



Faculdade de Pindamonhangaba



**Rafael Moreira Gonçalves**  
**Camila Rafaela Charleaux Gomes de Gouvêa**

**EFEITO ANTIMICROBIANO E CITOTÓXICO DA  
TEOBROMINA**

**Pindamonhangaba – SP**  
**2016**



Faculdade de Pindamonhangaba



**Rafael Moreira Gonçalves**  
**Camila Rafaela Charleaux Gomes de Gouvêa**

## **EFEITO ANTIMICROBIANO E CITOTÓXICO DA TEOBROMINA**

Monografia apresentada como parte dos requisitos para obtenção do diploma de Bacharel pelo Curso de Odontologia da Faculdade de Pindamonhangaba.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Graziella Nuernberg Back Brito

**Pindamonhangaba – SP**  
**2016**

Gouvêa, Camila Rafaela Charleaux Gomes; Gonçalves, Rafael Moreira  
Efeito Antimicrobiano e Citotóxico da Teobromina / Camila Rafaela  
Charleaux Gomes de Gouvêa; Rafael Moreira Gonçalves /  
Pindamonhangaba-SP : FUNVIC Fundação Universitária Vida Cristã,  
2016.  
34f.

Monografia (Graduação em Odontologia) FUNVIC-SP.  
Orientador: Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito.

1 Teobromina. 2 Cacau. 3 Antimicrobiano

I Efeito Antimicrobiano e Citotóxico da Teobromina II Camila  
Rafaela Charleaux Gomes de Gouvêa; Rafael Moreira Gonçalves.



Faculdade de Pindamonhangaba



**Rafael Moreira Gonçalves**  
**Camila Rafaela Charleaux Gomes de Gouvêa**

### **EFEITO ANTIMICROBIANO E CITOTÓXICO DA TEOBROMINA**

Monografia apresentada como parte dos requisitos para obtenção do diploma de Bacharel pelo Curso de Odontologia da Faculdade de Pindamonhangaba.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Graziella Nuernberg Back Brito

Data: \_\_\_\_\_

Resultado: \_\_\_\_\_

#### **BANCA EXAMINADORA**

Prof. \_\_\_\_\_ Faculdade de Pindamonhangaba

Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. \_\_\_\_\_ Faculdade de Pindamonhangaba

Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. \_\_\_\_\_ Faculdade de Pindamonhangaba

Assinatura \_\_\_\_\_

Dedico este TCC aos meus pais que sempre me incentivaram buscaram o melhor para mim, nunca deixaram faltar nada, me incentivando com muita dedicação, luta e respeito. Aos meus pais que não fosse por eles minha coragem, minhas forças já haveriam se esgotado, aos meus irmãos que são meus companheiros assíduos, transmitiram muita força, companheirismo e camaradagem, dando-me cada dia mais força de vontade para superar meus desafios. A minha namorada Marli, que me incentivou e sempre me apoiou em momentos difíceis, esteve sempre presente me encorajando e me ajudando em tudo. Aos meus amigos presentes que sempre me fizeram acreditar neste dia de glória. E a todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram para que este dia chegasse com êxito. Acredito que sem vocês nada disso seria possível. Obrigado pelo apoio, carinho, compreensão e força. Essa vitória não é só minha, é nossa!

Agradeço mais este sonho concretizado, ao ensinamento de todos os professores, ao apoio dos colegas Camila, Jessica, Kauê, e a todos os outros colegas que estavam sempre ao meu redor, me aturando, me aconselhando, em todos os momentos, nos momentos ruins e nos momentos bons estávamos juntos.

Dedico o meu TCC para todos aqueles que fizeram do meu sonho real, me proporcionando forças para que eu não desistisse de ir atrás do que sempre busquei. Muitos obstáculos foram impostos para durante esses últimos anos, mas graças a vocês eu não fraquejei. Obrigado por tudo família, namorada, professores, amigos e colegas.

As maravilhas de Deus estão a nosso dispor por toda a vida, basta que lutemos para conquistar o espaço que é nosso no mundo. Obrigado a todos que fizeram parte desta minha longa e feliz trajetória.

Rafael

Dedico minha vida ao meu filho João Camilo, com ele tudo passou a ter mais cor, tudo passou a ter sentido. Sua compreensão em minha ausência, sua alegria ao ver minha chegada, sua presença durante meus estudos, nossas paradinhas para mamar, que alimentam a minha alma. Amor da minha vida.

Ao meu marido Alexandre, pela paciência, apoio e compreensão, minha força e segurança.

A meu pai Camilo e minha mãe Nice, pelo apoio constante em todas as etapas de minha vida. Obrigada pai e mãe principalmente pelo cuidado com meu filho. A vocês não tenho e nunca teria palavras o suficiente para agradecer tudo que fizeram e fazem por mim.

Ao meu parceiro Rafael, obrigado pela compreensão.

Aos demais colegas de sala, em especial Jessica Voiola e Ana Clélia Campos, obrigada pelo acolhimento.

Dedico também e sempre a Deus, pois se eu já tinha motivos para agradecer, hoje tenho muito mais.

Camila

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos á Deus por ter me possibilitado estarmos firmes durante toda essa trajetória, caminho esse que irá nos levar á realização dos nossos sonhos!

À nossa orientadora professora Dra. Graziella Nuernberg Back Brito por todos os ensinamentos, pela dedicação, e por pacientemente nos orientar neste trabalho.

Ao Professor Dr. Virgílio Vilas Boas, por sua disponibilidade em nos auxiliar com coorientador.

À professora Cristiana Tengan, por nos ajudar com a formatação e organização.

Ao Biomédico Lucas de Paula Ramos, pelo importante apoio em nossa pesquisa.

## RESUMO

Com as frequentes pesquisas na área odontológica, houve a recente descoberta de uma substância extraída da semente do cacau, a teobromina (*Theobroma cacao*). Teobromina é um substrato do chocolate, considerada uma substância anticariogênica, que tem benefícios na remineralização dentinária, e um efeito não tóxico, capaz de inibir o processo de microrganismos envolvidos no processo da cárie. Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade antimicrobiana da Teobromina, com o método da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM), por meio de microdiluição em caldo e utilizando as cepas de referência de *C. albicans* (sorotipo A – ATCC 36801) e *S. mutans* (ATCC 35688) em crescimento planctônico. Os valores de CIM e CMM foram testados nos ensaios de citotoxicidade através de teste colorimétrico MTT. Como resultado, não houve CIM para *C. albicans* nas duas situações testadas e para *S. mutans* a CIM foi de 12,5 mg/mL para a diluição em solução salina e saliva artificial. Não houve CMM para as cepas testadas. A teobromina não foi citotóxica a partir da concentração de 320 mg/mL. Concluímos nesta pesquisa que o extrato de teobromina apresentou uma ação bacteriostática para *S. mutans* e não apresentou citotoxicidade nesta concentração.

Palavras-chave: Teobromina. Cacau. Antimicrobiano.

## ABSTRACT

With frequent research in the dental field, there was the recent discovery of a substance extracted from the cocoa seed, theobromine (*Theobroma cacao*). Theobromine is a substrate of the chocolate, considered an anticariogenic substance, that has benefits in the dentin remineralization, and a nontoxic effect, able to inhibit the process of microorganisms involved in the caries process. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial capacity of Theobromine, using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Microbicidal Concentration (CMM) method, using broth microdilution using the reference strains of *C. albicans* (serotype A - ATCC 36801) and *S. mutans* (ATCC 35688) in planktonic growth. MIC and CMM values were tested in the cytotoxicity assays using the MTT colorimetric assay. As a result, there was no CIM for *C. albicans* in the two situations tested and for *S. mutans* MIC was 12.5 mg / mL for dilution in saline solution and artificial saliva. There was no CMM for the strains tested. Theobromine was not cytotoxic from the 320 mg / mL concentration. We conclude in this research that the extract of theobromine presented a bacteriostatic action for *S. mutans* and did not present cytotoxicity in this concentration.

Keywords: Theobromine. Cocoa. Antimicrobial.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Cárie.....</b>	<b>10</b>
2.1.1 <i>ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS</i> .....	12
2.1.2 <i>CANDIDA ALBICANS</i> .....	13
<b>2.2 A Teobromina .....</b>	<b>14</b>
2.2.1 MECANISMO DE AÇÃO DA TEOBROMINA.....	16
2.2.2 EFEITOS FISIOLÓGICOS .....	16
<b>2.3 O Flúor .....</b>	<b>17</b>
2.3.1 MECANISMO DE AÇÃO DO FLÚOR .....	18
2.3.2 TOXICIDADE AO FLÚOR.....	20
<b>3 MÉTODO .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Determinações da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbica Mínima (CMM) .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Avaliação da Citotoxicidade .....</b>	<b>24</b>
3.2.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE COM MMT.....	25
<b>3.3 Análise Estatística.....</b>	<b>26</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Após pesquisa realizada por uma universidade de Tulane, onde se analisou um extrato de chocolate não tóxico que supera o flúor em relação aos efeitos anticarie, ainda considerando os perigos relacionados da toxicidade que o mesmo apresenta, aplicaram a substituição do flúor por uma pasta à base de chocolate, oferecendo uma solução palatável e sem riscos caso sua ingestão. Assim puderam dispor da ação benéfica que a teobromina apresenta referente aos estudos científicos, em uma solução inovadora para prevenção da carie. Esta inovação é de grande importância para a área odontológica, visto que os benefícios, visam um tratamento longe do perigo da toxicidade sistêmica, não apresentando alterações fisiológicas e ainda contribuindo para uma remineralização dentinária.

Sabemos da grande importância que o flúor apresenta no papel de prevenção a cárie, e seu uso na área odontológica.

O flúor é comprovadamente eficaz no combate e na prevenção da cárie dentária, sendo utilizado em todo mundo com tal finalidade, seja por sua adição à água de abastecimento público, ao sal, a gotas e a comprimidos, a géis ou a bochechos para aplicação tópica, a vernizes fluoretados e dentifrício, ou mesmo a materiais odontológico, como no caso dos ionômeros de vidro.<sup>1</sup>

A prevalência de cárie, na maioria dos países, diminuiu nas últimas duas décadas, devido à implementação de programas de saúde pública, ao uso do flúor através da fluoretação das águas de abastecimento e o uso de dentifrícios fluoretados.<sup>2</sup> Porém, se seu uso não for cauteloso respeitando sua devida dosagem, concentração e tempo de exposição, o flúor pode causar malefícios como, fluorose dentária, intoxicação sistêmica, ou, até mesmo a morte.

A busca pela melhora da qualidade dos materiais odontológicos tem levado a um crescimento exponencial de novos produtos no mercado. No entanto, para o aprimoramento desses materiais e para a comprovação de sua eficácia, os mesmos necessitam ser submetidos a diversos testes laboratoriais, procurando visualizar o seu desempenho clínico quando da utilização na cavidade bucal.<sup>3</sup>

Com uma abordagem cada vez maior em inovações de materiais e substâncias, e as frequentes pesquisas na área odontológica para encontrar um produto comercializável que atenda as exigências, tanto dos cirurgiões dentistas, quanto a de seus clientes, houve a descoberta de uma substância que é extraída da semente do cacau, a teobromina.

A teobromina está presente no cacau (*Theobroma cacao*) e, conseqüentemente, no chocolate, sobretudo no chocolate amargo e meio amargo.<sup>4</sup>

A teobromina tem efeito na remineralização da lesão artificial do esmalte. Assim, a remineralização produzida pelo tratamento com a teobromina, significou um aumento da resistência dos dentes frente ao ataque ácido. Isto não é surpreendente, pois seu estudo também observou de que o tamanho dos cristais foram aumentados, e a cristalinidade dos dentes melhorou através do crescimento de hidroxiapatita, em um sistema de formação de apatita contendo uma eficaz quantidade de xantina parcialmente alquilada, a teobromina. Quer *in vitro* como em saliva artificial, ou *in vivo* como em ratos em crescimento que se alimentaram de dieta contendo teobromina, apresentaram ótimos resultados.<sup>4</sup>

O extrato de teobromina é um pó branco cristalino, cuja sua composição química é semelhante à cafeína, ajuda a endurecer o esmalte dos dentes, tornando os usuários menos suscetíveis à cárie dentária.<sup>4</sup>

A remineralização observada com teobromina confirmou o relatório de dois estudos anteriores, onde após uma exposição regular de uma superfície desmineralizada do esmalte dentinário, a teobromina induziu uma recristalização de superfície e aumentou a dureza do esmalte em comparação ao fluoreto de sódio.<sup>4</sup> Os resultados indicaram que a dureza da superfície do esmalte do grupo teobromina, foi grandemente reforçada em comparação com o grupo de fluoreto.<sup>5</sup>

O objetivo deste trabalho foi de avaliar a capacidade antimicrobiana da Teobromina, assim como a citotoxicidade celular deste extrato.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Cárie

A cárie é uma doença de caráter crônico, causada pelo processo de desmineralização da superfície dental por ácidos orgânicos provenientes da fermentação dos carboidratos da dieta, pelas bactérias.<sup>6</sup> Ainda Leites et al.<sup>6</sup> concordou com (Newbrum, 1988), que acrescentou um quarto fator – o tempo – que deve ser considerado em qualquer discussão sobre a etiologia da cárie.

Considerada uma das doenças crônicas mais prevalentes em adultos e crianças no mundo. De etiologia multifatorial, a cárie envolve micro-organismos específicos, carboidratos fermentáveis, superfície dentária, características inerentes ao hospedeiro e tempo de exposição. Todos esses fatores desempenham um papel no processo dinâmico na desmineralização e remineralização que ocorre na superfície dentária.<sup>7</sup>

Com o passar do tempo, e na contínua exposição aos fatores, o biofilme pode passar a ser colonizado por bactérias acidogênicas que poderão promover o início da desmineralização dos tecidos duros do dente por ácidos orgânicos produzidos pela fermentação de carboidratos e, conseqüentemente, lesões ativas em esmalte poderão ser produzidas. Essa lesão é caracterizada por lesão de mancha branca, e é comumente encontrada em áreas de maior estagnação de biofilme dentário, ou seja, nas superfícies cervicais, proximais e oclusais. Caso não se intervenha no processo onde a desmineralização prevalece sobre a remineralização, a lesão de cárie pode evoluir até ter perdas consideráveis com a formação de cavidade.<sup>7</sup>

A mancha branca está relacionada com a perda de mineral pelo esmalte que, quando diagnosticada em sua fase inicial, ainda apresenta-se parcialmente desmineralizada, sendo passível de remineralização. A formação da lesão de mancha branca em esmalte está diretamente atribuída ao efeito da acumulação e retenção prolongada do biofilme bacteriano visível. Assim com a presença de *Streptococcus mutans* e lactobacilos na saliva.<sup>7</sup>

Apesar da definição clássica de cárie associar-se à dissolução dos tecidos mineralizados do dente, isto é apenas uma face do processo cariioso. Na verdade, o processo cariioso apresenta uma dinâmica que, se desmineraliza o dente, também pode remineralizá-lo frente a condições específicas. Portanto, o processo cariioso apresenta naturalmente momentos de desmineralização e remineralização.<sup>8</sup>

A cárie se justifica em uma destruição progressiva e localizada dos dentes, principalmente das coroas dentárias; doença infecciosa que resulta em uma perda localizada de miligramas de minerais dos dentes afetados, causada por ácidos orgânicos provenientes da fermentação microbiana dos carboidratos da dieta, seriam outras definições de cárie. Qualquer que seja a definição de cárie, quando não tratada pode haver progressão culminando com a destruição quase total do dente e levando à infecção da polpa e tecidos de suporte, com sequelas às vezes graves.<sup>9</sup>

Considerada como uma doença infectocontagiosa e transmissível que acompanha a humanidade desde tempos imemoriais. Resulta da colonização da superfície do esmalte por micro-organismos, especialmente os *Streptococcus mutans*, que, metabolizando carboidratos fermentáveis (por exemplo a sacarose) produzem ácidos. Essa acidez localizada, provocada pela disponibilidade de açúcar, leva à dissolução do fosfato de cálcio das camadas superficiais da estrutura de esmalte, liberando fosfato e cálcio para o meio bucal. A partir de um determinado momento essa perda mineral atinge tal grau que observa-se a formação de uma cavidade cuja evolução, nos casos extremos, corresponde à destruição de toda a coroa dentária. A relação açúcar-cárie está bem documentada e não há qualquer dúvida quanto ao papel central do açúcar no processo cariogênico.<sup>10</sup> Entre estes, encontramos a composição do próprio biofilme, composição e capacidade tampão da saliva, velocidade da secreção salivar e composição e frequência da dieta. Além dos fatores determinantes, existem os fatores confundidores, que são aqueles que variam de população para população nos quais se incluem os fatores sócio-econômicos, educacionais e comportamentais.<sup>6</sup>

A estrutura mineral dentária depende do ambiente oral. Quando exposta ao meio bucal, alterações de temperatura, capacidade tampão e pH da placa, podem levar à solubilização dos cristais de hidroxiapatita. Em normalidade, cálcio e fosfato estão presentes na saliva em condições de supersaturação em relação ao esmalte, favorecendo a manutenção do estado cristalino deste tecido quando em pH 6,8. Alterações na dieta com a conversão de carboidratos em ácido pelas bactérias do biofilme levam a variação do pH. Valores de pH inferiores a 5,5 criam condições para que haja aumento de solubilidade e dissolução dos cristais do esmalte. Quando episódios de redução do pH são intercalados por períodos maiores de retorno ao pH fisiológico, há um retorno ao equilíbrio entre os íons provenientes da saliva e do esmalte dentário. No entanto, quando períodos de pH crítico tornam-se mais frequentes, pode ocorrer o predomínio da saída de íons do dente, formando uma lesão de cárie.<sup>11</sup>

É fato comprovado que as doenças que acometem a cavidade bucal são de origem infecciosa. Dependendo de fatores tais como a dieta e a remoção mecânica 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 biofilme, e ainda assim ter saúde. Todavia, quando a remoção mecânica da placa é deficiente e a utilização da sacarose é frequente ocorre uma seleção para certos organismos patogênicos e a placa se torna mais virulenta, podendo resultar tanto em lesões de tecido duro (cáries), quanto de tecido mole (doenças periodontais). Desta forma, o objetivo primário, em termos de saúde bucal, seria manter o controle do acúmulo de bactérias sobre os dentes.<sup>12</sup>

Segundo Leites et al.<sup>6</sup> pode-se concluir que, sendo a cárie um processo infeccioso, a prevenção e a diminuição desta contaminação, e o seu controle químico mecânico, devem ser objeto de preocupação quando o objetivo é controlar e eliminar a doença.

Contudo, o controle desse desequilíbrio entre os processos de desmineralização e remineralização, para se levar à paralisação do desenvolvimento da lesão, pode ser obtido através da modificação de fatores que interfiram na baixa do pH do biofilme dentário ou na solubilidade dos cristais, como por exemplo, a presença do flúor.<sup>11</sup>

### **2.1.1 Estreptococos do Grupo *mutans***

A correlação entre *S. mutans* com a doença cárie tem sido extensivamente estudada, indicando ser esta bactéria, o seu principal agente etiológico. Estreptococos do Grupo *mutans* (EGM), incluem um grupo com sete espécies: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. ferus*, *S. macacae*, *S. downei*. São cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos, microaerófilos, acidogênicos e acidúricos, e capazes de formar polissacarídeos extracelulares.<sup>6</sup>

EGM são um grupo de micro-organismos altamente cariogênicos pelas seguintes características: Capacidade de colonizar a superfície dentária colonizam superfícies que não descamam (dentes, materiais restauradores, acrílicos); produção de polissacarídeos extracelulares do tipo glicana (dextrana e mutana) a partir da sacarose, o que favorece a formação de biofilme espesso; capacidade acidogênica, produção de ácido láctico, pré-requisito essencial para que um micro-organismo seja considerado cariogênico; capacidade acidúrica, sobrevivência do micro-organismo em pH ácido; acúmulo de polissacarídeos

intracelulares de glicose do tipo amilopectina a partir de carboidratos da dieta do hospedeiro; fermentadores de grande quantidade de carboidratos, incluindo manitol e sorbitol.<sup>6</sup>

Para Leites et al.<sup>6</sup> a literatura consultada é unânime em afirmar que a cárie é uma doença multifatorial e que os micro-organismos são essenciais para seu desenvolvimento. *Streptococcus do Grupo mutans* (EGM), são o principal agente etiológico da cárie e as espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* as que apresentam potencial cariogênico em humanos.

### 2.1.2 *Candida albicans*

A microbiota bucal desempenha um papel importante no desenvolvimento de cárie dentária. Os micro-organismos que têm sido associados com esta doença incluem *Streptococcus mutans*, lactobacilos, *Candida albicans*, entre outros.<sup>13</sup>

A espécie *Candida albicans* é conhecida por substancialmente reduzir o pH do ambiente pela produção de ácidos e para sobreviver em níveis baixos de pH. A queda de pH promovida pela produção ácida está relacionada para o aparecimento de lesões de cárie.<sup>13</sup> *Candida albicans* é um fungo frequentemente encontrado no biofilme e a sua capacidade para segregar enzimas e ácidos orgânicos colagenolíticas pode determinar o seu papel no estabelecimento da doença cárie.

Estudos demonstraram que *Candida albicans* tem a mesma capacidade de colonizar hidroxiapatita como o *S. mutans*, no entanto, usa de diferentes mecanismos.<sup>14</sup> Este micro-organismo adere a hidroxiapatita, especialmente através de interações eletrostática. *Candida albicans* tem também a capacidade de dissolver hidroxiapatita a uma maior taxa de quando em comparação com *Streptococcus mutans*.<sup>14</sup> Brighent et al.<sup>13</sup> relata que essa capacidade é quase 20 vezes maior do que o do *Streptococcus mutans*.

Em um estudo feito por Carvalho et al.<sup>15</sup> *S. mutans* e *C. albicans* foram os micro-organismos mais isolados da dentina de crianças com cáries de mamadeira (83,3% e 70,8%, respectivamente). No entanto, *S. mutans* foi associada com a presença de cáries em geral, enquanto ocorreu uma maior frequência de *C. albicans* em crianças com cárie de mamadeira quando comparadas a crianças livres de cárie ou crianças com outros tipos de cárie.

*Candida albicans* é um fungo altamente tolerantes a ácido. Por isto é capaz de secretar ácidos orgânicos e reduzir o pH da saliva para um valor menor do que a produzida por

*Streptococcus mutans*. Os resultados a partir de um estudo recente demonstraram sua participação na etiologia da cárie.<sup>14</sup>

Carvalho et al.<sup>15</sup> em seu estudo *in vitro* confirmou o alto potencial acidogênico da *Candida albicans*. É consenso que a cariogenicidade depende não somente do pH terminal, mas também de vários fatores, incluindo a capacidade do micro-organismo em colonizar a superfície dentária.

## 2.2 A Teobromina

Desde a antiguidade o cacau tem sido utilizado como um produto medicinal. Os Incas consideravam as bebidas feitas com cacau como a “bebida dos deuses”, o que levou ao nome científico da árvore de cacau, *Theobroma cacao*, das palavras gregas theo (Deus) e broma (bebida). No século XIX o chocolate tornou-se um item de luxo, e voltou a ser também utilizado como remédio, igualmente ao que ocorria na antiguidade. Mais recentemente, vários estudos apontam o cacau como um fator de prevenção de diversas doenças crônicas. O cacau tem se mostrado promissor em relação a melhora da função cardíaca, dos sintomas de angina pectoris, da digestão, da função renal, além de estimular o sistema nervoso e a função intestinal. Constatou-se também que, o chocolate amargo, rico em cacau, tem importante efeito sobre o aumento da vasodilatação arterial, a capacidade antioxidante e a proteção contra a oxidação da LDL-col. Seu consumo tem mostrado reduções nas concentrações de colesterol e biomarcadores inflamatórios, como as citocinas e interleucinas.<sup>16</sup>

Teobromina (3,7-dimetilxantina), um pó branco cristalino, é um alcalóide prontamente disponível no cacau (240 mg / xícara) e chocolate (1,89%). Seus níveis são mais elevados em chocolates escuros (Aproximadamente 10 g / kg) a mais do que nos chocolates ao leite (1-5 g / kg). O chocolate de qualidade superior tende a conter mais teobromina do que o chocolate de qualidade inferior. O conteúdo de teobromina em média nos grãos de cacau são de aproximadamente 20,3 mg /g.<sup>4</sup>

Segundo Salva,<sup>17</sup> ela causa menos impacto no sistema nervoso central do que a cafeína, afeta o nível de serotonina no organismo e pode ser utilizada como vasodilatador, auxiliando na liberação da urina e na estimulação do coração.

Como produto químico a teobromina tem a fórmula molecular  $C_7H_8N_4O_2$ , é um pó branco e é principalmente produzido através das cascas das sementes de cacau, subproduto do

processamento de chocolate. É pouco solúvel em água à temperatura ambiente e álcool, sendo mais solúvel em água quente. Este composto é considerado diurético, relaxante muscular e vasodilatador.<sup>18</sup>

Na área da odontologia, Paolino e Kashket (1985) observaram *in vitro* que o extrato de cacau foi capaz de inibir a enzima glicosil transferase, responsável pela formação de polissacarídeos extracelulares em cepas de *S. sanguis*, *S. mutans*, *A. viscosus* e *A. naeslundii*. A ingestão de alimentos contendo cacau, pode representar uma dieta capaz de modular a produção de polissacarídeos extracelulares.<sup>12</sup>

Segundo Amaechi,<sup>4</sup> e Verma et al.<sup>5</sup> a remineralização observada com teobromina confirmou o relatório de dois estudos anteriores, em que a exposição regular de uma superfície desmineralizada do esmalte a teobromina, induziu uma recristalização de superfície e aumentou a dureza do esmalte comparado com fluoreto de sódio. Foi recentemente evidenciado que a Teobromina é capaz de melhorar a remineralização de lesões de cárie *in vitro*. Os resultados dos estudos indicaram que a dureza da superfície do esmalte, referente ao grupo tratado com a teobromina, foram grandemente reforçados em comparação com o grupo de fluoreto.

Nakamoto et al.<sup>19</sup> relata em sua pesquisa que, a teobromina aumenta o tamanho dos cristais de hidroxilapatita, como demonstrado em estudos *in vitro*, e a alteração significativa da superfície do esmalte pela teobromina é indicado pelo aumento da dureza. Também cita que, em revisão crítica da literatura toxicologia de metilxantinas, demonstra que o cacau em si não tem efeitos adversos notificados que seja prejudiciais ao homem.

De acordo com Landucci et al.<sup>20</sup> experimentos em laboratório demonstraram que extratos de cacau, chá e café inibiram a enzima glicosiltransferase de vários estreptococos orais, sendo que os extratos de cacau e café não perderam essa habilidade mesmo após a retirada do ácido tânico presente em seus extratos.

Teobromina é um alcalóide, do grupo metilxantina, encontrada em maior concentração nas sementes de cacau. Também é encontrada no chocolate. Sua concentração é de seis a sete vezes mais em comparação com a cafeína.<sup>21</sup>

Nos últimos anos a teobromina começou ser estudada para o uso de seus benefícios na saúde bucal. Contida no chocolate, acabou por ter um efeito anticariogênico mais elevado do que o flúor na redução da solubilidade de fosfato após exposição acida da superfície do esmalte. A dureza do esmalte dos dentes em contato com a troca de minerais na camada superficial de teobromina a 200mg / L, teve um efeito positivo na remineralização. Estes resultados foram confirmados por estudo *in vitro* que, a teobromina, extrato do cacau, pode

fornecer proteção muito intensa sobre a superfície do esmalte, demonstrando a eficácia de seus benefícios.<sup>21</sup>

### 2.2.1 MECANISMO DE AÇÃO DA TEOBROMINA

A teobromina contém alguns polifenóis que inibem atividade anti-glicosiltransferase. Um estudo realizado relatava que a sacarose-dependente na aderência celular de *Streptococcus mutans*, foi significativamente deprimido com extrato de cacau.<sup>22</sup> Diversas espécies bacterianas do biofilme dental quando em contato com a sacarose, podem sintetizar vários tipos de polissacarídeos ou convertê-la em ácido. Os polissacarídeos formados podem ser: polímeros de glicose (Glicanos), formados pela enzima glicosiltransferase a partir da sacarose. Os glicanos com a maioria das ligações  $\alpha$ 1-6 são denominados dextranos, e os com predominância  $\alpha$ 1-3 são chamados mutanos. Estes últimos são altamente insolúveis e rígidos, e podem formar agregados fibrosos, enquanto que os dextranos formam cadeias flexíveis sendo mais solúveis.<sup>23</sup>

De acordo com Ferreira<sup>18</sup> na ação terapêutica, tem como propriedade a inibição das enzimas fosfodiesterases dos nucleotídeos cíclicos, que tem como função a catálise de decomposição do AMP cíclico e do GMP cíclico em 5'-AMP e 5'-GMP. Portanto, essas vias ficam sobrecarregadas de AMP e GMP cíclicos, e a transdução de sinal é potencializada.

Em outro estudo realizado por Ferreira,<sup>18</sup> cita que (Geraets et al. 2006), estudou a capacidade de inibição de poli (ADP ribose) polymerase-1 (PARP-1) pela cafeína e os seus vários metabolitos, tais como outras metilxantinas. Após o estudo foi possível observar que a teobromina tem atividade inibidora sobre a PARP-1 nas células epiteliais e endoteliais cultivadas em condições fisiológicas. Esta inibição pode ter implicações importantes para o tratamento nutricional de patologias inflamatórias agudas e crônicas, como a prevenção de lesões derivadas da isquemia (reestruturação do fluido de sangue, após um período de privação de oxigênio tecidual) ou complicações vasculares em pacientes com diabetes.

### 2.2.2 EFEITOS FISIOLÓGICOS

A teobromina em relação a remineralização, evidencia um aumento na dureza da superfície do esmalte. Pode aumentar a dureza superficial do esmalte pela reação intersticial. Na unidade de célula de cristal de apatita que é um micro túnel com um diâmetro de  $\pm 176$  pm, é possível que um íon menor que este diâmetro possa passar pelo túnel para gerar a reação intersticial da teobromina em íons de cristais de apatita. A fórmula molecular para teobromina é  $C_7H_8N_4O_2$ . Alguns íons em teobromina (C = 170 pm, N = 152 pm, e H = 152 pm), têm menor diâmetro do que o micro túnel. A substituição de outros íons de cristais de apatita irá alterar as propriedades físicas da própria apatita. O arranjo de cristais de apatita irá reduzir ou minimizar o aparecimento de forças entre os átomos adjacentes. Consequentemente, exigindo uma maior força para separar todos os átomos de cristais arranjados. Indiretamente, isto irá aumentar a densidade do cristal de apatita e torná-lo mais difícil de se quebrar. Na macroscópica o caso é visto como um aumento da dureza da superfície de esmalte.<sup>24</sup>

### 2.3 O Flúor

A medida de maior impacto para o controle do desenvolvimento da cárie tem sido o uso de flúor. Embora seu uso isolado não impeça o desenvolvimento da cárie, apenas reduza a sua progressão, o declínio mundial da manifestação desta doença tem sido atribuído ao uso abrangente de uma ou mais formas de utilização do flúor.<sup>25</sup> O uso do flúor sob a forma de fluoreto tem papel fundamental no controle da cárie dentária e contribuiu para significativa redução na prevalência e na severidade da doença em todo o mundo.<sup>26</sup> Evidências científicas comprovam a eficácia de diferentes métodos de aplicação tópica de flúor na diminuição da incidência e na prevenção da doença cárie.<sup>27</sup>

O flúor pode ser oferecido à população de diversas formas, sendo as mais utilizadas a fluoretação da água de abastecimento e os dentifrícios fluoretados. Entretanto, a exposição ao flúor também pode ocorrer por meio das soluções para bochechos, dos géis para uso tópico e dos materiais de uso odontológico, além de suplementos e dieta, por meio de alimentos e bebidas industrializadas.<sup>26</sup> Murakami e Marcelo,<sup>27</sup> ressaltam que as Indicações com relação à

frequência, à concentração e ao tipo de produto fluoretado a ser utilizado na prática clínica devem ser individualizadas e dependem da idade e da análise de risco e atividade de cárie do paciente.

Estudos sobre flúor aparecem desde meados do século XX, e mantendo-se como tendência na primeira década do século XXI, com os estudos epidemiológicos registrando declínios nas prevalências da cárie dentária, não só nos países industrializados, como também em alguns países em desenvolvimento. Esse fenômeno tem sido atribuído, em grande parte, à utilização de dentifrícios fluoretados, seja através de métodos tópicos, seja por meio da fluoretação das águas de abastecimento público.<sup>28</sup>

Para Ferreira et. al.<sup>28</sup> a fluoretação da água é reconhecida como o método mais efetivo, econômico e abrangente de prevenção da cárie dentária, sobretudo em locais onde a prevalência dessa doença é elevada. A fluoretação da água é recomendada pela Organização Mundial de Saúde a partir da década de 1950, vem sendo realizada no Brasil desde 1953.

### 2.3.1 MECANISMO DE AÇÃO DO FLÚOR

Atualmente, há um consenso de que o flúor importante é aquele mantido constante na cavidade bucal, sendo capaz de interferir com a dinâmica do processo de cárie, reduzindo a quantidade de minerais perdidos durante a desmineralização e ativando a quantidade repostada durante a remineralização salivar.<sup>25</sup>

A causa da perda mineral no processo de cárie é a presença de biofilme dental cariogênico, que produzem ácidos quando exposto a carboidratos fermentáveis (principalmente sacarose), causando a desmineralização dental na interface dente-biofilme. Assim, a presença de biofilme e sua exposição ao açúcar são fatores indispensáveis para o desenvolvimento de cárie e infelizmente o F<sup>-</sup> tem pouco efeito sobre esses dois fatores. Embora ele possa apresentar algum efeito antimicrobiano, diminuindo a produção de ácidos por bactérias, este só foi demonstrado em laboratório, sob exposição a altas concentrações de F<sup>-</sup>, que não ocorrem regularmente na cavidade bucal (mínimo 10 ppm F<sup>-</sup>).<sup>29</sup>

Quando o açúcar é convertido em ácidos pela placa dental, atinge-se pH crítico para a dissolução dos minerais à base de apatita, porém devido à presença de flúor, uma certa quantidade desses minerais é simultaneamente repostada na forma de fluorapatita. Isto ocorre porque em determinado pH, o meio é subsaturante (deficiente) em relação a um tipo de

mineral (HA) que assim dissolve-se, porém sendo supersaturante (excesso) em relação a outro (FA) este forma-se. Em acréscimo, quando o pH retorna ao normal, a saliva naturalmente tenta repor os minerais perdidos pelo dente, sendo esta propriedade remineralizante ativada pela simples presença de flúor no meio (saliva, placa ou fluido do esmalte–dentina). Como resultado do efeito do flúor reduzindo a desmineralização e ativando a remineralização, há uma perda líquida de mineral menor do que se não houvesse flúor presente.<sup>25</sup>

Segundo Cury e Tenuta,<sup>29</sup> a Fluorapatita (FA) é um mineral menos solúvel do que a Hidroxiapatita (HA). Com isso a FA é um mineral que tende a se precipitar mais facilmente do que a HA em meio contendo cálcio e fosfato inorgânico, minerais esses presentes na saliva e placa (biofilme) dental. Assim, havendo F- presente na cavidade bucal, toda perda mineral ocorrendo sob o biofilme dental cariogênico tenderá a ser parcialmente revertida pela precipitação no dente do mineral menos solúvel, a FA. Com isso, a perda mineral líquida é reduzida, uma vez que parte dos minerais perdidos é repostos novamente na estrutura dental. Assim, comum à descrição de que o fluoreto diminui a desmineralização e ativa a remineralização do esmalte e da dentina.

Narvai,<sup>10</sup> destaca que apesar de formar certa quantidade de apatita fluoretada no processo de mineralização, o mecanismo pelo qual o flúor confere maior resistência ao esmalte dentário ocorre na superfície dessa estrutura, ao longo de toda a vida, através de sucessivos episódios de desmineralização e remineralização superficial, desencadeados pela queda de pH decorrentes da produção de ácidos a partir de carboidratos. A presença contínua, ao longo de toda a vida do indivíduo, de pequenas quantidades de flúor no meio bucal é, portanto, indispensável para que o efeito preventivo se manifeste, com a formação de fluoreto de cálcio na etapa de remineralização. Admite-se que essa nova superfície, contendo flúor, é muito menos solúvel em ácidos que a superfície de esmalte original.

Em um novo estudo feito por Cury e Tenuta,<sup>30</sup> sobre os dentifrícios fluoretados descreve que, para ser absorvido o fluoreto precisa estar solúvel e assim enquanto todo o F- do NaF (solubilidade = 5%) é passível de ser absorvido, a do CaF<sub>2</sub> é extremamente limitada porque a solubilidade do fluoreto de cálcio é de apenas 0,0015% (3.000 vezes menor). Assim, nos cremes dentais contendo Ca<sup>++</sup> como abrasivo, parte do F- presente está insolúvel dentro do tubo de dentifrício e assim quando esse creme dental é ingerido nem todo o fluoreto será absorvido, isto é, não está 100% biodisponível. Esse conhecimento de biodisponibilidade de drogas em geral quando ingeridas por via oral é antigo e é válido para cremes dentais. Esses cremes dentais são formulados com MFP/CaCO<sub>3</sub> tendo 1.450 ppm de flúor total, porém aproximadamente 1.000-1.100 ppm de flúor solúvel. Cremes dentais não contendo Ca no

abrasivo são geralmente formuladas com sílica (SiO<sub>2</sub>) e NaF tendo 1.100 ppm de flúor total, do qual todo ele está solúvel. o creme dental com MFP/CaCO<sub>3</sub> apresenta uma concentração de fluoreto total 30% maior (1500 ppm F) do que o com NaF/SiO<sub>2</sub> (1100 ppm F), o risco de toxicidade será igual quando da ingestão. Isso é relevante porque embora o primeiro seja de menor custo, como a concentração total é maior tem havido restrição ao seu uso por crianças.

A diminuição da desmineralização diz respeito à precipitação de minerais na forma de FA quando a HA da estrutura dental está sendo solubilizada pelo baixo pH gerado no biofilme dental exposto a carboidratos fermentáveis. A ativação da remineralização sugere que, quando o pH do biofilme dental volta a subir, ou quando este é removido pela escovação expondo a estrutura dental à capacidade remineralizadora da saliva, a precipitação de mineral nos locais onde ele foi perdido será ativada se houver F<sup>-</sup> presente no meio ambiente bucal. Mais importante do que ter F<sup>-</sup> incorporado na estrutura mineral do dente, é ter fluoreto disponível na cavidade bucal para ser incorporado na estrutura mineral do dente quando o mineral mais solúvel HA está sendo dissolvido como consequência do processo de cárie.<sup>29</sup>

Considerando que para ser absorvido o fluoreto deve estar na forma de íon F<sup>-</sup> (para haver a formação de HF e posterior difusão), a ingestão de flúor na forma de sais de baixa solubilidade, como fluoreto de cálcio, por exemplo, reduz a absorção. Esse princípio pode ser usado no tratamento da intoxicação aguda, pela administração via oral de compostos contendo cálcio ou alumínio, que formam sais de baixa solubilidade com o F<sup>-</sup>, diminuindo sua absorção.<sup>29</sup>

### 2.3.2 TOXICIDADE AO FLÚOR

Apesar dos benefícios dos fluoretos relacionados à prevenção da cárie, não se pode descartar a presença de riscos decorrentes de sua utilização. A exposição a altas quantidades de fluoreto pode causar efeitos adversos, que dependem da quantidade e da frequência de ingestão, ocasionando intoxicação aguda ou intoxicação crônica. O flúor é absorvido principalmente no estômago e, quando há uma única ingestão em altas doses, os sintomas vão desde dores abdominais, náuseas e vômito, até mesmo a morte.<sup>26</sup>

Toxicidade aguda: refere-se à ingestão de grande quantidade de flúor de uma única vez. Dependendo da dose a qual o indivíduo é submetido, as consequências podem ser desde irritação gástrica até morte. Tendo em vista acidentes letais, ocorridos com indivíduos

submetidos a doses que no passado eram consideradas seguramente toleradas, foi estabelecido que em nenhum procedimento odontológico uma pessoa pudesse estar sujeita a uma dose igual ou superior a 5,0 mg F/kg de peso corpóreo – esta dose tem sido chamada de dose provavelmente tóxica (DPT). Assim, tanto os métodos sistêmicos como os tópicos de uso de flúor podem de alguma forma estar envolvidos com a toxicidade aguda.<sup>29</sup>

Toxicidade crônica: A toxicidade crônica devido ao flúor envolve a ingestão de pequenas quantidades diárias podendo afetar tecidos mineralizados, particularmente o osso e o esmalte. Assim, a fluorose óssea era relatada no passado devido à poluição industrial ou ingestão de água contendo flúor natural em concentração acima de 10 ppm. No presente, a fluorose óssea ainda tem sido descrita devido à poluição ambiental. Isto tem sido relatado na China, em decorrência da combustão do carvão para o aquecimento caseiro ou para secar alimentos. Enquanto a fluorose óssea não está diretamente relacionada com o campo da Odontologia, o mesmo não pode ser dito com relação à fluorose dental. Assim, é necessário conhecer melhor os mecanismos de desenvolvimento da fluorose dental e os fatores que contribuem para o aumento do risco, para garantir os benefícios do flúor no controle da cárie, sem preocupações maiores com seu efeito colateral.<sup>25</sup>

Há necessidade de controlar o uso de fluoretos nas diversas formas de apresentação devido à estreita relação entre o controle da cárie e o desenvolvimento da fluorose dentária, para que assim continue sendo possível a redução significativa da prevalência da cárie sem que a fluorose venha a se tornar um problema de saúde pública. Para isso, a dose limite recomendada de ingestão de flúor situa-se entre 0,05 e 0,07 mg F/Kg peso corporal/dia.<sup>26</sup> A dose provavelmente tóxica que pode causar uma intoxicação aguda por ingestão de flúor é de 5 mg de F-/kg de peso. Os sintomas deste tipo de intoxicação são: náusea, dor gástrica, suor, hipersalivação, diarreia, dor de cabeça, fraqueza generalizada e, em casos severos, a parada cardiorrespiratória. Com relação à intoxicação crônica, o limite diário a partir do qual o paciente apresenta risco de desenvolver fluorose dental é de 0,7 mg de F-/g/dia.<sup>27</sup>

Segundo Cury,<sup>25</sup> paralelamente ao declínio de cárie há relatos de aumento de fluorose dental. Quando há mais de 20 anos foi mostrado pela primeira vez que dentifrício fluoretado era fator de risco de fluorose, os autores foram enfáticos ao concluírem que, apesar disso “fluorose dental não era preocupação de saúde pública na cidade onde o trabalho foi realizado”. De lá para cá, a avaliação dessa associação não tem sido aprofundada nas dezenas de publicações feitas no mundo inteiro sobre dose de ingestão de fluoreto por crianças e potencial risco de fluorose com base na espúria dose limite de 0,07 mg F/dia/kg de peso, a partir da qual a fluorose seria esteticamente inaceitável.

Dentifrício fluoretado tem sido considerado responsável pelo declínio de carie dentária ocorrido tanto em países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento, como o Brasil.<sup>30</sup>

Uma vez que os estudos sobre a toxicidade do uso tópico de fluoretos ainda são escassos e inconclusivos, as revisões sistemáticas que abordam o assunto recomendam cuidado na indicação do uso concomitante de diversas fontes de fluoretos em crianças de pouca idade.<sup>27</sup> Assim, é fundamental uma exposição apropriada que garanta os benefícios do flúor no controle da cárie sem maiores preocupações com efeitos colaterais.<sup>25</sup>

### 3 MÉTODO

O delineamento experimental constitui-se em determinações da concentração inibitória mínima e concentração microbicida mínima de atividades antimicrobiana da teobromina, frente aos micro-organismos comumente presentes no processo da formação e evolução da cárie. Também realizado avaliação da citotoxicidade da teobromina, realizado por meio do teste colorimétrico MTT, que analisou a atividade mitocondrial celular.

A saliva artificial utilizada neste estudo foi manipulada na farmácia Byoformula®, sendo a sua composição química descrita: CMC 10,0 g/l Sorbitol líquido 42,74 g/l, Cloreto de potássio 0,620 g/l, Cloreto de sódio 0,850 g/l, Cloreto de magnésio 0,05 g/l, Cloreto de cálcio 0,166, g/l, Benzoato de Sódio 1,0 g/l, Fosfato 0,8035 g/l, Fosfato de Potássio Monobásico 0,326 g/l Água destilada 940,82 ml, pH ajustado para 7,2 usando KOH.

A solução salina de Cloreto de Sódio (NaCl) 0,9% foi preparada e esterilizada.

A teobromina à 99% utilizada no experimento foi adquirida da empresa Alfa Aesar, de fórmula química  $C_7H_8N_4O_2$ , massa molar 180,17g/mol, (pf: 345-350°C, densidade:1,50g/ml, CAS: 83-67-0).

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

#### 3.1 Determinações da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos foi realizada sobre cepas de referência (ATCC - *American Type Culture Collection*) de *C. albicans* (ATCC 18804) e *S. mutans* (ATCC 35688).

Para a determinação das concentrações inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM) dos extratos foi utilizado o método de microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), normas M7-A6 (CLSI, 2003) e M27-A21 (CLSI, 2002). Primeiramente, a bactéria foi cultivada em ágar Brain Heart Infusion (BHI – Himedia, Mumbai, Índia) e *C. albicans* em ágar Sabouraud dextrose (SD – Himedia) por 24

h a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> para *S. mutans*. Em seguida, suspensões microbianas foram preparadas em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e padronizados pela escala de Mac Farland em 10<sup>6</sup> células.

O meio de cultura utilizado para crescimento para *S. mutans* foi o caldo Mueller Hinton (Himedia) e para *C. albicans* foi utilizado caldo RPMI 1640 (Himedia) com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol, tamponado a pH 7,0 ± 0,1 com MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). As microdiluições da teobromina foram realizadas em placas de 96 poços (TPP, Trasadingen, Switzerland), onde foram adicionados 100 µL de meio de cultura em 10 poços e 100 µL da solução mãe (100mg/mL) apenas no primeiro poço de onde foi iniciada uma série de diluições (1:2) até a décima diluição. Em seguida, foram adicionados em todos os poços 100 µL da suspensão microbiana padronizada. Com isso, os inóculos alcançaram aproximadamente as concentrações de 5 x 10<sup>5</sup> UFC/mL, para as bactérias, e de 5 x 10<sup>2</sup> a 2,5 x 10<sup>3</sup> UFC/mL, para *C. albicans*. Poços de controle de crescimento (C-), meio mais inóculo, e do meio (C+), sem inóculo, foram adicionados. Após incubação de 24 h, a CIM foi determinada no último poço da microplaca na diluição que, não foi observada turvação. Para determinação da CMM, 100 µL da CIM e de poços anteriores a ela foram semeados em ágar BHI ou SB. Após 48 h de incubação, ela foi determinada na menor concentração onde não houver crescimento microbiano.

### **3.2 Avaliação da citotoxicidade**

A avaliação da citotoxicidade da teobromina foi realizada por meio do teste colorimétrico MTT, que analisou a atividade mitocondrial celular após contato de 5 min com as culturas de macrófagos de camundongo (RAW 264.7).

A cultura de macrófagos de camundongos (RAW 264.7), provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro - Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM – RJ), será cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York, EUA) e mantidas em frascos de cultivo celular (TPP, Suíça), incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica, com 5% de CO<sub>2</sub>.

O meio de cultura foi trocado a cada 48 h e quando foi observado estado de subconfluência das células, caracterizado pela ocupação de mais de 70% do frasco, as células foram utilizadas nos testes. A monocamada de células foi desagregada do assoalho do frasco de cultura com auxílio de um varredor celular, as células suspensas foram centrifugadas por 5 min a 3000 rpm. Foi aplicado o teste de exclusão com pelo azul de Trypan, para ser quantificado o número de células viáveis.

### 3.2.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE COM MTT

Foi realizada análise da atividade mitocondrial das células viáveis pelo método de redução do brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl) 2,5-difeniltetrazólio (MTT) em formazina. A solução de MTT foi preparada a partir da suspensão de 0,5 mg do pó de MTT (Sigma Aldrich Co., Alemanha) em 1 mL de *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Cultilab, Brasil) estéril.

Em microplacas (Nunc, Dinamarca), foram adicionados 200 µL de meio DMEM + 10% SFB contendo  $2 \times 10^4$  células viáveis. Estas placas foram incubadas (37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>) por 24 horas para que ocorra aderência celular nos poços da microplaca. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e acrescentado 200 µL/poço da solução de teobromina nas maiores concentrações. Foram utilizados poços-controles, contendo apenas células com meio de cultura. O período de incubação foi de 24 horas e o teste feito em triplicata. Após, o material foi descartado, e os poços foram lavados com PBS para descartar as células mortas. Em seguida, para verificação da viabilidade da cultura, foram adicionados 100 µL/poço da solução de MTT. As placas foram incubadas novamente (37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>) por período de 1h, abrigadas da luz. Posteriormente, esta solução foi descartada e adicionados 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) para expor os cristais de formazina produzidos, após absorção do sal de MTT, por células viáveis. Após incubação de 10 minutos e agitação em *shaker*, por igual período, a absorbância dos poços foram lidas em leitora de microplacas com comprimento de onda de 570 nm. As densidades ópticas (DO) obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade celular empregando-se a seguinte fórmula: % Viabilidade = (DO Grupo Tratado x 100) / Média DO Grupo Controle.

### **3.3 Análise estatística**

Os dados da citotoxicidade foram analisados estatisticamente pelo método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4 RESULTADOS

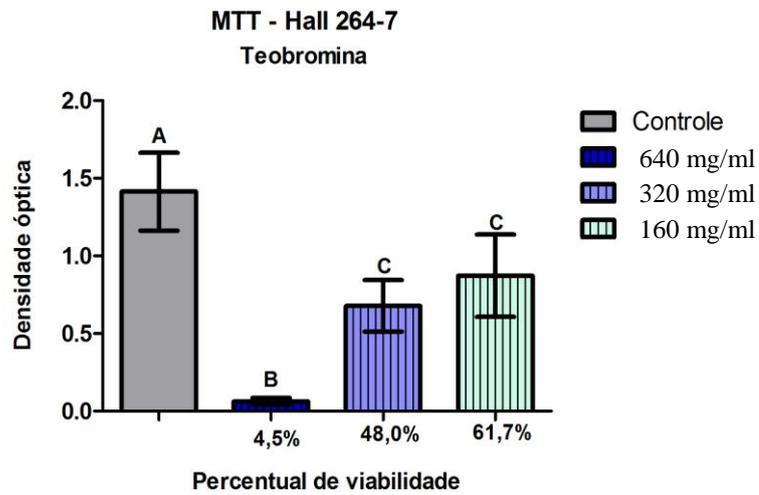
Foram realizados os testes para cada espécie a fim de estabelecer a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento microbiano planctônico (CIM) ou matar cada micro-organismo (CMM). De acordo com os resultados obtidos, foi possível perceber que a Teobromina só teve efeito bacteriostático para *S. mutans* na concentração CIM = 12,5 mg/mL em ambos os diluentes testados. O extrato de teobromina não apresentou efeito microbicida (Tabela 1).

Tabela 1- Determinação das concentrações inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM)

<b>Extrato de Teobromina (NaCl 0,9%) 100mg/mL</b>		
<b>Micro-organismos</b>	<b>CIM (mg/mL)</b>	<b>CMM (mg/mL)</b>
<i>Candida albicans</i>	ausente	Ausente
<i>Streptococcus mutans</i>	12,5	Ausente
<b>Extrato de Teobromina (Saliva) 100 mg/mL</b>		
<b>Micro-organismos</b>	<b>CIM (mg/mL)</b>	<b>CMM (mg/mL)</b>
<i>Candida albicans</i>	ausente	Ausente
<i>Streptococcus mutans</i>	12,5	Ausente

Fonte- O autor

A teobromina não apresentou efeito citotóxico a partir da concentração de 320 mg/mL em solução salina. Não foi testado a teobromina diluída em saliva artificial.



Fonte: O autor

Figura 1- Avaliação da viabilidade celular de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) tratado com a Teobromina por 5 minutos nas diferentes concentrações.

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi utilizado o extrato de Teobromina no método de microdiluição em caldo, para evidenciar a CIM e CMM em relação aos micro-organismos *Candida albicans*, e *Streptococcus mutans*. A Teobromina apresentou atividade antimicrobiana somente para *Streptococcus mutans*, determinando uma inibição do micro-organismo na concentração de 12,5 mg/ml. Torres et al.<sup>12</sup> e Kargula et al.<sup>22</sup> em seus estudos *in vitro* também evidenciaram que, o extrato de cacau foi capaz de inibir a enzima glicosil transferase, responsável pela formação de polissacarídeos extracelulares em cepas de *S. sanguis*, *S. mutans*, *A. viscosus* e *A. naeslundii*. Os mesmos relatam que, a ingestão de alimentos contendo cacau poderia representar um componente da dieta capaz de modular a produção de polissacarídeos extracelulares, que é também confirmado por Kargula<sup>22</sup> relatando em seu estudo que, a teobromina contém alguns polifenóis que exibem atividade anti-glucosiltransferase, tornando-a assim uma substância com capacidade anticárie pelos seus efeitos benéficos.

Quanto ao flúor, Cury e Tenuta<sup>29</sup> demonstram que quanto aos efeitos antimicrobianos o flúor age diminuindo a produção de ácidos por bactérias, porém afirma que isto só foi demonstrado em laboratório, sob exposição a altas concentrações de F-, que não ocorrem regularmente na cavidade bucal (mínimo 10 ppm F-).

Kargula et al.<sup>22</sup> confirma que a sacarose dependente na aderência celular do *Streptococcus mutans*, foi significativamente deprimido com extrato de cacau, porém não de forma significativa. O resultado do experimento mostrou que, apesar do extrato de cacau conter certo potencial anticárie, não foi suficiente para reduzir significativamente a ação cariogênica da sacarose. O extrato foi examinado em relação à atividade cariostática em experimentos *in vitro*, reduzindo o crescimento da taxa de *mutans*, na síntese de glicano insolúvel por glicosiltransferase na indução do patógeno-livre específico. Os resultados indicaram então que o extrato de cacau possuía potencial anticariogênico, mas estes efeitos anticariogênico em si não são suficientes para inibir a cárie.

Substâncias anticariogênicas, sobretudo produtos químicos, agentes biológicos e substâncias naturais, antiplaca e anticárie na restrição *in vivo* da formação do biofilme e dá cárie, agem principalmente sobre a formação dos polissacarídeos extracelulares. O ácido tânico, encontrado em vários tipos de chás e bebidas como o café é estudado como um importante inibidor de crescimento bacteriano e da ação da enzima glicosil-transferase, capaz também de formar um complexo estável com proteínas ricas em prolinas presentes na boca, as

quais estão diretamente envolvidas com a adsorção de bactérias bucais à película adquirida. Essa capacidade de unir as proteínas pode interferir com os receptores da superfície celular dos micro-organismos envolvidos na adesão bacteriana. Relata ainda em seu artigo que, em pesquisas realizadas, o flúor e o ácido tânico, presentes em algumas variedades de chá afetaram o crescimento, aderência e a produção de polissacarídeos extracelulares por *S. mutans*. Experimentos em laboratório demonstraram que extratos de cacau, chá e café inibiram a enzima glicosiltransferase de vários estreptococos orais, sendo que, os extratos de cacau e de café, não perderam essa habilidade mesmo após a retirada do ácido tânico presente em seus extratos.<sup>23</sup>

O fato do extrato de teobromina ter apresentado a ação inibitória do *Streptococcus mutans* é muito importante, pois este micro-organismo está descrito dentre os principais agentes etiológicos da cárie. Portanto, uma ação bacteriostática do principal micro-organismo responsável pela formação de polissacarídeos extracelulares, cujo, a teobromina demonstrou ser eficaz, torna-se uma medida de modulação do processo da cárie e uma ação anticárie.

Em relação aos efeitos do extrato, Syafira et al.<sup>21</sup> relata em seu estudo que, dificilmente teobromina tem o efeito toxico. Nakamoto et al.<sup>19</sup> afirma após revisão critica da literatura da toxicologia de metilxantinas que, o cacau em si não tem efeitos adversos notificados que seriam prejudiciais ao homem, pois a meia vida da teobromina no plasma de seres humanos é de cerca de seis horas. Assim, para atingir um nível tóxico de teobromina em um humano de 65kg, seria necessário ingerir cerca de 86 barras de chocolates ao leite, sabendo que a teobromina esta presente no cacau numa concentração de cerca de 1,89%.

No presente estudo, a Teobromina não apresentou citotoxicidade a partir da concentração de 320 mg/ml. Evidenciou-se que a concentração 12,5 mg/ml apresentou um efeito bacteriostático para *S. Mutans*, portanto a substância poderia ser utilizada de maneira tópica frente a concentração utilizada.

## 6 CONCLUSÃO

Concluimos nesta pesquisa frente ao resultado obtido que, o extrato de teobromina apresentou uma ação inibitória de *Streptococcus mutans* em ambos os diluentes testados, na concentração de 12,5 mg/ml. Também foi observado que a teobromina não apresentou efeito citotóxico a partir da concentração de 320 mg/ml.

Com vários estudos citados referindo os benefícios do uso da teobromina, sugerimos ainda que novas pesquisas sejam realizadas, para que se desvendem os totais benefícios do extrato de cacau em relação à prevenção e promoção da saúde bucal na área odontológica.

## REFERÊNCIAS

- 1 Zanin L, Pardi V, Pereira AC. Métodos de utilização de flúor tópico. In: Pereira AC e Colaboradores. Odontologia em saúde coletiva: Planejando ações e promovendo saúde. Porto Alegre; Artmed; 2003.275-86.
- 2 Pitoni CM. Efeitos de fluoretos na remineralização de lesões dentinárias: Estudo *in situ*. Tese (Doutorado em odontologia). Florianópolis:Universidade federal de Santa Catarina, Área de concentração odontopediatria; 2007.
- 3 Donassolo TA, Romano AR, Demarco FF, Delala-Bona A. Avaliação da microdureza superficial do esmalte e da dentina de dentes bovinos e humanos (permanentes e decíduos). Rev Odonto Ciências. 2007 Out./Dez. 22(58):311-16.
- 4 Amaechi BT, Porteous NB, Ramalingam K, Mensinkai P, Ccahuana Vasquez RA, Sadeghpour A. et. al. Remineralization of artificial enamel lesions by theobromine Carie Res. 2013;(4):399-405.
- 5 Verma A, Khurshid S, Parveen F, Khanna S, Pandey P. Remineralization: An approach towards conservation of tooth. Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences. 2015 Jul. 4(61):10713-19.
- 6 Leites ACBR, Pinto MB, Souza ERS. Aspectos microbiológicos da cárie dental. Salusvita, Bauru. 2006; 25(2):239-52.
- 7 Mameluque S. Tratamento preventivo do esmalte dental exposto à situação de alto desafio cariogênico: estudo *in vitro*. Tese (Doutorado em Odontologia). Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo (USP), Área de concentração: Odontologia Restauradora – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2014.
- 8 Marinho VA, Pereira GM. Cárie: Diagnóstico e plano de tratamento. R. Un. Alfenas. Alfenas. 1998;(4):27-37.
- 9 Burnett GW, Scherp HW, Schuster G.S. Microbiologia oral e doenças infecciosas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1978.

- 10 Narvai PC. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX, Departamento de Prática de Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Ciência & Saúde Coletiva, 2000;5(2):381-92.
- 11 Jardim JJ, Maltz M. O papel do flúor no processo de formação e controle da lesão de cárie. Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre, 2005 Jul.46(1):64-9.
- 12 Torres CRG, Kubo CH, Anido AA, Rodrigues JR. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos, 2000 Jul./Dez. 3 (2).
- 13 Brighenti FL, Medeiros AC, Matos BM, Ribeiro ZA, Koga-Ito CY. Evaluation of caries-associated virulence of biofilms from *Candida albicans* isolated from saliva of pediatric patients with sickle-cell anemia. J Appl Oral Sci. 2014;22(6):484-9.
- 14 Vasconcelos LCS, Sampaio FC, Sampaio MCC, Pereira MSV, Higino JS, Peixoto MHP. Minimum Inhibitory Concentration of Adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) Gel Against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. Braz Dent J. 2006;17(3):223-27.
- 15 Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DMP. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. Archives of Oral Biology. 2006;(51):1024-28.
- 16 Nogueira LP. Avaliação do efeito da ingestão do chocolate-cacau 70% sobre a pressão arterial, biomarcadores circulantes da função endotelial, metabolismo glicídico e lipídico em hipertensos primários estágio 1. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental). Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas; 2009.
- 17 Salva TJG. Relação entre os teores de teobromina e cafeína em grãos de café oriundos de cruzamentos entre cafeeiros mutantes ac e cultivares elites. IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Curitiba, Jun. 2015.
- 18 Ferreira AS. Validação da determinação de teobromina em amostras de cacau e seus derivados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Dissertação (Mestrado em tecnologia e segurança alimentar). Lisboa: Universidade nova de Lisboa, Faculdade de ciências e tecnologia; 2013.
- 19 Nakamoto T, Simmons WB Jr, Falster AU. forming systems: Methods and products. United States patent US 6183711. 2001 Feb. 06.

20 Landucci LF, Oliveira LD, Brandão EHS, Koga-ito CY, Jardim EG, Jorge AOC. Efeitos de *coffea arabica* sobre a aderência de *Streptococcus mutans* à superfície de vidro. Cienc. Odontol. Bras. 2003 Jul./Set.6(3):58-64.

21 Syafira G, Permatasari R, Wardani N. Theobromine Effects on Enamel Surface Microhardness: In Vitro. Journal of Dentistry Indonesia, 2012;19(2):32-6.

22 Kargula B, Ozcan M, Pekera S, Nakamoto T, Simmons WB, Falster AU. Evaluation of Human Enamel Surfaces Treated with Theobromine: A Pilot Study. Oral Health Prev Dent, 2012 Nov.10(3):275-82.

23 Landucci LF, Oliveira LD, Brandão EHS, Koga-Ito CY, Jardim Júnior EG, Jorge AOC. Efeitos de *Coffea arabica* sobre a aderência de *Streptococcus mutans* à superfície de Vidro: Effects of *Coffea arabica* on *Streptococcus mutans* adherence to glass surfaces. Cienc Odontol Bras, 2003 Jul./Set.6(3):58-64.

24 Nasution AI, Zawil C. The comparison of enamel hardness between fluoride and theobromine application. Int J Contemp Dent Med Rev, 2014.

25 Cury JA. Uso do flúor e controle da cárie como doença. 2002. Disponível em: [http://w2.fop.unicamp.br/dcf/bioquimica/downloads/mat\\_consulta4-usofluorcontrolecarie.pdf](http://w2.fop.unicamp.br/dcf/bioquimica/downloads/mat_consulta4-usofluorcontrolecarie.pdf).

26 Leal SD, Carvalho FS, Carvalho CAP. Conhecimento de alunos do curso de odontologia sobre o uso racional do flúor. Rev Odontol UNESP. 2015 Jan./Fev.44(1):51-8.

27 Murakami C, Marcelo B. Utilização de fluoretos na clínica odontopediátrica contemporânea. Revista FGMNews. 2010 Jan.(12):33-6.

28 Ferreira RGLA, Marques RA, Menezes LM, Narvai PC. Múltiplos aspectos do uso do flúor em saúde pública na visão de lideranças da área de saúde. Ciência & Saúde Coletiva.2013;18(7):2139-46

29 Cury JA, Tenuta LMA. Evidências para o uso de fluoretos em odontologia. Odontologia Baseada em Evidências. Por que usar fluoreto em Odontologia e seu mecanismo de ação anticárie. 2010 Jan.2(4):5-7.

30 Cury JÁ, Tenuta LMA. Riscos do uso do dentifrício fluoretado na prevenção e controle de cárie na primeira infância. Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre, 2012 Set./Dez.53(3):21-7.

Autorizo cópia total ou parcial desta obra, apenas para fins de estudo e pesquisa, sendo expressamente vedado qualquer tipo de reprodução para fins comerciais sem prévia autorização específica do autor. Autorizo também a divulgação do arquivo no formato PDF no banco de monografias da Biblioteca institucional.

Rafael Moreira Gonçalves

Camila Rafaela Charleaux Gomes de Gouvêa  
Pindamonhangaba, dezembro de 2016.