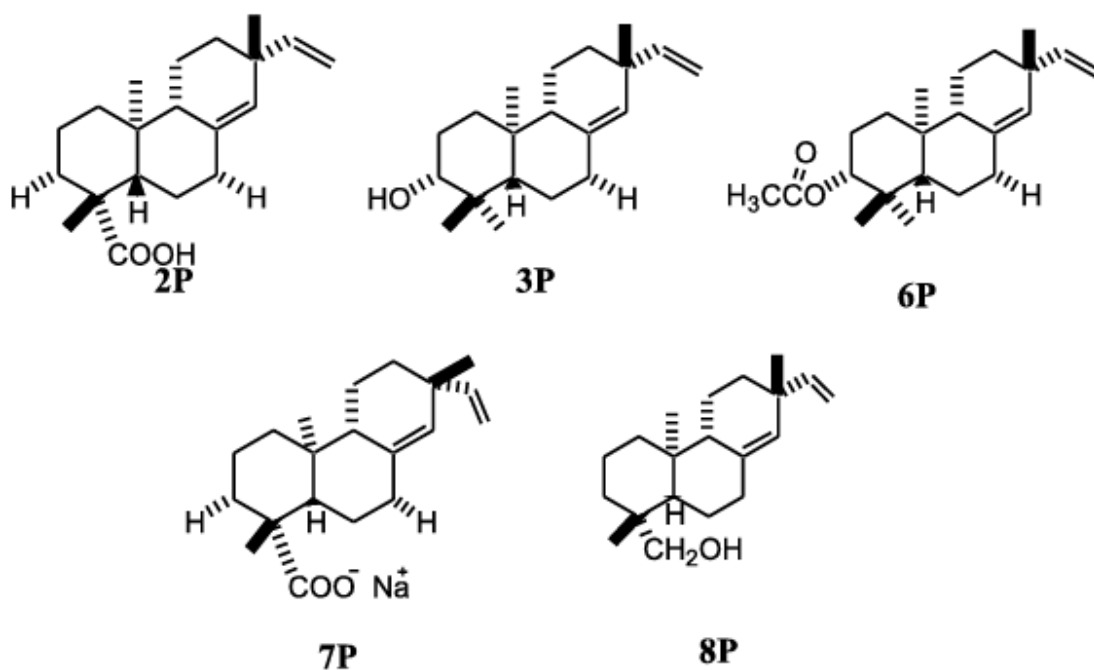
Esses valores podem ser explicados pelo trabalho realizado por Urzúa e colaboradores (2008), que mostraram que a presença de sistema de anéis decalina lipofílicos com um grupo hidrofílico doador de ligação de hidrogênio (HBD) é muito importante para a atividade antimicrobiana exibida por diterpenos e que adição de um segundo grupo HBD no sistema de anel decalina leva a uma redução ou supressão da atividade.

Foram avaliados 9 pimaranos (substâncias 15-17 e 19-24) no presente trabalho e os mesmos apresentaram valores de CIM frente às bactérias cariogênicas maiores que 100 $\mu\text{g/mL}$. Destes, 87,3% dos resultados foram 400 ou maiores que 400 $\mu\text{g/mL}$. Todos os

pimaranos avaliados apresentaram um ligante em C19 de baixa polaridade, o que justifica o baixo resultado frente aos microrganismos avaliados.

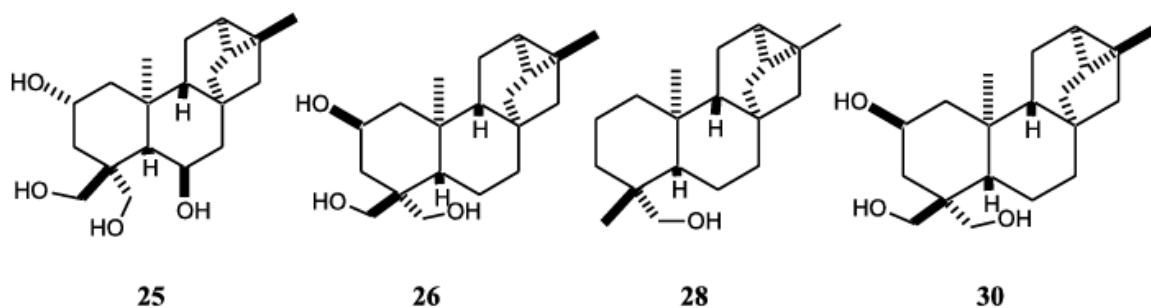
Quando comparamos os resultados de CIM frente aos mesmos microrganismos com as substâncias 2 (P), 3 (P), 6 (P), 7 (P) e 8 (P) (Figura 77) da Revisão Bibliográfica, pode-se perceber que todas elas apresentam grupos ligados em C19 ou C3 mais hidrofílicos, o que sugere que grupamentos hidrofílicos ligados nessa região está diretamente relacionado com a melhoria da atividade antimicrobiana apresentada por pimaranos e concorda com a proposta de Urzúa e colaboradores (2008).

Figura 77 - Substâncias 2 (P), 3 (P), 6 (P), 7 (P) e 8 (P).



Foram avaliados 4 traquilobanos (substâncias 25, 26, 28 e 30, Figura 78) no presente trabalho. Dentre eles, a substância 28 apresentou os melhores valores de CIM e o que diferencia essa substância é a presença de somente ligante HBD no conjunto de anéis lipofílicos, enquanto as outras apresentam vários grupos ligantes HBDs.

Figura 78 - Substâncias 25, 26, 28 e 30.



Fazendo uma análise geral dos resultados por microrganismo, observa-se que os microrganismos cariogênicos mais sensíveis frente ao conjunto de substâncias testadas foram o *S. mitis*, *S. sanguinis* e *L. casei* apresentando valores de CIM menores que 200 µg/mL (variando entre 50 e 200 µg/rnL) para 40%, 20% e 16,7% das substâncias testadas, respectivamente.

Já o microrganismo periodontal mais sensível ao conjunto de substâncias testadas foi o *P. gingivalis* apresentando valores de CIM de 100 e 200 µg/mL para 60,0% das substâncias testadas, respectivamente e *F. nucleatum* e *B. Jragilis* foram sensíveis a 10,0% das substâncias testadas com valores de 50, 100 e 200 µg/mL. Esse dado pode ser considerado interessante, uma vez que a literatura mostra que destas, *Fusobacterium nucleatum* é a mais abundante bactéria anaeróbia gram-negativa na placa subgingival e apresenta importância na sua formação, além de que *Porphyromonas gingivalis* é a bactéria mais patogênica que ocorre na periodontite adulta severa e na doença periodontal aguda (SAMOT et al., 2013).

CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos no presente e com base nas condições experimentais, pode-se concluir que:

No levantamento bibliográfico realizado foram encontrados 18 artigos sobre a atividade antibacteriana de 53 moléculas de diterpenos frente aos microrganismos avaliados no presente estudo. A maior parte delas pertencente às classes dos labdanos (14 compostos, 26,42%), cauranos (13 compostos, 24,52%) e dos pimaranos (13 compostos, 24,52%). Além disso, foram encontrados 6 compostos diterpênicos da classe dos abietanos (11,32%), 3 compostos do tipo trachylobanos (5,66%), 2 compostos do tipo rosano (3,77%), 1(1,89%) de cada um dos tipos: casbeno e beyerano.

A análise dos dados das atividades antimicrobianas relatadas na Revisão Bibliográfica revelaram que os valores encontrados na literatura, em sua maioria, concordam com a proposta de Urzúa, et al (2008).

Em relação aos resultados apresentados no presente trabalho, dados de atividade antimicrobiana das 31 substâncias frente a 12 bactérias mostraram que o menor valor de CIM contra o conjunto de microrganismos testados foi de 50 µg/mL.

Analisando de uma maneira geral os valores de CIM frente às bactérias cariogênicas, as substâncias 20, 28, 29 e 31 foram as mais efetivas em relação ao conjunto de microrganismos testados.

Para os microrganismos endodônticos, os dados da Revisão Bibliográfica mostram que somente 26,42% das substâncias foram avaliadas contra estas bactérias, ressaltando a importância de se adquirir mais resultados contra as mesmas. Quando são avaliados os valores de CIM (µg/mL) as substâncias 28, 29 e 31 foram novamente as mais efetivas em relação ao conjunto de microrganismos testados.

De uma maneira geral, apesar da existência de artigos científicos que evidenciam a capacidade antimicrobiana de diversas classes de diterpenos, há a necessidade de se investigar um maior número dos mesmos para que seja possível relacionar melhor a estrutura química e o potencial antibacteriano desta classe de metabólitos. Nesse sentido, o grande volume de resultados apresentados (372 resultados, 97,64% em relação ao total de 381 já descritos na literatura) contribui de maneira significativa para ampliar o

conhecimento do potencial antimicrobiano dos diterpenos, aumentando as informações para um estudo da relação estrutura-atividade (SAR).

REFERÊNCIAS

AGUIAR, L.A. Inibição da contratilidade do músculo liso traqueal de ratos por um diterpeno caurano isolado de *Croton argyrophyloides*. 2009. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza- Ceará.

ALI, F.; SANGWAN, P.L.; KOUL, L.; PANDEY, A.; BANI, S.; ABDULLA, S.T.; SHARMA, P.R.; KITCHLU, S.; KHAN, LA. 4-epi-Pimaric acid: a phytomolecule as a potent antibacterial and anti-biofilm agent for oral cavity pathogens. *European Journal of Clinical Microbiology*, v.31, p. 149-159, 2012.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAQUI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p.678-689, 2006.

ALMEIDA, R.F.; PINHO, N.M.; LIMA, C.; FARIA, I.; SANTOS, P.; BORDALO, C. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. *Revista Portuguesa de Clínica Geral*, v.22, p.379-390, 2006.

ALMEIDA, M.O. Obtenção dos derivados dos terpenos afidicolina e enidrina através da biotransformação e semissíntese e avaliação da atividade leishmanicida. 2010. 159 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto- SP.

AMBROSIO, S.R.; FURTADO, N.A.J.C.; OLIVEIRA, D.C.R.; COSTA, F.B.; MARTINS, C.H.G.; CARVALHO, T.C.; PORTO, T.S.; VENEZIANI, R.C.S. Antimicrobial Activity of kaurane diterpenes against Oral Pathogens. *Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung*, v.63, p. 326-330, 2008.

AMBROSIO, S.R.; VENEZIANI, R.C.S.; MARTINS, C.H.G.; HELENO, V.C.G.; FURTADO, N.A.J.C.; CUNHA, W.R. Diterpenes: Na Approach against cariogenic gram positive bacteria. *Advances in Medicine and Biology*, v.16. New York: Nova Publishers, 2010.

AMBROSIO, S.R.; PORTO, T.S.; FILHO, A.A.; MAGALHÃES, L.G.; VENEZIANI, R.C.; FURTADO, N.A.; SIMÃO, M.R.; SEVERIANO, M.R.; MELO, M.E.; RODRIGUES, V.; SAID, S. Fungal transformation of pimaradienoic acid and its schistosomicidal activity against *Schistosoma mansoni*. In: 59a International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Plant Research, Antalya, Turquia. Livro de Resumos, V. 1, p. PL84, 2011.

AMBROSIO, S.R.; PORTO, T.S.; DA SILVA, J.R.; MELO, M.E.; MARTINS, C.H.; VENEZIANI, R.C.; HELENO, V.C.; FURTADO, N.A.; ARAKAWA, N.S.; SAID, S. Biotransformation of ent-8(14), 15-pimaradiene and antimicrobial activity of the obtained derivatives against multi-resistant Gram-positive bacteria. In: 59a International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Plant Research, Antalya, Turquia. Livro de Resumos, v. 1, p. PL85, 2011.

ANDRADE, B.B.; MOREIRA, M.R.; AMBROSIO, S.R.; FURTADO, N.A.J.C.; CUNHA, W.R.; HELENO, V.C.G.; SILVA, A.N.; SIMÃO, M.R.; ROCHA, E..M.P.; MARTINS, C.H.G.; VENEZIANI, R.C.S. Evaluation of ent-Kaurenoic Acid Derivatives for their Anticariogenic Activity. *Natural Product Communications*, v. 6, n.6, p. 777-780, 2011.

ANGELIS, G.A.M.C. Associação de doença periodontal com Síndrome Coronária Aguda: um estudo caso controle. 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP.

ASKUN, T.; TUMEN, G.; SATIL, F.; ATES, M. Characterization of the phenolic composition and antimicrobial activities of Turkish medicinal plants. *Pharmaceutical Biology*, v.47, n.7, p.563-571, 2009.

BAKRI, I.M.; DOUGLAS, C.W.I. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Archives of Oral Biology*, v. 50, p. 645-651, 2005.

BARRETO, S.J.P. Copaifera langsdorffii: estudo fitoquímico, validação de métodos cromatográficos e análise sazonal. 2011. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto- SP.

BERNARDES, W.A.; LUCARINI, R.; SOUZA, M.G.M.; TOZATTI, M.G.; SILVA, M.L.A.; FILHO, A.A.S.; MARTINS, C.H.G.; CUNHA, W.R. Ácido carnósico: um diterpenos isolado de Rosmarinus officinalis com potencial antibacteriano frente à bactérias bucais. In: 32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza. Livro de Resumos, v. 1, p. QB030, 2009.

BERNARDES, W.A.; LUCARINI, R.; TOZATTI, M.G.; SOUZA, M.G.M.; SILVA, M.L.A.; FILHO, A.A.S.; MARTINS, C.H.G.; CROTTI, A.E.M.; PAULETTI, P.M.; GROppo, M.; CUNHA, W.R. Antimicrobial Activity of Rosmarinus officinalis against Oral Pathogens: Relevance of Camosic Acid and Camosol. *Chemistry & Biodiversity*, v.7, p.1835-1840, 2010.

BIER, O. Bacteriologia e imunologia: em suas aplicações à medicina e à higiene. São Paulo: Melhoramentos, 1981.

BOECK, P.; SÁ, M.M.; DE SOUZA, B.S.; CERCENÁ, R.; ESCALANTE, A.M., ZACHINO, S.A., CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. A simple synthesis ofkaurenoic esters and other derivatives and evaluation of their antifungai activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.16, p. 1360-1366, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. - Brasília: Ministério da Saúde, 116f. 2012.

BROWN, T. A.; AHN, S.; FRANK, R. N.; CHEN, Y. M.; LEMOS, J. A.; BURNE, R. A. A hypothetical protein of Streptococcus mutans is critical for biofilm formation. *Infection and Immunity*, v. 73, n.5, p. 3147-3151, 2005.

CABRAL, M.M.W. Avaliação do potencial antimicrobiano de terpenóides naturais e derivados semissintéticos frente a microrganismos causadores da tuberculose e patologias relacionadas. 2014. 85 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de Franca - UNIFRAN, Franca- SP.

CARRIJO, M.G.M.S. Relevância da bioatividade do ácido ent-copálico frente a bactérias anaeróbias bucais no modo planctônico e sésil. 2013. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de Franca - UNIFRAN, Franca- SP.

CARTER, G.T. Natural products and Pharma 2011: strategic changes spur new opportunities. *Natural Product Reports*, v. 28, p. 1783-1789, 2011.

CARVALHO, T.C.; SIMÃO, M.R.; AMBRÓSIO, S.R.; FURTADO, N.A.J.C.; VENEZIANI, R.C.S.; HELENO, V.C.G.; DA COSTA, F.B.; GOMES, B.P.F.A.; SOUZA, M.G.M.; REIS, E.B.; MARTINS, C.H.G. Antimicrobial Activity of Diterpenes from *Viguiera arenaria* against Endodontic Bacteria. *Molecules*, v. 16, n. 3, p. 543-551, 2011.

CAVALCANTE, A.L.F.A. Plantas medicinais e saúde bucal: Estudo etnobotânico, atividade antimicrobiana e potencial para interação medicamentosa. 2010. 210 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-Paraíba.

CHANG, R.; MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; CUNHA, L.C.S.; ROCHA, E.O.; AQUINO, F.J.T.; SOUZA, M.G.M.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Essential Oil Composition and Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Campomanesia pubescens* O. Berg, Native of Brazilian Cerrado. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 30, n. 9, p.1843-1848, 2011.

CHHOUR, K.; NADKARNI, M. A.; BYUN, R.; MARTIN, F. E.; JACQUES, N. A.; HUNTER, N. Molecular Analysis of Microbial Diversity in Advanced Caries. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 843-849, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. 7 ed. CLSI document M11-A7. CLSI, Wayne, Pensilvânia, USA, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard - 8. ed. CLSI Document M7-A8. CLSI, Wayne, Pensilvânia, USA, 2009.

CORDEIRO, C. H. G.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORRÊA, M. A.; PIZZOLITO, A. C.; BAUAB, T.M. Análise farmacognóstica e atividade antimicrobiana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 3, p. 395-404, 2006.

COSTA, J.P. Estudo dos efeitos neurofarmacológicos e toxicológicos do fitol visando o planejamento de novos psicofármacos. 2012.149 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Piauí, Teresina- Piauí.

COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N.; MADEIRA, S..V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual de Química*, v. 2, n.1, p. 47-58, 2010.

DA COSTA, F. B.; VICHNEWSKI, W.; HERZ, W. Constituents of *Viguiera aspillioides* and *V. robusta*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 24, n. 6, p. 585-587, 1996.

DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; MASCHERPA, D.; GRISOU, P.; GIUSTO, G.; LINGSTROM, P.; PRATTEN, J.; SIGNORETT, C. Plant and Fungal Food Components with Potential Activity on the Development of Microbial Oral Diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, p.1-9, 2011.

DEWICK, P.M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 3 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009.

DOS SANTOS, C.A.L. Prevalência dos fatores associados à doença periodontal em púrpuras, Londrina-PR. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)-Universidade Estadual de Londrina, Londrina- Paraná.

DRUMOND, M.R.S. Estudo comparativo in vitro da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, v.4, n. 1, p. 33-38, 2004.

ESCOBAR, L.M.; ARISTIZABAL, F.A.G. Aplicación de un método para fluorométrico evaluar la proliferación celular pt líneas celulares tumorales. *Vitae*. v. 17, p. 173-180, 2010.

FERES, M., FIGUEIREDO, L.C.; BARERTO, I.M.; COELHO, M.H.; ARAÚJO, M.W.; CORTELLI, S.C. In vitro antimicrobial activity of plant extracts and propolis in saliva samples of healthy and periodontally-involved subjects. *International Academy of Periodontology*, v.7, p. 90-96, 2005.

FUKUSHIMA, R.S.; WELMER, P.J.; KUNZ, D.A. Uso de redução fotocatalítica para apressar a preparação de meios de cultura para saccarolytic espécies de *Clostridium*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34, p.22-26, 2003.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. *Current opinion in Chemical Biology*, v.12, p. 306-317, 2008.

GEBARA, E.C.E.; LIMA, L.A.; MAYER, M.P.A. Própolis: antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, p. 365-369, 2002.

GUIMARAES, A. R. D.; PERES, M. A.; VIEIRA, R. S.; FERREIRA, R. M.; RAMOS-JORGE, M. L.; APOLINARIO, S.; DEBOM, A. Self-perception of side effects by adolescents in a chlorhexidine-fluoride-based preventive oral health program. *Journal of Applied Oral Science*, v.14, n. 2, p. 291-296, 2006.

- HANSON, J.R. Diterpenoids. *Natural Products Reports*. v.21, p. 785-793, 2004.
- HARVEY, A.L. Natural Products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, n.19/20, v.13, p.895-901, 2008.
- HERNÁNDEZ, D.M.; DÍAZ-RUIZ, G.; RIVERO-CRUZ, B.E.; BYE, R.A.; AGUILAR, M.I.; RIVERO-CRUZ, J.F. Ent-trachyloban-19-oic acid isolated from *Iostephane heterophylla* as a promising antibacterial agent against *Streptococcus mutans* biofilms. *Fitoterapia*, v. 83, p. 527-531, 2012.
- JAKIEMIU, E.A.R. Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba- Paraná.
- JONES, C.G. Clorexidine: is it still the gold standard? *Periodontology*, v. 15, p.55-62, 1997.
- JORGE, A. O. C. *Microbiologia Bucal*. São Paulo: Santos, 122p.,1995.
- JUIZ, P.J.L.; ALVES, R.J.C.; BARROS, T.F. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 20, n. 1, p. 134-139, 2010.
- JUNG, H.A.; LEE, E.J.; KIM, J.S.; KANG, S.S.; LEE, J.; MIN, B.; CHOI, J.S. Cholinesterase and BACE1 Inhibitory Diterpenoids from *Aralia cordata*. *Archives of Pharmacal Research*, v.32, n.10, p.1399-1408, 2009.
- KROL, M. Dental Caries, Oral Health, and Pediatricians. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, p. 253-270, 2003.
- LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N.P. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 4^a ed. Copenhagen: Blakwell Munskgaard, 2003.
- Lili, X; SHI, Y.; YU, B.; WILLIAMS, I.; SUNG, H.; ZHANG, Q.; LIANG, J.; IP.,N.; MIN, Z. Antibacterial diterpenoids from *Sagittaria pygmaea*. *Planta Medica*, v.73, p. 84-90, 2007.
- Lili, X.; SHI, Y.; LIANG, J.; ZHI-DA, M. Antibacterial ent-Rosane and ent-Kaurane Diterpenoids from *Sagittaria trifolia* var. *sinensis*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, V. 7, n.5, p.341-345, 2009.
- KELES, L.C. Estudo fitoquímico das raízes e do caule de *Minasia alpestris* (Asteraceae) e avaliação das atividades antimicrobianas de seus extratos frente a microrganismos da cavidade bucal. 2008. 201f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de Franca, Franca- São Paulo.
- KOO, H.; ROSALEN P. L.; CURY J. A.; PARK Y. K.; BOWEN W. H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 5, p. 1302-1309, 2002.

MACHADO, A.C.; OLIVEIRA, R.C. Medicamentos Fitoterápicos na odontologia: evidências e perspectivas sobre o uso da aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 16, N.2, p. 283-289, 2014.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Mediciniais: A Necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, n.3, p. 429-438, 2002.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, n. 1, p. 71- 109, 1998.

MARINHO, B.V.S.; ARAÚJO, A.C.S. O uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. *International Journal of Dentistry*, v.6, n.4, p.124-131, 2007.

MARTINS, C.G.; MORAES, T.S.; MATANGONI, S.; LUCARINI, R.; VENEZIANI, R.S.; FURTADO, N.C.; HELENO, V.G.; AMBROSIO, S.R. Anti-biofilm activity of pimarane diterpenoids against anaerobes. In: 59a International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Plant Research, Antalya, Turquia. Livro de Resumos, V. 1, p. PM66, 2011.

MCBAIN, A. J.; BARTOLO, R. G.; CATRENICH, C. E.; CHARBONNEAU, D.; LEDDER, R. G.; GILBERT, P. Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the viality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 8, p. 4770-4776, 2003.

MENDONZA, L.; WILKENS, M.; URZUA, A. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v.58, p.85-88, 1997.

MENEGATTI, R.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. A importância da síntese de fármacos. *Cadernos temáticos da Química Nova na escola*, n.3, p.16-22, 2001.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, v.24, p.105-111, 2001.

MONTEIRO, A.M. Influência do tratamento periodontal sobre os marcadores de risco para aterosclerose em pacientes com periodontite crônica. 2010. 45 f. Tese (Doutor em Ciências)- Universidade de São Paulo, São Paulo- São Paulo.

MORE, G.; TSHIKALANGE, T.E.; LALL, N.; BOTHA, F.; MEYER, J.J.M. Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 119, p.473-477, 2008.

MOREIRA, A.N.; FERREIRA, R.C.; VIEIRA, P.A.; VALADARES, H.A.C. Agentes antimicrobianos no controle da placa supragengival parte I. *Arquivos em Odontologia*, v.37, n.1, p. 87-98, 2001.

MURTHY, M.M.; SUBRAMANYAM, M.; BINDU, M.H.; ANNAPURNA, J. Antimicrobial activity of clerodane diterpenoids from *Polyalthia longifolia* seeds. *Fitoterapia*, v. 76, p. 336-339, 2005.

NARVAI, P. C.; FRAZÃO, P.; RONCALLI, A. G.; ANTUNES, J. L. F. Cárie dentária no Brasil: declínio, iniquidade e exclusão social. *Revista Panamericana Salud Publica*, v.19. n. 6, p. 385-393, 2006.

NATECHE, F.; MARTIN, A.; BARAKA, S.; PALOMINO, J.C.; KHALED, S.; PORTAELS, F. Application of the resazurin microtitre assay for detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Algiers. *Journal Medicinal Microbiology*, v. 55, p. 857-860, 2006.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.. Natural Products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v. 75, n.3, p.311-335, 2012.

NIERO, R. et al. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. Ciências Farmacêuticas, contribuições ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí, Univale, 2003.

OLIVEIRA, F.Q., GOBIRA, B., GUIMARÃES, C., BATISTA, J., BARRETO, M., SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 17, n. 3, p.466-476, 2007.

OLIVEIRA, M.S.A. Avaliação da atividade antimicrobiana do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Piper aduncum* (L) e *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. sobre bactérias periodontopatogênicas. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de alimentos) - Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares- Minas Gerais.

OLIVEIRA, M.H. et al. Semissíntese: Uma solução para problemas farmacológicos de produtos naturais. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 9, p. 62-68, 2012.

PAGE, R.C.; OFFENBACHER, S.; SCHROEDER, H.E.; SEYMOUR, G.J.; KORNMAN, K.S. Advances in the pathogenesis of the periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology*, v. 14, p. 216-248, 1997.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; WINGS, J.; PORTAELS, F. Rezazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.46, p. 2720-2722, 2002.

PARK, K.M.; YOU, J.S.; LEE, H.Y.; BAEK, N.I.; HWANG, J.K. KUWANON, G. An antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 84, p. 181-185, 2003.

PEREIRA, A.C. Síntese e atividade biológica de algumas lignanas e neolignanas. 2011. 171 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Universidade Federal de Franca, Franca- São Paulo.

PEREIRA, A.L. Influência da condição de saúde bucal na qualidade de vida dos indivíduos. 2010. 78 f. Monografia (Especialização em Atenção Básica em Saúde da Família)- Universidade Federal de Minas Gerais, Campos Gerais - Minas Gerais.

PETERSEN, P.E.; OGAWA, H. Strengthening the prevention of the periodontal disease: the WHO approach. *Journal of Periodontology*, v.76, n.12, p.2187-2193, 2005.

PORTO, T.S.; FURTADO N.A.J.C.; HELENO, V.C.G.; MARTINS, C.H.G.; COSTA, F.B.; SEVERIANO, M.E.; SILVA, A.N.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBRÓZIO, S.R. Antimicrobial ent-pimarane diterpenes from *Viguiera arenaria* against Gram-positive bacteria. *Fitoterapia*, v.80, p.432-436, 2009a.

PORTO, T.S.; RANGEL, R.; FURTADO, N.A.J.C., CARVALHO, T.C.; MARTINS, C.H.G.; VENEZIANI, R.C.S.; COSTA, F.B.; VINHOLIS, A.H.C.; CUNHA, W.R.; HELENO, V.C.G.; AMBRÓZIO, S.R. Pimarane-type diterpenes: antimicrobial activity against oral pathogens. *Molecules*, v.14, p.191-199, 2009b.

PORTO, T.S.; FURTADO, N.A.J.C.; DA COSTA, F.B.; MARTINS, C.H.G.; HELENO, V.C.G.; AMBROSIO, S.R. Atividade antimicrobiana do extrato das raízes de *Viguiera arenaria* Baker e do seu metabólito principal contra patógenos bucais. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia. Livro de Resumos, v. 1, 2007.

PUPO, M.T.; GUIMARÃES, D.O.; FURTADO, N.A.J.C.; BORGES, W.S.; Microbial Natural Products: a promising source of bioactives compounds. In: TAFT, C.A. *Modern Biotechnology in medicinal chemistry and industry*. Kerala: Signpost, p.51-78, 2006.

RANGEL, R. Reisolamento, modificação estrutural e avaliação da atividade antimicrobiana de diterpenos de *Viguiera arenaria*. 2009. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Universidade de Franca, Franca- São Paulo.

RIJO, P.; FAUSTINO, C.; SIMÕES, M.F. Antimicrobial natural products from *Plectranthus* plants. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Formatex 2013, v.1, p. 1-10, 2013.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 80-84, 2005.

ROSAS-PÍNÓN; MEJÍA, A.; DÍAZ-RUIZ, G.; AGUILAR, M.I.; SÁNCHEZ-NIETO, S.; RIVERO-CRUZ, J.F. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *Journal of Ethnopharmacology*, n.141, p. 860-865, 2012.

SÁ, N.C.; CAVALCANTE, T.T.A.; RODRIGUES, A.S.; SOUZA, J.W.; BANDEIRA, P.N.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; TEIXEIRA, E.H.; SANTOS, H.S. Atividade antimicrobiana e antibiofilme do composto 1,4-dihidroxi-2E,6E,12E-trien-5-ona-casbeno frente a bactérias orais. In: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia. Livro de Resumos, v. 1, p. BIO-030, 2012.

SAMOT, J.; BADET, C. Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health. *Anaerobe*, v. 19, p.34-38, 2013.

SANTIN, G.C. Associação entre insegurança alimentar e cárie dentária. 2012. 84 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba- Paraná.

SANTOS, P.F. Novos diterpenos isolados das raízes de *Xylopi langsdorffiana* St-Hil & Tui (ANNONACEAE). 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e sintéticos bioativos)- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- Paraíba.

SARKER, S.D., NAHAR, L., KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, v.42, p.321-324, 2007.

SEVERIANO, M.E.; SIMÃO, M.R.; PORTO, T.S.; MARTINS, C.H.G.; VENEZIANI, R.C.S.; FURTADO, N.A.J.C.; ARAKAWA, N.S.; SAIO, S.; OLIVEIRA, D.C.R.; CUNHA, W.R.; GREGÓRIO, L.E.; AMBRÓSIO, S.R. Anticariogenic properties of ent-pimarane diterpenes obtained by microbial transformation. *Molecules*, v. 15, p. 8553-8566, 2010.

SILVA, A.G.P.; SILVA, A.N.; MATOS, P.M.; PORTO, T.S.; MARTINS, C.H.G.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBROSIO, S.R.; HELENO, V.C.G. Atividade antimicrobiana de diterpenos labdanos naturais e semi-sintéticos contra microrganismos multirresistentes e cepas-padrão. In: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia. Livro de Resumos, v. 1, p. QPN-051, 2012.

SINGH, J. et al. Ethnomedicine: Use in dental caries. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, v.6, n.21, p.1308-1312, 2007.

SOUZA, A.B.; SOUZA, M.G.M.; MOREIRA, M.A.; MOREIRA, M.R.; FURTADO, N.A.J.C.; MARTINS, C.H.G.; BASTOS, J.K.; DOS SANTOS, R.A.; HELENO, V.C.G.; AMBROSIO, S.R.; VENEZIANI, R.C.S. Antimicrobial Evaluation of Diterpenes from *Copaifera langsdorffii* Oleoresin Against Periodontal Anaerobic Bacteria. *Molecules*, v. 16, p. 9611-9619, 2011a.

SOUZA, A.B.; MARTINS, C.H.G.; SOUZA, M.G.M.; FURTADO, N.A.J.C.; HELENO, V.C.G.; SOUZA, J.P.B.; ROCHA, E.M.P.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBRÓSIO, S.R. Antimicrobial Activity of Terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. Against Cariogenic Bacteria. *Phytotherapy Research*, v. 25, p. 215-220, 2011b.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. trad. SANTAREM et al., *Fisiologia Vegetal*. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ULUBELEN, A.; OKSUZ, S.; TOPCU, G.; GOREN, A.C.; VOELTER, W. Antibacterial Diterpenes from the Roots of *Salvia blepharochlaena*. *Journal of Natural Products*, v. 64, p.549-551, 2001.

URZÚA, A.; REZENDE, M.C.; MASCAYANO, C. INS, C.H.G.; SOUZA, M.G.M.; FURTADO, N.A.J.C.; HELENO, V.C.G.; VASQUEZ, L. A structure-activity study of antibacterial diterpenoids. *Molecules*, v.13, p. 882-891, 2008.

VENEZIANI, R.C; SOUZA, A.B.; MARTINS, C.H.; HELENO, V.C.; SOUZA, M.G.; FURTADO, N.A.; SOUZA, J.P.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R.; AMBROSIO, S.R. Diterpenes from *Copaifera langsdorfii* oleoresin against anaerobic oral pathogens. In: 59a International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Plant Research, Antalya, Turquia. Livro de Resumos, v. 1, p. PM66, 2011.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, n.2, p. 326-337, 2006.

VUORELA, P.; LEINONEN, M.; SAIKKU, P.; TAMMELA, P.; RAUHA, J.P.; WENNERBERG, T., VUORELA, H. Natural products in the process of finding new drug candidates. *Current Medicinal Chemistry*, v.11, p.1375-1389, 2004.

WATANABE, T.; KATAYAMA, S.; MATSUBARA, M.; RONDA, Y.; KUWAHARA, M. Antibacterial carbohydrate monoesters suppressing cell growth of *Streptococcus mutans* in the presence of sucrose. *Current Microbiology*, v. 41, n. 3, p. 210-213, 2000.

WONG, R.W.K.; HAGG, U.; SAMARANAYAKE, L.; YUEN, M.K.Z.; SENEVIRATNE, C.J.; KAO, R. Antimicrobial activity of Chinese medicine herbs against common bacteria in oral biofilm. A pilot study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v.39, p.599-605, 2010.

YATSUDA, R.; ROSALEN, P.L.; CURY, J. A.; MURATA, R. M.; REHDER, V. L. G.; MELO, L. V.; KOO, A. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of *mutans streptococci*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 97, p. 183- 189, 2005.

REALIZAÇÃO:



ACESSE NOSSO CATÁLOGO!



WWW.SEVENPUBLI.COM

CONECTANDO O **PESQUISADOR** E A **CIÊNCIA** EM UM SÓ CLIQUE.