

## EFEITO ANTIBACTERIANO DO CAFÉ: CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EM MEIO DE CULTURA CONTENDO DENTES/BIOFILME EXPOSTOS AO EXTRATO AQUOSO DE *COFFEA CANEPHORA*<sup>1</sup>

Nicolli Meckelburg<sup>2,7</sup>; Karine Caldas Pinto<sup>2,8</sup>; Adriana Farah<sup>3,9</sup>; Natalia Lopes Pontes Iorio<sup>4,10</sup>; Viviane Santos da Silva Pierro<sup>5,11</sup>; Kátia Regina Neto dos Santos<sup>6,12</sup>; Lucianne Cople Maia<sup>2,13</sup>; Andréa G. Antonio<sup>2,14</sup>

<sup>1</sup> Projeto financiado pela Fundação Carlos Chagas Filho (FAPERJ), Rio de Janeiro.

<sup>2</sup> Departamento de Odontopediatria e Ortodontia, Faculdade de Odontologia, UFRJ, Rio de Janeiro – RJ.

<sup>3</sup> Núcleo de Pesquisa em Café Prof. Luiz Carlos Trugo, Inst. Nutrição, UFRJ, Rio de Janeiro – RJ.

<sup>4</sup> Departamento de Ciências Básicas, UFF – Pólo Nova Friburgo, Nova Friburgo – RJ.

<sup>5</sup> Departamento de Odontopediatria, Universidade Salgado de Oliveira, Niterói – RJ.

<sup>6</sup> Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ, Rio de Janeiro – RJ.

<sup>7</sup> Aluna de graduação, Faculdade de Odontologia, UFRJ, ni\_meck@hotmail.com.

<sup>8</sup> Aluna de graduação, Faculdade de Odontologia, UFRJ, kakacaldas@terra.com.br.

<sup>9</sup> Professora, PhD, Inst. Nutrição - UFRJ, Rio de Janeiro – RJ, afarah@nutricao.ufrj.br.

<sup>10</sup> Professora, PhD, Departamento de Ciências Básicas, UFF – Pólo Nova Friburgo, Nova Friburgo – RJ, nataliaiorio@hotmail.com.

<sup>11</sup> Professora, DDS, MSD, PhD, Faculdade de Odontologia, UNIVERSO, Niterói – RJ, vivipierro@gmail.com.

<sup>12</sup> Professora, PhD, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ, Rio de Janeiro – RJ, santoskrn@micro.ufrj.br.

<sup>13</sup> Professora, DDS, MSD, PhD, Faculdade de Odontologia, UFRJ, Rio de Janeiro – RJ, rorefa@terra.com.br.

<sup>14</sup> Professora, DDS, MSD, PhD, Faculdade de Odontologia, UFRJ, Rio de Janeiro – RJ, andreagantonio@yahoo.com.br.

**RESUMO:** Objetivou-se determinar as alterações da concentração de cálcio em meio de cultura contendo dentes/biofilme expostos ao extrato de *C. canephora*. Trinta blocos de esmalte foram fixados aleatoriamente em 2 placas de poliestireno com 24 poços contendo BHI (1485 µL/poço). Adicionou-se o inóculo de um pool de saliva humana (0,4 x 10<sup>7</sup> UFC/mL, 15µL/poço) ao sistema de placas, a fim de formar biofilme misto sobre os fragmentos (10 dias em microaerofilia - 37 °C). As amostras (áreas expostas – 22 mm<sup>2</sup>) foram tratadas diariamente (50 µL, um minuto de exposição), por uma semana, de acordo com os seguintes grupos de tratamento (G,n =8 por grupo): G1– extrato de *C. canephora* a 20%; G2– água Mili-Q (controle negativo); G3 – antibiótico (controle positivo). Outros seis fragmentos representaram o controle branco (G4). O conteúdo de cálcio do meio de cultura foi verificado em triplicata no baseline, 4<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dias, através de espectrofotometria de absorção atômica. Testes de microdureza transversal do esmalte foram realizados como indicador de desmineralização dentária. Houve um aumento da concentração de cálcio no meio após 4 e 7 dias de tratamento do G1 (3,80±1,3mg/mL e 4,93±2,1mg/L, respectivamente) e do G3 (4<sup>o</sup> - 5,7±1,8mg/mL; 7<sup>o</sup> - 6,7±3,5 mg/L), não havendo diferença ( $p>0,05$ ) entre os grupos em todos os momentos avaliados. Houve queda da concentração de cálcio no meio do G2 após o mesmo período, sendo esta diferença significativa apenas quando os valores foram comparados ao G3 ( $p<0,05$ ). O menor teor de cálcio, ao fim do experimento, foi apresentado no G4: 2,16±0,2 mg/ mL ( $p<0,05$ ). Considerando nossos estudos anteriores em que o extrato de *C. canephora* apresentou efeito antibacteriano e antidesmineralizante, sugere-se que o aumento da concentração de cálcio no meio em que o extrato de *C. canephora* foi empregado deva-se ao seu efeito antibacteriano, que causou a lise bacteriana e conseqüente aumento da concentração do íon no meio.

**PALAVRAS-CHAVE:** biofilme dental, dentes decíduos, *Coffea canephora*, cálcio

### COFFEE'S ANTIBACTERIAL EFFECT: CALCIUM CONCENTRATION IN CULTURE MEDIUM CONTAINING TEETH/BIOFILM EXPOSED TO *COFFEA CANEPHORA* AQUEOUS EXTRACT

**ABSTRACT:** This study aimed to determine the changes of calcium concentration in culture medium containing teeth/biofilm exposed to *C. canephora* aqueous extract. Thirty enamel fragments were randomly fixed in 2 polystyrene plates with 24 wells containing BHI (1485 µL/well). Pooled human saliva (0.4 x 10<sup>7</sup> UFC/mL, 15µL/well) was added to form biofilm on fragments over a 10-day period in microaerophilic conditions. Specimens were divided into treatment groups (G, n = 8 per group) and treated (50 mL) daily for 1 min over 1 week as follows: G1 - extract of *C. canephora* at 20 %; G2 - Milli-Q water (negative control); G3 - antibiotic (positive control). Six other fragments represented the blank control (G4). The calcium content of the culture medium was checked in triplicate at baseline, 4 and 7 days of treatment, by atomic absorption spectrophotometry. Cross-sectional hardness of the enamel was used as a demineralization indicator. There was an increase in the concentration of calcium in the media after 4 and 7 days of treatment of G1 (3,80±1,3mg/mL e 4,93±2,1mg/L, respectively) and G3 (4<sup>o</sup> - 5,7±1,8mg/mL; 7<sup>o</sup> - 6,7±3,5 mg/L). No difference ( $p>0.05$ ) was observed between these groups in all evaluated moments. There was a decrease in calcium concentration in G2 media after 7 days of treatment and it was only different when the values were compared to G3 ( $p<$

0.05). The lower calcium content, at the end of the experiment, was represented by G4:  $2.16 \pm 0.2$  mg/mL ( $p < 0.05$ ). Considering our previous studies in which *C. canephora* extract presented antibacterial and antidemineralizing effects, our data suggest that the increase in calcium concentration after treatment with *C. canephora* extract is due to its antibacterial effect, which caused the bacterial lyses and consequent release of the ion in the media.

**KEY WORDS:** dental biofilm, deciduous teeth, *Coffea canephora*, calcium

## INTRODUÇÃO

Dentre as atividades farmacológicas, a antimicrobiana vem sendo exaustivamente estudada, nas últimas décadas, devido ao agravamento da resistência aos antimicrobianos em populações bacterianas (Oliveira et al., 2006). Assim, a busca de novos agentes antibacterianos derivados de produtos naturais provenientes de plantas poderia ser uma alternativa, principalmente por apresentarem uma diversidade molecular muito superior àquelas derivadas de produtos sintéticos (Novais et al., 2003).

O café, uma bebida popular em todo o mundo, tem demonstrado possuir tais propriedades no combate a várias doenças, dentre elas a cárie dentária (Daglia et al., 2010; Antonio et al., 2010; Antonio et al., 2011; Antonio et al., 2012; Almeida et al., 2012), especialmente a espécie *Coffea canephora* (Antonio et al., 2010), rica em polifenóis (Farah et al., 2006) que são compostos considerados potentes agentes na prevenção de doenças orais (Koo et al., 2002; Yatsuda et al., 2005). Um estudo recente (Antonio et al., 2011) demonstrou que além do efeito antibacteriano contra o *Streptococcus mutans* - uma das espécies bacterianas envolvidas com a doença cárie, o extrato de *Coffea canephora* exerceu efeito preventivo da desmineralização do esmalte dentário exposto a um biofilme misto. Entretanto, apesar dos resultados positivos em relação ao *Coffea canephora*, mais pesquisas que investiguem a capacidade anticariogênica desta bebida são ainda sugeridas pelos autores.

Neste sentido, o presente estudo teve por objetivo identificar a influência do extrato de *Coffea canephora* na dinâmica de cárie, levando-se em consideração a concentração de cálcio em meio de cultura contendo dentes/biofilme expostos a esta substância. Tendo em vista que alguns autores (Futsaether e Johnsson, 1994; Herbaud et al., 1998; Jones et al., 1999; Torrecilla et al., 2000) revelaram que o cálcio está presente na célula bacteriana e envolvido na manutenção da sua estrutura, o presente estudo parte da hipótese nula de que o comportamento do *Coffea canephora* não diferenciará da claritromicina (controle) no que diz respeito à prevenção da desmineralização dentária e ambos promoverão aumento de cálcio no meio de cultura, decorrente de morte celular.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostra de café e preparo do extrato aquoso

Foi utilizada uma amostra de *Coffea canephora* integral (Brasil, Estado do Espírito Santo, Distrito de Cachoeiro de Itapemirim, Fazenda Experimental de Pacotuba, INCAPER, A. G. Antonio, s/no – RFA 37915), a 20%, cujos grãos foram torrados por 6 minutos, à temperatura de 220°C (torra clara), moídos e peneirados. O extrato aquoso foi preparado por adição de 20g de pó de café em 100mL de água Milli-Q purificada (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA), com auxílio de uma cafeteira (Wallita, São Paulo, Brasil), como tradicionalmente a bebida do café é preparada.

### Seleção e Preparo dos fragmentos dentários

Foram selecionados 15 molares decíduos hígidos, esfoliados naturalmente de crianças que vivem no Rio de Janeiro, Brasil, em conformidade com as regras do Comitê de Ética do Instituto de Estudos em Saúde Coletiva (IESC), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil (Processo nº 43/2007). Estes dentes foram obtidos através de doação voluntária de pacientes que apresentavam condições adequadas de saúde bucal. Os dentes foram inspecionados utilizando-se uma lupa estereoscópica (40X) e, àqueles com manchas, trincas ou qualquer defeito, foram excluídos. Após seleção inicial, 15 dentes foram armazenados em solução fisiológica (trocada a cada semana) até o início do estudo.

Os dentes foram seccionados mesio-distalmente utilizando uma máquina de corte de alta precisão (Isomet, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), resultando em 30 fragmentos. Cada fragmento foi recoberto com esmalte para unhas, expondo uma área de 22 mm<sup>2</sup>. Todos os fragmentos foram submetidos à esterilização com óxido de etileno (Bioxxi, Brasil) antes do início do experimento.

### Inoculo para formação do biofilme misto sobre os fragmentos dentários

Coletou-se saliva não estimulada de três voluntários não consumidores habituais de café com idades entre 25-36 anos (média de 29 anos), que apresentavam boa saúde geral e bucal. Os indivíduos não estavam fazendo uso de medicação e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os mesmos foram instruídos a não consumirem alimentos ou bebidas, exceto água, 01 hora antes da coleta salivar. As amostras de saliva não estimulada foram obtidas após os voluntários cuspirem em um tubo graduado, esterilizado, por 5 minutos. Durante o período de coleta, os indivíduos permaneceram confortavelmente sentados em uma sala ventilada e iluminada. Em seguida, 1 mL da amostra de saliva de cada um desses sujeitos do estudo foram inseridos em um único tubo graduado formando um *pool* de saliva. Em seguida, homogeneizou-se esse *pool*, perfazendo um volume total de 3mL.

Vale acrescentar que a concentração bacteriana do inoculo era de  $0,4 \times 10^7$  UFC/ $\mu$ L.

### Formação do biofilme sobre a superfície do esmalte dentário exposto

O modelo de biofilme utilizado neste estudo foi o preconizado por Antonio et al. (2011). Formou-se biofilme dental sobre os fragmentos de dentes decíduos, a partir de um pool de saliva humana, em placa de poliestireno com 24 poços (TPP, Zellkultur Testplatte 24 F), após um período de 10 dias de incubação em microaerofilia, a 37° C.

#### Protocolo de Tratamento

Após a formação do biofilme sobre os fragmentos dentários, as amostras foram tratadas diariamente de acordo com os seguintes grupos de tratamento (G, n=8 em cada): G1- 50 µL de extrato aquoso de *C. canephora* a 20%, G2- 50 µL de água Milli-Q purificada (controle negativo), G3- 50 µL de antibiótico/Clarithromicina (controle positivo). Outros seis fragmentos representaram o controle branco (G4) - sem inóculo e sem tratamento.

Antes da aplicação de cada substância sobre o biofilme dental, o meio de cultura (BHI, Difco, EUA) foi removido de cada poço. Procedeu-se com o tratamento por 1 minuto e, em seguida, os fragmentos dentários foram lavados por duas vezes com 1500 µL de água de injeção (substância inerte). Posteriormente, os poços foram novamente preenchidos com um novo meio de cultura (BHI). O tratamento foi realizado sempre na mesma hora, por 1 minuto, durante 07 dias.

#### Aferição do pH das substâncias testadas

A análise do pH das substâncias utilizadas no tratamento do biofilme sobre os fragmentos dentários foi realizada através de um equipamento específico (Analion –PM 600, Brasil), previamente calibrado com as soluções padrões.

#### Análise do conteúdo de cálcio

Para a análise do conteúdo de cálcio realizou-se a coleta de 1000µL dos meios de cultura nos seguintes momentos do estudo: (1) - antes de iniciar o tratamento (*baseline*), (2) no 4º dia e (3) no 7º dia de tratamento, respectivamente. Essas amostras foram centrifugadas e ao seu sobrenadante foram adicionados 500µL de ácido nítrico a 65%, a fim de possibilitar a leitura pelo espectrofotômetro de absorção atômica com chama (Analyst 300 – Perkim Elmer, Alemanha). O lantânio foi utilizado para suprimir a interferência de fosfato.

#### Análise de microdureza transversal

Após o sétimo dia de tratamento, 6 fragmentos dentários de cada grupo foram removidos dos poços e seccionados ao meio, resultando em duas partes, que foram preparadas e polidas para análise de microdureza transversal de acordo com o método proposto por Hara et al. (2003). Duas sequências (equidistantes em 150 µm) de 5 indentações foram realizadas, tanto da área exposta como da não exposta (controle do fragmento – CF; que representou a dureza do fragmento hígido, ou seja, a área que não sofreu ação de qualquer substância empregada para tratamento), a uma distância de 10, 30, 50, 70 e 90 µm da superfície do esmalte dental. Os valores de dureza (expressos em kgf/mm<sup>2</sup>) foram obtidos através de um microdurômetro digital (HVS-1000, Time Group Inc., China), de acordo com Antonio et al. (2011).

#### Análise estatística

Utilizou-se o programa SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) para realização das análises estatísticas. As diferenças do conteúdo de cálcio do meio de cultura nos diferentes momentos do estudo foram observadas através do teste Two-Way ANOVA para dados repetidos, enquanto a diferença entre os grupos foi verificada através do teste de Tukey. ANOVA e o teste de Tukey também foram utilizados para verificar as diferenças quanto os valores de microdureza entre os grupos. O nível de significância assumido em todas as análises foi de 5%.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados da concentração de cálcio em meio de cultura contendo dentes/biofilme, nos diferentes grupos do estudo, podem ser observados na figura 1. Constatou-se um aumento da concentração de cálcio após 4 e 7 dias de tratamento no grupo tratado com o extrato de café (G1) (3,80±1,3mg/mL e 4,93±2,1mg/L, respectivamente) e também no 4<sup>o</sup> (5,7±1,8mg/mL) e no 7<sup>o</sup> (6,7±3,5mg/L) dias do grupo tratado com o antibiótico (G3-controle positivo), não havendo diferença estatisticamente significativa (p= 0,136) entre ambos, em todos os momentos avaliados. Houve queda da concentração de cálcio no G2 (controle negativo) após o mesmo período, sendo esta diferença significativa apenas quando os valores foram comparados ao G3 (p=0,009), enquanto o G4 (controle branco) apresentou a menor concentração de cálcio (2,16±1,2 mg/mL) após os 7 dias de tratamento dos demais grupos. Os autores do presente estudo acreditam que assim como o antibiótico, o extrato de *C. canephora* foi capaz de causar a lise das bactérias e, conseqüentemente, ter provocado, após os 7 dias de tratamento, o aumento da concentração de cálcio no meio de cultura, pois a célula bacteriana apresenta alta concentração desse íon (Norris et al., 1996). Antonio et al. (2011) demonstraram que o extrato aquoso de *C. canephora*, a uma concentração de 16%, é bactericida frente ao *S. mutans*, uma das bactérias que participam do processo cariioso. O mesmo grupo de autores (Antonio et al., 2012) observou, em um estudo *in vitro*, que o tal extrato com uma concentração mais elevada (a 20%) foi capaz de reduzir em 15,2% um biofilme misto formado a partir de um *pool* de saliva humana, comprovando que tal substância apresenta efeito bactericida e, por conseguinte, nos levando a crer que o mesmo estaria desempenhando um papel semelhante ao antibiótico frente as bactérias do presente estudo. Mesmo diante de tal afirmativa, torna-se importante salientar que o G3 (extrato de café) não apresentou diferença estatística em relação ao G2 (água Mili-Q), apesar de ter apresentado um resultado limítrofe (p = 0,0531). No entanto, acredita-se que tal resultado seja decorrente ao baixo número de amostras testadas no presente trabalho.

Alguns estudos (Mekalanos, 1992; Clapham,1995; Petterson et al., 1996; Sanders et al., 1999; Whitaker e Larman, 2001; Ikura et al., 2002) afirmam que na presença de um antimicrobiano, há um aumento de cálcio livre citoplasmático na célula bacteriana pelo influxo do referido íon, justamente para manutenção das suas funções. Tal fato representa uma prova de que o antibiótico inibiu a síntese protéica das bactérias (mecanismo de ação da claritromicina) causando a

morte desses micro-organismos e, assim, possivelmente ocorreu a lise bacteriana devido a uma supersaturação de cálcio da célula no G3 e os íons foram liberados. De maneira que, se apenas um stress celular tivesse ocorrido, sem a sua lise, o meio estaria subsaturado de cálcio, o que não foi observado tanto no G3, como no G1. Assim, os autores sugerem que o extrato de café também tenha causado a morte das células bacterianas, sem, contudo, ter conhecimento sobre o mecanismo de ação dessa substância frente às bactérias, razão pela qual novos estudos devam ser realizados para esclarecer tal fato. O que se tem ciência é que os compostos fenólicos presentes no café tem um efeito tóxico frente aos micro-organismos. Segundo Cowan (1999) tal efeito é decorrente de inibição enzimática ou de interações inespecíficas com determinadas proteínas celulares.

Diante dos resultados, os autores também conjecturaram sobre uma possível perda de minerais dos fragmentos dentários supersaturados de cálcio para o meio subsaturado deste elemento, por diferença de gradientes (osmose) - o que aumentaria a concentração de cálcio no próprio meio anteriormente subsaturado em relação ao dente. Tal efeito seria decorrente da própria acidez do antibiótico (pH = 5,28) e do café (pH = 5,04). Entretanto, ambos não diferiram da água (pH = 5,75) ( $p > 0,05$ ). Portanto, caso o aumento de cálcio no meio fosse decorrente somente da perda mineral do fragmento dentário devido ao pH ácido do extrato de café e do antibiótico, uma concentração similar de cálcio no meio do grupo da água (controle negativo) deveria ser constatada. Além disso, o teste de microdureza transversal foi empregado, e com ele pôde-se observar perda de dureza ou de minerais em todos os grupos que foram expostos ao biofilme (G1, G2 e G3) até 30 $\mu$ m de profundidade (tabela 1), sendo que a maior perda de minerais foi constatada no G2 (até 30 $\mu$ m) ( $p < 0,05$ ). Valinotti et al. (2011) e Soares et al. (2012) também constataram uma maior perda de minerais de fragmentos dentários submersos em água deionizada, quando comparados a outras substâncias, dentre eles, um antimicrobiano (claritromicina). Esses autores sugerem que provavelmente devido ao desafio cariogênico/erosivo sofrido pelos dentes, os íons cálcio e fosfato do esmalte foram liberados, devido à condição de subsaturação da água. No presente trabalho, o G2 (grupo da água) apresentou menor concentração de cálcio quando comparado aos grupos G1 (grupo do extrato de café) e G3 (grupo do antibiótico). E neste sentido, alguma outra fonte de cálcio estaria presente, corroborando a nossa hipótese de que o cálcio do grupo tratado com o extrato do café e do grupo tratado com o antibacteriano era proveniente das bactérias. Além disso, foi observado um efeito preventivo do café (G1) e do antibiótico (G3), frente à desmineralização dentária, sem diferença estatística entre esses grupos.

Outro ponto que não deve deixar de ser mencionado, refere-se à concentração de cálcio das substâncias empregadas no tratamento, o que poderia ter influenciado o resultado encontrado. Segundo Antonio et al. (2011), o extrato de *C. canephora* a 20%, preparado como no presente estudo, possui maior concentração de cálcio (276,81 $\mu$ g/mL) quando comparado ao antibiótico (11,6 $\mu$ g/mL) (Valinoti et al., 2011). De maneira que, caso realmente a concentração de cálcio, presente nessas substâncias, fosse o motivo do aumento do referido íon nos grupos do extrato do café (G1) e do antibiótico (G3), o G1 deveria apresentar maior conteúdo de cálcio no meio em relação ao controle positivo (G3), o que não aconteceu.

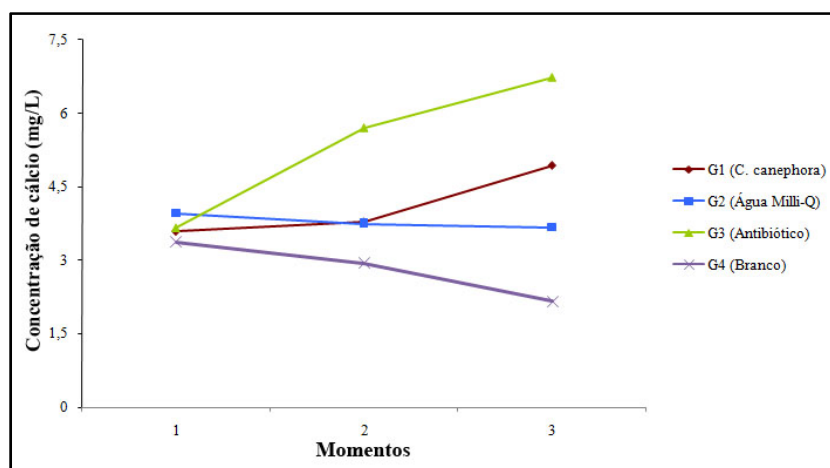


Figura 1: Média da concentração de cálcio em meio de cultura contendo dentes/biofilme inseridos nos diferentes grupos do estudo.

Tabela 1: Valores de microdureza dos fragmentos de cada grupo estudado.

Grupos estudados	Valores (média ± DP) de microdureza (kgf/mm <sup>2</sup> ) em cada profundidade				
	10µm	30µm	50µm	70µm	90µm
G1	177,93±79,17 <sup>a</sup>	224,57±52,32 <sup>a</sup>	318,00±67,92 <sup>b</sup>	311,43±47,66 <sup>b</sup>	322,68±39,06 <sup>b</sup>
CF do G1	291,78±25,69 <sup>b</sup>	327,98±32,13 <sup>b</sup>	334,91±23,97 <sup>b</sup>	331,56±13,65 <sup>b</sup>	324,83±16,51 <sup>b</sup>
G2	102,27±17,54 <sup>c</sup>	135,75±38,22 <sup>c</sup>	298,75±64,39 <sup>b</sup>	312,80±27,87 <sup>b</sup>	311,60±32,21 <sup>b</sup>
CF do G2	296,56±37,46 <sup>b</sup>	310,32±37,25 <sup>b</sup>	323,60±23,84 <sup>b</sup>	326,52±28,53 <sup>b</sup>	345,36±28,72 <sup>b</sup>
G3	195,87±13,44 <sup>a</sup>	228,64±42,65 <sup>a</sup>	315,80±37,91 <sup>b</sup>	329,72±38,58 <sup>b</sup>	326,47±31,71 <sup>b</sup>
CF do G3	289,78±34,12 <sup>b</sup>	319,16±24,80 <sup>b</sup>	324,79±14,23 <sup>b</sup>	322,96±17,52 <sup>b</sup>	349,42±19,02 <sup>b</sup>
G4	292,19±26,98 <sup>b</sup>	313,18±48,96 <sup>b</sup>	329,42±54,74 <sup>b</sup>	317,94±42,77 <sup>b</sup>	331,57±28,46 <sup>b</sup>
CF do G4	295,23±26,75 <sup>b</sup>	324,67±35,76 <sup>b</sup>	319,21±37,63 <sup>b</sup>	324,53±15,39 <sup>b</sup>	322,49±43,87 <sup>b</sup>

Nota: DP – desvio padrão; CF – controle do fragmento (área protegida pelo esmalte de unha); G1 – grupo tratado com o extrato de café; G2 – grupo tratado com a água Milli-Q (controle negativo); G3 – grupo tratado com o antibiótico (Claritromicina) e G4 (grupo não tratado e sem biofilme – controle branco). Considerando sempre a mesma profundidade do esmalte dentário (a mesma coluna) e entre os diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4), valores com a mesma letra sobrescrita não são estatisticamente diferentes ( $\alpha=0,05$ ).

## CONCLUSÕES

No presente estudo, pode-se observar o efeito preventivo do extrato de *C. canephora* quanto à desmineralização dentária. Além disso, diante dos resultados, os autores sugerem que o aumento da concentração de cálcio em meio de cultura contendo dentes/biofilme deva-se ao efeito antibacteriano do extrato aquoso de *C. canephora*, que possivelmente promoveu a morte das bactérias e conseqüente liberação do íon pela supersaturação da célula. Entretanto, futuros trabalhos que quantifiquem os micro-organismos viáveis após o tratamento de dentes/biofilme com o extrato de café são necessários; assim como estudos que identifiquem as espécies microbianas envolvidas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores do presente estudo agradecem o suporte financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. A. P., NAGHETINI C. C., SANTOS, V. R., ANTONIO A. G., FARAH, A., GLÓRIA, M. B.A. Influence of natural coffee compounds, coffee extracts and increased levels of caffeine on the inhibition of *Streptococcus mutans*. *Food Research International*, 49: 459–461, 2012.
- ANTONIO, A. G., IORIO, N. L., FARAH, A., DOS SANTOS, K. R. N., MAIA, L. C. Effect of *Coffea canephora* aqueous extract on microbial counts in *ex vivo* oral biofilms: a case study. *Planta Medica*, 78: 755-760, 2012.
- ANTONIO, A. G., IORIO, N. L., PIERRO, V. S., CANDREVA, M. S., FARAH, A., DOS SANTOS, K. R. N., MAIA, L. C. Inhibitory properties of *Coffea canephora* extract against oral bacteria and its effect on demineralization of deciduous teeth. *Archives of Oral Biology*, 56: 556–564, 2011.
- ANTONIO, A. G., MORAES, R. S., PERRONE, D., MAIA, L. C., SANTOS, K. R. N., IORIO, N. L. P., FARAH, A. Species, roasting degree and decaffeination influence the antibacterial activity of coffee against *Streptococcus mutans*. *Food Chemistry*, 118: 782–788, 2010.
- CLAPHAM, D. E. Calcium signaling. *Cell*, 80: 259–268, 1995.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564–582, 1999.
- DAGLIA, M., PAPETTI, A., GRISOLI, P., ACETI, C., SPINI, V., DACARRO, C., GAZZANI, G. Isolation, identification, and quantification of roasted coffee antibacterial compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 10208–10213, 2007.
- FARAH, A., DE PAULIS, T., MOREIRA, D. P., TRUGO, L. C., MARTIN, P. R. Chlorogenic acids and lactones in regular and waterdecaffeinated arabica coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 374–381, 2006.
- FUTSAETHER, C. M., JOHNSON, A. (1994) Using fura-2 to measure intracellular free calcium in *Propionibacterium acnes*. *Canadian Journal of Microbiology*, 40: 439–445, 1994.
- HARA, A. T., QUEIROZ, C. S., PAES LEME, A. F., SERRA, M. C., CURY, J. A. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine *in situ*. *Caries Research*, 37: 339–344, 2003.
- HERBAUD, M. L., GUISEPI, A., DENIZOT, F., HAIECH, J., KILHOFFER, M. C. Calcium signalling in *Bacillus subtilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1448: 212–226, 1998.
- IKURA, M., OSAWA, M., AMES, J. B. The role of calcium-binding proteins in the control of transcription: structure to function. *Bioessays*, 24: 625–636, 2002.
- JONES, H. E., HOLLAND, I. B., BAKER, H. L., CAMPBELL, A. K. Slow changes in cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in *Escherichia coli* highlight two putative influx mechanisms in response to changes in extracellular calcium. *Cell Calcium*, 25: 265–274, 1999.

- KOO, H., CURY, J. A., ROSALEN, P. L., AMBROSANO, G. M., IKEGAKI, M., PARK, Y. K. Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. *Caries Research*, 36: 445–448, 2002.
- MEKALANOS, J. J. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *Journal of Bacteriology*, 174: 1–7, 1992.
- NORRIS, V., GRANT, S., FREESTONE, P., CANVIN, J., SHEIKH, F. N., TOTH, I., TRINEI, M., MODHA, K., NORMAN, R. I. Calcium signalling in bacteria. *Journal of Bacteriology*, 178: 3677–3682, 1996.
- NOVAIS, T.S.; COSTA, J.F.O.; DAVID, J.L.P.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 14: 5-8, 2003.
- OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O., VIEIRA, W. L., FREIRE, K. R. L.,TRAJANO, V. N., LIMA, I. O., SOUZA, E. L., TOLEDO, M. S., SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16:77-82, 2006.
- PETTERSON, J., NORDFELTH, R., DUBININA, E., BERGMAN, T., GUSTAFSSON, M., MAGNUSSON, K. E., WOLF-WATZ, H. Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science*, 273: 1231–1233, 1996.
- SANDERS, D., BROWNLEE, C., HARPER, J. F. Communicating with calcium. *Plant Cell*, 11: 691–706, 1999.
- SOARES, D. N., VALINOTI, A. C., PIERRO, V. S., ANTONIO, A. G., MAIA, L. C. Cross-sectional microhardness of bovine enamel subjected to three paediatric liquid oral medicines: an *in vitro* study. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 13: 261-265, 2012.
- TORRECILLA, I., LEGANES, F., BONILLA, I., FERNANDEZ-PINAS, F. Use of recombinant aequorin to study calcium homeostasis and monitor calcium transients in response to heat and cold shock in cyanobacteria. *Plant Physiology*, 123: 161–176, 2000.
- VALINOTI, A. C., PIERRO, V. S., DA SILVA, E. M., MAIA, L. C. *In vitro* alterations in dental enamel exposed to acidic medicines. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 21: 141-50, 2011.
- WHITAKER, M., LARMAN, M. G. Calcium and mitosis. *In vitro Cellular & Developmental Biology*, 12: 53–58, 2001.
- YATSUDA, R., ROSALEN, P. L., CURY, J. A., MURATA, R. M., REHDER, V. L., MELO, L.V., KOO, H. Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*, 97: 183–189, 2005.