

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Centro de Ciência da Saúde

Faculdade de Odontologia

**ATIVIDADE ANTICARIOGÊNICA DE EXTRATOS E
COMPOSTOS QUÍMICOS DO CAFÉ**

Andréa Gonçalves Antonio

Rio de Janeiro

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Centro de Ciência da Saúde

Faculdade de Odontologia

Andréa Gonçalves Antonio

ATIVIDADE ANTICARIOGÊNICA DE EXTRATOS E COMPOSTOS QUÍMICOS DO CAFÉ

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (Área de Concentração: Odontopediatria) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia (Área de Concentração: Odontopediatria).

Orientadores:

Prof.^a Dra.^a Lucianne Cople Maia

Prof.^a Adjunta da Disciplina de Odontopediatria da FO/UFRJ

Prof.^a Dra.^a Adriana Farah

Prof.^a Adjunta do Instituto de Nutrição Josué de Castro/UFRJ

Prof.^a do Programa de Pós-graduação do Instituto de Química/UFRJ

Rio de Janeiro

2010

Antonio, Andréa Gonçalves.

Atividade anticariogênica de extratos e compostos químicos do café /
Andréa Gonçalves Antonio. – Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Odontologia,
2010.

xxii, 102 f.: il.; 31 cm.

Orientadores: Lucianne Cople Maia e Adriana Farah

Tese (doutorado) -- UFRJ, Faculdade de Odontologia, Programa de
Pós-graduação em Odontologia, 2010.

Referências bibliográficas: f. 88-97

1. Streptococcus mutans – efeitos de drogas. 2. Streptococcus sobrinus –
efeitos de drogas. 3. Placa Dentária – prevenção e controle. 4. Cárie Dentária
– prevenção e controle. 5. Café – química. 6. Testes de Dureza. 7.
Concentração de Íons de Hidrogênio. 8. Dente Decíduo - microbiologia. 9.
Agentes Antibacterianos. 10. Odontopediatria – Tese. I. Maia, Lucianne
Cople. II. Farah, Adriana. III Universidade Federal do Rio de Janeiro, FO,
Programa de Pós-graduação em Odontologia, Odontopediatria. IV.
Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANDREA GONÇALVES ANTONIO

“ATIVIDADE ANTICARIOGÊNICA DE EXTRATOS E COMPOSTOS QUÍMICOS DO CAFÉ”

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia(Odontopediatria), Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Odontologia(Odontopediatria).

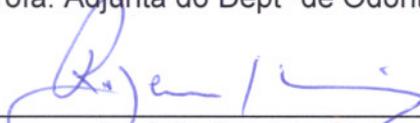
Rio de Janeiro, 24 / 06 / 2010.



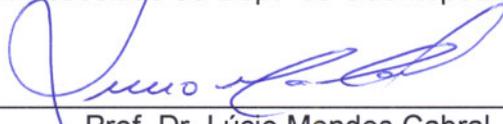
Prof. Dra Ivete Pomarico Ribeiro de Souza
DO-Prof. Titular do Dept^o de Odontopediatria e Ortodontia-FO-UFRJ



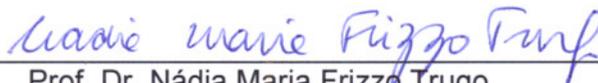
Prof. Dra Lucianne Cople Maia de Faria
DO-Prof. Adjunta do Dept^o de Odontopediatria e Ortodontia-FO-UFRJ



Prof. Dr Rogério Gleiser
DO-Prof. Associado do Dept^o de Odontopediatria e Ortodontia-FO-UFRJ



Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral
DO-Prof. Associado do Dept^o de Medicamentos-Fac. de Farmácia-UFRJ



Prof. Dr. Nádia Maria Frizzo Trugo
DO-Prof. Adjunta do Dept^o de Bioquímica-Instit. de Química-UFRJ

DEDICO

*Aos meus filhos **Pedro e Eduardo** por me impulsionarem a buscar vida nova a cada dia. Dois grandes presentes de Deus que fazem brilhar os meus olhos e minha vida ter razão. Apesar de “água e vinho”, ambos são admiráveis em essência. Obrigada por terem aceito se privar da minha companhia devido aos meus estudos, concedendo a mim a oportunidade de me realizar ainda mais.*

*Ao meu marido **Elias** que soube, com tamanha compreensão, dividir os momentos ao meu lado com todas as tarefas do Doutorado ao longo dos últimos anos. Obrigada pelo seu amor, carinho e companheirismo. Você e nossos filhos são tudo para mim!*

“O Amor...
É difícil para os indecisos.
É assustador para os medrosos.
Avassalador para os apaixonados!
Mas, os vencedores no amor são os fortes.
Os que sabem o que querem e querem o que têm!
Sonhar um sonho a dois, e nunca desistir da
busca de ser feliz, é para poucos!”
Cecília Meireles

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por estar sempre ao meu lado, me dando forças e iluminando o meu caminho para tomar decisões e seguir em frente nos momentos certos.

“Todas as coisas têm o seu tempo, e todas elas passam debaixo do céu segundo o tempo que a cada um foi prescrito.” (Eclesiastes, 3:1)

À minha querida mãe, **Solange**, e ao meu querido pai, **Atilano**, pelo amor, educação e, sobretudo, dedicação aos filhos. Nunca chegaria até aqui se não fosse pela ajuda e apoio que recebi de vocês ao longo da minha vida. Obrigada! Amo vocês!

“A maior sabedoria que existe é a de conhecer-se alguém a si próprio.” (Galileu Galilei)

Aos meus irmãos, **Alexandre** e **Atilano**, pelo carinho, cuidado e atenção, sempre me incentivando.

“As palavras de amizade e conforto podem ser curtas e sucintas, mas o seu eco é infindável.” (Madre Tereza de Calcutá)

À **Prof^a Dr^a Lucianne Cople Maia** por ter me concedido a oportunidade de ser sua orientanda. Você é um exemplo de professora! Gostaria que soubesse o quanto te admiro pela sua incansável dedicação aos alunos e pelo seu trabalho. Foi um privilégio estar ao seu lado nestes últimos anos, tanto nos momentos de alegria e conquistas como também nas derrotas. Aprendi muito e serei eternamente grata! Tenha certeza de que sempre você será a minha referência, a pessoa em quem tentarei me espelhar para o desenvolvimento de

qualquer projeto de pesquisa. Hoje, mais do que orientadora, você é uma amiga! Obrigada pela confiança!

À **Prof^a Dr^a Adriana Farah** pela atenção, carinho e todos os ensinamentos valiosos que recebi ao longo destes anos. Obrigada por ter confiado em mim para o desenvolvimento deste trabalho. Ter alguém de tamanha competência norteando este estudo foi motivo de grande orgulho!

À **Prof^a Dr^a Kátia Regina Netto dos Santos**. Todas as palavras que estão escritas neste pequeno parágrafo são poucas para agradecer a você. Obrigada por ter me recebido em seu laboratório de maneira tão acolhedora e, principalmente, por ter despertado em mim um grande interesse na área da Microbiologia. Agradeço toda dedicação e orientação, de maneira tão criteriosa, para a finalização deste trabalho. Você foi mais do que uma colaboradora, foi de fato uma orientadora!

À **Prof^a Dr^a Ivete Pomarico Ribeiro de Souza** por ter me aprovado para o programa de Pós-graduação em Odontopediatria e por todos os ensinamentos transmitidos ao longo do curso. Sua sabedoria e determinação são motivos da grande admiração que tenho pela senhora! Muito obrigada por tudo!

Ao **Prof. Dr. Rogério Gleiser** pelo apoio e valiosa colaboração para a elaboração da parte escrita deste trabalho. Expresso aqui minha admiração pelos seus conhecimentos!

Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria (FO/UFRJ)**, **Dr^a. Laura Primo**, **Dr^a. Glória Castro** e **Dr. Marcelo Costa** exemplos de profissionalismo e dedicação. Muito obrigada pelo incentivo e ensinamentos transmitidos durante o Curso de Doutorado.

Ao **Prof. Ronir Raggio** pela valiosa ajuda com o tratamento estatístico dos dados do presente estudo.

Ao **Prof. Dr. Thomaz Chianca** pela colaboração com a análise de alguns resultados do presente estudo.

À amiga **Nátalia Iorio Lopes Pontes**. Você é uma pessoa especial! Obrigada pelo companheirismo, cuidado comigo e empenho nos nossos experimentos. Grande parte do que aprendi sobre Microbiologia devo a você. Nunca irei esquecer os dias que ficamos até tarde no laboratório. Em alguns obtivemos sucesso, em outros tivemos que recomeçar, mas sempre com muito entusiasmo e dedicação. Juntas, formamos uma grande dupla!

À amiga **Renata Moraes Lira** por ter me apresentado à professora Kátia Regina Netto dos Santos, dando início a este trabalho, e pela sua inestimável ajuda com os primeiros ensaios microbiológicos. Rê, você mora no meu coração!

À amiga **Viviane Santos da Silva Pierro**. Companheira de todos os momentos. Juntas, lutamos, sofremos, demos boas risadas e, principalmente,

trabalhamos muito! Gostaria aqui de expressar o quanto te admiro, pela pessoa maravilhosa e pela profissional extremamente competente que é. Obrigada pelo carinho, incentivo e ajuda!

Às alunas de iniciação científica, **Paola Selmi, Raisa Malafaia, Mariana Ferreira** e, em especial, à **Monique Candreva** por toda colaboração e apoio durante os procedimentos que foram realizados no Departamento de Odontopediatria (FO/UFRJ).

À amiga **Carla Martins**. Obrigada pelo companheirismo e apoio durante os ensaios do nosso futuro trabalho. Tenha certeza de que ele será o próximo!

Aos colegas do **Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos**, pela ajuda em mostrar todo o funcionamento do laboratório, incentivo e interesse pelo meu estudo. Em especial à **Viviane Marques**, ao **Daniel Perrone** e à **Luciana Costa** pelo auxílio com algumas análises químicas das minhas amostras. Sou muito grata a todos vocês!

Aos colegas do **Laboratório de Infecção Hospitalar do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes**. Serei eternamente grata pelo acolhimento, respeito, ajuda e paciência para a realização deste trabalho. Todos vocês são pessoas mais que especiais! Muito obrigada.

Ao **João Carlos Monteiro**, funcionário do Departamento de Odontopediatria (FO/UFRJ), pelos lindos desenhos deste trabalho. Mesmo diante dos meus

pedidos mais difíceis, você sempre esteve com um sorriso no rosto e com extrema boa vontade em realizar. Obrigada pela sua paciência e competência!

À colega de Doutorado **Tatiana Kelly** pela ajuda em momentos importantes desta pesquisa. Sempre doce e disposta a colaborar, a você agradeço imensamente.

Aos colegas de Doutorado, **Ana Karla**, minha companheira de turma, **Cristiana, Lívia, Márcia, Patrícia, Rafael, Raquel, Valéria e Viviane Câncio** pelas palavras de incentivo e pelas contribuições nos seminários. Obrigada a todos pela agradável convivência.

Aos funcionários do Departamento de Odontopediatria (FO/UFRJ), **Andréa, Mere, Kátia, Luíza, Zezé, Robson, Isabel, Rose, Sr. Jorge** e, em especial, à **Gina** pela colaboração com os cafezinhos que fizemos. Meus agradecimentos por todos os sorrisos e apoio que recebi durante o curso.

À **FAPERJ** pela ajuda financeira através da bolsa de Doutorado e incentivo ao ensino e à pesquisa.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento!

*É um cientista bem
mediocre aquele que pretende
poder passar sem fé e sem
Deus!*

Werner Von Braun

RESUMO

ANTONIO, Andréa Gonçalves. **Atividade anticariogênica de extratos e compostos químicos do café**. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Avaliou-se a atividade anticariogênica de extratos e compostos químicos do café, através de dois estudos laboratoriais. No primeiro, foram testados grãos integrais e descafeinados das espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, em diferentes graus de torrefação (6, 7, 8, 13 e 15 minutos), totalizando 36 extratos. Os extratos e 6 constituintes químicos presentes em ambas as espécies (ácido clorogênico – 5-CQA; ácido caféico, trigonelina, cafeína, ácido nicotínico e ácido ferúlico) foram submetidos a ensaios de susceptibilidade microbiológica. Assim, pode-se identificar a concentração mínima destas substâncias necessária para inibição do crescimento (CMI) de *Streptococcus mutans* (SM). Em acréscimo, avaliou-se a capacidade dos extratos e compostos de inibir a formação do biofilme de cepas de SM e/ou reduzi-lo. Todos os extratos de café foram caracterizados quimicamente através de cromatografia líquida de alta eficiência e medições do pH. Os extratos integrais com tempo de torrefação entre 6 e 8 minutos (torra clara à média clara), assim como os descafeinados com tempo de torra de 6 e 7 minutos, apresentaram o mesmo valor de CMI (5 mg/mL). Trigonelina, 5-CQA e ácido caféico demonstraram uma CMI de 0,8 mg/mL. O extrato de *C. canephora* com 6 minutos de torra e de qualidade superior dos grãos obteve os melhores resultados na inibição da formação do biofilme de SM (39,6%) e reduziu em 6,6% o biofilme já formado, sendo, por isso, selecionado para o segundo estudo. Experimentos foram realizados a fim de identificar a atividade antibacteriana do extrato selecionado diante do SM e do *Streptococcus sobrinus* (SS). A viabilidade das células planctônicas de SM e SS frente a diferentes concentrações do extrato foi analisada através de testes de suscetibilidade para verificar: a CMI, a concentração mínima bactericida (CBM) e a curva de morte das bactérias. O efeito do extrato sobre a desmineralização dentária foi investigado após a sua aplicação sobre o biofilme misto formado em fragmentos de 1^{os} molares decíduos (n = 24). O biofilme foi tratado com: extrato de *C. canephora* a 20%; água Milli-Q (controle negativo) e clorexidina (controle positivo), uma vez ao dia, por uma semana. Seis fragmentos não receberam nenhum tipo de tratamento (controle branco). O pH do biofilme foi monitorado após o último dia do ensaio. A dureza transversal (DT) do esmalte foi determinada como indicador de desmineralização. O extrato de *C. canephora* apresentou CMI = 7 ± 2 mg/mL e CBM = 160 ± 0 mg/mL diante do SM, sem exercer ação antibacteriana contra o SS. O extrato a 20% e também na concentração equivalente ao MBC promoveu uma redução de colônias de SM após 3 horas de tratamento ($p < 0,05$). O pH do biofilme ($\sim 4,8$) não diferiu ($p > 0,05$) entre o extrato de café e os controles negativo e branco. O mesmo extrato reduziu a desmineralização do esmalte até 30 μ m, a partir da sua superfície ($p < 0,05$). Concluiu-se que o 5-CQA, o ácido caféico e a trigonelina, bem como extratos de torra clara do café, principalmente da espécie *Coffea canephora*, são substâncias com ação anticariogênica.

Palavras chave: Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus, placa dentária, cárie dentária, dente decíduo, testes de dureza, concentração de íons de hidrogênio, microbiologia, café.

ABSTRACT

ANTONIO, Andréa Gonçalves. **Anticariogenic activity of coffee extracts and coffee chemical compounds**. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

The anticariogenic activity of coffee extracts and coffee chemical compounds was evaluated by means of two laboratory experiments. In the first one, variations of whole and decaffeinated beans of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* were tested at different levels of roasting (6, 7, 8, 13 and 15 minutes), totaling 36 extracts. These samples and 6 chemical constituents present in both species (chlorogenic acid - 5-CQA, caffeic acid, trigonelline, caffeine, nicotinic acid and ferulic acid) were submitted to microbiological susceptibility tests by agar dilution method. Thus, the minimum concentration (MIC) of these substances necessary for growth inhibition of *Streptococcus mutans* (SM) was evaluated. Additionally, the ability of the extracts and the compounds to inhibit the biofilm formation of SM and/or to reduce it were assessed. It was conducted through the microdilution method in which the biofilm was quantified. All coffee extracts were chemically characterized by high performance liquid chromatography and measurements of pH. All regular extracts, between 6 to 8 minutes of roasting (light roasting to medium roasting degree), showed the same MIC = 5.0 mg/mL, as well as the decaffeinated extracts roasted for 6 and 7 minutes. Trigonelline, 5-CQA and caffeic acid showed a MIC of 0.8 mg / mL. The *C. canephora* with 6 minutes of roasting and with the high quality beans presented the better results in relation to the biofilm formation (39.6%) and reduced in 6.6% the already formed biofilm. Thus, this extract was selected to the second study. Experiments were performed to identify the antibacterial activity of the extract against SM and also against *Streptococcus sobrinus* (SS). The viability of planktonic cells against different concentrations of the selected extract was analyzed by susceptibility tests to verify the MIC, the minimum bactericidal concentration (MBC) and the bacterial killing curve. The effect of coffee extract on dental demineralization was investigated after its use on the mixed biofilm formed on primary 1st molar fragments (n=24). The biofilm was treated with: *C. canephora* extract at 20%; Milli-Q water (negative control) and chlorhexidine (positive control); once a day for a week. Blank controls comprised fragments without any treatment. Biofilm pH was monitored on the last treatment day. Changes in tooth mineralization were assessed by cross-sectional microhardness (CSMH) test. MIC (0.7 ± 0.2 mg/mL) and MBC (160 ± 0 mg/mL) values showed that *C. canephora* extract was active against SM having no significant effect on SS. The extract produced a significant reduction in the number of colonies of SM after a 3-hour treatment ($p < 0.05$) with undiluted extract (20%) and MBC concentration. Biofilm pH values (~ 4.8) did not differ significantly among negative and blank controls and coffee extract. The extract reduced enamel demineralization up to 30 μm from the enamel surface ($p < 0.05$). One could conclude that 5-CQA, caffeic acid and trigonelline, as well as the coffee extracts with light roasted degree, mainly the *Coffea canephora* specie, are anticariogenic substances.

Key words: Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus, dental plaque, dental caries, deciduous teeth, hardness tests, hydrogen-ion concentration, microbiology, coffee.

RESUMEN

ANTONIO, Andréa Gonçalves. **Anticaries actividad de extractos y compuestos de café.** Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Se investigó las propiedades anticaries de diferentes extractos y compuestos químicos del café, por lo medio de dos estudios de laboratorio. En el primer, se evaluaron las variaciones de los cafés integrales y descafeinado, de especies *Coffea arabica* y *Coffea canephora*, en los diferentes niveles de tostado (6, 7, 8, 13 y 15 minutos), de los cuales se produjeron 36 extractos. Estas muestras y seis componentes químicos presentes en ambas especies (ácido clorogénico - 5-CQA, ácido cafeico, trigonelina, cafeína, ácido nicotínico y el ácido ferúlico) fueron sometidas a pruebas de sensibilidad microbiológica. Se puede identificar la concentración mínima de estas sustancias necesaria para la inhibición del crecimiento (CMI) de *Streptococcus mutans* (SM). Además, se evaluó la capacidad de los extractos y compuestos para inhibir la formación de placa formados por cepas del mismo organismo y/o reducirlo. Sin embargo, todos los extractos de las integrales, con tiempo de tostado 6 a 8 minutos, mostraron el mismo valor de CMI (5 mg/mL), así como los asados descafeinados de 6 y 7 minutos. Trigonelina, 5-CQA y ácido cafeico mostraron CMI de 0,8 mg/mL. El extracto de *C. canephora* integrable con tiempo de tostado de 6 minutos inhibió la formación de placa en 39,6% y redució de la placa ya formada en el 6,6%, y por lo tanto seleccionado para el segundo estudio. Se realizaron experimentos para determinar las propiedades antibacterianas del extracto antes de la SM y también de *Streptococcus sobrinus* (SS). La viabilidad de las células de SM y SS a diferentes concentraciones del extracto se analizó mediante pruebas de susceptibilidad seleccionado para la verificación de la MIC, la concentración bactericida mínima (CBM) y la curva de la muerte de las bacterias. El efecto de este extracto en la desmineralización del diente fue investigado después de su aplicación en de la formación de placa dental en fragmentos de molares primero (n = 24). La placa dental fue tratado con: extracto de *C. canephora* 20%, de agua Milli-Q (control negativo) y clorhexidina (control positivo), una vez al día, durante una semana. Seis fragmentos no recibieron ningún tratamiento (control blanco). El pH de la placa fue supervisada a partir del último día de la prueba. La dureza transversal (TD) de esmalte se determinó como un indicador de la desmineralización. El extracto de *C. canephora* mostró CMI = 7 ± 2 mg/mL y MBC = 160 ± 0 mg/mL antes de las cepas de la SM, pero sin actividad antibacteriana frente a las SS. Este extracto del 20% y la concentración equivalente al CBM promueve una reducción de las colonias de SM después de 3 horas de tratamiento ($p < 0,05$). El pH de la placa ($\sim 4,8$) no fue diferente ($p > 0,05$) entre el extracto de café y controls (negativos y blanco). El mismo extracto redució La desmineralización del esmalte hasta 30 μm de la superficie ($p < 0,05$). Se há podido concluir que el 5-CQA, el ácido cafeico y la trigonelina, así como los extractos de café tostado ligero, son sustancias que actúan como anticaries.

Palabras claves: Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus, placa dental, caries dental, diente primario, dureza prueba, concentración de iones hidrogeno, microbiologia, café.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Desenho esquemático das sequências de identações em diferentes profundidades, tanto na área exposta ao biofilme, como na área protegida 29

Artigo 2

Figure 1: The biofilm model and tests used to identify the anticariogenic property of *Coffea canephora* extract69

Figure 2: Bacterial killing kinetics of a *C. canephora* extract and controls for 180 minutes.....70

Figure 3: Means of enamel Knoop hardness (kg/mm^2) after treatments with coffee extracts and controls, considering the distance (μm) from the enamel surface.....71

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Table 1: Roasting time and degree, instrumental colour, percent weight loss on a wet basis during roasting and pH of coffee samples from Groups 1 and 2...	35
Table 2: Sucrose, caffeine, trigonelline and nicotinic acid contents in green and roasted coffee extracts from Groups 1 and 2. ^a	35
Table 3: Contents of cinnamic acid derivatives in green and roasted coffee extracts from Groups 1 and 2. ^{a,b,c}	36
Table 4: Number of colony-forming units (CFU) for coffee extracts from Group 1 (G1) and Group 2 (G2) with inhibitory activity against <i>Streptococcus mutans</i> ...	37

Artigo 2

Table 1: Contents of cinnamic acid derivatives (phenolic compounds) and caffeine in <i>Coffea canephora</i> extract at 20%. ^{a,b}	67
Table 2: Mineral contents of <i>Coffea canephora</i> extract at 20% and BHI medium. ^a	68

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbância
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain heart infusion
C	Celsius
C	<i>Coffea</i>
CA	Caffeic acid
CFQA	Cafeoylferuloylquinic acids
CFU	Colony – forming unit
CGA	Chlorogenic acid
CGL	Chlorogenic acid lactone
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CO ₂	Dióxido de carbono
CPOD	Dentes permanentes cariados perdidos e obturados
CQA	Ácido cafeoilquínico/cafeoylquinic acid
CQL	Cafeoylquinide
CSLI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CSMH	Cross-sectional microhardness
DAD	Diod array detector
diCQA	Dicaffeoylquinic acids

DT	Dureza transversal
ESI	Electron spray ionization
FQA	Feruloylquinic acids
FQL	Feruloylquinide
G	grama/ gram
G1	Group 1
G2	Group 2
H ₂	Gás hidrogênio
IESC	nstituto de estudos em Saúde Pública
L	Litro
m	metro
MBC	Minimal Bactericidal Concentration
MG	miligrama/miligram
MH	Müeller-Hinton
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
min.	Minutes
mL	mililitro/ mililiter
mm	milímetro/ milimetre
MS	Mass spectrofotometry
N ₂	Gás nitrogênio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
ND	Not detected
nm	nanometro
PBS	Phosfate – buffered saline
<i>p</i> -CoQA	<i>p</i> -coumaruloylquinic acids

pH	Potencial hidrogeniônico/ Potential Hydrogen
PVA	Conjunto de grãos defeituosos
SM	<i>Streptococcus mutans</i>
SPSS	Statistical Product and Service Solutions
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFRJ	Universidade federal do Rio de Janeiro

LISTA DE SÍMBOLOS

~	Aproximadamente
°	Grau/degree
±	Mais ou menos
>	Maior que
®	Marca registrada
<	Menor que
μ	Micro
=	Igual
%	Por cento
≤	Menor ou igual que

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 PROPOSIÇÃO	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS – 1 ^A FASE	12
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS – 2 ^A FASE	12
3 DELINEAMENTO DA PESQUISA	14
3.1 1 ^a FASE DO ESTUDO	14
3.1.1 <i>Substâncias testadas</i>	14
3.1.2 <i>Preparo dos extratos de cafés</i>	15
3.1.3 <i>Preparo das amostras dos compostos químicos</i>	16
3.1.4 <i>Caracterização química dos extratos do café</i>	17
3.1.5 <i>Cepas bacterianas e preparação do inóculo</i>	19
3.1.6 <i>Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)</i>	19
3.1.7 <i>Determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB)</i>	20
3.1.8 <i>Avaliação do efeito dos extratos e compostos químicos do café sobre o biofilme formado por Streptococcus mutans</i>	21
3.1.9 <i>Experimentos adicionais</i>	22
3.1.10. <i>Análise estatística dos resultados</i>	23
3.2. 2 ^a FASE DO ESTUDO	23
3.2.1 <i>Preparo do extrato de café, controles e caracterização química da substância teste</i>	23
3.2.2 <i>Testes microbiológicos de suscetibilidade</i>	24
3.2.3 <i>Curva de morte bacteriana</i>	25
3.2.4 <i>Seleção dos dentes decíduos e preparo dos fragmentos para o ensaio com biofilme</i>	26
3.2.5 <i>Inóculo bacteriano utilizado no ensaio com biofilme</i>	27
3.2.6 <i>Formação de biofilme misto sobre os fragmentos dentários</i>	27
3.2.7 <i>Tratamento do biofilme</i>	28
3.2.8 <i>Avaliação do pH do biofilme</i>	29
3.2.9 <i>Ensaio de Microdureza Transversal</i>	29
3.2.10 <i>Análise do conteúdo mineral do Extrato de C. canephora</i>	30
3.2.11 <i>Análise estatística dos dados</i>	31
4 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.....	32
4.1 ARTIGO 1	33
4.2 ARTIGO 2.....	40
5 DISCUSSÃO	74
5.1 METODOLOGIA	74
5.2 RESULTADOS	79
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
7 CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXOS	98

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 40 anos tem sido constatada uma redução significativa dos índices de cárie em humanos (EKLUND, 2010), tendo esta sido resultado do uso disseminado de fluoretos (EGGERTSSON & FERREIRA-ZANDONA, 2009; MILGROM et al., 2009) e da diminuição da ingestão de produtos contendo açúcar (MOYNIHAM & PETERSEN, 2004). No entanto, apesar de nas últimas décadas estarmos observando esta queda da prevalência de cáries em países desenvolvidos, o oposto tem sido constatado naqueles em desenvolvimento (PETERSEN et al., 2005).

Particularmente em relação ao Brasil, embora o levantamento epidemiológico realizado pelo Ministério da Saúde em 2003 tenha revelado que o país atingiu a meta proposta pela Organização Mundial da Saúde para o índice CPOD aos 12 anos de idade ($CPOD_{12} \leq 3$), esse resultado não corresponde à uniformidade da prevalência de cárie em nível nacional, considerando as regiões brasileiras separadamente (BRASIL, 2004). Tal fato é facilmente compreendido quando as dimensões territoriais, as diferenças sócio-econômicas e culturais, bem como o entendimento da cárie como uma doença multifatorial e que sofre a influência de fatores inerentes às particularidades individuais (THYLSTRUP & FEJERSKOV, 2001) são levados em consideração.

Atribui-se ao nível sócio-econômico, à raça e à dieta pobre em ferro e rica em açúcar, a explicação acerca da alta prevalência de cáries entre os brasileiros (PATUSSI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008). Psoter, Reid e Katz, através de uma revisão sistemática em 2005, verificaram uma forte relação entre as condições nutricionais e/ou a ingestão de nutrientes e a doença cárie, principalmente em países em desenvolvimento. Isso porque diante de uma

dieta rica em açúcar e carboidratos fermentáveis, o pH do biofilme dental permanecerá baixo, favorecendo o crescimento da microbiota cariogênica e, conseqüentemente, aumentando o risco à doença (KIDD & FEJERSKOV, 2004; PAES LEME et al., 2006).

Já está bem estabelecido na literatura (TAKAHASHI & NYVAD, 2008; CURY & TENUTA, 2009; FILOCHE et al., 2010) que quando os depósitos microbianos permanecem aderidos ao dente por mais de três dias, ocorrem quedas pronunciadas do pH do biofilme levando a uma perda da integridade do esmalte e, conseqüentemente, à formação da lesão de cárie. Assim, os efeitos locais dos carboidratos fermentáveis no metabolismo do biofilme e na produção de ácido são fundamentais no processo carioso, mas os efeitos nutricionais ou sistêmicos também podem influenciar o progresso da doença e, por isso, devem ser levados em consideração (TOUGER-DECKER & VAN LOVEREN, 2003).

Casos de desnutrição por períodos prolongados poderão afetar tecidos e órgãos como, por exemplo, o cérebro e as glândulas salivares, levando a uma diminuição da capacidade metabólica (RIBEIRO & RIBEIRO, 2004). Considerando exatamente a hipofunção das glândulas, acredita-se que exista associação entre desnutrição e a doença cárie (MOYNIHAN, 2005; JOHANSSON et al., 1985; HARRIS & NAVIA, 1980; MENAKER & NAVIA, 1973), principalmente devido a uma diminuição dos índices de secreção salivar, prejudicando a atividade das proteínas salivares antimicrobianas e o grau de glicolização de proteínas, acarretando em um aumento do biofilme dental (THYLSTRUP & FEJERSKOV, 2001) e, conseqüentemente, a um maior risco à doença.

Diante deste quadro, fica evidente que novas pesquisas devem ser realizadas com o intuito de determinar estratégias anticariogênicas para reduzir os riscos impostos pelo açúcar e outros carboidratos fermentáveis, explorando o uso de produtos que possam prevenir a doença cárie (TOUGER-DECKER & VAN LOVEREN, 2003). Segundo Moynihan (2005), existem indícios de que o efeito da indução de atividade cariiosa dos carboidratos é aumentado ou reduzido por componentes específicos de determinados alimentos, sendo, portanto, denominados protetores por inibir de alguma maneira a atividade de cárie.

Por exemplo, a ação preventiva do queijo e do iogurte tem sido relatada em estudos experimentais e em humanos (RUGG-GUNN et al., 1975; RUGG-GUNN et al., 1984; PETTI et al., 1997, TANAKA et al., 2010). Na realidade, o alto conteúdo de cálcio e fósforo é indicado como o responsável pelo mecanismo cariostático destes alimentos (RUGG-GUNN et al., 1985). As gorduras também parecem reduzir a cariogenicidade dos alimentos, mas ainda não foi esclarecido como e até que ponto (THYLSTRUP & FEJERSKOV, 2001).

Segundo Kashket (1985), a maneira que se utiliza ou a presença de componentes específicos em determinados produtos podem modificar os efeitos da sacarose ou de outros açúcares sobre a doença cárie, através da interferência na formação de polissacarídeos extracelulares por bactérias cariogênicas, dentre elas o *Streptococcus mutans* e o *Streptococcus sobrinus*, considerados os microrganismos mais associados a esta condição em humanos (SMITH, 2002).

Nesta perspectiva, cada vez mais pesquisadores se empenham em estudos de produtos naturais ou constituintes dos mesmos, como alternativa de

agentes sintéticos (MARCUCCI et al., 2001), visando oferecer um grau de proteção contra os microrganismos envolvidos com a doença cárie, e, por conseguinte, reduzir a prevalência e a severidade de tal patologia (PERCIVAL et al., 2006; CHUNG et al., 2006).

Dentre estes produtos, o efeito antibacteriano de compostos fenólicos extraídos de diferentes tipos de plantas como a própolis, o chá verde, o cacau e a uva, tem sido relatado (OOSHIMA et al., 1993; OOSHIMA et al., 2000; SIMONETTI et al., 2004; SMULLEN et al., 2007; CHO et al., 2008). Várias pesquisas têm constatado o potencial destes agentes naturais na prevenção de doenças orais, particularmente doenças decorrentes da presença de biofilme sobre a superfície dentária (KOO et al., 2002; YATSUDA et al., 2005; XIAO et al., 2007; BODET et al., 2008; SRIKANTH et al., 2008).

O café, também rico em compostos fenólicos, (KASHKET et al., 1985; DAGLIA et al., 1998), vem apresentando promissores resultados quanto à redução do potencial cariogênico de dietas que contém açúcar, considerando-se os resultados de um estudo epidemiológico (ANILA NAMBOODIRIPAD & KORI, 2009) em que os autores observaram uma redução de dentes com superfícies cariadas, perdidas e obturadas (CPOS) em uma população com o hábito de consumir café quando comparada a outra sem o mesmo costume. No entanto, Thylstrup e Fejerskov (2001) sugerem que constantes investigações devem ser realizadas com alimentos que possuem atividades antibacterianas, principalmente através da identificação do composto ou compostos ativos específicos que possuem esta propriedade e suas possíveis implicações.

O Café

O café é a semente seca dos frutos originados de uma árvore do gênero *Coffea* da família das *Rubiáceas* (*Rubiaceae*), sendo que dentre as mais de 80 espécies distintas, as mais comercializadas são *Coffea arabica*, considerada mais nobre e de reputadas qualidades de sabor (LUNA-FILHO, 2006), e *Coffea canephora*, todas provenientes dos trópicos em altitudes que podem variar entre o nível do mar até 2000 metros (MONTEIRO & TRUGO, 2005).

A preparação da bebida é somente obtida após a torrefação e extração aquosa destes grãos, conferindo a cor, a textura e o sabor amplamente apreciado pelos consumidores (CHARURIN et al., 2002), que vêm aumentando em todo o mundo (YEN et al., 2005; FARAH, 2009). Este fato exerce grande importância econômica para o Brasil, já que hoje, este país ocupa a posição de primeiro produtor e exportador mundial de café, sendo responsável por aproximadamente 34% da produção mundial (FOREIGN AGRICULTURAL SERVICES, 2007).

Além da sua importância econômica, o café tem despertado interesse científico e popular em relação às suas características sensoriais e aos seus efeitos terapêuticos. Tal fato tem aumentado o consumo da bebida de café também por crianças e adolescentes (ABIC, 2007).

O consumo diário e moderado de café torna o cérebro mais atento, diminui a incidência de depressão e apatia, além de estimular a memória, atenção e concentração, melhorando a atividade intelectual normal (HARVEY & MARSH 1978, FARAH et al., 2009). Estas propriedades são corroboradas por Flores et al. (2000) em um estudo onde o consumo de café para jovens

envolvidos com o uso de drogas é recomendado, objetivando aumentar o estado de alerta, bem como o desempenho físico e intelectual desta população.

De acordo com um projeto da Associação Brasileira das Indústrias de Café denominado “Café na Merenda e Saúde na Escola”, já em prática em algumas escolas do estado de Minas Gerais (ABIC, 2007), o consumo moderado de café pela manhã com ou sem leite, além de melhorar o rendimento escolar, auxilia na disseminação de hábitos de alimentação saudável junto aos jovens, prevenindo diversas doenças, já que se trata de uma planta nutracêutica, ou seja, combina propriedades nutricionais com farmacêuticas (PAQUIN, 2009).

São vários os estudos (ROBINSON et al, 1996; ARION et al, 1997; JOHNSTON et al., 2003) que se propõem a investigar as propriedades farmacológicas deste fruto, atribuindo-as especificamente aos seus compostos. Mediante estes fatos, fica evidente a importância biológica do café e, conseqüentemente, da necessidade do melhor conhecimento de sua composição e propriedades.

Compostos Químicos do Café

A composição química do café cru depende da espécie e da variedade em questão, e também de outros fatores como práticas agrícolas, grau de maturação do fruto, processamento primário e condições de estocagem (CLARKE, 1987).

O café verde caracteriza-se por ser constituído de cafeína, ácidos clorogênicos e trigonelina. Outros componentes, mais comuns a outros vegetais, também estão presentes como: oligossacarídeos, polissacarídeos,

proteínas, lipídeos e minerais (TRUGO, 1984; CLARKE & MACRAE, 1985; MAZAFFERA, 1991; CLIFFORD, 2000). O conteúdo de água varia de aproximadamente 50% antes da colheita até aproximadamente 9-12% após o processo de secagem. O restante é composto por 30 elementos, sendo que destes, somente o magnésio parece apresentar diferenças significativas entre as espécies. Palmitato de caveol e palmitato de cafestol, dois diterpenos constituintes da fração lipídica do café, com ação anticancerígena, também estão presentes nas sementes cruas (WATTENBERG, 1983; CAVIN et al., 2002).

Embora infusões e bebidas sejam preparadas a partir dos frutos de café fermentados em épocas diferentes, somente após a torrefação e a extração aquosa dos grãos é que se obtém a bebida para consumo. Durante este processo de torra, uma série de transformações ocorre na composição química deste fruto (FARAH, 2009). As proteínas são degradadas, além de reagirem com outros compostos, como carboidratos. Já os aminoácidos livres, são completamente consumidos durante o processo de torra. O teor de lipídeos não parece ser significativamente afetado pelo processo. Mas a sacarose é completamente consumida pelas reações de caramelização, entre outras (TRUGO & MACRAE, 1989).

Em relação à cafeína, ela não sofre alterações apreciáveis após o processo de torrefação, podendo apenas ocorrer perdas por sublimação. Trata-se do composto mais conhecido do café, devido às suas propriedades fisiológicas e farmacológicas. Dos diversos efeitos atribuídos à cafeína, alguns já apresentam comprovação científica, como o efeito estimulante do sistema

nervoso central, a diminuição do sono e a ação de estimular o músculo cardíaco (NEHLIG, 1999, FARAH et al., 2006 - a).

A maioria dos compostos do café ainda é pouco estudada, mas muitos são importantes para a saúde humana (ABIC, 2007). A trigonelina é um alcalóide, como a cafeína, de grande importância no café, gerando com sua degradação térmica uma classe de compostos, os pirróis, que são de relevante importância para o seu aroma. Além disso, a trigonelina é precursora da niacina, uma vitamina do complexo B, produzida durante o processo de torrefação, o que faz do café um dos poucos alimentos que aumentam o seu valor nutricional após o processamento térmico (CLIFFORD & WILSON, 1985; TRUGO, 1985).

Em decorrência da sua instabilidade térmica, os ácidos clorogênicos são quase que completamente degradados quando submetidos a condições intensas de torrefação. Trata-se de um conjunto de cinco grupos principais de compostos fenólicos e seus isômeros, formados pela esterificação de uma molécula de ácido quínico com uma ou duas moléculas de ácido cafeico, ferúlico ou *p*-cumárico, que por serem derivados do ácido cinâmico, são chamados de cinamatos ou hidroxicinamatos. Portanto, os cinco principais grupos de ácidos clorogênicos são: ácidos cafeoilquínicos, ácidos dicafeoilquínicos, ácidos feruloilquínicos, ácidos cafeoilferuloilquínicos e, minoritariamente, os ácidos *p*-cumaroilquínicos (FARAH et al., 2006 - b). Durante a torrefação, estas substâncias geram uma série de compostos fenólicos de baixo peso molecular, que apresentam características sensoriais bem variadas (MOREIRA et al., 2000).

Além da importância para a formação de aroma e sabor, os ácidos clorogênicos possuem também bioatividade (FARAH, 2009). Robinson et al., em 1996, demonstraram que o ácido 3,5-dicafeoilquínico é um potente inibidor da integrase do vírus da imunodeficiência em humanos (HIV-1), uma enzima requerida para infecção das células. O ácido 5-cafeoilquínico, o ácido cafeico e toda família destes ácidos mostraram-se potentes antioxidantes em eritrócitos humanos (DE MARIA et al., 1999). Além disto, também foram observados: o efeito indutor na replicação e na mobilidade de macrófagos de camundongos, o que acarretaria um aumento da imunidade (TATEFUJI et al., 1996); características anti-mutagênicas (STICH et al., 1982; WATTENBERG, 1983); a indução da diminuição dos níveis sanguíneos de glicose por meio da inibição da enzima glicose-6-fosfatase (ARION et al., 1998; HERLING et al., 1998) e também, propriedades antibacterianas (DOGASAKI et al., 2002; DAGLIA et al., 1998; DAGLIA et al., 2007).

Propriedade Antibacteriana do Café

Tendo em vista que a administração sistêmica pertinente de antimicrobianos tem sido apontada como a causa principal do aparecimento de microrganismos cada vez mais resistentes a estas drogas (SANTOS, 2002), destaque deve ser dado à propriedade antibacteriana do café, fortalecendo o conceito de que o desenvolvimento de novas terapias que lançam mão de produtos naturais para a prevenção e tratamento de doenças, dentre elas as da cavidade bucal, é de grande relevância no campo da medicina (WALKER, 1996).

Dentro deste contexto, um estudo de Kashket et al. (1985) merece atenção, uma vez que os autores constataram que constituintes do café podem inibir a formação de glicosiltransferase por bactérias cariogênicas. Os autores ponderam ainda que provavelmente esta inibição deva-se à ação de seus compostos fenólicos.

Daglia et al. (1998) cuidaram de verificar a capacidade antibacteriana do café através de um estudo *in vitro* envolvendo o *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus mutans*, sugerindo que o processo de torrefação deste produto seria o responsável por gerar um único composto capaz de inibir fortemente o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Porém os autores não detectaram precisamente este composto.

Já no ano de 2007, os mesmos autores (DAGLIA et al., 2007) afirmaram que esse composto não poderia ser um de seus constituintes naturais, mas sim uma ou mais substâncias resultantes de uma reação de caramerilização após a torra dos grãos do café, sendo estes chamados de compostos α -*dycarbonil*. No entanto, estes resultados estariam contrapondo estudos (KASHKET et al., 1985; SMULLEN, 2007; KIM et al., 2010; LEE & LEE, 2010) que mostram que os compostos fenólicos, naturalmente presentes em determinados produtos, possuem potente ação antibacteriana contra bactérias orais.

Reforçando ainda mais a teoria do potencial antibacteriano de produtos naturais do café, Furuhashi et al. (2002) constataram através de testes microbiológicos que o ácido clorogênico e o ácido caféico - compostos naturalmente encontrados nesse fruto - possuem propriedades antibacterianas contra a *Legionella pneumophila*, uma bactéria responsável por infecções

respiratórias. Fato este também observado por Almeida et al. (2006), que, através do fracionamento da trigonelina, do ácido caféico e do ácido 5-cafeoilquínico por cromatografia gasosa, identificaram a ação antibacteriana destes constituintes naturais do café frente a enterobactérias.

Assim, fica claro que apesar dos estudos mencionados anteriormente, ainda existem lacunas a serem esclarecidas referentes às propriedades antibacterianas dos extratos e compostos químicos do café frente às bactérias envolvidas com a doença cárie. E, sobretudo, o seu efeito sobre o processo de desremineralização dentária, resultando em dados mais consistentes em relação às suas propriedades anticariogênicas.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade anticariogênica de extratos e compostos químicos do café através de ensaios laboratoriais.

2.2 Objetivos Específicos – 1ª fase

- ✓ Determinar a mínima concentração de extratos e compostos químicos do café necessária para inibir o crescimento de cepas de *Streptococcus mutans*, identificando-os frente aos resultados.
- ✓ Avaliar o efeito dos extratos e compostos químicos do café sobre o biofilme formado por *Streptococcus mutans*, identificando-os quanto a esta propriedade.
- ✓ Avaliar a influência da espécie, do grau de torrefação e do tipo de café, integral ou descafeinado, na ação antibacteriana dos extratos testados.
- ✓ Determinar o extrato de café de maior atividade antibacteriana, diante das propriedades antibacterianas apresentadas.

2.3 Objetivos Específicos – 2ª fase

- ✓ Determinar a mínima concentração do extrato de café, selecionado a partir do 1º ensaio, necessária para inibir o crescimento não só de cepas de *Streptococcus mutans*, mas também de cepas de *Streptococcus sobrinus*.
- ✓ Determinar a concentração bactericida ideal deste extrato de café frente às cepas de *Streptococcus mutans* e de *Streptococcus sobrinus*.

- ✓ Identificar o pH do biofilme formado sobre o esmalte decíduo humano, após terem sido tratados com o extrato de café selecionado.
- ✓ Avaliar o potencial anticariogênico do extrato de café selecionado, a partir da análise de esmalte decíduo humano submetidos a ele, na presença de biofilme misto.

3 DELINEAMENTO DA PESQUISA

A fim de que sejam respondidos os objetivos do presente estudo, este foi dividido em duas fases, sendo elas:

- ✓ Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de diferentes extratos e compostos químicos de duas espécies de café: *Coffea arabica* e *Coffea canephora*.
- ✓ Avaliações *in vitro* e *ex vivo* do potencial anticariogênico do extrato de café, selecionado a partir da fase anterior, tendo em vista o melhor desempenho antibacteriano.

Para a realização de ambas as fases deste trabalho, todas as substâncias estudadas foram preparadas no Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), o mesmo ocorrendo com a sua caracterização. Já em relação aos experimentos microbiológicos, estes foram realizados no Laboratório de Infecção Hospitalar do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ.

Visando facilitar a compreensão das fases do estudo, suas metodologias serão individualmente apresentadas:

3.1 1ª Fase do Estudo

3.1.1 Substâncias testadas

Na primeira etapa deste estudo avaliaram-se os extratos aquosos de duas espécies de café: *Coffea arabica* (*C. arabica*) e *Coffea canephora* cv.

Conillon ou Robusta (*C. canephora*), tanto na forma integral quanto descafeinada; verde e em diferentes níveis de torra, provenientes de plantações localizadas nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo. Além disso, os principais compostos químicos (amostras padrão) destas espécies de café também foram testados, quais sejam: ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico); trigonelina; cafeína; ácido caféico; ácido nicotínico e ácido ferúlico (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO – USA).

3.1.2 Preparo dos extratos de cafés

Os grãos das espécies de *C. arabica* e *C. canephora* foram torrados com o auxílio de uma torradeira (I-Roast, MO - USA) que operou em uma temperatura máxima de 220° C, obtendo-se grãos com níveis de torra distintos de acordo com o tempo de duração deste procedimento. Desta forma, seguindo as normas da Associação Brasileira das Indústrias de Café (ABIC), foram obtidos grãos nos seguintes tempos de torra: 6, 7, 8, 13 e 15 minutos. Além disto, o grau da torra também foi determinado pela coloração obtida após a torrefação de acordo com o que é preconizado pelo Sistema de Classificação de Cores do Café (AGTRON-SCAA) e pela perda de peso molecular (FARAH et al., 2005).

Posteriormente, tanto os grãos verdes quanto os torrados foram moídos, em um moedor próprio de laboratório, e peneirados com auxílio de uma peneira com 0,46mm de espessura.

Os extratos dos cafés a 10% foram obtidos através da adição de 10 g do pó em 100 mL de água fervente purificada Milli-Q (Millipore Corp., Billerica, Ma, USA). As misturas obtidas permaneceram em repouso por 10 minutos e foram

filtradas através de filtros de papel apropriados - Whatman n°1 (Watman, Maidstone, UK). Após este procedimento obtiveram-se 36 extratos aquosos de cafés na concentração de 100 mg/mL cada um, que foram divididos em 2 grupos de acordo com a qualidade dos grãos, previamente escolhidos e selecionados. Esta característica foi determinada pelo conjunto de grãos defeituosos – PVA: valores de PVA acima de 20% representaram grãos de baixa qualidade, enquanto que àqueles abaixo desse valor foram considerados de alta qualidade.

Grupo 1 (alta qualidade dos grãos – PVA = 4%):

- ✓ seis extratos aquosos de *C. arabica* (Yellow Bourbon) integral: verde; 6, 7, 8, 13 e 15 minutos de torrefação
- ✓ seis extratos aquosos de *C. canephora* integral: verde; 6, 7, 8, 13 e 15 minutos de torrefação

Grupo 2 (baixa qualidade dos grãos – PVA = ~ 40%):

- ✓ seis extratos aquosos de *C. arabica* integral: verde; 6, 7, 8, 13 e 15 minutos de torrefação
- ✓ seis extratos aquosos de *C. arabica* descafeinado: verde; 6, 7, 8, 13 e 15 minutos de torrefação
- ✓ seis extratos aquosos de *C. canephora* integral: verde; 6, 7, 8, 13 e 15 minutos de torrefação
- ✓ seis extratos aquosos de *C. canephora* descafeinado: verde; 6, 7, 8, 13 e 15 minutos de torrefação

3.1.3 Preparo das amostras dos compostos químicos

Para obtenção das soluções estoques (0,1%) dos diferentes compostos

químicos padrões (Sigma-Aldrich, USA) do café, adicionaram-se 0,1 g dessas substâncias padrões em 100 mL de água purificada Milli-Q (Millipore Corp., Billerica, Ma, USA). Sendo que para obter uma mistura homogênea, estas soluções permaneceram em agitação por um período de 5 a 20 minutos.

Após todos os extratos aquosos e as amostras dos compostos químicos serem preparadas, todas essas soluções passaram por filtros estéreis (Millipore – 3M) antes dos testes microbiológicos. Além disso, alíquotas dos diferentes extratos e dos compostos químicos foram separadas e análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também foram realizadas com o intuito de confirmar a concentração final de 10% e 0,1% das respectivas amostras que foram estudadas.

3.1.4 Caracterização química dos extratos do café

Inicialmente, com a finalidade de caracterizar quimicamente os extratos aquosos de café testados neste ensaio laboratorial, avaliou-se o pH dos mesmos através da utilização de um pHmetro (DM20 Digimed, Santo Amaro, SP, Brazil). Em seguida, de acordo com o método proposto por Farah et al. (2006 – b), a concentração de ácido caféico, ácido ferúlico e ácidos clorogênicos (ácidos 3-, 4 e 5-cafeoilquínicos; ácidos 3-, 4- e 5-feruloilquínicos; ácidos 3-, 4- e 5-cumaroilquínicos; ácidos 3,4-, 3,5- e 4,5-dicafeoilquínicos, ácidos cafeoilferuloilquínicos), bem como de suas respectivas 1,5-quinolactonas foram determinadas pelo gradiente de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um espectrofotômetro de massa contendo um detector de feixes de diodo e também um dispositivo que ioniza os elétrons para fazer a leitura dos resultados (CL-DAD-ESI-MS). Os conteúdos de

cafeína, trigonelina, ácido nicotínico e sacarose dos extratos de café foram também determinados por CL-ESI-MS de acordo com Perrone, Donangelo e Farah (2008), utilizando uma coluna específica (Spherisorb[®] S5 ODS2 Microbore column, 150 × 2,0 mm, 5 µm, Waters, Milford, MA, USA).

Todas as soluções foram submetidas às análises em triplicata.

3.1.5 Cepas bacterianas e preparação do inóculo

A amostra bacteriana de *Streptococcus mutans* utilizada neste ensaio pertence à coleção de amostras do Laboratório de Infecção Hospitalar do departamento de Microbiologia Médica do Instituto Prof. Paulo de Góes da UFRJ e é proveniente da American Type Culture Collection (ATCC): *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

Para o preparo do inóculo, a amostra bacteriana citada foi inicialmente avaliada para verificação do grau de pureza. Em seguida, colônias bacterianas isoladas foram selecionadas e transferidas para solução salina a 0,85% até atingir uma turvação referente à escala 0,5 de *McFarland* – cerca de 10⁸ UFC/mL (MCFARLAND, 1907). Oriundos desta suspensão, 100 µL foram adicionados a um tubo contendo 5 mL de um caldo de cultura de Mueller-Hinton (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), que foi incubado a uma temperatura de 36,5 ± 1,0 °C, por 4-6 horas. Novamente ajustou-se a densidade da suspensão bacteriana ao tubo 5 da escala de *McFarland* (MCFARLAND, 1907), objetivando-se padronizar o crescimento bacteriano no tubo. Uma vez realizado este procedimento, 300 µL desta nova suspensão foram adicionados a 9,7 mL de um caldo de cultura de Mueller-Hinton (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), a fim de se obter um inóculo bacteriano contendo 4-5 x 10⁶ UFC/mL.

3.1.6 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A CMI foi avaliada pelo método de diluição em meio de crescimento bacteriano de Miller-Hinton (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) para cada uma das amostras dos extratos de café e também para cada um dos compostos químicos, seguindo o protocolo preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CSLI, antigo NCCLS, 2003). Para a avaliação dos extratos, a faixa de concentração testada foi entre 10 mg/mL e 1 mg/mL. Para a investigação dos compostos químicos isolados, avaliou-se uma faixa de concentração de 1.000 µg/mL a 12,5 µg/mL.

Foram transferidos 100 µL do inóculo bacteriano ($4-5 \times 10^6$ CFU/mL) para cada tubo com a respectiva diluição contendo os extratos de café e os compostos químicos mencionados, atingindo ao final uma concentração bacteriana de cerca de 5×10^5 UFC/mL. Para controle do crescimento bacteriano, um tubo foi preparado com 0,9 mL de caldo Miller-Hinton (MH) e 100 µL da suspensão bacteriana. Um segundo tubo foi também utilizado neste ensaio contendo 2 mL de caldo MH, representando o controle branco. Todos os tubos foram incubados por 24 horas, a uma temperatura de $36,5 \pm 1,0$ °C. A CMI foi estabelecida como a menor diluição onde não houve crescimento bacteriano.

3.1.7 Determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A CMB é a menor concentração de uma substância capaz de eliminar 99,9% do microrganismo testado. Assim, para a determinação da CMB foram selecionados os tubos do ensaio anterior com as concentrações onde não se

observou crescimento bacteriano. A partir desses, alíquotas de 0,1 mL foram retiradas e, em seguida, semeadas em placas de agar sangue, sem adição de substância alguma. Após 24 horas de incubação sob uma temperatura de $36,5 \pm 1,0$ °C, em microaerofilia, caso não fosse observado crescimento bacteriano na placa, a concentração da substância em análise era considerada bactericida (ISENBERG, 1992).

Além disso, as placas que não apresentaram concentrações bactericidas foram submetidas à contagem de colônias.

3.1.8 Avaliação do efeito dos extratos e compostos químicos do café sobre o biofilme formado por *Streptococcus mutans*

Os compostos químicos e extratos aquosos que demonstraram melhores resultados quanto à inibição do crescimento bacteriano (resultados do CMI e CMB) foram submetidos a testes de microdiluição (WEI et al., 2006) com o intuito de avaliar o efeito de tais amostras sobre o biofilme formado pelo *Streptococcus mutans*.

As substâncias selecionadas foram diluídas em 96 poços de uma placa de poliestireno (TPP, Zellkultur Testplatte 96 F) contendo meio de cultura *Brain-Heart Infusion Growth* (BHI, 200 µL/poço; Difco, Sparks, USA) suplementado com 2% de sacarose (BHIS). O controle positivo foi a clorexidina (0,05%) e o meio de cultura sem substância teste foi considerado o controle não tratado. Já a água Milli – Q caracterizou o controle negativo, e o meio de cultura sem inóculo, o branco. Alíquotas (20 µL) de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (5×10^7 UFC/mL) foram inoculadas em cada poço, exceto em relação ao branco (controle). Cada placa de poliestireno foi incubada por 24 horas em

anaerobiose (10% CO₂, 80% N₂, 10% H₂, 37°C). O sobrenadante de cada poço foi decantado e as células planctônicas foram removidas através de lavagem com PBS (pH 7,2). Posteriormente, procedeu-se à secagem do biofilme em temperatura ambiente, sendo ele corado durante 1 hora com cristal de violeta (0,1%).

Quantificou-se a formação de biofilme pela adição de 200 µL de etanol a 80% e acetona a 20% em cada poço. Logo depois, a absorbância (570 nm) – A_{570} – foi determinada através da utilização de um leitor de microplacas apropriado (modelo 550 – Bio Rade Microplate Reader, Marnes – La-Coquete, França).

Baseado no exposto acima, o cálculo da porcentagem da inibição adotado para este ensaio microbiológico está representado através da seguinte equação:

$$\left(1 - \frac{A_{570} \text{ da substância}}{A_{570} \text{ do controle não tratado}} \right) \times 100$$

Paralelamente, uma nova placa com 96 poços também foi preparada contendo as mesmas substâncias teste. Todo conteúdo desta placa foi transferido para outra adicional que já continha biofilme estabelecido (24 horas de incubação), sendo posteriormente colocada em estufa a 37°C por 24 horas, sob condições anaeróbicas. O crescimento celular foi avaliado através da medida de absorbância (570 nm), sendo o biofilme fixado, corado e quantificado como descrito anteriormente. Todo experimento com biofilme foi realizado em quadriplicata.

3.1.9 Experimentos adicionais

Ainda nessa fase do estudo, dois experimentos adicionais foram realizados. Eles consistiram em testes para observar: (1) o efeito do etanol sobre o *Streptococcus mutans* e (2) o efeito da sacarose sobre o mesmo microrganismo.

3.1.10. Análise estatística dos resultados

Quanto à análise dos resultados, os mesmos foram armazenados em um banco de dados do programa estatístico SPSS versão 11.0, a fim de que a associação entre a concentração dos compostos químicos e o número de colônias formadas nas placas de agar sangue fosse investigada através da análise de correlação de Pearson. Ademais, utilizou-se o teste t de *Student* para verificar a significância estatística dos resultados encontrados com o experimento envolvendo o biofilme e também em relação à contagem de colônias. Considerou-se um nível de significância de 5%.

3.2. 2ª Fase do Estudo

A partir dos resultados obtidos com a realização da primeira fase do estudo, o extrato de *C. canephora* de grãos de melhor qualidade, com 6 minutos de torra, foi o extrato selecionado para ser testado nesta segunda etapa do trabalho. Atribuiu-se a sua seleção ao seu melhor desempenho antibacteriano frente ao *Streptococcus mutans*.

Assim, um segundo estudo foi conduzido, no qual fragmentos de dentes decíduos humanos foram submetidos a um ambiente microbiológico, com a proposta de formar biofilme misto sobre esses fragmentos. Tais amostras foram tratadas com o extrato selecionado e os controles, para posterior análise

da dureza do esmalte decíduo humano.

3.2.1 Preparo do extrato de café, controles e caracterização química da substância teste

Os grãos de *C. canephora* foram submetidos à torrefação e moagem, seguindo o mesmo protocolo da fase anterior da pesquisa. Contudo, um extrato mais forte foi preparado para ser testado nesta segunda etapa.

Assim, através da adição de 20 g do pó de café em 100 mL de água fervente purificada Milli-Q (Millipore Corp. Billerica, Ma, USA), obteve-se o extrato aquoso a 20% com concentração de 200 mg/mL a ser submetido aos testes de susceptibilidade e para o experimento envolvendo os fragmentos dentários. Devido às particularidades inerentes ao método, apenas para o ensaio da curva de morte bacteriana, foi preparado um extrato um pouco mais concentrado (25 %).

Utilizou-se a clorexidina a 0,05% como controle positivo nos testes de susceptibilidade microbiológica e curva de morte bacteriana. Já a clorexidina a 0,12% representou o controle positivo no ensaio em que o biofilme sobre os fragmentos dentários foram tratados. A água purificada Milli-Q (Millipore Corp. Billerica, Ma, USA) representou o controle negativo para todos os testes realizados nessa etapa do estudo.

Da mesma forma que na primeira fase do trabalho e seguindo o mesmo método cromatográfico, foi determinada a concentração de ácidos clorogênicos (ácidos 3-, 4 e 5-cafeoilquínicos; ácidos 3-, 4- e 5-feruloilquínicos; e ácidos 3,4-, 3,5- e 4,5-dicafeoilquínicos) e de cafeína.

3.2.2 Testes microbiológicos de suscetibilidade

Testes de susceptibilidade, seguindo o mesmo método da fase anterior, foram realizados com o objetivo de identificar a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) do extrato de *C. canephora* selecionado frente não só ao *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), mas também ao *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478). Todavia, partiu-se de concentrações mais altas do extrato, abrangendo uma faixa de concentração entre 5 a 160 mg/mL.

3.2.3 Curva de morte bacteriana

Para este ensaio utilizou-se o extrato de *C. canephora* em diferentes concentrações: 1%, 16% e 20%. Esta avaliação teve como objetivo promover um estudo do comportamento bacteriano na presença desses extratos, após a sua fase de crescimento exponencial.

Foi selecionada apenas a amostra ATCC 25175 de *Streptococcus mutans* para ser testada, pois através dos ensaios de suscetibilidade realizados previamente a esta etapa, observou-se que não foi possível encontrar a mínima concentração do extrato aquoso de *C. canephora* necessária para impedir o crescimento da amostra bacteriana ATCC 33478 de *Streptococcus sobrinus*.

Após a adição do inóculo ($\sim 10^8$) em cada tubo contendo o extrato em suas diferentes concentrações, alíquotas de 100 μ L de cada sistema (inóculo + extrato) foram coletadas a cada intervalo de 30 minutos até um período final de 3 horas.

Semeaduras convergentes a partir de diluições (10^{-3} a 10^{-8}) dessas suspensões, provenientes de cada intervalo, foram realizadas em placas de

agar sangue com auxílio da alça Drigalski. Estas placas foram incubadas em microaerofilia a 37°C por 48 horas e, ao final desse período, as células bacterianas viáveis foram enumeradas (UFC/mL).

Além dos tubos com os extratos de *C. canephora* nas concentrações citadas, dois outros tubos contendo 2 mL de Mueller-Hinton (Difco, Sparks, USA) foram utilizados como controles; um sem inóculo bacteriano para controle de esterilidade e o outro (branco) com o inóculo para o controle de crescimento. Também foram submetidos ao ensaio: clorexidina a 0,05% (controle positivo) e água Milli-Q (controle negativo).

Assim, a curva de morte do *Streptococcus mutans* na presença dos extratos de cafés e dos controles pôde ser construída, comparando a população bacteriana do início do experimento (tempo zero) e a cada 30 minutos de intervalo após as substâncias testes terem sido adicionadas.

3.2.4 Seleção dos dentes decíduos e preparo dos fragmentos para o ensaio com biofilme

Para o ensaio do biofilme, foram selecionados doze primeiros molares decíduos esfoliados, hígidos, sem alterações visíveis ao Microscópio Esterioscópico (40×) para o ensaio com biofilme. Tais elementos dentários foram doados por crianças que residiam no Rio de Janeiro, em conformidade com as regras do Comitê de Ética Local (Instituto de Estudos em Saúde Pública – IESC) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Processo n° 43/2007 – Anexo 1).

Após a seleção, os dentes foram submetidos a uma cortadeira de alta precisão (Isomet, Buehler, Lake Bluff, USA), para que um corte eqüidistante fosse feito no sentido mésio-distal de cada elemento. Em uma vista oclusal, dois fragmentos foram aproveitados. Logo em seguida, os espécimes ($n = 24$ fragmentos) foram armazenados em uma solução de soro fisiológico.

Antes do ensaio, os fragmentos foram cobertos com esmalte de unha deixando uma área de exposição de 21 mm². Esta superfície coberta representou o controle do próprio fragmento, pois não foi exposta ao tratamento.

3.2.5 Inóculo bacteriano utilizado no ensaio com biofilme

O inóculo constituiu-se de um *pool* de saliva humana: saliva não estimulada proveniente de três voluntários (indivíduos adultos) que estavam em jejum de uma hora. Tais voluntários assinaram um termo de consentimento (Anexo 2) autorizando a coleta de sua saliva e apresentavam bom estado de saúde geral e bucal. Os critérios adotados para esta avaliação foram os propostos por Zero (1995) e modificados pela presente autora, quais sejam:

- ✓ Boa saúde geral
- ✓ Não estar fazendo uso de medicação, durante o período de um mês anterior ao início do presente ensaio, que pudesse influenciar o fluxo salivar ou alterar a microbiota bucal
- ✓ Ausência de atividade de cárie.
- ✓ Ausência de lesões não restauradas ou com restaurações inadequadas.
- ✓ Ausência de aparelhos ortopédicos e/ou ortodônticos

Assim, um mililitro (1 mL) de saliva de cada indivíduo foi transferido do tubo de coleta para um único tubo de maior calibre, resultando em um inóculo com 2×10^8 UFC/mL. Desta suspensão foi também quantificado o número de colônias de *Streptococcus mutans* ($0,6 \times 10^3$ CFU/mL).

3.2.6 Formação de biofilme misto sobre os fragmentos dentários

Após esterilização dos fragmentos dentários com óxido de etileno (Bioxxi, Brasil), os mesmos foram fixados em uma placa de poliestireno contendo 24 poços (TPP, Zellkultur Testplatte 24 F) pela adição de 400 mL de agar a 2% (Noble agar, Difco, USA). Após o endurecimento do agar, adicionou-se, em cada poço, o meio de cultura (BHI, Difco, 1485 µL/poço) já contendo o inóculo (15 µL/poço).

Este sistema foi incubado em condições de microaerofilia por 10 dias a 37 °C, a fim de que biofilme misto fosse formado sobre tais fragmentos dentários.

3.2.7 Tratamento do biofilme

Após o biofilme misto se formar na superfície do esmalte, 3 tipos distintos de tratamento foram aplicados sobre ele: (1) 50 µL do extrato de *C. canephora* (20%); (2) 50 µL de clorexidina (0,12%) – controle positivo e (3) 50 µL de água Milli-Q – controle negativo. Cada grupo de seis fragmentos recebeu um tipo de tratamento, que foi realizado uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, durante uma semana. Seis outros fragmentos não receberam nenhum tipo de tratamento, o que representou o controle branco.

Antes de os fragmentos serem tratados, removeu-se o meio de cultura

do interior dos poços delicadamente com auxílio de uma pipeta. Em seguida, os espécimes receberam o tratamento por um minuto e, após este período, procedeu-se à lavagem. Para tal, utilizou-se, por 2 vezes, 1500 µL de água de injeção (pH neutro). Após o término da lavagem, um novo meio de cultura (BHI, 1500 µL), sem o inóculo, foi adicionado em cada poço. O sistema placa/fragmentos/biofilme foi novamente incubado em microaerofilia até o dia seguinte ao do tratamento, e assim, sucessivamente até completar uma semana.

3.2.8 Avaliação do pH do biofilme

Após o sétimo dia de tratamento, identificou-se o pH do biofilme formado sobre as superfícies dos fragmentos dentários com o auxílio de um microeletrodo (NMPH3 Beetrode, World Precision Instruments, USA) conectado a um pH metro (DM20 Digimed, Santo Amaro, SP, Brazil) e a um eletrodo de referência (DRIREF-2SH Beetrode, World Precision Instruments).

Uma seleção aleatória de três fragmentos que foram submetidos ao mesmo tratamento foi realizada. Mensurou-se o pH em dois momentos: imediatamente e 5 minutos após o último tratamento.

3.2.9 Ensaio de Microdureza Transversal

Após a medição do pH do biofilme, os fragmentos foram novamente cortados com auxílio da cortadeira de alta precisão, resultando em duas metades. Em seguida, uma dessas partes dentárias foi incluída em uma base cilíndrica, permanecendo a superfície dentária exposta para ser polida e posteriormente avaliada.

A dureza transversal do esmalte decíduo foi aferida através de um indentador Knoop acoplado em um microdurômetro (HVS-1000, Time Group Inc., China), utilizando uma carga de 25 gramas por 10 segundos. Duas sequências de 14 identações, separadas entre si a uma distância de 150 μm , foram realizadas nas seguintes profundidades: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 200 e 300 μm , tendo como referência a superfície do esmalte seguindo em direção à junção-amelo-dentinária (figura 1).

Todas as indentações previamente relatadas foram realizadas tanto nas áreas expostas ao biofilme misto, como nas áreas não expostas ao biofilme (áreas protegidas pelo verniz de unha – controle), caracterizando uma análise pareada, totalizando seis corpos de prova de cada tratamento submetidos ao teste de dureza.

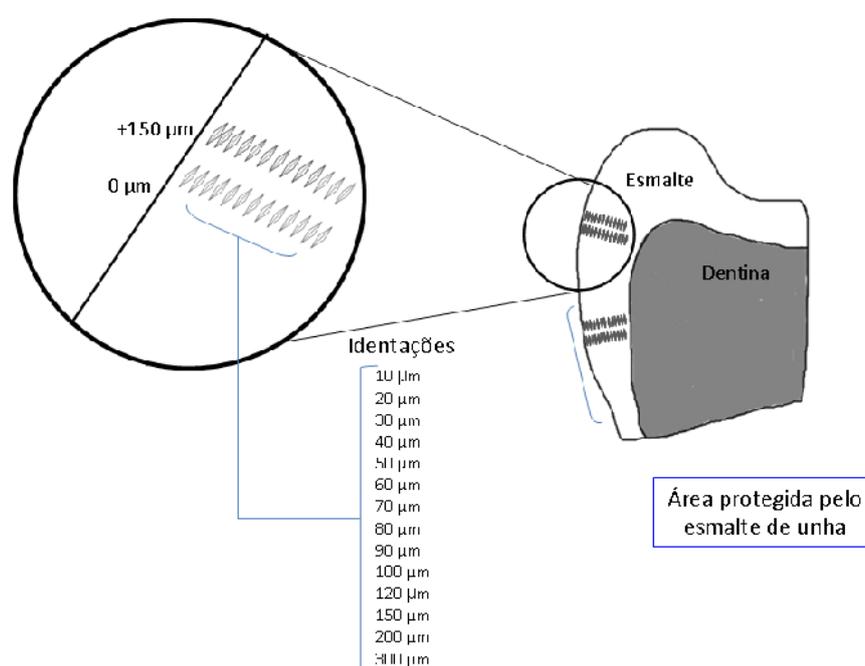


Figura 1: Desenho esquemático das sequências de identações em diferentes profundidades, tanto na área exposta ao biofilme, como na área protegida

3.2.10 Análise do conteúdo mineral do Extrato de *C. canephora*

Analisou-se o conteúdo mineral (Zinco, Estrôncio, Silício, Enxofre, Fósforo, Sódio, Manganês, Magnésio, Potássio, Ferro, Cobre, Cálcio, Bário, Boro e Alumínio) tanto do extrato de *C. canephora* (20 %) como do meio de cultura em que os fragmentos foram imersos.

Este experimento foi realizado em duplicata através de um espectrofotômetro de absorção atômica (Analyst 300 – Perkin Elmer, Germany).

3.2.11 Análise estatística dos dados

Os resultados dessa 2ª fase do estudo foram também armazenados no SPSS, porém versão 17.0. Através do teste de Kruskal-Wallis, compararam-se as diversas substâncias testadas nos ensaios de curva de morte bacteriana e também identificou-se se houve diferença entre elas no experimento que avaliou o pH do biofilme.

Para avaliar a significância estatística dos valores de dureza, utilizou-se o ANOVA seguido do teste de Tukey. Para todas as análises considerou-se um nível de significância de 5%.

4 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

Artigo 1: Species, Roasting Degree and Decaffeination Influence the Antibacterial Activity of Coffee against *Streptococcus mutans*

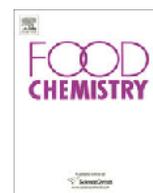
Artigo 2: Inhibitory properties of *Coffea canephora* extract against oral bacteria and its demineralization effect on deciduous teeth

café a 20%



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Species, roasting degree and decaffeination influence the antibacterial activity of coffee against *Streptococcus mutans*

Andréa G. Antonio^a, Renata S. Moraes^a, Daniel Perrone^b, Lucianne C. Maia^a,
Kátia Regina N. Santos^c, Natália L.P. Iório^c, Adriana Farah^{b,*}

^a Departamento de Odontopediatria e Ortodontia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, RJ 21949-900, Brazil

^b Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, RJ 21949-900, Brazil

^c Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, RJ 21949-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 January 2009

Received in revised form 15 May 2009

Accepted 21 May 2009

Keywords:

Coffee
Antibacterial activity
Biofilm
Anticariogenic activity
Streptococcus mutans
Chlorogenic acid
Trigonelline
Caffeine

ABSTRACT

Coffee beverage has been associated with antibacterial activity against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. This study aimed at identifying natural compounds in coffee that contribute to such activity and investigate the influence of species, roasting and decaffeination on it. Coffee chemical compounds and aqueous extracts of green and roasted regular and decaffeinated *Coffea arabica* and *Coffea canephora* beans were tested. MIC, biofilm inhibition and biofilm reduction results were correlated with the concentration of coffee compounds in the extracts. 5-Caffeoylquinic acid, trigonelline and caffeic acid solutions showed bacteriostatic activity (MIC = 0.8 mg/mL). Lighter and regular extracts showed higher inhibitory activity than darker and decaffeinated extracts, with an inverse correlation between bacterial colony-forming units and roasting degree. Only regular *C. canephora* extracts showed biofilm formation inhibition. The joint effect of chlorogenic acids, trigonelline and caffeine or other compounds removed by decaffeination seems to be one of the causes for coffee antibacterial activity against *S. mutans*.

© 2009 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Streptococcus mutans is a Gram-positive bacterium considered to be the major causative agent of dental caries in humans (Smith, 2002). These bacteria are able to synthesise water-insoluble glucans from sucrose, which mediate their adherence on teeth surfaces and contribute to the formation of dental biofilms. The biofilm formation is vital for the progression of dental caries and thus, inhibition of this factor is one of the strategies currently used to prevent this disease (Xiao, Zhou, Feng, Hao, & Li, 2007). In this way, researchers have dedicated themselves to the study of natural products – or their chemical constituents – that offer a certain degree of protection against bacterial growth and biofilm formation (Osawa et al., 2001; Thimothe, Bonsi, Padilla-Zakour, & Koo, 2007).

Coffee is one of the most popular and widely consumed beverages throughout the world. Recently, the scientific and popular interest concerning its effects on health has increased due to beneficial pharmacological properties demonstrated in clinical and epidemiological studies such as anti-inflammatory, antifungal and hypoglycaemic (Johnston, Clifford, & Morgan, 2003; Kendrick

& Day, 2007; Ohshima, Miyakawa, Watanabe, & Ohyama, 2003; Rosengren, Dotevall, Wilhelmsen, Thelle, & Johansson, 2004). The *in vitro* antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria has also been reported (Almeida, Farah, Silva, Nunan, & Glória, 2006; Almeida, Naghetini, Santos, & Glória, 2004; Daglia, Cuzzoni, & Dacarro, 1994; Daglia, Papetti, Dacarro, & Gazzani, 1998; Daglia et al., 2007). This activity seems to change according to the chemical composition of coffee (Daglia et al., 1998), which may be influenced by species and processing such as roasting and decaffeination (Farah, de Paulis, Moreira, Trugo, & Martin, 2006; Farah, de Paulis, Trugo, & Martin, 2005). According to Daglia et al. (1998), the greatest activity against *Staphylococcus aureus* and *S. mutans* was observed in fractions containing compounds with low molecular weight (<200 Da) and weak acidic properties. In a later study (Daglia et al., 2007), it was stated that minor compounds in roasted coffee such as glyoxal, methylglyoxal and diacetyl were the main agents responsible for the inhibitory effect against the growth of oral streptococci and that this activity was enhanced in the presence of caffeine. Moreover, in both studies the authors believed that naturally occurring compounds did not explain the antibacterial activity of coffee because the tested green coffee extract did not exert activity against such microorganisms. However, the presence of a large amount of sucrose in green coffee

* Corresponding author. Tel./fax: +55 21 2562 8213.

E-mail address: afarah@iq.ufrj.br (A. Farah).

extracts (~6–10% of coffee composition) but not in roasted (~0.01% of coffee composition) (Farah, Monteiro, Calado, Franca, & Trugo, 2006) was not considered. Furthermore, a few natural active substances in coffee of low molecular weight such as trigonelline, caffeic acid and 5-caffeoylquinic acid (139, 180 and 354 Da, respectively) have shown activity against the growth of *Legionella pneumophila* (Furuhata, Dogasaki, Hara, & Fukuyama, 2002), Enterobacteria (Almeida et al., 2006) and *S. mutans* (Almeida et al., 2004).

In view of existing contradictory results and of the persistent need for new strategies for caries control, the aim of the present study was to verify if natural coffee compounds contribute to the antibacterial activity against *S. mutans*, correlating results of minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), biofilm inhibition concentration and biofilm reduction concentration assays with the concentration of major bioactive compounds in various coffee extracts with different chemical composition. Additionally, this study aimed at investigating the effect of species, decaffeination and roasting on such antibacterial effect.

2. Materials and methods

2.1. Coffee chemical compounds

5-Caffeoylquinic acid (chlorogenic acid, 5-CQA), caffeic acid, ferulic acid, trigonelline, nicotinic acid and caffeine (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) solutions at 1 mg/mL were prepared using Milli-Q purified water (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). All standard solutions were filtered through sterile filter paper discs (TPP, 0.22 µm membrane, Zurich, Switzerland) prior to microbiological tests.

2.2. Coffee samples and aqueous extracts

Regular *C. arabica* cv. Yellow Bourbon and *C. canephora* cv. Conillon beans were harvested, respectively, in Minas Gerais and Espírito Santo, Brazil (Group 1). One blend of *C. arabica* harvested in São Paulo and a second sample of *C. canephora* cv. Conillon harvested in Espírito Santo were used in both regular and decaffeinated forms (Group 2). Decaffeination was performed using water and dichloromethane (Cocam, Brazil). Samples from Group 2 were of inferior quality comparing to those of Group 1.

Samples were roasted in a commercial spouted bed roaster (I-Roast, Gurnee, IL, USA), operating at a maximum temperature of 220 °C, for 6, 7, 8, 13 and 15 min. The Roast Colour Classification system (Agtron-SCAA, Reno, NV; 1995), the percent weight loss values on a wet basis (Farah et al., 2005, 2006) and the instrumental colour (Colourgap 1A, Leogap-Probat, Brazil) were used as tools for roasting degree determination. Green and roasted coffee beans were ground in a laboratory-scale mill to pass through a 0.46 mm sieve.

Coffee extracts at 10% were obtained by a coffee brewing procedure commonly used in Brazil, percolating 100 mL of pre-boiling (95 °C) Milli-Q purified water through 10 g of green or roasted coffee samples. The extracts were filtered through Whatman #1 qualitative filter paper (Whatman, Maidstone, UK). Prior to microbiological tests, all coffee extracts were re-filtered through sterile filter papers (TPP, 0.22 µm membrane) and aliquots of the filtered extracts were reserved for chromatographic analyses.

2.3. Chemical characterisation of coffee extracts

The pH of the extracts was obtained by means of a pH metre (DM20 Digimed, Santo Amaro, SP, Brazil). The contents of caffeic,

ferulic and chlorogenic acids (3-, 4- and 5-caffeoylquinic acids – 3-, 4- and 5-CQA; 3-, 4- and 5-feruloylquinic acids – 3-, 4- and 5-FQA; 3-, 4- and 5-coumaroylquinic acids – 3-, 4- and 5-CoQA; 3,4-, 3,5- and 4,5-dicaffeoylquinic acids – 3,4-, 3,5- and 4,5-diCQA; caffeoylferuloylquinic acids – CFQA), their respective 1,5-quinolactones (3- and 4-caffeoylquinide – 3- and 4-CQL; 3- and 4-feruloylquinide – 3- and 4-FQL; 3,4-dicaffeoylquinide – 3,4-diCQL) were determined by gradient LC–DAD–ESI–MS according to Farah et al. (2006), using a Magic C30 column (150 × 2.0 mm, 5 µm, 100 Å, Michrom Bioresources, Inc., Auburn, CA). The contents of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose were determined by LC–ESI–MS according to Perrone, Donangelo, and Farah (2008), using a Spherisorb® S5 ODS2 Microbore column (150 × 2.0 mm, 5 µm, Waters, Milford, MA, USA). The LC equipment (Shimadzu, Kyoto, Japan) comprised a LC-10ADvp quaternary pump, a CTO-10ASvp column oven, an 8125 manual injector (Rheodyne) with a 5 µL loop and a SPD-M10Avp diode array detector. This LC system was interfaced with a LC–MS 2010 mass spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan).

For sample clarification prior to the chromatographic analyses of phenolic compounds, 500 µL of each coffee extract were mixed with 500 µL of each Carrez solution and the volume was made up to 50 mL with Milli-Q water. For the determination of trigonelline, nicotinic acid, caffeine and sucrose Carrez solutions were replaced by 1 mL of saturated basic lead acetate solution (Farah et al., 2006). The mixtures were shaken, let rest for 10 min and filtered through a Whatman #1 qualitative filter paper and a 0.22 µm membrane (Millipore). The filtrates were used directly for chromatography. Chemical analyses were performed in triplicate.

2.4. Bacterial strains and culture

The bacterial strain used was from the American Type Culture Collection (ATCC): *S. mutans* ATCC 25175. Bacteria were kept at –20 °C in Tryptic Soy Broth [TSB] (Oxoid, Hampshire, England) with 20% glycerol and activated by transfer into blood agar, and incubation at 36.5 ± 1.0 °C, in anaerobic conditions, for 48 h in a candle jar. Bacterial cells were suspended, according to the McFarland protocol (1907), in saline solution to produce a suspension of about 1.5 × 10⁸ CFU/mL. Three-hundred microlitres of this suspension were mixed with 9.7 mL of Mueller–Hinton bacterial broth medium (Difco, Sparks, USA), resulting in an inoculum with 4–5 × 10⁶ CFU/mL.

2.5. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) determination

MIC was evaluated by the dilution method in Mueller–Hinton broth medium (Difco) according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS) guidelines (NCCLS, 2003), with concentrations ranging from 1 to 10 mg/mL of the 10% coffee extracts. The concentrations varied from 1 to 1000 µg/mL for the standard solutions. The inoculum was added to each tube and the MIC value was evaluated after 24 h of incubation at 36.5 ± 1.0 °C, as the lowest concentration that completely inhibited the formation of visible growth. The MBC determination was used to assess if the inhibitory effect observed in MIC determinations was through a lethal (bactericidal) action. Samples from tubes where the MIC results showed no bacterial growth were removed with a loop, inoculated onto a blood agar plate, and incubated at 36.5 ± 1.0 °C, for 48 h in a candle jar. MBC was considered to be the concentration at which microorganisms were totally unable to grow. In the cases where the referred samples showed no bactericidal activity, the number of colonies formed (colony-forming units – CFU) on that plate was calculated at the inhibitory concentrations (no presence of turbidity). The controls included an inocu-

lated Mueller–Hinton broth medium (Difco) without the test compounds. Experiments were performed three times in duplicate.

2.6. Ethanol test

Based on the fact that ethanol has been used as a vehicle for chemical compounds or as an extraction solvent for plant extracts in various antibacterial studies (Almeida et al., 2004; Dall'Agnol et al., 2003; Xiao et al., 2007), and in order to choose a solution vehicle eliminating the possibility of false-positive results, ethanol alone was tested – in replacement of standard solution or coffee extracts – for *S. mutans* growth inhibition. HPLC grade ethanol (0.4 mL) (Tedia, Brazil) at 5%, 10% and 20% was added to test tubes containing 3.6 mL inoculated Mueller–Hinton broth medium. Experiment was performed in duplicate.

2.7. Sucrose supplemented medium test

The *S. mutans* inoculum was made as described above in Section 2.4. Three-hundred microlitres of the inoculum were transferred to two test tubes, one containing only 9.7 mL of Mueller–Hinton broth medium (control) and one containing the same amount of medium supplemented with 5.06 mg of sucrose. After incubation at 36.5 ± 1 °C for 6 h, diluted samples from the tubes were inoculated onto a blood agar plate and incubated at the same temperature for 48 h in a candle jar. The number of CFU was calculated. The experiment was performed in duplicate.

2.8. Biofilm susceptibility assay

The standard solutions and extracts showing better performance in relation to the cell-growth inhibition (MIC and MBC results) were selected for this assay. All 6 min roasted coffee extracts were tested. The effect of 5-CQA, trigonelline and selected extracts on *S. mutans* biofilm formation was examined by microdilution method. Twofold serial dilutions of extracts were prepared in 96-well polystyrene tissue culture plates (TPP, Zellkultur Testplatte 96 F) containing brain–heart infusion growth supplemented with 2% sucrose (BHIS, Difco, 200 µL/well) with final concentrations of 1.25, 2.5, 5.0, 50 and 90 mg/mL of the 10% selected coffee extracts. The selected standard solutions were tested at the concentration of 0.8 mg/mL. Chlorhexidine (0.05%, w/v) was used as the positive control; the medium without the tested agents was used as the non-treated control and the medium alone as the blank control. Aliquots (20 µL) of *S. mutans* ATCC 25175 cell suspension (final concentration of cells 5×10^7 CFU/mL) were inoculated in the wells of the polystyrene tissue culture plate except in the wells with the cell culture media alone as the blank control. After incubation in an anaerobic incubator (10% CO₂, 80% N₂, 10% H₂, 37 °C, 24 h), absorbance at 570 nm was recorded to assess the culture growth. Culture supernatants from each well were then decanted and planktonic cells were removed by washing with PBS, pH 7.2. The biofilm was air-dried (room temperature), stained (1 h) with 0.1% (w/v) Crystal Violet (Sigma) and rinsed thoroughly with water until control wells appeared colourless. Biofilm formation was quantified by the addition of 200 µL of 80% ethanol and 20% acetone to each Crystal Violet-stained well. The absorbance at 570 nm (A_{570}) was determined using a microplate reader (model 550 – Bio Rade Microplate Reader, Marnes – La-Coquette, France). The percentage of inhibition was calculated using the equation $(1 - A_{570} \text{ of the test} / A_{570} \text{ of non-treated control}) \times 100$ (Wei, Campagna, & Bobek, 2006).

To examine the effects of the selected chemical compounds and coffee extracts, *S. mutans* ATCC 25175 cells (20 µL aliquots of 5×10^7 CFU/mL) were inoculated into the wells of a polystyrene microtitre plate containing BHIS at a volume of 200 µL/well. Fol-

lowing incubation in an anaerobic incubator (10% CO₂, 80% N₂, 10% H₂, 37 °C, 24 h), the culture supernatant from each well was decanted and planktonic cells were removed by washing with PBS. BHIS containing the test samples, prepared in another microtitre plate, was then transferred to the one-day biofilm plate, and the plates were further incubated at 37 °C for 24 h under anaerobic conditions. Following, the cell growth was assessed by measurement of the absorbance at 570 nm, and the biofilm was fixed, stained and quantified as described above. The biofilm assays were performed in quadruplicate.

2.9. Statistical analysis

The association between chemical composition and number of colonies formed on the plate surface results was investigated using Pearson correlation analysis. CFU and biofilm results were analysed using Student's *t* test. SSPS software, version 11.0 was used for all statistical analysis. A 5% significance level was considered.

3. Results and discussion

In the present study, six bioactive compounds and 36 coffee extracts with distinct chemical composition were tested for *S. mutans* growth inhibition. For those compounds and coffee extracts showing growth inhibition in any of the tested concentrations, MIC was determined. Additionally, the coffee extracts showing the best performances in these assays were tested for biofilm inhibition and reduction.

3.1. Ethanol test

All tubes containing ethanol inhibited the growth of *S. mutans*, compared to the control with Milli-Q purified water. Therefore, for the evaluation of antibacterial activity Milli-Q water was chosen as the vehicle for selected chemical compounds and for coffee extracts preparation.

3.2. Selected coffee compounds

5-CQA, caffeic acid and trigonelline were able to inhibit the growth of *S. mutans*, with MIC of 0.8 mg/mL (bacteriostatic activity). No bactericidal activity was observed at this concentration. Nicotinic acid, caffeine and ferulic acid did not show bacteriostatic activity against *S. mutans* at tested concentrations. Although it is possible that at higher concentrations nicotinic acid, caffeine and ferulic acid would show bacteriostatic activity and 5-CQA, caffeic acid and trigonelline would show bactericidal activity, this test was not performed because we opted for testing concentrations that would mimic those found in coffee or other food sources.

The number of CFU from the tube containing trigonelline (0.1×10^2) was significantly lower than those containing 5-CQA and caffeic acid (0.3×10^2 and 0.5×10^2 , respectively) ($p < 0.01$), evidencing a stronger antibacterial activity of trigonelline against *S. mutans* compared with those of the tested phenolic compounds. Among the phenolic compounds, 5-CQA showed the highest inhibitory performance. These results are in accordance with previous studies investigating the antibacterial activity of coffee compounds against *S. mutans* and other bacteria (Almeida et al., 2004; Almeida et al., 2006; Furuhashi et al., 2002). Furuhashi et al. (2002) reported antibacterial activity of caffeic and 5-CQA against a strain of *L. pneumophila*, while Almeida et al. (2006), Almeida et al. (2004) described antibacterial effects of trigonelline, 5-CQA and caffeic acid on the growth of Enterobacteria and *S. mutans*, respectively, using the agar diffusion method. To our knowledge, the antibacterial activity of ferulic and nicotinic acids against *S. mutans* had not been

tested until the present study. Despite the inhibitory effect of 5-CQA and trigonelline on *S. mutans* cell-growth, these compounds did not exert inhibition or reduction of the bacteria biofilm formation at the tested concentration (correspondent to MIC result). This is not surprising, given that biofilm is less susceptible to antimicrobial agents compared with planktonic cells (Wei et al., 2006).

The colour characterisation, percent weight loss on a wet basis during roasting and pH of the tested coffee extracts from Groups 1 and 2 are presented in Table 1. Sucrose, caffeine, trigonelline and nicotinic acid concentrations in the coffee extracts are presented in Table 2. Phenolic compounds concentrations are presented in Table 3.

3.3. Coffee extracts from Group 1

In Group 1 regular coffee samples of different species (*C. arabica* cv. Yellow Bourbon and *C. canephora* cv. Conillon) were tested be-

Table 1

Roasting time and degree, instrumental colour, percent weight loss on a wet basis during roasting and pH of coffee samples from Groups 1 and 2.

Roasting time (min)	Roasting degree	Colour ^a	Weight loss (%)	pH ^b
<i>C. canephora</i> (Group 1)				
–	Green	>200	0.0	5.3
6	Very light	172	13.5	4.9
7	Very light	150	14.8	5.1
8	Moderately light	100	16.4	5.1
13	Moderately dark	72	21.9	5.2
15	Dark	59	25.2	5.2
<i>C. arabica</i> (Group 1)				
–	Green	>200	0.0	6.0
6	Moderately light	104	15.1	5.0
7	Moderately dark	68	17.8	5.2
8	Dark	60	20.1	5.3
13	Very dark	40	24.8	5.5
15	Very dark	40	26.2	5.6
<i>C. canephora</i> (Group 2)				
–	Green	>200	0.0	5.1
6	Very light	196	12.6	5.3
7	Very light	140	14.0	5.5
8	Medium	88	16.9	5.7
13	Moderately dark	62	23.4	5.9
15	Dark	47	23.7	6.0
<i>C. arabica</i> (Group 2)				
–	Green	>200	0.0	5.6
6	Very light	172	12.3	5.3
7	Light	134	14.1	5.6
8	Moderately Light	111	15.2	5.7
13	Moderately dark	65	20.9	5.8
15	Dark	58	21.4	5.9
Decaffeinated <i>C. canephora</i> (Group 2)				
–	Green	>200	0.0	5.0
6	Very light	187	10.3	5.3
7	Very light	144	12.1	5.5
8	Light	134	12.3	5.5
13	Moderately light	107	14.0	5.7
15	Light medium	93	15.5	5.8
Decaffeinated <i>C. arabica</i> (Group 2)				
–	Green	>200	0.0	5.0
6	Very light	198	9.2	5.1
7	Very light	164	10.2	5.3
8	Very light	162	10.8	5.5
13	Light medium	96	14.9	5.7
15	Medium	81	16.2	5.8

^a Measured by luminosity degree. Results are means of determinations in triplicate.

^b Means of determinations in duplicate.

Table 2

Sucrose, caffeine, trigonelline and nicotinic acid contents in green and roasted coffee extracts from Groups 1 and 2.^a

Roasting time (min)	Sucrose	Caffeine	Trigonelline	Nicotinic acid
<i>C. canephora</i> (Group 1)				
–	4770.1	1031.2	698.7	ND ^b
6	74.7	1111.1	536.3	8.8
7	35.3	1100.2	430.0	13.1
8	20.5	997.2	317.0	18.9
13	11.1	971.1	72.0	24.2
15	12.4	955.8	24.3	23.6
<i>C. arabica</i> (Group 1)				
–	10213.7	513.6	850.5	ND ^b
6	112.3	540.2	641.3	6.5
7	41.8	519.2	320.6	18.3
8	31.2	496.7	169.1	20.2
13	21.2	413.6	25.9	19.2
15	20.2	387.2	10.3	16.8
<i>C. canephora</i> (Group 2)				
–	4086.7	666.7	557.9	ND ^b
6	424.2	759.6	508.2	2.9
7	122.2	730.1	456.1	6.3
8	37.3	750.6	226.1	14.0
13	24.4	719.7	23.4	21.0
15	21.0	599.4	23.5	18.5
<i>C. arabica</i> (Group 2)				
–	4603.8	357.1	958.8	ND ^b
6	725.7	485.9	652.9	5.0
7	228.9	476.2	523.3	11.7
8	61.7	505.4	335.4	39.8
13	27.6	524.6	28.3	32.6
15	20.6	536.9	21.1	33.4
Decaffeinated <i>C. canephora</i> (Group 2)				
–	2451.1	18.4	712.3	ND ^b
6	273.0	20.9	687.6	3.7
7	98.5	18.2	578.8	8.6
8	82.2	17.9	520.0	8.4
13	38.2	17.1	386.0	13.2
15	39.1	13.9	237.7	21.7
Decaffeinated <i>C. arabica</i> (Group 2)				
–	4002.5	16.0	1001.2	ND ^b
6	1116.6	14.6	852.3	2.2
7	475.4	14.5	803.5	4.0
8	331.1	16.4	774.2	5.4
13	52.8	13.1	404.1	15.6
15	47.2	13.2	198.2	30.1

^a Results are shown as mean of triplicate of analysis, expressed in µg/mL. Analyses' coefficient of variation was <5%.

^b ND = not detected.

fore and after 6, 7, 8, 13 and 15 min of roasting. Both species inhibited *S. mutans* growth when roasted for 6, 7 and 8 min, with MIC of 5.0 mg/mL. The extracts obtained from green beans and at 13 and 15 min of roasting did not show inhibitory activity at tested concentrations. Inoculation of positive tubes onto a blood agar plate showed that at tested concentrations (5 and 10 mg/mL), the lighter the roasting degree the higher was the inhibitory activity (Table 4). Daglia et al. (1998) observed higher antibacterial activity in acidic fractions of coffee extracts. In our study, samples showing higher inhibitory activity (lighter samples) also showed lower pH compared to darker samples (Table 1).

Our MIC results are also in agreement with those obtained in the tests with isolated compounds. Trigonelline and 5-CQA are thermo-labile compounds and therefore the darker the roasting degree the lower their concentration (Tables 2 and 3). Trigonelline is a *N*-methyl-betaine (Farah et al., 2006) and 5-CQA is an ester of caffeic acid with quinic acid (Farah et al., 2006). During roasting, trigonelline is demethylated to form nicotinic acid or degraded into low molecular weight compounds (Farah et al., 2006), while chlorogenic acids may be isomerised, epimerised, lactonised and also degraded to low molecular weight compounds (Farah et al., 2006).

Table 3
Contents of cinnamic acid derivatives in green and roasted coffee extracts from Groups 1 and 2.^{a,b,c}

Roasting time	CA	5-CQA	Total CQA	Total FQA	Total <i>p</i> -CoQA	Total diCQA	CFQA	Total CGA	Total CQL	Total FQL	3,4-diCQL	Total CGL
<i>C. canephora</i> (Group 1)												
–	3.8	3588.9	5804	423.2	40.9	642.6	116.1	7026.8	ND	ND	ND	ND
6	ND	946.3	2048.5	254.7	42.1	84.4	21.7	2451.6	242.3	44.9	1.9	289.1
7	ND	514.1	1161.5	185.5	28	30.8	11.6	1417.5	160	36.9	1.0	199.4
8	ND	218.1	499.5	101.2	17.3	10.3	5.4	633.8	81	24.1	0.3	106.8
13	ND	18.2	40.2	18.7	10.8	0.5	ND	59.4	9.2	6.6	ND	15.4
15	ND	7.2	16	6.8	ND	0.4	ND	23.2	6	2.7	ND	5.4
<i>C. arabica</i> (Group 1)												
–	2.7	2132.5	2770.1	254.8	71.7	93.1	13.2	3202.9	ND	ND	ND	ND
6	ND	727.0	1674.9	159.5	56	31.2	3.6	1925.2	66.2	8.7	ND	74.9
7	ND	224.2	557	52.8	23.7	7.1	ND	640.5	40.8	5.3	ND	46.1
8	ND	92.7	235.7	30.3	13.8	3.4	ND	283.2	19.8	1.4	ND	21.2
13	ND	8.9	22	5.2	1.5	ND	ND	28.7	3.3	ND	ND	3.3
15	ND	5.9	15.1	3.3	0.6	ND	ND	19.1	2.9	ND	ND	2.9
<i>C. canephora</i> (Group 2)												
–	4.0	1527.5	2489.6	476.7	44	96.7	37.2	3143.9	ND	ND	5.4	5.4
6	ND	1118.6	2340	315.1	25.1	143.1	63.0	2886.3	151.2	31.9	1.4	184.5
7	ND	853.4	1894	299.1	29.5	63.4	31.9	2317.9	207.9	44.9	41.0	293.8
8	ND	220.1	521.2	135.6	18.7	11.9	4.9	692.3	91	30	ND	130.5
13	ND	6.8	17.4	7.2	ND	1.1	2.1	27.8	10.0	2.1	ND	12.1
15	ND	11.0	24.6	15.9	ND	ND	ND	40.6	2.2	2.9	ND	5.1
<i>C. arabica</i> (Group 2)												
–	2.9	1499.9	2527.2	252.4	67.5	114.4	25.6	2987.1	ND	ND	ND	ND
6	ND	1098.4	2402.1	168.8	63.7	86.1	17.4	2738.2	152.1	15.5	1.9	169.5
7	ND	709.7	1605.1	122.4	48	43	8.3	1826.9	132.0	18.4	0.4	150.8
8	ND	429.1	1003.4	78.8	40.2	21.2	4.6	1148.1	110.1	14.1	0.2	124.4
13	ND	10.6	27.9	4.3	1	2.1	3.1	38.4	11.5	ND	ND	11.5
15	ND	15.0	33.7	6.3	0.9	3	8.0	51.9	6.6	3.0	ND	9.6
Decaffeinated <i>C. canephora</i> (Group 2)												
–	5.5	1678.1	4283.6	672.1	40	275.3	123.6	5394.8	10.6	5.1	6.7	22.4
6	ND	1470.3	3192.9	556.1	50	110.6	64.2	3973.7	290.2	67.5	3.4	361.1
7	ND	692.8	1542.5	309.9	35	44.1	24.2	1955.8	178.9	50.1	2.3	231.3
8	ND	608.4	1363.3	284.2	32.8	37.6	22.2	1740.2	155.3	38.5	1.0	194.8
13	ND	185.6	445.3	104.2	10.4	18.5	5.4	583.8	64.0	21.2	ND	85.2
15	ND	75.2	175.2	52.6	4.9	3.8	3.6	240.2	18.6	9	ND	27.6
Decaffeinated <i>C. arabica</i> (Group 2)												
–	3.3	2359.2	6075.3	839.1	78.8	410.5	131.7	7535.2	5.4	7.3	8.4	21.2
6	ND	2188.6	4956.3	650.3	64.8	200.7	72.2	5944.2	242.9	42.7	6.2	291.8
7	ND	2010.4	4356.6	565.2	68.3	180.6	66.6	5237.3	370.4	81.1	3.8	455.3
8	ND	1479.8	3222.5	440.6	64.4	118.8	48.1	3894.4	275.9	52.3	4.5	332.7
13	ND	148.6	365	58.3	28.8	13.9	31.5	497.5	94.0	28.4	ND	122.4
15	ND	76.4	180.4	47.1	11.1	3.6	2.1	244.3	21.9	7.6	ND	29.5

^a Results are shown as mean of triplicate of analysis, expressed in µg/mL. Analyses' coefficient of variation was <5%.

^b No ferulic acid was observed in any of the analysed samples from both groups.

^c CA, caffeic acid; CQA, cafeoylquinic acids; FQA, feruloylquinic acids; *p*-CoQA, *p*-coumaruloylquinic acids; diCQA, dicaffeoylquinic acids; CFQA, cafeoylferuloylquinic acids; CGA, chlorogenic acids; CQL, caffeoylquinide; FQL, feruloylquinide; diCQL, dicaffeoylquinide; CGL, chlorogenic acids lactones.

Like 5-CQA, other CQA and diCQA isomers are also formed from caffeic and quinic acid, and it is very possible that all these compounds, which together are responsible for more than 90% of the chlorogenic acids content in the coffee extracts, exert antibacterial activity. On the other hand, since ferulic acid did not show activity against *S. mutans*, it is possible that feruloylquinic acids and their lactones do not exert such activity. The mechanisms of growth inhibition of chlorogenic acids and trigonelline are not clear, but according to Cowan (1999) the causes for phenolic toxicity to microorganisms may include enzymatic inhibition by oxidised compounds, possibly through reaction with sulfidryl groups or also through more nonspecific interactions with proteins.

Although the contents of 5-CQA and trigonelline in the coffee extracts were similar to those of the standard solutions with bacteriostatic activity (Tables 2 and 3), other non-bacteriostatic compounds such as polysaccharides and aminoacids that are also part of coffee composition may have contributed to increase the MIC of coffee extract compared to those of the isolated compounds.

Despite caffeic acid inhibitory activity, the amount of this phenolic acid in its non-esterified form in coffee is generally very low,

especially in the roasted beans (Farah et al., 2005). In the present study, we only identified caffeic acid in the green coffee extracts (Table 3). Although the high concentrations of chlorogenic acids, trigonelline and caffeic acid were found in the green coffee extracts (4.0 and 7.0 mg/mL altogether in *C. arabica* and *C. canephora*, respectively) (Tables 2 and 3), sucrose concentration in these extracts was quite high (10.2 and 4.8 mg/mL, respectively), being equivalent to 2.6 and 0.7 times those of the sum of the tested antibacterial compounds in *C. arabica* and *C. canephora*, respectively (Table 2). The majority of the oral microbiota depends on sugar as energy source (McNeill & Hamilton, 2004). Although glucose is the preferred sugar for bacterial growth, bacteria may use a large variety of sugars such as sucrose, maltose and lactose as alternative sources of energy (Wen, Browngardt, & Burne, 2001). Therefore, it is most likely that sucrose has promoted the growth of the referred bacteria, counteracting the inhibitory effect of trigonelline and chlorogenic acids in the green coffee extracts.

The present results are in accordance with Daglia et al. (1998, 2007) who did not observe inhibitory activity in green coffee extracts. However, one of these studies (Daglia et al., 2007) reported

Table 4
Number of colony-forming units (CFU) for coffee extracts from Group 1 (G1) and Group 2 (G2) with inhibitory activity against *Streptococcus mutans*.

Roasting time (min)	Concentration (mg/mL)	CFU ^a
<i>C. canephora</i> (G1)		
6	10	1.85
	5	2.48
7	10	2.28
	5	2.90
8	10	3.04
	5	2.31
<i>C. arabica</i> (G1)		
6	10	1.70
	5	2.36
7	10	2.20
	5	2.85
8	10	2.95
	5	3.26
Regular <i>C. canephora</i> (G2)		
6	10	2.26
	5	2.81
7	10	2.65
	5	3.18
8	10	3.00
	5	3.48
Regular <i>C. arabica</i> (G2)		
6	10	2.08
	5	2.78
7	10	2.60
	5	2.99
8	10	3.11
	5	3.30
Decaffeinated <i>C. canephora</i> (G2)		
6	10	2.38
	5	2.89
7	10	3.04
	5	3.97
Decaffeinated <i>C. arabica</i> (G2)		
6	10	2.36
	5	2.85
7	10	2.78
	5	3.96

^a Results are shown in log₁₀ scale for better comparison.

that due to the lack of antibacterial activity of green coffee, along with a positive activity of dark roasted coffee, the compounds with inhibitory activity could not be naturally present in coffee, being formed by Maillard reaction during roasting process. The study went further identifying α -dycarbonyl compounds as the main coffee agents with inhibitory activity (Daglia et al., 2007). Nevertheless, such compounds are present in very low concentrations in commonly consumed aqueous coffee extracts (Daglia et al., 2007). Furthermore, even though the medium roasted coffee extract evaluated by Daglia et al. (2007) was about six times more concentrated than the light roasted extracts (6 and 7 min of roasting) used in the present study, all extracts exhibited similar MIC results. This indicates that the antibacterial effect of the referred α -dycarbonyl compounds may be lower than those of natural coffee compounds such as 5-CQA, trigonelline, caffeic acid and possibly other compounds that are more abundant in lighter roasted coffees, although results from the present study and from Daglia et al. (2007) cannot be directly compared. This matter should be investigated in future studies.

In order to confirm our hypotheses that the high concentration of sucrose present in green coffee beans was counteracting the antibacterial effect of natural coffee compounds, we performed an additional experiment incubating the *S. mutans* inoculum in test tubes containing plain medium (control) or the same medium supplemented with sucrose. The concentration of sucrose used in this

test was similar to that found in the *C. canephora* sample from Group 1. The number of CFU from the control tube was 1.2×10^6 , while the number of CFU of the supplemented medium tube was 5.3×10^6 , 4.4 times higher than in non-supplemented media. This result increases evidence that sucrose may counteract the antibacterial effect of natural occurring compounds in green coffee beans.

Regarding differences between both investigated species, *C. arabica* cv. Yellow Bourbon extracts showed similar inhibitory activity on the growth of *S. mutans* when compared to *C. canephora* cv. Conillon. No significant difference was observed between the numbers of CFU of both species (Table 4). In the biofilm formation assays, however, while *C. arabica* cv. Yellow Bourbon extract did not inhibit the biofilm formation at tested concentrations, *C. canephora* cv. Conillon showed an inhibition of 39.6% (compared to 91.7% of the positive control chlorhexidine) at 90 mg/mL, a concentration similar to that commonly used in Brazil and other countries for coffee preparation (100 mg/mL). As far as we know, this is the first study evaluating the inhibitory activity of coffee on biofilm formation, but it is possible that the anti-adhesive property reported for coffee (Daglia et al., 2002) is related to this activity. Considering that the contribution of caffeine for the anti-adhesive property of coffee has previously been discarded (Daglia et al., 2002), the possible involvement of chlorogenic acids and their lactones in such activity should be investigated, since the amount of both classes of compounds in the active *C. canephora* extract (6 min roasted) was about 27% and 73% higher than in *C. arabica*, respectively.

Regarding the biofilm reduction assay, *C. canephora* extract of Group 1 showed a low biofilm viability reduction (6.6%) at 90 mg/mL (against 20.6% by chlorhexidine), while *C. arabica* did not show reduction at tested concentrations. The low reduction of mature biofilm when compared to the inhibition of biofilm formation was expected, since in a biofilm, bacteria are invariably less susceptible to antimicrobial agents than their planktonic counterparts (Wilson, 1996). Nonetheless, the inhibition of early biofilm formation is more important than the reduction of mature biofilm because once the formation of biofilm is inhibited, mature biofilm existence may be prevented.

3.4. Coffee extracts from Group 2

With the intention to confirm the results from Group 1 and because decaffeination process may considerably change coffee chemical composition (Farah et al., 2006; Toci, Farah, & Trugo, 2006), a group of green and roasted regular and decaffeinated *C. arabica* and *C. canephora* samples from the same lot was tested. As in Group 1, all regular coffee extracts roasted for 6, 7 and 8 min inhibited the growth of *S. mutans*, with a MIC of 5 mg/mL. No activity was observed in extracts roasted for 13 and 15 min. No significant difference was observed between the numbers of CFU of both species (Table 4). Also, as in Group 1, regular *C. canephora* showed biofilm formation inhibition (18.3% inhibition at 90 mg/mL), while regular *C. arabica* did not exhibit inhibitory activity at tested concentrations.

Only *C. arabica* and *C. canephora* extracts prepared from beans roasted for 6 and 7 min inhibited the bacterial growth (MIC of 5 mg/mL). Differently from the regular samples, extracts from decaffeinated beans roasted for 8 min did not show inhibitory activity. Additionally, none of the decaffeinated extracts inhibited the biofilm formation. Although in the present study caffeine alone did not exert inhibitory activity on the growth of *S. mutans*, studies performed by Daglia et al. (2007) and Almeida et al. (2004) observed that at concentrations of 5.0 and 2.0 mg/mL, respectively, caffeine provided antimicrobial activity against *S. mutans*. These authors also showed that caffeine was able to enhance the inhibi-

tory effect of coffee compounds. This could explain why decaffeinated coffee roasted for 8 min did not show inhibitory effect. Furthermore, other possibly inhibitory compounds may have been washed out by water and dichloromethane during decaffeination process. As in regular samples, a significant inverse correlation was found between roasting degree and inhibitory activity among decaffeinated samples (Table 4). Group 2 samples did not show biofilm reduction at tested concentrations.

Regular samples from Group 1 showed a tendency ($p = 0.08$) to exhibit better antibacterial performance than those from Group 2. Additionally, regular *C. canephora* samples from Group 1 showed better inhibitory performance of biofilm formation than those from Group 2. This could probably be explained by the inferior quality of samples from Group 2, which contained a higher number of fermented defective beans such as black and sour (Farah et al., 2006; Toci & Farah, 2008) possibly presenting unknown substances that could counteract the antibacterial effects of natural coffee components.

In conclusion, this study showed that 5-CQA, trigonelline, and caffeic acid from coffee exert inhibitory activity against the growth of *S. mutans*; that such activity is enhanced by the presence of caffeine and/or other compounds extracted by decaffeination; that *C. canephora* extracts seems to exert better performance in relation to inhibition of biofilm formation than those of *C. arabica* and that roasting degree is inversely associated with antibacterial activity against *S. mutans*.

Coffee is a natural ingredient that may be obtained in large quantities at low cost. Furthermore, the advantage of coffee as an antibacterial beverage is that it is consumed in a concentrated form (6–10%) as opposed to various medicinal infusions that have shown such effect *in vitro* and are usually consumed at 1–2% (Bravo, Goya, & Lecumberri, 2007). So, the fact that the coffee derived extract used in this study exhibited antibacterial activity against *S. mutans* cell-growth and against *S. mutans* biofilm formation supports the hypothesis that it may be highly beneficial as an anticariogenic ingredient, when consumed without sucrose addition. However, in the *in vivo* situation, *S. mutans* does not occur in monoculture, but rather in a complex ecosystem biofilm. As the *in vitro* tests employed in this study are essentially preliminary screenings, further investigation – especially *in vivo* – should be performed to verify the effect of regular light roasted *C. canephora* and *C. arabica* extracts and their components in the prevention of dental caries.

Acknowledgments

The authors would like to thank Professor José Mauro Costa Monteiro (Minas Gerais, Brazil) and Mr. Robert Machtans Junior from Cocam Cia. de Café Solúvel e Derivados (São Paulo, Brazil) for generously providing the coffee samples. The financial support of the National Council for Technological Development (CNPq), Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D)/EMBRAPA (Brazil) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) is acknowledged.

References

- Almeida, A. A. P., Farah, A., Silva, D. A. M., Nunan, E. A., & Glória, M. B. (2006). Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against Enterobacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8738–8743.
- Almeida, A. A. P., Naghetini, C. C., Santos, V. R., & Glória, M. B. (2004). *In vitro* antibacterial activity of coffee extracts on *Streptococcus mutans*. In *Proceedings of the 20th international conference on coffee science* (pp. 242–248). Bangalore, India: ASIC.
- Bravo, L., Goya, L., & Lecumberri, E. (2007). LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Research International*, 40, 393–405.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564–582.
- Daglia, M., Cuzzoni, M. T., & Dacarro, C. (1994). Antibacterial activity of coffee: Relationship between biological activity and chemical markers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2273–2277.
- Daglia, M., Papetti, A., Dacarro, C., & Gazzani, G. (1998). Isolation of an antibacterial component from roasted coffee. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18, 219–225.
- Daglia, M., Papetti, A., Grisoli, P., Aceti, C., Spini, V., Dacarro, C., et al. (2007). Isolation, identification, and quantification of roasted coffee antibacterial compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10208–10213.
- Daglia, M., Tarsi, R., Papetti, A., Grisoli, P., Dacarro, C., Pruzzo, C., et al. (2002). Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans*' adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1225–1229.
- Dall'Agno, R., Ferraz, A., Bernardi, A. P., Albring, D., Nör, C., Sarmento, L., et al. (2003). Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*, 10, 511–516.
- Farah, A., de Paulis, T., Moreira, D. P., Trugo, L. C., & Martin, P. R. (2006). Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 374–381.
- Farah, A., de Paulis, T., Trugo, L. C., & Martin, P. R. (2005). Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1505–1513.
- Farah, A., Monteiro, M. C., Calado, V., Franca, A. S., & Trugo, L. C. (2006). Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry*, 98, 373–380.
- Furuhata, K., Dogasaki, C., Hara, M., & Fukuyama, M. (2002). Inactivation of *Legionella pneumophila* by phenol compounds contained in coffee. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, 30, 291–297.
- Johnston, K. L., Clifford, M. N., & Morgan, L. M. (2003). Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: Glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 728–733.
- Kendrick, S. F. W., & Day, C. P. (2007). A coffee with your brandy, Sir? *Journal of Hepatology*, 46, 980–982.
- McFarland, J. (1907). Nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 14, 1176–1178.
- McNeill, K., & Hamilton, I. R. (2004). Effect of acid stress on the physiology of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *Microbiology*, 150, 735–742.
- NCCLS (2003). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. In *Approved standard M7–A6* (6th ed.). Wayne, PA: NCCLS.
- Ohshima, T., Miyakawa, Y., Watanabe, T., & Ohyama, K. (2003). Effect of amphotericin B dilution with various beverages on the survival of *Candida albicans* cells. *Kansenshogaku Zasshi*, 77, 29–33.
- Osawa, K., Miyazaki, K., Shimura, S., Okuda, J., Matsumoto, M., & Ooshima, T. (2001). Identification of cariostatic substances in the cacao bean husk: Their anti-glucosyltransferase and antibacterial activities. *Journal of Dental Research*, 80, 2000–2004.
- Perrone, D., Donangelo, C. M., & Farah, A. (2008). Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in green and roasted coffee by liquid chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 110, 1030–1035.
- Rosengren, A., Dotevall, A., Wilhelmsen, L., Thelle, D., & Johansson, S. (2004). Coffee and incidence of diabetes in Swedish women: A prospective 18-year follow-up study. *Journal of Internal Medicine*, 255, 89–95.
- Smith, D. J. (2002). Dental caries vaccines: Prospects and concerns. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 13, 335–349.
- Thimothe, J., Bonsi, I. A., Padilla-Zakour, O. I., & Koo, H. (2007). Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis interspecific* hybrids) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10200–10207.
- Toci, A., & Farah, A. (2008). Volatile compounds as potential defective coffee beans markers. *Food Chemistry*, 108, 1133–1141.
- Toci, A., Farah, A., & Trugo, L. C. (2006). Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após a torração. *Química Nova*, 29, 965–971.
- Wei, G.-X., Campagna, A. N., & Bobek, L. A. (2006). Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 1100–1109.
- Wen, Z. T., Browngardt, C., & Burne, R. A. (2001). Characterization of two operons that encode components of fructose-specific enzyme II of the sugar: Phosphotransferase system of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*, 205, 337–342.
- Wilson, M. (1996). Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *Journal of Medical Microbiology*, 44, 79–87.
- Xiao, J., Zhou, X. D., Feng, J., Hao, Y. Q., & Li, J. Y. (2007). Activity of *Nidus Vespae* extract and chemical fractions against *Streptococcus mutans* biofilms. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 547–552.

4.2 Artigo 2

Inhibitory properties of *Coffea canephora* extract against oral bacteria and its demineralization effect on deciduous teeth

A.G. Antonio^a; N.L.P. Iorio^b; V.S.S. Pierro^a; M.S. Candreva^a; A. Farah^c; K.R.N. dos Santos^b; L.C. Maia^{a*}

^a Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

^b Department of Medical Microbiology, Prof. Paulo de Góes Microbiology Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

^c Food and Nutritional Biochemistry Laboratory, Department of Biochemistry, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Brasil.

Running title: Anticariogenic effect of coffee

Corresponding author:

Lucianne Cople Maia

Postal address: Rua Gastão Gonçalves, 47/501, Santa Rosa, Niterói – Rio de Janeiro, Brazil

Postal code: 24240-030

Phone number: 55-21-2629-3738

Fax number: 55-21-2629-3738

E-mail address: rorefa@terra.com.br

Abstract

The antibacterial activity of *Coffea canephora* extract was evaluated *in vitro* against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. The viability of planktonic cells was analyzed by susceptibility tests (MIC and MBC) and time-kill assays. The effect of the extract on dental demineralization was also investigated. Primary 1st molar fragments (n = 24) were inoculated with a saliva pool and sustained in a multiple plaque growth system for 10 days by means of BHI medium to form biofilm. The biofilm was treated with light roasted *C. canephora* extract at 20%, Milli-Q water (negative control) and chlorhexidine (positive control) once a day, during a week. Blank controls comprised fragments without treatment. Biofilm pH was monitored by a microelectrode in the last day of treatment. Changes in tooth mineralization were assessed by cross-sectional microhardness (CSMH) test. MIC and MBC for *S. mutans* were 7 ± 2 mg/mL and 160 ± 0 mg/mL, respectively, showing no activity for *S. sobrinus*. The extract produced a 4-log reduction in the number of colonies of *S. mutans* after 3-hour treatment ($p < 0.05$) with undiluted extract (20%) and MBC concentration (16%). There was no difference among negative/blank controls and coffee plaque pH. Differences between CSMH values of dental fragments subjected to the coffee extract and to chlorhexidine were not significant. At depths up to 30 μm from the enamel surface, coffee extract and chlorhexidine promoted higher CSMH values when compared to blank/negative controls ($p < 0.05$). Our data suggest that light roasted *C. canephora* extract is beneficial as an anticariogenic substance.

Key words: coffee, antimicrobial activity, oral bacteria, acid production, dental plaque, microhardness, microelectrodes, plaque pH, deciduous teeth

Introduction

Dental biofilm is defined as the diverse microbial community found on tooth surface embedded in a matrix of polymers of bacterial and host origin (Kidd and Fejerskov, 2004). From a biochemical point of view, the bacteria in the biofilm are always metabolically active, causing fluctuations in pH. These fluctuations may cause a loss of minerals from the tooth when pH drops, or a gain of minerals when pH increases (Filoche et al., 2010). The cumulative result of these de- and re-mineralization processes may be a net loss of minerals, leading to dissolution of the dental hard tissues and the formation of a caries lesion (Takahashi and Nyvad, 2008). Therefore an important strategy for the prevention of dental caries is to reverse or halt the mineral loss (Featherstone, 1994).

Over the past two decades, the anti-caries potential of polyphenols extracted from different types of natural products such as propolis, tea, cocoa, cranberry, has been reported (Oshima et al., 1993; Oshima et al., 2000; Simonetti et al., 2004; Smullen et al., 2007; Cho et al., 2008). These substances have been proven to be potential agents in the prevention of oral disease, particularly biofilm-related diseases (Koo et al., 2002; Yatsuda et al., 2005; Xiao et al., 2007; Bodet et al., 2008; Srikanth et al., 2008).

In the plant kingdom, the sources of polyphenols are numerous (Hayacibara et al., 2005; Smullen et al., 2007; Percival et al., 2006; Yamanaka et al., 2007). Coffee is not only the most popular and widely consumed beverage throughout the world, but also rich in polyphenols as well (Farah et

al., 2009). Studies have shown the possibility of dental caries prevention by coffee's antibacterial activity against *Streptococcus mutans* (Almeida et al.; 2004; Daglia et al., 2007; Antonio et al., 2010), which is a member of the endogenous oral microflora and also a contributor to biofilm formation in the oral cavity (Socransky and Haffajee, 2002).

The antibacterial activity of coffee against *Streptococcus mutans* changes according to its chemical composition (Daglia et al., 1998, Antonio et al., 2010) that is influenced by species and processing such as roasting and decaffeination (Antonio et al., 2010). Previously, we observed that *C. canephora* extracts presented better performance as an antibacterial agent compared to *Coffea arabica* (Antonio et al., 2010). However, there is no evidence that *C. canephora* extracts exert the same activity against cariogenic bacteria other than *Streptococcus mutans*. Another important aspect that has not been investigated is the effect of coffee on the de-remineralization process of caries disease. Exploring these themes would result in a more direct and realistic picture of coffee anticaries effect.

Therefore, in the present study, we first evaluated, *in vitro*, the antibacterial effect of a *C. canephora* extract against *S. mutans* and *S. sobrinus*. Following, we investigated the demineralization effect of the extract on deciduous teeth after *ex vivo* treatment of mixed biofilm.

Materials and Methods

Coffea canephora extract and controls

Regular *Coffea canephora* cv. Conillon beans were roasted in a commercial spouted bed roaster (I-Roast, Gurnee, IL, USA), operating at a max.

temperature of 220°C, for 6 min, to produce a light roasting degree (SCAA, USA). Roasting coffee beans were ground in a laboratory-scale mill to pass through a 0.46 mm sieve. An aqueous coffee extract at 20% (pH 5.28 ± 0.8) was obtained by a coffee brewing procedure, percolating 100 mL of pre-boiling (95°C) Milli-Q purified water through 20 g of ground roast coffee. Chlorhexidine at 0.05% and at 0.12% (pH 5.10 ± 0) were used for the Killing kinetics and biofilm assays, respectively, as positive controls, whereas Milli-Q purified water (pH 5.75 ± 0.6) was used as the negative control for both experiments.

Characterization of phenolic compounds from *Coffea canephora* extract

The contents of caffeic and chlorogenic acids (3-, 4- and 5- caffeoylquinic acids – 3-, 4- and 5-CQA; 3-, 4- and 5-feruloylquinic acids – 3-, 4- and 5-FQA and 3,4-; 3,5- and 4,5-dicaffeoylquinic acids – 3,4-, 3,5- and 4,5-diCQA) were determined by gradient LC-DAD-ESI-MS according to Farah et al. (2006), using a Magic C30 column (150 × 2.0 mm, 5µm, 100 Å, Michrom Bioresources, Inc., Auburn, CA). The contents of caffeine were determined by LC-ESI-MS according to Perrone et al. (2008).

The liquid chromatograph equipment (Shimadzu, Kyoto, Japan) comprised a LC-10ADvp quaternary pump, a CTO-10ASvp column oven, a 8125 manual injector (Rheodyne) with a 5µL loop and a SPD-M10Avp diode array detector. This liquid chromatograph system was interfaced with a LC-MS 2010 mass spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). For sample clarification prior to the chromatographic analyses of phenolic compounds, 500 µL of each coffee extract were mixed with 500 µL of Carrez solutions and the volume was made up to 50 mL with Milli-Q water. The mixtures were shaken, allowed to rest

for 10 min and filtered through a Whatman #1 qualitative filter paper and through a 0.22 µm membrane (Millipore). The filtrates were used directly for chromatography. Chemical analyses were performed in triplicate.

Bacterial strains and culture to evaluate the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The bacterial strains used were from the American Type Culture Collection (ATCC): *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478. Bacteria were kept at –20 °C in Tryptic Soy Broth [TSB] (Oxoid, Hampshire, England) with 20% glycerol and activated by transfer into blood agar. The plates were incubated at 37 °C during 48 h, in a candle jar. Bacterial cells were suspended, according to the McFarland protocol (McFarland, 1907), in saline solution to produce a suspension of about 1.5×10^8 CFU/mL. 300 µL of this suspension were mixed with 9.7 mL of Mueller-Hinton bacterial broth medium (Difco, Sparks, USA), resulting in an inoculum with $4-5 \times 10^6$ CFU/mL.

MIC and Minimum Bactericide Concentration (MBC) determination

MIC was evaluated by the dilution method in Mueller-Hinton broth medium (Difco, Sparks, USA) according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS) guidelines (NCCLS, 2003), with concentrations ranging from 5 to 160 mg/mL of the 20% aqueous coffee extracts. 100 µL of the inoculum were added to each tube and the MIC value was evaluated after 24 h incubation at 37 °C, as the lowest coffee solution concentration inhibiting observable growth. Samples from tubes where the MIC

results showed no bacterial growth were removed with a loop, inoculated onto a blood agar plate, and incubated at 37 °C, for 48 h. MBC was considered to be the lowest concentration at which microorganisms were totally unable to grow (NCCLS, 1999). The controls included an inoculated Mueller-Hinton Broth medium (Difco, Sparks, USA) without the test coffee extracts and also tubes with no inoculated Mueller-Hinton Broth medium (Difco, Sparks, USA), but with the test extracts, in all concentrations tested. Experiments were performed three times in duplicate.

Killing kinetics assays

The experiment of bacterial killing kinetics of the coffee extract was described by Alviano et al. (2008). Only *S. mutans* ATCC 25175 was used in this study because we did not find the MIC and the MBC of the tested coffee extract against *S. sobrinus*. Accordingly, 0.4 mL aliquots of the bacterial strain culture, after adjustment to 0.5 McFarland scale, which were grown for 10h in Müeller-Hinton Broth medium (Difco, Sparks, USA) at 37 °C under microaerofilia, were added to 1.6 mL of the extract at 25% to give a final concentration of 20%. Also, coffee extracts at 1% and 16% were tested. After the inoculum addition, 100 µL aliquots of each system were collected at 30 min intervals up to 3 hours, to enumerate viable cells by serial dilution (10^{-3} to 10^{-8}) in sterile saline and spreading of 100 µL of each dilution in blood agar plates. Two more tubes containing 2 mL of Müeller-Hinton Broth medium (Difco, Sparks, USA) were used as controls; one without bacteria for a sterility control and the second with bacteria for a growth control. Chlorexidine at 0.05% (positive control) and Milli-Q water (negative control) were also tested. The

blood agar plates were incubated during 48 h at 37 °C in microaerofilia to determine the CFU/ml. The killing kinetics curve for *Streptococcus mutans* strain with the coffee extract and the controls was obtained comparing the bacterial population at the beginning of the experiment (time = 0 min) and at each 30 min interval after the addition of the tested substances.

Tooth selection and sample preparation for biofilm plate assay

The naturally exfoliated primary first molars used in this investigation were collected from children living in Rio de Janeiro, Brazil, in conformity with the rules of the Local Ethics Committee of the Institute of Studies in Public Health, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil (Process No. 43/2007). Twelve teeth were inspected using a light microscope (40 X), and none of them was found to have structural alterations. All teeth were stored in physiological solution (changed every week) until the beginning of the experiment. The teeth were sectioned mesiodistally by using a cutting machine (Isomet, Buehler, Lake Bluff, Ill., USA), resulting in 24 fragments. Each fragment was coated with an acid-resistant nail varnish leaving a window (21 mm²) of exposed tooth. All fragments were submitted to ethylene oxide sterilization (Bioxxi, Brazil) prior to the experiment (figure 1).

Inoculum to form biofilm on tooth fragments

The inoculum comprised unstimulated whole mixed saliva, collected from three volunteers (1 man and 2 women) aged 25–36 years (mean 29 years), who spit into a graduated collection tube. The subjects were in good general and oral health, and had all natural teeth. None of the subjects was on any

medication and they gave their informed consent. Subjects were instructed not to consume food or beverages except water for 1 hour before saliva collection. Moreover, none of them consumed coffee habitually. The saliva produced in the first 30 seconds was discarded and then, it was collected for exactly 5 minutes. Their mean DMFT (4.6) and mean whole saliva flow rate (0.83mL/min) were registered.

The saliva (1 mL) from each volunteer was placed into a tube, which was mixed using a vortex, resulting in an inoculum with 2×10^8 CFU/mL (dilution of 1:200). From this suspension, 0.6×10^3 CFU/mL of *S. mutans* were identified.

Biofilm plate assay

The biofilm model (Figure 1) employed in this study was able to form stable and reproducible biofilm with human saliva. It was conducted in polystyrene 24-well tissue-culture plates (TPP, Zellkultur Testplatte 24 F). The tooth fragments were fixed inside the wells with 400 μ L of agar at 2% (Noble agar, Difco, USA). First, each fragment was placed inside a well and then the agar was carefully added in its bottom, leaving the teeth surface exposed for treatment. After the agar had become solid in order to fix the referred tooth fragments, the wells were completed with Brain-Heart Infusion growth media (BHI, Difco, 1485 μ L/well) already containing the inoculum (15 μ L/well). The system was incubated in microaerofilia for 10 days at 37 °C so as to produce biofilm.

After biofilm formation on the teeth, three different types of treatment were performed (six teeth for each treatment): (1) 50 μ L of *C. canephora* extract at 20%; (2) 50 μ L of Milli-Q purified water (negative control); and (3) 50 μ L of

chlorhexidine at 0.12% (positive control). Six biofilm-covered teeth, which did not receive any treatment, were considered the blank control. Before substances' application on dental biofilm for one minute, the medium from each well was removed. After each treatment, dental fragments were rinsed twice with 1500 μ L of distilled water (neutral pH) and a new Brain-Heart Infusion growth media (BHI, Difco, Sparks, USA; 1500 μ L/well) was inserted into the wells. The treatment procedure was performed once a day, at the same hour, during a week.

Plaque pH measurements

The plaque pH measurements (figure 1) were performed with a touch microelectrode (Beetrode MEPH-3L, WPI, New Haven, Conn., USA) and with a reference electrode connected to a pH meter (Orion Res Inc., Cambridge, Mass., USA). The electrode was calibrated using pH 4.0 and pH 7.0 buffers before the beginning of each test and also after every plaque pH determination. A group of three teeth from the six treated with each substance and also from the six blank controls had their biofilm evaluated. The microelectrode was inserted into the biofilm on each teeth and the plaque pH was measured on 7th day of treatment at time intervals of 0 (immediately after) and 5 minutes after substances' application. The pH analyses were blind.

Cross-sectional microhardness test of teeth fragments

At the end of the experimental phase, the tooth fragments were removed from the wells, and longitudinally sectioned in the middle of the fragment resulting in two halves (Figure 1). Each half was included in stubs and the cut

surfaces were exposed and polished. The cross-sectional microhardness (CSMH) was performed according to Hara *et al.* (2000). Two sequences of fourteen indentations were made at 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 200 and 300 μm from the outer enamel surface, 150 μm apart. The means were calculated for each distance. CSMH values were measured using a Digital Microhardness Tester (HVS-1000, Time Group Inc., China), with a load of 25 g for 10 s (Argenta *et al.*, 2003). The data were expressed as Knoop hardness number (kg/mm^2) since there is a discrepancy in the literature regarding conversion of hardness to mineral concentration (Featherstone *et al.*, 1983; Kielbassa *et al.*, 1999). Afterwards, the hardness of the untreated enamel that was covered with the nail varnish was used as control. The examiner was blind during the experiment.

Mineral contents of the *C. canephora* extract

An aliquot of 3 mL from *C. canephora* extract at 20% and from BHI growth media was sampled and centrifuged (3000xg, 3 min., 4°C). The supernatant was treated with 250 μL of 65% of HNO_3 . The solutions were analyzed by atomic absorption spectroscopy (Analyst 300 – Perkin Elmer, Germany) in order to calculate the contents of Zinc, Strontium, Silicon, Sulfur, Phosphorus, Sodium, Manganese, Magnesium, Potassium, Iron, Copper, Calcium, Barium, Boron and Aluminum in the coffee and in the media where the teeth were submitted to treatments.

In relation to fluoride contents, it was also analyzed in samples of *C. canephora* and BHI, in duplicate, according to Lima and Cury (2001). Fluoride was analyzed using an ion specific electrode (Orion - 96-09) after buffering with

the same volume of TISAB II (acetate buffer 1.0 M, pH 5.0 containing NaCl 1.0 M and 1,2 cyclohexanediaminetetracetic 0.4%). The electrode was calibrated with five standard solutions ranging from 0.125 to 2.0 µg F/mL. The calibration curve ($r=0.909$) was tested against fluoride standard solutions (Orion) and blanks.

Analyses were performed in duplicate.

Statistical analysis

The Kruskal-Wallis test was used for statistical comparison of Killing kinetics assays results and also for the effect of *C. canephora* extract on acidogenicity of biofilm. For analyses of CSMH values, the assumptions of equality of variances and normal distribution of errors were respectively checked with the Shapiro-Wilk test for all response variables (Queiroz *et al.*, 2008). ANOVA and Tukey test were used to detect differences among treatments. SSPS software, version 17.0 was used for all statistical analyses. Differences between means were considered significantly different when values of $p < 0.05$ were obtained.

Results

The phenolic compounds, caffeine and minerals concentrations in the *C. canephora* aqueous extract at 20% are presented in Table 1 and Table 2, respectively.

Antibacterial and bactericidal activities of coffee extract

The *C. canephora* extract was tested for its antibacterial activity toward *S. mutans* and *S. sobrinus*. MIC and MBC values, 7 ± 2 (mg/mL) and 160 ± 0 (mg/mL), respectively, showed that the coffee extract is active against *S. mutans*. No antibacterial (MIC) and bactericidal (MBC) activities were found against *S. sobrinus* at tested concentrations.

Killing kinetics results

The different concentrations of coffee extract (1%, 16% and 20%) acted differently on *S. mutans* when compared to the controls and one to another (Figure 2). *C. canephora* aqueous extract at 16% and 20% ($p > 0.05$) demonstrated a 4-log reduction in the growth of *S. mutans* after 3h treatment, compared to the untreated control ($p < 0.05$). Chlorhexidine at 0.05% could reduce the CFU count of *S. mutans* ATCC 25175 below the detection limit (50 CFU/ml) from 30 min on ($p < 0.05$). *C. canephora* extract at 1% was not able to reduce the initial bacterial population after 3h treatment in the same proportion of the extracts with the highest concentrations ($p < 0.05$).

Effect of *C. canephora* extract on acidogenicity of biofilm

Although we observed a small raise (from 4.81 ± 0.10 to 4.95 ± 0.05) of biofilm pH 5 min. after the last treatment (7th day of treatment) with the *C. canephora* aqueous extract at 20%, it was not significant ($p > 0.05$) when compared to the treatment with negative control (from 4.89 ± 0.11 to 4.84 ± 0.13) and to blank control (4.83 ± 0.14 to 4.85 ± 0.16).

It was not possible to evaluate the pH of the biofilm treated with the positive control (chlorhexidine at 0.12%), since these tooth fragments showed no biofilm accumulation after 7 days of treatment.

Cross-sectional microhardness results

For the CSMH analysis (Figure 3), *C. canephora* aqueous extract significantly ($p < 0.05$) inhibited demineralization at depths up to 30 μm from the enamel surface when compared to blank and negative controls. Also, at depths up to 20 μm , fragments subjected to chlorhexidine (0.12%) presented less loss of hardness than coffee extract, but the difference between both treatments was not significant for all distances.

The hardness values of the tooth fragments' areas subjected to coffee extract and chlorhexidine (0.12%) did not differ statistically from the adjacent areas that were previously protected with acid-resistant varnish.

Discussion

The use of plant extracts with medicinal properties represents a concrete alternative for the treatment of different diseases. This includes the use of natural products as antimicrobial agents (Zhang et al, 2009; Bodet et al., 2008; Alviano et al, 2008; Cho et al., 2008; Hayacibara et al., 2006), even though in the absence of scientific basis such practices may generate serious adverse effects (Alviano et al, 2008). Regarding the use of coffee extracts, it could not be disapproved, since this beverage is part of the habitual diet for many people, except for those who are very sensitive to caffeine.

There is no doubt that coffee is the most consumed beverage in the

world after mineral water. In addition to its pleasant flavor, it has been considered as a potential functional food for its biopharmacological properties demonstrated in clinical and epidemiological researches (Kendrick & Day, 2007; Ohshima, Miyakawa, Watanabe & Ohyama, 2003; Johnston, Clifford & Morgan, 2003; Rosengren et al., 2004, Farah 2009). In the last decade, a series of studies have been performed exploring the anti-infective properties of coffee on different microorganisms (Signoretto et al., 2010; Stauder et al., 2010; Antonio et al., 2010; Zhang et al, 2009, Almeida et al., 2006; Daglia et al., 2002; Guzmán et al, 1995), which can generate a significant improvement in managing several kinds of health disorders.

Anila Namboodiripad and Kori (2009) observed that subjects who consumed coffee daily without sugar and milk showed Decayed Missing and Filled Surface (DMFS) scores of 2.9, whereas in subjects who did not consume coffee, the DMFS score was 4.0, demonstrating the anticaries properties of coffee. The anticaries effect of a substance has been related to: (1) its physicochemical effects, by inhibiting demineralization and enhancing remineralization processes (Featherstone, 1994); (2) its antibacterial effects, by inhibiting the critical metabolic processes of mutans streptococci (Bradshaw et al. 2002); and (3) by preventing the development of favorable low pH environments for cariogenic bacteria in the biofilm (Bradshaw et al, 2002). In the present study, these three effects were evaluated in *C. canephora* extract.

Included in the group of bacteria associated with carious lesions is the group of mutans streptococci, which contains seven species, although two of them, *S. mutans* and *S. sobrinus*, are the main bacteria associated with caries in humans (Thylstrup and Fejerskov, 2001). In the present study, we selected

both bacteria to be evaluated. Nevertheless, mutans streptococci species are not considered to be one of the early or primary colonizers of teeth, but rather colonize at later stages of plaque development, after other species have adhered on the tooth surface. Acquisition of these bacteria, and their final proportions in plaque, may be related in part to the presence of other plaque species and in part to the environmental conditions (Fontana et al., 2004). Therefore, in the present study, an *in vitro* biofilm/caries model using a saliva pool - where mixed species were controlled by *in vitro* environmental and nutrient conditions - was applied to simulate an *in vivo* situation. According to Fontana et al. (2004) a bacterial system is the best *in vitro* caries model to accurately mimic an oral environment.

Still considering the methodology, different concentrations of chlorhexidine were used as positive controls. For time-kill experiment with strains of ATCC, the positive control was chlorhexidine at 0.05%, while for the biofilm assay it was chlorhexidine at 0.12%. Several studies (Antonio et al., 2010; Xiao et al., 2007; Xie et al., 2008) have been using chlorhexidine at 0.05% as the positive control for biofilm models formed by only one ATCC microorganism strain. According to Filoche et al. (2010), single-species biofilms were more susceptible to treatment with chlorhexidine than a biofilm provided by different species of microorganisms. In the present work, the biofilm formed on teeth surface should be considered as a complex net of different species of bacteria, thus the authors opted for a higher concentration of chlorhexidine (0.12%) as the positive control, just as it is prescribed for the oral cavities.

In the current study, *C. canephora* extract did not show bacteriostatic activity against *S. sobrinus* at tested concentrations. Although it might be

possible at higher concentrations, this test was not performed because we opted for testing concentrations that still could be normally consumed by people (up to 20%). This concentration has already shown antibacterial properties against enterobacteria (Almeida et al., 2006).

According to our results, the minimum concentration of the coffee extract that inhibited the growth of *S. mutans* was 7 ± 2 (mg/mL). A similar result (MIC = 5 mg/mL) has been previously observed by Antonio et al. (2010), when evaluating the antibacterial activity of *C. arabica* and *C. canephora*. Regarding the minimum bactericidal concentration (160mg/mL) of this extract against *S. mutans*, it was higher than MIC in from 4 to 5 dilutions. Comparable results were demonstrated by studies with natural products (Duarte et al., 2003; Castro et al., 2009).

The outcome of the time-kill assay showed that the *C. canephora* extract exhibited a time- and concentration-dependent killing effect against *S. mutans* ATCC 25175. This means that after 3h contact between *S. mutans* and the extract, the number of viable cells reduced significantly. Our data suggests that the consumption of coffee can prevent the colonization of *S. mutans*, since coffee has been widely and safely consumed as a beverage for a long period of time. Signoretto et al. (2006) observed, in an *ex vivo* study, a positive correlation between the consumption of coffee and oral health in terms of reduction of plaque deposition and lower counts of odontopathogens, such as *S. mutans*.

Considering the results of the cross-sectional microhardness test, it showed that the *C. canephora* extract at 20% inhibited the demineralization of enamel at depths up to 30 μ m from the enamel surface. Despite the similar

inhibitory effect of the coffee extract at 16% and at 20% on killing kinetics experiment with planktonic cells of *S. mutans*, we opted to conduct the biofilm plate assay testing the extract at 20% since we used mixed biofilm formed by human saliva, which tend to be more resistant than planktonic cells (Wei, Campagna & Bobek, 2006),

The process of enamel demineralization involves the dissolution of enamel apatite crystals, and the diffusion of ions, such as calcium, phosphate, and hydrogen, into and out of the enamel microstructures (Tem Cate and Duijsters, 1982). It has been suggested that the ion diffusion pathway in enamel is controlled by the organic matrix network, which occupies the enamel tissue (Zhang et al., 2009). The changes on enamel organic matrix can affect the demineralization process through the control of the diffusion pathway in tooth structures (Featherstone, 1984). In the present study, the chemical analyses of the coffee extract showed a large amount of calcium and phosphorus in the referred extract. So, the authors supposed that the *C. canephora* extract could interact with the enamel organic matrix through its mineral contents, inhibiting the decomposition of the organic matrix during the acid attack by the microorganisms.

Furthermore, Zhang et al. (2009) avowed that interactions between polyphenols and organic matrixes seem to also inhibit the demineralization process. According to them, the referred interaction involves covalent, ionic, hydrogen bonding or hydrophobic processes, which induces the metamorphism of enamel organic matrix. The metamorphic organic matrix is precipitated in the enamel, resulting in a slow down of the speed of mineral ions loss, and consequently, enamel demineralization is inhibited. In our study, the *C.*

canephora extract was extremely rich in polyphenol compounds, which should have inhibited the demineralization process of the fragments submitted to the artificial caries/biofilm model. A grape seed extract, another natural substance containing polyphenols, exerted a similar effect on the tooth hard tissue (Xie et al, 2008).

Another point should be emphasized. Since BHI medium contained some minerals like calcium and phosphorus, one could say that these minerals could have exerted an effect on teeth remineralization process. However, all tooth fragments, including blank and negative controls, were equally kept with BHI medium in the wells. A significant difference between the hardness of dental biofilm that received the coffee treatment and the negative and blank controls led us to believe that the amount of the referred chemical compounds in the coffee extract was responsible for such result.

C. canephora extract demonstrated a significant inhibitory effect of demineralization even after applying a small amount of the extract (50 μ L) on the biofilm and for a short period of time. Aspiras et al. (2010) stated that the biofilm acts as a storage reservoir for ions such as calcium, fluoride and phosphate, causing a raise in retention and an exchange between these ions and tooth enamel. In addition, dental plaques on enamel tooth have been shown to consist of microbial “stacks” surrounded by voids and channels, exhibiting an open and fragmented architecture with a high surface-area in the outermost layers (Zhang et al., 2009). The void-and-channel system in plaque would serve as a route for the distribution of antimicrobial compounds. This would increase the time needed for remineralization and thus delaying the caries combat. In the present study, even though the biofilm was washed after treatment, the coffee

compounds were probably retained in the biofilm netting, being released over time to the tooth and allowing the constant ion exchange.

We know that small amounts of calcium and phosphorus lost by enamel during the pH drop throughout the de-remineralization process can be more efficiently recovered if fluoride is present in the oral environment (Cury and Tenuta, 2009). In a recent study (Stauder et al., 2010) the authors reported that the coffee fraction tested against oral biofilm contained fluoride, which is understood by us that the anticaries action of coffee aqueous extract should be also enhanced by the presence of fluoride in coffee. However, in the present study, the fluoride contents of *C. canephora* and of BHI were lower than the limits needed (0,1 µg F/mL) to raise the pH of biofilm (Belli et al., 1995) and consequently favor the ionic exchanges during the de-remineralization process.

In this study, although the coffee extract penetrated through the biofilm net pathways, inhibiting the demineralization process, it was not able to increase the biofilm pH. The *C. canephora* extract studied was made from a light roasted ground coffee with weak acidic properties (pH 5.28 ± 0.8). Although it prevented the rising of dental biofilm pH, it has a large amount of phenolic compounds and caffeine that favors its antimicrobial action (Antonio et al., 2010). The authors believe that both the inhibition of demineralization and the antibacterial properties of this coffee extract against *S. mutans* were more important caries-preventive factors than its influence on the biofilm acidogenicity.

Analysis of data from our CSMH experiment indicates no significant difference between the fragments with biofilm which was treated with the coffee extract and those treated with chlorhexidine (0.12%). However, the hardness

values of fragments submitted to chlorhexidine at depths under 20µm from enamel surface were lower than the same values of fragments/biofilm treated with the coffee extract. It is well documented that chlorhexidine is a classic anticaries agent due to its properties in killing both Gram-negative and Gram-positive bacteria by damaging their cell wall. Its antiplaque action is superior to other antiseptics with greater antibacterial activity (Wise et al., 2008). Probably, the effect of this potent antimicrobial agent reduced a great number of viable cells, thus preventing the acid production by the current oral bacteria and consequently the loss of mineral. So, its anticaries action was only due to its antibacterial properties, since it does not contain chemical compounds that are able to interfere with the organic matrix of enamel, enhance the remineralization of tooth enamel, and consequently elevate the hardness of the present enamel fragments.

In view of the presented data, a light roasted *C. canephora* aqueous extract can be considered as a potential anticariogenic substance due to its capacity of preventing the growth of *S. mutans* and of inhibiting dental demineralization. However, as much as we have tried to mimic a real situation, these results were obtained in an *in vitro* environment. Further *ex vivo/in vivo* studies should be elaborated with the aim of investigating new approaches for caries management such as the benefits of the retention of this anticariogenic agent into dental biofilms.

Acknowledgment

The authors would like to thank Mr. Marlei Gomes da Silva for generously providing support for the biofilm assay. The financial support of the

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) is also acknowledged.

References

- Almeida, A. A. P., C. C. Naghetini, V. R. Santos and M. B. Glória.** 2004. *In vitro* antibacterial activity of coffee extracts on *Streptococcus mutans*, p. 242-248. *Proceedings of the 20th International Conference on Coffee Science* Bangalore, India: ASIC.
- Almeida, A. A. P., A. Farah, D. A. M. Silva, E. A. Nunan, and M. B. Glória.** 2006. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against Enterobacteria. *J Agric Food Chem.* **54**:8738–8743.
- Alviano, W. S., D. S. Alviano, C. G. Diniz, A. R. Antonioli, C. S. Alviano, L. M. Farias, M. A. Carvalho, M. M. Souza and A. M. Bolognese.** 2008. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Arch Oral Biol.* **53**:545-552.
- Anila Namboodiripad, P. C., S. Kori.** 2009. Can coffee prevent caries? *J Conserv Dent.* **12**: 17-21.
- Antonio, A. G., R. S. Moraes, D. Perrone, L. C. Maia, K. R. N. Santos, N. L. P. Iório and A. Farah.** 2010. Species, Roasting Degree and Decaffeination Influence the Antibacterial Activity of Coffee against *Streptococcus mutans*. *Food Chem.* **118**:782-788.
- Argenta, R. M., C. P. Tabchoury and J. A. Cury.** 2003. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. *Pesqui Odontol Bras.* **17**:241-246.

Aspiras M., P. Stoodley, L. Nistico, M. Longwell and M. de Jager. Clinical implications of power toothbrushing on fluoride delivery: effects on biofilm plaque metabolism and physiology. 2010. *Int J Dent*. Epub 2010 Apr 15.

Belli, W. A., D. H. Buckley and R. E. Marques. 1995. Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. *Canad J Microbiol.* **41**: 785-791.

Bodet, C., D. Grenier, F. Chandad, I. Ofek, D. Steinberg and E. I. Weiss. 2008. Potential oral health benefits of cranberry. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **48**:672-680.

Bradshaw, D. J., P. D. Marsh, R. J. Hodgson and J. M. Visser. 2002. Effects of glucose and fluoride on competition and metabolism within in vitro dental bacterial communities and biofilms. *Caries Res.* **36**:81-86.

Castro, M. L., A. M Nascimento, M. Ikegaki, C. M. Costa-Neto, S. M. Alencar and P. L. Rosalen. 2009. Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian própolis type 6. *Bioorg Med Chem.* **17**:5332-5335.

Cho, Y. S., N. L. Schiller and K. H. Oh. 2008. Antibacterial effects of green tea polyphenols on clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol.* **57**:542-546.

Cury, J. A. and L. M. A. Tenuta. 2009. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral res.* **23**: 23-30.

Daglia, M., A. Papetti, C. Dacarro and G. Gazzani. 1998. Isolation of an antibacterial component from roasted coffee. *J Pharm Biomed Anal.* **18**:219-225.

Daglia, M., T. Tarsi, A. Papetti, P. Grisoli, C. Dacarro, C. Pruzzo, and G. Gazzani. 2002. Antiadhesive Effect of Green and Roasted Coffee on

Streptococcus mutans' Adhesive Properties on Saliva-Coated Hydroxyapatite Beads. J Agric Food Chem. **50**:1225-1229.

Duarte, S., H. Koo, W. H. Bowen, M. F. Hayacibara, J. A. Cury, M. Ikegaki and P. L. Rosalen. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. 2003. Biol Pharm Bull. **26**:527-531.

Daglia, M., A. Papetti, P. Grisoli, C. Aceti, V. Spini, C. Dacarro, and G. Gazzani. 2007. Isolation, identification, and quantification of roasted coffee antibacterial compounds. J Agric Food Chem. **55**:10208-10213.

Farah, A. Coffee as a speciality and functional beverage. In: Functional and Speciality beverage technology. Paquin, P.; Woodhead Publishing, CRC Press, England, p. 370-390, 2009.

Farah, A., T. de Paulis, D. P. Moreira, L. C. Trugo, and P. R. Martin. 2006. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. J Agric Food Chem. **54**:374-381.

Featherstone, J. D. Fluoride, remineralization and root caries. Am J Dent. 1994. **7**:271-274.

Featherstone, J. D. and H. Rosenberg. 1984. Lipid effect on the progress of artificial carious lesions in dental enamel. Caries Res. **18**:52–55.

Featherstone, J. D. B., J. M. Ten Cate, M. Shariati and J. Arends. 1983. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. Caries Res. **17**:385–391.

Filoche, S., L. Wong and C. H. Sissons. 2010. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. J Dent Res. **89**:8-18.

Fontana, M., A. Haider and C. González-Cabezas. 2004. Caries lesion development and biofilm composition responses to varying demineralization times and sucrose exposures. *Biofilms*. **1**:229-237.

Guzma`n, C. A., G. Piatti, C. Pronzato, A. Crippa, and C. Pruzzo. 1995. Inhibition of bacterial colonization of the gut by human and bovine casein. *Microecol Ther*. **25**:236-239.

Hara, A. T., C. S. Queiroz, A. F. Paes Leme, M. C. Serra and J. A. Cury. 2003. Caries Progression and Inhibition in Human and Bovine Root dentine in situ. *Caries Res*. **37**:339- 344.

Hayacibara, M. F., H. Koo, P. L. Rosalen, S. Duarte, E. M. Franco, W. H. Bowen, M. Ikegaki, and J. A. Cury. 2005. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *J Ethnopharmacol*. **101**:110-5.

Johnston, K. L., M. N. Clifford and L. M. Morgan. 2003. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *Am J Clin Nutr*. **78**: 728-733.

Kendrick, S. F.W. and C. P. Day. 2007. A coffee with your brandy, Sir? *J Hepatol*. **46**: 980-982.

Kidd, E. A. M. and O. Fejerskov. 2004. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res*. **83** (Spec Iss C):C35-C38.

Kielbassa, A. M., K. T. Wrbas, J. Schulte-Mönting and E. Hellwig. 1999. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. *Arch Oral Biol*. **44**:243-251.

- Koo, H., J. A. Cury, P. L. Rosalen, G. M. Ambrosano, M. Ikegaki and Y. K. Park.** 2002. Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. *Caries Res.* **36**:445-448.
- Lima, Y. B. O. and J. A. Cury.** 2001. Ingestão de flúor por crianças pela água e dentifrício. *Rev Saude Publica.* **35**: 576-581.
- McFarland, J.** 1907. Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J Am Med Assoc.* **14**:1176-1178.
- NCCLS.** 1999. Methods for determining bactericidal activity on antimicrobial agents. In *Approved Guidelines*; Vol. 19; NCCLS: Wayne, PA.
- NCCLS.** 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. In *Approved Standard M7- A6*, 6th ed.; NCCLS: Wayne, PA.
- Ooshima, T., T. Minami, W. Aono, A. Izumitani, S. Sobue, T. Fujiwara, S. Kawabata and S. Hamada.** 1993. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. *Caries Res.* **27**:124-129.
- Ohshima, T., Y. Miyakawa, T. Watanabe and K. Ohyama.** 2003. Effect of amphotericin B dilution with various beverages on the survival of *Candida albicans* cells. *Kansenshogaku Zasshi.* **77**: 29-33.
- Ooshima, T., Y. Osaka, H. Sasaki, K. Osawa, H. Yasuda, M. Matsumura, S. Sobue and M. Matsumoto.** 2000. Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in in-vitro and animal experiments. *Arch Oral Biol.* **45**:639-45.
- Percival, R. S., D. A. Devine, M. S. Duggal, S. Chartron and P. D. Marsh.** 2006. The effect of cocoa polyphenols on the growth, metabolism, and biofilm

formation by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *Eur J Oral Sci.* **114**:343-348.

Perrone, D.; A. C. Donangelo and A. Farah. 2008. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in green and roasted coffee by chromatography – mass spectrometry. *Food Chem.* **110**:1030-1035.

Queiroz, C. S., A. T. Hara, A. F. Paes Leme and J. A. Cury. 2008. pH-Cycling Models to Evaluate the Effect of Low Fluoride Dentifrice on Enamel De- and Remineralization. *Braz Dent J.* **19**:21-27.

Rosengren, A., A. Dotevall, L. Wilhelmsen, D. Thelle and S. Johansson. 2004. Coffee and incidence of diabetes in Swedish women: a prospective 18-year follow-up study. *J Int Med.* **255**: 89-95.

Signoretto, C., F. Bianchi, G. Burlacchini, F. Sivieri, D. Spratt and P. Canepari. 2010. Drinking habits are associated with changes in the dental plaque microbial community. *J Clin Microbiol.* **48**:347-356.

Signoretto C., G. Burlacchini, F. Bianchi, G. Cavalleri and P. Canepari. Differences in microbiological composition of saliva and dental plaque in subjects with different drinking habits. 2006. *New Microbiol.* **29**:293-302.

Simonetti, G., N. Simonetti and A. Villa. 2004. Increased microbicidal activity of green tea (*Camellia sinensis*) in combination with butylated hydroxyanisole. *J Chemother.* **16**:122-127.

Smullen, J., G. A. Koutsou, H. A. Foster, A. Zumbé and D. M. Storey. 2007. The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* **41**:342-349.

Socransky, S. S. and A. D. Haffajee. 2002. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000.* **28**: 12–55.

- Srikanth, R. K., N. D. Shashikiran and V. V. Subba Reddy.** 2008. Chocolate mouth rinse: Effect on plaque accumulation and mutans streptococci counts when used by children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* **26**:67-70.
- Stauder, M., A. Papeti, M. Daglia, L. Vezzulli, G. Gazzani, P. E. Varaldo and C. Pruzzo.** 2010. Inhibitory Activity by Barley Coffee Components towards *Streptococcus Mutans* Biofilm. *Curr Microbiol.* Published online: 02 April 2010.
- Takahashi, N. and B. Nyvad.** 2008. Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. *Caries Res.* **42**:409–418.
- Ten Cate, J. M. and P. P. Duijsters.** 1982. Alternating demineralisation and remineralisation of artificial enamel lesions. *Caries Res.* **16**:201–210.
- Thylstrup, A. and O. Fejerskov.** *Cariologia Clínica.* 3^a ed. Editora Santos, São Paulo, 2001.
- Xiao, J., X. D. Zhou, J. Feng, Y. Q. Hao, J. Y. Li.** 2007. Activity of Nidus Vespaee extract and chemical fractions against *Streptococcus mutans* biofilms. *Lett Appl Microbiol.* **45**:547-552.
- Xie, Q., A. K. Bedran-Russo; C. D. Wu.** 2008. In vitro remineralization effects of grape seed extract on artificial root caries. *J Dent.* **36**:900-906.
- Wei, G. X., A. N. Campagna and L. A. Bobek.** 2006. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. *J Antimicrob Chemother.* **57**: 1100-1109.
- Wise, M. P., J. M. Cole1, D. W. Williams, M. A. Lewis and P. J. Frost.** 2008. Efficacy of oral chlorhexidine in critical care. *Critical Care.* **12**:419.
- Yamanaka, A., T. Kouchi, K. Kasai, T. Kato, K. Ishihara and K. Okuda.** 2007. Inhibitory effect of cranberry polyphenol on biofilm formation and cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.;* **42**: 589-592.

Yatsuda, R., P. L. Rosalen, J. A. Cury, R. M. Murata, V. L. Rehder, L. V. Melo and H. Koo. 2005. Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. *J Ethnopharmacol.* **97**:183-189.

Zhang, L., J. Xue, L. Jiyao, L. Zou, Y. Hao, X. Zhou and W. Li. 2009. Effects of *Galla chinensis* on inhibition of demineralization of regular bovine enamel or enamel disposed of organic matrix. *Arch Oral Biol.* **54**: 817-822.

Table 1: Contents of cinnamic acid derivatives (phenolic compounds) and caffeine in *Coffea canephora* extract at 20%.^{a, b}

Chemical compounds	Mean \pm SD
<i>Cinnamic acid derivatives</i>	3650.78 \pm 74.0
3-CQA	808.6 \pm 16.8
5-CQA	1342.2 \pm 52.7
3-FQA	136.6 \pm 7.0
4-CQA	863.4 \pm 22.3
5-FQA	78.7 \pm 6.5
4-FQA	181.08 \pm 7.4
3,4-diCQA	125.30 \pm 4.4
3,5-diCQA	42.75 \pm 0.4
4,5-diCQA	72.14 \pm 1.1
CA	87.33 \pm 35.0
<i>Caffeine</i>	2110 \pm 0.4

^a Results are shown as mean of triplicate of analysis, expressed in $\mu\text{g/mL}$. ^b CA = caffeic acid; CQA = cafeoylquinic acids; FQA = feruloylquinic acids; diCQA = dicaffeoylquinic acids; CGA = chlorogenic acids.

Table 2: Mineral contents of *Coffea canephora* extract at 20% and BHI medium.^a

Minerals	<i>Coffea canephora</i> extract (20%) (media ± SD)	BHI medium (media ± SD)
Zinc	0.52 ± 0.03	1.57 ± 0.02
Strontium	1.11 ± 0.05	0.04 ± 0.01
Silicon	6.66 ± 0	4.05 ± 0.04
Sulfur	314.66 ± 9.6	243.73 ± 3.2
Phosphorus	491.67 ± 22.77	294.82 ± 10.54
Sodium	26.66 ± 1.67	2714.8 ± 97
Manganese	1.94 ± 0.03	0.04 ± 0.01
Magnesium	589.69 ± 18.32	14.04 ± 2.12
Potassium	10173.58 ± 182	759.35 ± 19.43
Iron	3.22 ± 0.15	0.8 ± 0.01
Copper	0.46 ± 0.02	0.2 ± 0
Calcium	216.71 ± 11.93	10.8 ± 3.2
Barium	0.14 ± 0	0.04 ± 0.01
Boron	4.23 ± 0.16	0.10 ± 0
Aluminum	0.083 ± 0.08	0.3 ± 0
Fluoride	0.018 ± 0	0.044 ± 0.003

^a Results are shown as mean of duplicate of analysis, expressed in µg/mL.

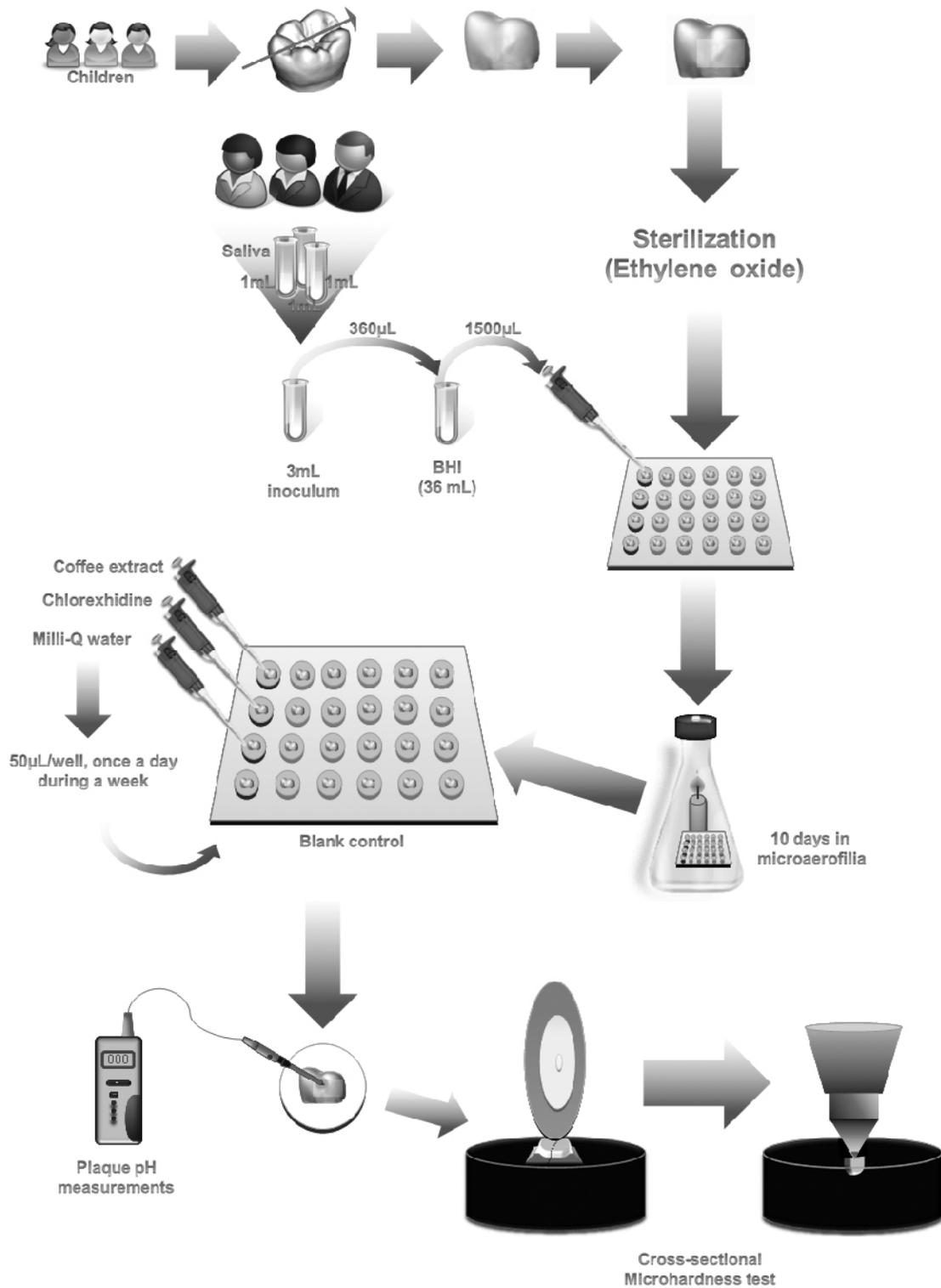


Figure 1: The biofilm model and the tests used to identify the anticariogenic property of *Coffea canephora* extract.

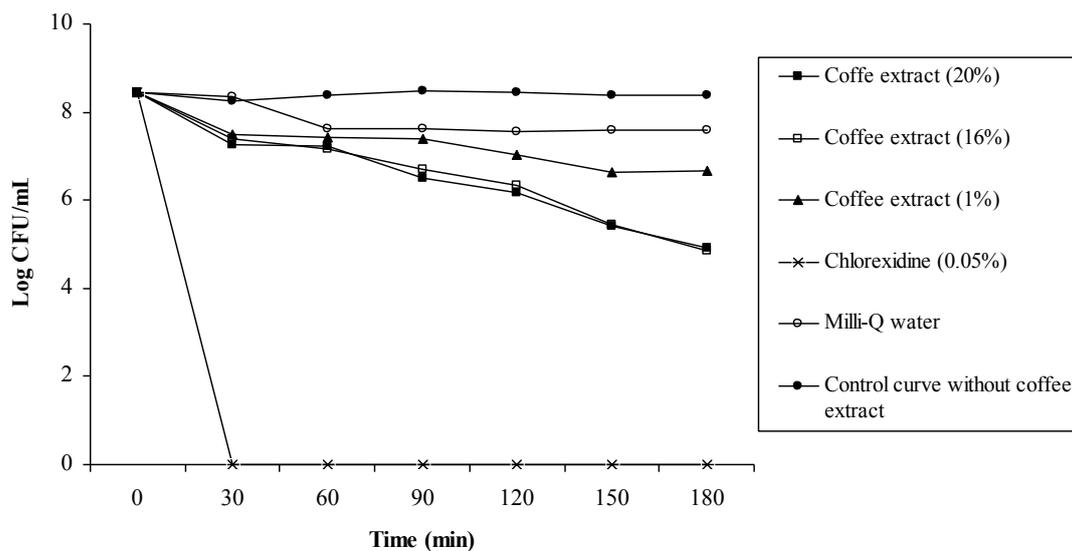


Figure 2: Bacterial killing kinetics of a *C. canephora* extract and controls for 180 minutes. The *S. mutans* CFU was determined at 30 min intervals after the contact with the following treatments: (1) *C. canephora* aqueous extracts at different concentrations (1%, 16% and 20%), (2) chlorhexidine (0.05%) – positive control and (3) Milli-Q water – negative control. Bacterial growth without the extracts and control solutions was also monitored. Significant differences ($p < 0.05$) were found between controls and coffee extracts at 16% and 20% from 150 minutes onwards and also between chlorhexidine (0.05%) and all other treatments, in all moments.

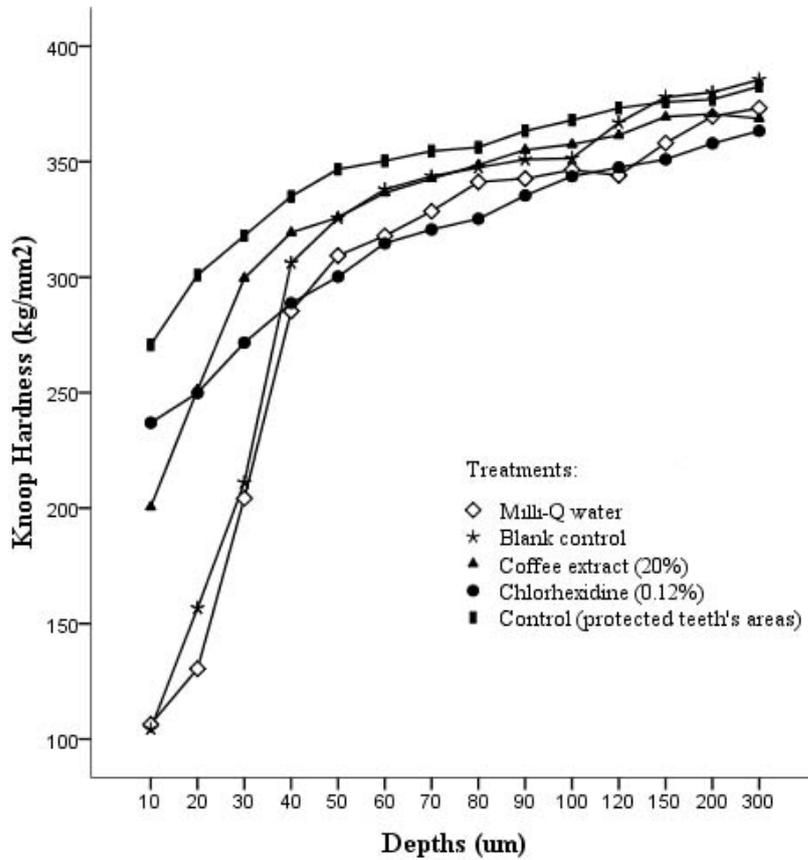


Figure 3: Means of enamel Knoop hardness (kg/mm²) after treatments with coffee extracts and controls, considering the distance (µm) from the enamel surface. A significant difference was found among the coffee extract and blank/negative controls at depths up to 30 µm ($p < 0.05$). No significant difference was observed between this extract and chlorhexidine ($p > 0.05$).

5 DISCUSSÃO

5.1 Metodologia

Produtos naturais e seus compostos são considerados as principais fontes inovadoras de agentes terapêuticos para o tratamento de doenças humanas (COHEN & CARTER, 2005). Dentre as inúmeras aplicações no campo da medicina: tratamento de doenças renais, inflamações, diabetes, tumores, cardiopatias e infecções (NGAI et al., 2005; VIUDA-MARTOS et al., 2008; SHUKLA et al., 2010 – a; FULDA et al. 2010; SHUKLA et al., 2010 – b; VORAVUTHIKUNCHAI et al., 2010), destaque deve ser dado para o uso desses produtos como agentes anti-infecciosos. Cerca de 70% de todas as substâncias com essa propriedade anti-infecciosa introduzidas entre 1981 e 2002 foram obtidas a partir de compostos provenientes de produtos naturais (NEWMAN et al., 2003). Isso porque a maioria delas possui grande diversidade química e especificidade bioquímica e molecular, dentre outras propriedades, que as tornam favoráveis como fonte para a síntese de novas substâncias benéficas ao ser humano (KOO & JEON, 2009).

Apesar disto, pesquisas com produtos naturais para prevenir ou tratar doenças bucais, como a cárie dental, não têm recebido a atenção necessária pelos profissionais de Odontologia em comparação com os demais pesquisadores em outras áreas da medicina (KOO & JEON, 2009). Os resultados da maioria dos estudos disponíveis na literatura forneceram poucas informações em relação às suas propriedades anticariogênicas porque há uma falta de caracterização química dos extratos naturais, não há exposição prolongada das células bacterianas aos agentes de teste e a maioria dos

ensaios está focada no crescimento das células bacterianas no estado planctônico ao invés de biofilmes (KOO & JEON, 2009).

Quanto ao presente estudo, este foi dividido em duas fases de execução. Na primeira, todos os extratos de café ou produtos naturais estudados foram submetidos à minuciosa análise química de seus compostos, bem como a testes de susceptibilidade microbiológicos envolvendo tanto células planctônicas como o biofilme formado pelo *Streptococcus mutans*. No entanto, ainda que grande parte dos requisitos necessários para se avaliar substâncias naturais (KOO & JOE, 2009) tenha sido realizada, a condução de uma segunda fase desta pesquisa foi fundamental para se determinar até que ponto o extrato de café estudado pode ser considerado anticariogênico ou não. Isto, devido ao fato de que a metodologia empregada nesta segunda etapa envolveu: (1) biofilme formado sobre dentes decíduos humanos e (2) testes microbiológicos onde as células bacterianas ficaram expostas ao extrato e aos controles por 3 horas.

Considerando o ensaio laboratorial da segunda fase do estudo, dentes decíduos foram utilizados como hospedeiros dos microrganismos formadores de biofilme. Segundo Attin et al. (2007), dentes decíduos possuem maior quantidade de íons carbonatos quando são comparados aos dentes permanentes, ocupando diferentes posições na estrutura da hidroxiapatita destes elementos. Tal característica é responsável por uma maior suscetibilidade do esmalte decíduo em perder minerais quando exposto a um desafio cariogênico em relação ao esmalte de dentes permanentes (SØNJU CLASEN et al., 1997). Apesar desta característica peculiar do esmalte decíduo, optou-se, no presente estudo, pelo seu uso no ensaio envolvendo biofilme

misto. Isso porque tais dentes representam elementos dentários com maior porosidade (LINDEN et al., 1986) ainda presentes na cavidade bucal de crianças até os doze anos de idade, em média, as quais poderiam se beneficiar dos efeitos positivos do café após o seu consumo.

Por essa razão, e por haver indícios de que o café possui propriedades antibacterianas contra diversos microrganismos (FURUHATA et al., 2002; ALMEIDA et al., 2006; DAGLIA et al., 2007), incluindo o *Streptococcus mutans* que é considerado um dos principais agentes etiológicos da cárie dental (THYLSTRUP & FERJESKOV, 2001), o café foi escolhido como objeto de estudo da presente pesquisa, abrindo uma nova perspectiva de estudos na área da fitoterapia em Odontologia.

A cafeína e os ácidos clorogênicos são considerados os principais compostos bioativos do café (FARAH et al., 2009). A cafeína é conhecida pela sua ação estimulante sobre o Sistema Nervoso Central, aumentando o estado de alerta nos indivíduos. Outros efeitos da cafeína sobre a saúde têm sido relatados; dentre eles, seu efeito antioxidante (FARAH et al., 2009). Diversos são os estudos que visam identificar as propriedades farmacológicas da cafeína para a saúde humana (RIBEIRO-ALVES et al., 2003; KUBO SHLONSKY et al., 2003). No entanto, apesar do empenho em esclarecer as propriedades desta substância, alguns autores relatam que os resultados parecem ainda ser inconclusivos quando se tenta associar o consumo da cafeína a efeitos benéficos ou não para a saúde (KUBO SHLONSKY et al., 2003).

Desta forma, quando se trata de crianças, a literatura que preconiza o consumo de café ainda é escassa (HARVEY & MARSH, 1978; FLORES et al.,

2000). Considerando-se um peso corporal normal, segundo a ABIC (2007), a ingestão diária deve ser diferenciada por idade: para crianças até 10 anos, a dose ideal é de até 200 mL por dia; entre 10 e 15 anos, recomenda-se até 350 mL; e, para a faixa etária entre 15 e 20 anos, o consumo recomendado é de 400 mL por dia. No entanto, não há na literatura científica, nem tampouco em órgãos oficiais regulamentadores de ingestão de alimentos, referências a respeito das doses ideais do consumo de café por crianças. Na presente pesquisa, os dentes decíduos com biofilme misto foram tratados com um café em alta concentração (200 mg/mL), que possui em média 2 mg/mL de cafeína em sua composição, dado que foi observado no presente estudo e corroborado por Almeida et al. (2006). No Brasil, assim como na Itália, a população em geral está habituada a consumir um café forte (10%) podendo ainda atingir uma concentração de 20% (ALMEIDA et al., 2006). Segundo Demirbag et al. (2006), após um longo período de consumo do café integral, a maioria dos efeitos adversos causados pela cafeína, tendem a desaparecer devido a uma adaptação metabólica do organismo, não gerando nenhum prejuízo para o indivíduo.

Com essa linha de pensamento, os efeitos benéficos também seriam dissipados. Contudo, um estudo epidemiológico recente realizado por Anila Namboodiripad e Kori (2009), constatou que 1000 indivíduos consumidores regulares de café por um período de 35 anos, apresentaram CPOS de 2,9, enquanto o valor do mesmo índice em indivíduos não consumidores de café (n = 1000) foi igual a 4,0, indicando que o café é de fato uma substância capaz de prevenir a cárie. Portanto, considerando a propriedade anticariogênica do café,

fica claro a partir dos resultados de Anila Namboodiripad e Kori (2009), que esta capacidade não foi perdida ao longo do tempo.

Na segunda fase dos experimentos, o modelo de trabalho preconizou o uso de 50 μL do café a 20%, equivalente a uma gota, para tratamento diário de cada dente contendo biofilme. Sabe-se que em ensaios microbiológicos, assim como farmacológicos, recomenda-se o uso da menor dose possível de uma substância para se obter uma resposta positiva necessária a um determinado tratamento, evitando com esta medida os possíveis efeitos adversos. Como se tratou de reproduzir o que poderia ocorrer na cavidade bucal de crianças, optou-se pelo uso de uma pequena quantidade de café sobre cada elemento dentário, o que seria equivalente a 20 gotas em toda cavidade bucal, considerando uma criança na fase de dentição decídua completa. Assim, com 50 μL destinados a cada elemento dentário, estes indivíduos estariam expostos a 1 mL de café, ou seja, uma quantidade ínfima de cafeína (~ 2 mg). Analisando a dose máxima permitida para a faixa etária em questão (200 mL), o conteúdo usado no presente estudo foi baixo, não representando nenhum prejuízo para a saúde.

Ao considerar, em particular, o ensaio do biofilme formado em dentes decíduos, não há na literatura consultada, estudos que tenham utilizado o mesmo método para avaliar a dureza do esmalte e acidogenicidade do biofilme dental formado. Visto que se tratou de um modelo de biofilme que envolveu ao mesmo tempo dentes decíduos, inóculo proveniente de saliva humana, ambiente microbiológico e tratamento com um produto natural.

Apesar das diferenças entre esse modelo *in vitro* e as condições observadas *in vivo* do biofilme dental em termos de: exposição à saliva e

mecanismos de defesa celular, regime alimentar, forças hidrodinâmicas e abrasivas, dentre outros fatores, o modelo deste estudo ainda assim foi capaz de simular os efeitos do café sobre o processo de desmineralização do esmalte decíduo. No entanto, para um modelo ser validado, os resultados advindos do seu emprego deveriam ser comparados àqueles de estudos *in vivo* (GUGGENHEIN et al., 2001). Portanto, a despeito do modelo utilizado nesta pesquisa não poder ser comparado com nenhum outro modelo de estudo *in vivo* envolvendo o café, pois não há dados sobre a dureza de dentes decíduos esfoliados provenientes de crianças que consumiram este produto por determinado período de tempo, seu mérito não deve ser menosprezado. Tendo em vista que se trata de um modelo de fácil execução, podendo ser mantido por um período extenso (uma semana), conforme preconizado por Guggenheim et al. (2001) para modelos *in vitro*.

Os demais experimentos realizados neste estudo envolvendo as análises microbiológicas e bioquímicas, assim como as análises de dureza do esmalte decíduo, seguiram protocolos já preconizados na literatura (NCCLS, 1999; NCCLS, 2003; HARA et al., 2003; WEI et al., 2006; FARAH et al., 2006 – a; FARAH et al., 2006 – b; ALVIANO et al., 2008) para se avaliar produtos naturais e modelos de estudos laboratoriais. Assim, pode-se dizer que com a metodologia empregada, os resultados alcançados são válidos e reprodutíveis.

5.2 Resultados

Na primeira fase do estudo, pode-se constatar um efeito soberano do extrato de *Coffea canephora* em relação ao extrato de *Coffea arabica*, pois o primeiro (amostra de alta qualidade) foi capaz de inibir em 39,6% a formação

de biofilme por *Streptococcus mutans*, enquanto que a segunda espécie, também de alta qualidade dos grãos, não foi capaz de desempenhar a mesma função. Segundo Farah et al. (2006 – a) e confirmado no presente estudo, existe uma quantidade superior de ácidos clorogênicos (polifenóis) nos extratos de *Coffea canephora* em relação aos de *Coffea arabica*, o que provavelmente contribuiu para o melhor desempenho antibacteriano da primeira espécie em relação à segunda, tendo em vista os inúmeros trabalhos (SMULLEN et al., 2007; XIE et al., 2008; BODET et al. 2008; SRIKANTH et al., 2008) que atribuem a estes compostos a capacidade dos produtos naturais em possuir ação antimicrobiana.

Apesar dos resultados negativos do extrato de *Coffea arabica* no ensaio do biofilme formado por *Streptococcus mutans*, mesmo daqueles que possuíam grau de torra mais clara (maior quantidade de ácidos clorogênicos), o contrário foi observado nos ensaios de suscetibilidade microbiológica. Ou seja, a diferença entre ambas as espécies de café estudadas não foram significativas nestes ensaios. Assim, acredita-se que um extrato de café com uma quantidade de ácidos clorogênicos em torno de 3000 µg/mL, já exerça alguma atividade antibacteriana diante de células planctônicas.

Acredita-se que não apenas os ácidos clorogênicos sejam os responsáveis pela propriedade antibacteriana do café frente ao *Streptococcus mutans*, mas sim a ação conjunta de compostos como a trigonelina, o ácido cafeico e a cafeína. Embora não tenham sido empregados testes de sinergismo para verificar a potencialização antibacteriana dos compostos químicos presentes no café, pode-se afirmar que quando pelo menos um destes compostos, como é o caso da cafeína, é removido do extrato, seu efeito

antibacteriano torna-se reduzido. Tal resultado foi observado na primeira fase do estudo ao se testar extratos de café descafeinado.

Ainda considerando as espécies de café relatadas, observou-se uma maior quantidade de lactonas (289,1 µg/mL) no extrato de *Coffea canephora* de melhor qualidade e de torra mais clara dos grãos, em relação ao extrato de *Coffea arabica* com as mesmas características (74,9 µg/mL). Embora alguns estudos tenham demonstrado que as lactonas possuem propriedades benéficas à saúde, dentre elas uma melhor ação da insulina hepática (SHEARER et al., 2003), não há relatos de trabalhos que tenham estudado o potencial antibacteriano desse composto. Acredita-se que essas lactonas possam ter contribuído para a inibição do crescimento de *Streptococcus mutans*, tendo em vista a sua maior quantidade no extrato de *Coffea canephora*. Contudo, sabe-se que em extratos de café descafeinados, o seu conteúdo é ainda superior, conforme visto no presente estudo e de acordo com Farah et al. (2006 – a), o que não foi suficiente para exercer uma melhor atividade antibacteriana desses extratos descafeinados. Pelo contrário, foram os extratos com pior desempenho, o que reforçou a teoria do efeito sinérgico antibacteriano dos compostos do café.

A despeito da descoberta da concentração mínima bactericida (160 mg/mL) do extrato de *Coffea canephora* de torra clara frente ao *Streptococcus mutans*, optou-se por não tratar o biofilme formado sobre os fragmentos dentários com esta concentração. Tal escolha deveu-se à falta de atividade antibacteriana deste extrato frente à células planctônicas de *Streptococcus sobrinus*. Assim, por se tratar de um experimento que utilizou um inóculo clínico (saliva humana) capaz de formar biofilme dental misto, que é mais resistente à

ação de antimicrobianos quando comparado às células planctônicas (WEI et al., 2006), um extrato mais concentrado (200 mg/mL) foi produzido para ser aplicado.

Diante dos resultados advindos do ensaio da curva de morte bacteriana (Anexo 3) e extrapolando para o que poderia acontecer em humanos, acredita-se que o uso prolongado do extrato de *Coffea canephora* em altas concentrações pode ser benéfico em termos de redução de um biofilme cariogênico, considerando o *Streptococcus mutans* como o principal patógeno envolvido com a doença cárie (THYLSTRUP & FERJESKOV, 2001). Um estudo realizado em 2006 (SIGNORETTO et al., 2006) demonstrou justamente essa redução de microrganismos, dentre eles o *Streptococcus mutans*, na cavidade bucal de indivíduos consumidores regulares de café, quando foram comparados a um grupo controle não sujeito à ingestão dessa bebida.

O extrato de *Coffea canephora* também foi capaz de inibir os efeitos da desmineralização dentária, o que pode ser constatado pelos valores mais altos de dureza do esmalte com biofilme tratado com café, em relação àqueles tratados com o controle negativo e com os que não receberam nenhum tipo de tratamento ($p < 0,05$). Além de possuir compostos, como o cálcio e o fósforo, que possam estar contribuindo para este resultado positivo, favorecendo as trocas iônicas entre o dente e o biofilme (ZHANG et al., 2009), esse extrato de café também é caracterizado por ser rico em compostos fenólicos que, segundo Xie et al. (2008) penetram na matriz orgânica do esmalte, causando uma precipitação dessa matriz, impedindo a perda de mineral do dente.

Por fim, diante de todos os aspectos de condução dos ensaios e dos resultados encontrados, no que tange às propriedades anticariogênicas do

café, entende-se que a importância deste estudo está na possibilidade de contribuir cientificamente com linhas de pesquisa focadas nos atributos farmacológicos deste produto.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No que tange ao consumo de café, uma questão é sempre abordada: O café é capaz de pigmentar o tecido dentário? Sabe-se que a pigmentação dos dentes pode ser intrínseca ou extrínseca (WATTS & ADDY, 2001). A pigmentação extrínseca é causada pela deposição de cromógenos externos na superfície do dente ou na camada da película que adere à superfície do esmalte. Já a pigmentação intrínseca ocorre quando os cromógenos são depositados nos tecidos dentários, geralmente a dentina, sendo normalmente de origem pulpar ou sistêmica (LEE et al., 2008). Contudo, existem casos em que cromógenos externos podem penetrar nos tecidos dentários através de alguns defeitos estruturais dos dentes, causando a pigmentação intrínseca (ADDY & MORAN, 1995). Tendo em vista que o café representa um cromógeno extrínseco (LEE et al., 2008), mas que também foi capaz de inibir a perda de minerais de fragmentos de dentes decíduos quando expostos ao biofilme dental, fica clara a necessidade de novas pesquisas que analisem o café como substância cromogênica, lançando mão de ensaios com dentes sem alterações estruturais.

Além disso, apesar de todos os compostos presentes no café contribuírem para o seu sucesso como substância anticariogênica, um ponto deve ser levado em consideração: o conteúdo de flúor no extrato. Sabe-se que em um meio com pH ácido, o flúor, mesmo em concentrações bem reduzidas, tem a capacidade de diminuir a produção de ácidos pelas bactérias presentes no biofilme, exercendo melhor o papel de agente antibacteriano (BELLI et al.,

1995). Neste estudo, o conteúdo de flúor do extrato torrado por 6 minutos de *C. canephora* a 20% foi menor do que o necessário para aumentar o pH do biofilme e, conseqüentemente, favorecer as trocas iônicas durante o processo de des-remineralização dos fragmentos dentários. Porém, Stauder et al. (2010) afirmaram ter encontrado esta substância em frações de extratos deste fruto submetidas à análise microbiológica envolvendo o *Streptococcus mutans*. Torna-se, portanto, relevante novas investigações desta substância em extratos de café de outras espécies.

No mais, em que pesem os significativos achados da presente pesquisa, são necessários outros estudos laboratoriais que analisem o mecanismo de ação dos compostos químicos que possam estar conferindo ao café a função de substância anticariogênica. E, sobretudo, ensaios clínicos que reafirmem esta propriedade, utilizando métodos que investiguem o consumo do café adoçado ou não. Isso porque se trata de uma bebida facilmente obtida, sendo a mais consumida no mundo depois da água mineral (FARAH, 2009), com ou sem açúcar.

Vale ainda dizer que ao se considerar especificamente os compostos químicos do café com propriedades anticariogênicas, o desenvolvimento de novos produtos, contendo tais substâncias, para serem utilizados na área da Odontologia pode vir a se tornar uma realidade. Assumindo o fato de que como o Brasil é o maior produtor mundial de café (ABIC, 2007), a obtenção destes compostos tornar-se-ia mais viável. No entanto, apesar do presente estudo ser ainda considerado como pioneiro em diversos aspectos, ele deve ser encarado como ensaios laboratoriais preliminares. Diversos outros devem ser implementados antes de estas substâncias serem utilizadas em humanos.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados é válido concluir que, todos os extratos de café com grau de torrefação mais clara apresentaram propriedades anticariogênicas ao inibir o crescimento do *Streptococcus mutans*, assim como alguns compostos químicos: ácido clorogênico (5-CQA), trigonelina e ácido caféico. Ademais, o extrato de *Coffea canephora* em alta concentração apresentou propriedades anti-desmineralizantes do esmalte de dentes decíduos.

No que tange às demais proposições, considerando a 1ª fase do estudo:

7.1 Todos os seguintes extratos apresentaram uma concentração mínima de 5 mg/mL capaz de inibir o crescimento bacteriano: extratos integrais de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, de ambos os grupos, torrados por 6, 7 e 8 minutos; e extratos descafeinados de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* torrados por 6 e 7 minutos. Em relação aos compostos químicos purificados, tanto o ácido clorogênico (5-CQA), como a trigonelina e o ácido caféico apresentaram uma concentração mínima inibitória de 0,8 mg/mL.

7.2 Apenas os extratos integrais de *Coffea canephora*, do **grupo 1** e **grupo 2**, foram capazes de inibir a formação de biofilme por cepas de *Streptococcus mutans* em 39,6% e 18,3%, respectivamente. Além disso, o extrato de *Coffea canephora* do **grupo 1** reduziu em apenas 6,6 % o biofilme já formado pelo mesmo microrganismo.

7.3 O desempenho antibacteriano dos extratos de *Coffea canephora* foi superior aos dos extratos de *Coffea arabica*, considerando a sua capacidade em inibir a formação de biofilme por *Streptococcus mutans*. No que concerne

ao grau de torrefação dos grãos, observou-se melhor ação inibitória de crescimento bacteriano dos extratos com grau de torrefação mais clara. E, em acréscimo, a presença da cafeína nos extratos de café influenciou positivamente para uma melhor ação antibacteriana. O que se levou a concluir que o melhor desempenho antibacteriano foi apresentado pelo extrato de *Coffea canephora* integral (**gupo 1**), torrado por 6 minutos (torra muito clara).

Ao considerar a 2^a fase do estudo, conclui-se que:

7.4 O extrato de *Coffea canephora* integral de torra muito clara não foi capaz de inibir o crescimento de cepas ATCC de *Streptococcus sobrinus*. Ele apenas inibiu o crescimento do *Streptococcus mutans* (ATCC), confirmando os resultados encontrados na 1^a fase do estudo: CMI = 7 ± 2 mg/mL.

7.5 O mesmo extrato apresentou propriedades bactericidas (MBC = 160 ± 0 mg/mL) contra o *Streptococcus mutans*, sem contudo exercer a mesma ação sobre o *Streptococcus sobrinus*.

7.6 O extrato de *Coffea canephora* a 20% não apresenta a capacidade de reverter o pH ácido do biofilme formado, *in vitro*, sobre fragmentos de dentes decíduos humanos.

7.7 O extrato de *Coffea canephora* a 20% foi capaz de inibir a perda de mineral de fragmentos de dentes decíduos humanos, conferindo a este extrato uma forte ação anticariogênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDY, M.; MORAN, J. Mechanisms of stain formation on teeth in particular associated with metal ions and antiseptics. **Adv Dent Res.**, v.9, n.4, p.450-456, 1995.

ALMEIDA, A. A. P.; FARAH, A.; SILVA, D. A. M.; NUNAN, E. A. & GLÓRIA, M. B. Antibacterial Activity of Coffee Extracts and Selected Coffee Chemical Compounds against Enterobacteria. *J Agric Food Chem.*, v.54, n.23, p.8738-8743, Nov, 2006.

ALVIANO, W. S.; ALVIANO, D. S.; DINIZ, C. G.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, C. S.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A.; SOUZA, M. M.; BOLOGNESE, A. M. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Arch Oral Biol.**, v.53, n.6, p.545-552, Feb, 2008.

ANILA NAMBOODIRIPAD, P. & KORI, S. Can coffee prevent caries? **J Conserv Dent.**, v.12, n.1, p.17-21, Jan, 2009.

ARION, W. J.; CANFIELD, W. K.; RAMOS, F. C.; SCHINDLER, P. W.; BURGER, H. J.; HEMMERLE, H.; SCHUBERT, G.; BELOW, P. & HERLING, A. W. Chlorogenic acid and hydroxynitrobenzaldehyde: new inhibitors of hepatic glucose 6-phosphatase. **Arch Biochem Biophys.**, v.339, n.2, p.315-322, Mar, 1997.

ARION, W. J.; CANFIELD, W. K.; RAMOS, F. C.; SU, M. L.; BURGER, H. J.; HEMMERLE, H.; SCHUBERT, G.; BELOW, P. & HERLING, A. W. Chlorogenic acid analogue S 3483: a potent competitive inhibitor of the hepatic and renal glucose-6-phosphatase systems. **Arch Biochem Biophys.**, v.351, n.2, p.279-285, Mar, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ (ABIC). Café e saúde. Disponível: http://www.abic.com.br/sabor_cafe.html, 2007.

ATTIN, T.; WEGEHAUPT, F.; GRIES, D.; WIEGAND, A. The potential of deciduous and permanent bovine enamel as substitute for deciduous and permanent human enamel: Erosion-abrasion experiments. **J Dent.**, v.35, n.10, p.773-777, Oct, 2007.

BELLI, W. A.; BUCKLEY, D. H.; MARQUIS, R. E. Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. **Can J Microbiol.**, v.41, n.9, p.785-791, Sep, 1995.

BODET, C.; GRENIER, D.; CHANDAD, F.; OFEK, I.; STEINBERG, D.; WEISS, E. I. Potential oral health benefits of cranberry. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v.48, n.7, p.672-680, Aug, 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Projeto SB Brasil 2003: condições bucais da população brasileira 2002-2003: resultados principais. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação de Saúde Bucal – Brasília: Ministério da Saúde; 2004. 68 p. Série C. Projetos, Programas e Relatórios.

CAVIN, C.; HOLZHAUSER, D.; SCHARF, G.; CONSTABLE, A.; HUBER, W. W. & SCHILTER, B. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food Chem Toxicol.**, v.40, n.8, p.1155-1163, Aug, 2002.

CHARURIN, P.; AMES, J. M. & DEL CASTILLO, M. D. Antioxidant activity of coffee model systems. **J Agric Food Chem.**, v.50, n.13, p.3751-3756, Jun, 2002.

CHO, Y.S.; SCHILLER, N. L.; OH, K. H. Antibacterial effects of green tea polyphenols on clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Curr Microbiol.**, v.57, n.6, p.542-546, Dec, 2008.

CHUNG, J. Y.; CHOO, J. H.; LEE, M. H. & HWANG, J. K. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. **Phytomed.**, v.13, n.4, p.261-266, Mar, 2006.

CLARKE, R. J. & MACRAE, R. Coffee, Vol 1. Chemistry. Eds.; Elsevier Publishing Co.; Amsterdam, 1985.

CLARKE, R. J. Grading, storage, pre-treatments and blending. In R. J. CLARKE & R. MACRAE (Eds.), Coffee volume 2: technology (p.35-58), Amsterdam: Elsevier Applied Science, 1987.

CLIFFORD, M. N. & WILSON, K. C. (Ed.) Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage. Westport: AVI Publishing Company, 1985.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption, and metabolism. **J Sci Food Agric.**, v.80, n.7, p.1033-1043, 2000.

CURY, J. A. & TENUTA, L. M. A. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? **Braz Oral Res.**, v.23, Suppl 1, p. 23-30, 2009.

DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; DACARRO, C. & GAZZANI, G. Isolation of an antibacterial component from roasted coffee. **J Pharm Biomed Anal.**, v.18, n.1-2, p.219-225, Oct, 1998.

DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; GRISOLI, P.; ACETI, C.; SPINI, V.; DACARRO, C.; GAZZANI, G. Isolation, identification, and quantification of roasted coffee antibacterial compounds. **J Agric Food Chem.**, v.55, n.25, p.10208-10213, Dec, 2007.

DE MARIA, R.; ZEUNER, A.; ERAMO, A.; DOMENICHELLI, C.; BONCI, D.; GRIGNANI, F.; SRINIVASULA, S. M.; ALNEMRI, E. S.; TESTA, U. & PESCHLE, C. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. **Nature**, v.401, n.6752, p.489-493, Sep, 1999.

DEMIRBAG, D.; OZDEMIR, F.; TURE, M. Effects of coffee consumption and smoking habit on bone mineral density. **Rheumatol Int.**, v. 26, n.6, p.530-535, Apr, 2006.

DOGASAKI, C.; SHINDO, T.; FURUHATA, K. & FUKUYAMA, M. Identification of chemical structure of antibacterial components against *Legionella pneumophila* in a coffee beverage. **Yakugaku Zasshi**, v.122, n.7, p.487-494, Jul, 2002.

EGGERTSSON H, FERREIRA-ZANDONA A. Dentition and lesion history. **Monogr Oral Sci.** v.21, n.3, p.102-12, Jun, 2009

EKLUND, S. A. Trends in dental treatment, 1992 to 2007. **J Am Dent Assoc.**, v.141, n.4, p.391-399, Apr, 2010.

FARAH, A. Coffee as a speciality and functional beverage. In: Functional and Speciality beverage technology. PAQUIN, P.; Woodhead Publishing, CRC Press, England, p.370-390, 2009.

FARAH, A.; DE PAULIS, T.; MOREIRA, D. P.; TRUGO, L. C. & MARTIN, P. R. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. **J Agric Food Chem.**, v.54, n.2, p.374-381, Jan, 2006 – b.

FARAH, A.; DE PAULIS, T.; TRUGO, L. C. & MARTIN, P. R. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. **J Agric Food Chem.**, v.53, n.5, p.1505-1513, Mar, 2005.

FARAH, A.; MONTEIRO, M. C.; CALADO, V.; FRANÇA, A. S.; TRUGO, L. C. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chem.**, v.98, n.2, p. 373-380, 2006 – a.

FILOCHE, S.; WONG, L.; SISSONS, C. H. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. **J Dent Res.**, v.89, n.1, p.8-18, Jan, 2010.

FLORES, G. B.; ANDRADE, F.; LIMA, D. R.; Brazilian Youth Drug Study. Can coffee help fighting the drug problem? Preliminary results of a Brazilian youth drug study. **Acta Pharmacol Sin.**, v.21,n.12, p. 1059-1070, Dec, 2000.

FOREING AGRICULTURAL SERVICES. United States Department of Agriculture. Disponível: <http://www.fas.usda.gov>, 2007.

FULDA S. Modulation of Apoptosis by Natural Products for Cancer Therapy. **Planta Med.**, May 19, 2010. Article in press.

FURUHATA, K.; DOGASAKI, C., HARA, M.; FUKUYAMA, M. Inactivation of *Legionella pneumophila* by phenol compounds contained in coffee. **J Antibac Antifung Agents.**, v.30, n.5, p.291-297, 2002.

GUGGENHEIM B, GIERTSEN E, SCHÜPBACH P, SHAPIRO S. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. **J Dent Res.**, v.80, n.1, p.363-370, Jan, 2001.

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 Res.**, v.37, n.5, p. 339- 344, Sep-Oct, 2003.

HARRIS, S. S. & NAVIA, J. M. Vitamin A deficiency and caries susceptibility of rat molars. **Arch Oral Biol.**, v.25,n.6, p. 415-421, 1980.

HARVEY, D. H. & MARSH, R. W. The effects of de-caffeinated coffee versus whole coffee on hyperactive children. **Dev Med Child Neurol.**, v.20, n.1, p.81-86, Feb,1978.

HERLING, A. W.; BURGER, H. J.; SCHWAB, D.; HEMMERLE, H.; BELOW, P.; SCHUBERT, G. Pharmacodynamic profile of a novel inhibitor of the hepatic glucose-6-phosphatase system. **Am J Physiol.**, v.274, n.6 (Pt1), p.G1087-1093, Jun, 1998.

ISENBERG, H. D. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Vol. 1. ASM Washington, DC, Sec 5.16, 1992.

JOHANSSON, I.; ERICSON, T.; BOWEN, W. & COLE, M. The effect of malnutrition on caries development and saliva composition in the rat. **J Dent Res.**, v.64, n.1, p. 37-43, Jan, 1985.

JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N. & MORGAN, L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **Am J Clin Nutr.**, v.78, n.4, p.728-733, Oct, 2003.

KASHKET, S.; PAOLINO, V. J.; LEWIS, D. A. & Van HOUTE, J. In vitro inhibition of glucosyltransferase from the dental plaque bacterium *Streptococcus mutans* by common beverages and food extracts. **Arch Oral Biol.**, v.30, n.11-12, p.821-826, 1985.

KIDD, E. A. M; FEJERSKOV, O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. **J Dent Res.**, v.83, Spec Iss C: C35-C38, 2004.

KIM, T. J.; WENG, W. I.; SILVA, J. L.; JUNG, Y. S.; MARSHALL, D. Identification of a natural antimicrobial substances in red muscadine juice against *Cronobacter sakazakii*. **J Food Sci.**, v.75, n.3, p. M150-154, Apr, 2010.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov.**, v.4, n.3, p.206-220, Mar, 2005.

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 Res.**, v.36, n.6, p.445-448, Nov-Dec, 2002.

KOO, H.; JEON, J. G. Naturally occurring molecules as alternative therapeutic agents against cariogenic biofilms. **Adv Dent Res.**, v.21, n.1, p.63-68, 2009.

KUBO SHLONSKY, A.; KLATSKY, A. L.; ARMSTRONG, M. A. Traits of persons who drinks decaffeinated coffee. **Ann Epidemiol.**, v.13, n.4, p.273-279, Apr, 2009.

LEE, B.S.; HUANG, S. H.; CHIANG, Y. C.; CHIEN, Y. S.; MOU, C. Y.; LIN, C. P. Development of in vitro tooth staining model and usage of catalysts to elevate the effectiveness of tooth bleaching. **Dent Mater.**, v.24, n.1, p.57-66, Jan, 2008.

LEE, O. H., LEE, B. Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. **Bioresour Technol.**, v.101, n.10, p.3751-3754, May, 2010.

LINDEN, L. A.; BJORKMAN, S.; HATTAB, F. The diffusion in vitro of fluoride and chlorhexidine in the enamel of human deciduous and permanent teeth. **Arch Oral Biol.**, v.31, n.1, p.33-37, 1986.

LUNA-FILHO, E. P. Cafés do Brasil e indicações geográficas. Disponível: <http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp>, 2006.

MANAKER, L. & NAVIA, J. M. Effect of undernutrition during the perinatal period on caries development in the rat. 11. Caries susceptibility in underfed rats supplemented with protein or caloric additions during the suckling period. **J Dent Res.**, v.52, n.4, p.680-687, Jul-Aug, 1973.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **J Ethnopharmacol.**, v.74, n.2, p.105-112, Feb., 2001.

MAZZAFERA, P. Trigonelline in coffee. **Phytochemistry**, v.30, n.7, p.2309-2310, 1991.

MCFARLAND, J. Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. **J Am Med Assoc.**, v.14, p.1176-1178, 1907.

MILGROM, P.; ZERO, D. T.; TANZER, J. M. An examination of the advances in science and technology of prevention of tooth decay in young children since the Surgeon General's Report on Oral Health. **Acad Pediatr.**, v.9, n.6; p.404-409, Nov-Dec, 2009.

MONTEIRO, M. C. & TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Quim Nova**, v. 28, n. 4, p. 637-641, 2005.

MOREIRA, R. F. A., TRUGO, L. C. & DE MARIA, C. A. B. Componentes voláteis do café torrado: parte II: compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Quim Nova.**, v.23,n.2, p.195-203, 2000.

MOYNIHAN, P. J. the role of diet and nutrition in the etiology and prevention of oral diseases. **Bulletin of WHO**, v.83, n.9, p. 694-699, Sep, 2005.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS.
Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard – Eighth edition. NCCLS document M7-A6. NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA, 2003.

NEHLIG, A. Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. **Neurosci Biobehav Rev.**, v.23, n.4, p.563-576, Mar, 1999.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products are sources of new drugs over the period 1981-2002. **J Nat Prod.**, v.66, n.7, p. 1022-1037, Jul, 2003.

NGAI, H. H.; SIT, W. H.; WAN, J. M. The nephroprotective effects of the herbal medicine preparation, WH30+, on the chemical-induced acute and chronic renal failure in rats. **Am J Chin Med.**, v.33, n.3, p.491-500, 2005.

OLIVEIRA, L. B.; SHEIHAM, A.; BONECKER, M. Exploring the association of dental caries with social factors and nutritional status in Brazilian preschool children. **Eur J Oral Sci.**, v.116, n.1, p.37-43, Feb, 2008.

OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; IZUMITANI, A.; SOBUE, S.; FUJIWARA, T.; KAWABATA, S. & HAMADA, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. **Caries Res.**, v.27, n.2, p.124-129, 1993.

OOSHIMA, T.; OSAKA, Y.; SASAKI, H.; OSAWA, K.; YASUDA, H.; MATSUMURA, M.; SOBUE, S. & MATSUMOTO, M. Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in in vitro and animal experiments. **Arch Oral Biol.**, v.45, n.8, p.639-645, Aug, 2000.

PAQUIN, P. Functional and Speciality beverage technology. Woodhead Publishing, CRC Press, England, 2009.

PATTUSSI, M. P.; HARDY, R.; SHEIHAM, A. The potential impact of neighborhood empowerment on dental caries among adolescents empowerment on dental caries among adolescents. **Community Dent Oral Epidemiol.**, v.34, n.5, p.344-350, Oct, 2006.

PERCIVAL, R. S.; DEVINE, D. A.; DUGGAL, M. S.; CHARTRON, S. & MARSH, P. D. The effect of cocoa polyphenols on the growth, metabolism, and biofilm formation by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. **Eur J Oral Sci.**, v.114, n.4, p.343-348, Aug, 2006.

PEREIRA, M. A.; PARKER, E. D. & FOLSOM, A. R. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus: an 11-year prospective study of 28 812 postmenopausal women. **Arch Intern Med.**, v.166, n.12, p.1311-1316, Jun, 2006.

PERRONE, D.; DONANGELO, A. C.; FARAH, A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in green and roasted coffee by chromatography – mass spectrometry. **Food Chem.**, v.110, n.4, p.1030-1035, Oct, 2008.

PETERSEN, P. E.; BOURGEOIS, D.; OGAWA, H.; ESTUPINAN-DAY, S. & NDIAYE, C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. **Bull World Health Organ.**, v.83, n.9, p.661-669, Sep, 2005.

PETTI, S.; SIMONETTI, R. & SIMONETTI D'ARCA, A. The effect of milk and sucrose consumption on caries in 6-to-11-year-old Italian schoolchildren. **Eur J Epidemiol.**, v.13, n.6, p.659-664, Sep, 1997.

PSOTER, W. J.; REID, B. C. & KATZ, R. V. Malnutrition and dental Caries: A Review of the literature. **Caries Res.**, v.39, n.6, p. 441-447, Nov-Dec, 2005.

RIBEIRO, N. M. E. & RIBEIRO, M. A. S. Breastfeeding and early childhood caries: a critical review. **J Pediatr (Rio J)**, v.80, Suppl.5, p.199-210, Nov, 2004.

ROBINSON, W. E. JR.; CORDEIRO, M.; ABDEL-MALEK, S.; JIA, Q., CHOW, S. A.; REINECKE, M. G., MITCHELL, W. M. Dicafeoylquinic acid inhibitors of human immunodeficiency virus integrase: inhibition of the core catalytic domain of human immunodeficiency virus integrase. **Mol Pharmacol.**, v.50, n.4, p.846-855, Oct, 1996.

RUGG-GUNN, A. J.; EDGAR, W. M.; GEDDES, D. A. & JENKINS, G. N. The effect of different meal patterns upon plaque pH in human subjects. **Br Dent J.**, v.139, n.9, p.351-356, Nov, 1975.

RUGG-GUNN, A. J.; HACKETT, A. F.; APPLETON, D. R.; EASTOE, J. E. & JENKINS, G. N. Correlations of dietary intakes of calcium, phosphorus and Ca/P ratio with caries data in children. **Caries Res.**, v.18, n.2, p.149-152, 1984.

RUGG-GUNN, A. J.; ROBERTS, G. J. & WRIGHT, W. G. Effect of human milk on plaque pH in situ and enamel dissolution in vitro compared with bovine milk, lactose, and sucrose. **Caries Res.**, v.19, n.4, p.327-334, 1985.

SANTOS, F. A.; BASTOS, E. M.; UZEDA, M.; CARVALHO, M. A.; FARIAS, L. M.; MOREIRA, E. S. & BRAGA, F. C. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **J Ethnopharmacol.**, v.80, n.1, p.1-7, Apr, 2002.

SHEARER, J.; SELLARS E. A.; FARAH, A.; GRAHAM, T. E.; WASSERMAN, D. H. Effects of chronic coffee consumption on glucose kinetics in the conscious rat. **Can J Physiol Pharmacol.**, v.85, n.8, p.823-830, Aug, 2007.

SHUKLA, N.; KUMAR, M.; AKANKSHA; AHMAD, G.; RAHUJA, N.; SINGH, A. B.; SRIVASTAVA, A. K.; RAJENDRAN, S. M.; MAURYA, R. Tectone, a new antihyperglycemic anthraquinone from *Tectona grandis* leaves. **Nat Prod Commun.**, v.5, n.3, p.427-430, Mar, 2010 – a.

SHUKLA, S. K.; GUPTA, S.; OJHA, S. K.; SHARMA, S. B. Cardiovascular friendly natural products: a promising approach in the management of CVD. **Nat Prod Res.**, v.24, n.9, p.873-898, May, 2010 – b.

SIGNORETTO, C.; BIANCHI, F.; BURLACCHINI, G.; SIVIERI, F.; SPRATT, D.; CANEPARI, P. Drinking habits are associated with changes in the dental plaque microbial community. **J Clin Microbiol.**, v.48, n.2, p.347-356, Feb, 2010.

SIGNORETTO, C.; BURLACCHINI, G.; BIANCHI, F.; CAVALLERI, G.; CANEPARI, P. Differences in microbiological composition of saliva and dental plaque in subjects with different drinking habits. **New microbial.**, v.29, n.4, p.293-302, Oct, 2006.

SIMONETTI, G.; SIMONETTI, N.; VILLA, A. Increased microbicidal activity of green tea (*Camellia sinensis*) in combination with butylated hydroxyanisole. **J Chemother.**, v.16, n.2, p.122-127, Apr, 2004.

SMITH, D. J. Dental caries vaccines: prospects and concerns. **Crit Rev Oral Biol Med.**, v.13, n.4, p.335-349, 2002.

SMULLEN, J.; KOUTSOU, G. A., FOSTER H. A., ZUMBÉ, A.; STOREY, D. M. The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, v.41, n.5, p.342-349, 2007.

SØNJU CLASEN, A. B.; RUYTER, I. E. Quantitative determination of type A and type B carbonate in human deciduous and permanent enamel by means of Fourier transform infrared spectrometry. **Adv Dent Res.**, v.11, n.4, p.523–527, Nov, 1997.

SRIKANTH, R. K.; SHASHIKIRAN, N. D.; SUBBA REDDY, V. V. Chocolate mouth rinse: Effect on plaque accumulation and mutans streptococci counts when used by children. **J Indian Soc Pedod Prev Dent.**, v.26, n.2, p.67-70, Jun, 2008.

STICH, H. F.; CHAN, P. K. & ROSIN, M. P. Inhibitory effects of phenolics, teas and saliva on the formation of mutagenic nitrosation products of salted fish. **Int J Câncer**, v.30, n.6, p.719-724, Dec, 1982.

TAKAHASHI, N. & NYVAD, B. Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. **Caries Res.**, v.42, n.6, p.409-418, Oct, 2008.

TANAKA, K.; MYIAKE, Y.; SASAKI, S. Intake of dairy products and the prevalence of dental caries in young children. **J Dent.**, v.38, n.7, p.579-583, Jul, 2010.

TATEFUJI, T.; IZUMI, N.; OHATA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. **Biol Pharm Bull.**, v.19, n.7, p.966-970, Jul, 1996.

THYLSTRUP, A. & FEJERSKOV, O. *Cariologia Clínica*. 3ª ed. Editora Santos, São Paulo, 2001.

TOUGER-DECKER, R. & van LOVEREN, C. Sugars and dental caries. **Am J Clin Nutr.**, v.78,n.4, p.881S-892S, Oct, 2003.

TRUGO, L. C. Carbohydrates. In: R Clarke; R Macrae. (Org.). COFFEE CHEMISTRY. 1 ed. LONDON: ELSEVIER APPLIED SC. PUBLISHERS, p. 0083-0114, 1985.

TRUGO, L. C. HPLC in Coffee Analysis. PhD Thesis. University of Reading, England, 1984.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. Application of Hplc to the analysis for some non-volatile coffee components. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.39, p.96-107, 1989.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **J Food Sci.**, v.73, n.9, p.R117-124, Nov, 2008.

VORAVUTHIKUNCHAI, S. P.; KANCHANAPOOM, T.; SAWANGJAROEN, N.; HUTADILOK-TOWATANA, N. Antioxidant, antibacterial and anti-giardial activities of *Walsura robusta* Roxb. **Nat Prod Res.**, v.24, n.9, p.813-824, May, 2010.

WALKER, C. B. The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. **Periodontol 2000**, v.10, p.79-88, Feb, 1996.

WANG, J. F.; SCHRAMM, D. D.; HOLT, R. R.; ENSUNSA, J. L.; CESAR, G. F.; SCHMITZ, H. H. & KEEN, C. L. A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. **J Nutr.**, v.130, p. 2115S-2119S, 2000.

WATTENBERG, L. W. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. **Cancer Res.**, v.43, n.5 Suppl, p.2448s-2453s, May, 1983.

WATTS, A.; ADDY, M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. **Br Dent J.**, v.190, n.6, p.309-316, Mar, 2001.

WEI, G. X.; CAMPAGNA, A. N.; BOBEK, L. A. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. **J Antimicrob Chemother.**, v.57, n.6, p. 1100-1109, Jun, 2006.

XIAO, J.; ZHOU, X. D.; FENG, J.; HAO, Y. Q.; LI, J. Y. Activity of *Nidus Vespae* extract and chemical fractions against *Streptococcus mutans* biofilms. **Lett Appl Microbiol.**, v.45, n.5, p. 547-552, Nov, 2007.

XIE, Q.; BEDRAN-RUSSO, A. K.; WU, C. D. In vitro remineralization effects of grape seed extract on artificial root caries. **J Dent.**, v.36, n.11, p.900-906, Nov, 2008.

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. **J Ethnopharmacol.**, v.97, n.2, p.183-189, Feb, 2005.

YEN, W. J.; WANG, B. S.; CHANG, L. W. & DUH, P. D. Antioxidant properties of roasted coffee residues. **J Agric. Food Chem.**, v.53, n.7, p.2658-2663, Apr, 2005.

ZERO, D.T. *In situ* Caries Models. **Adv Dent Res.**, v. Washington, v.9, n.3, p.214-130, Nov, 1995.

ZHANG, L.; XUE, J.; JIYAO, L.; ZOU, L.; HAO, Y.; ZHOU, X.; LI, D. W. Effects of Galla chinensis on inhibition of demineralization of regular bovine enamel or enamel disposed of organic matrix. **Arch Oral Biol.**, v.54, n.9, p.817-822, Sep., 2009.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ESTUDOS DE SAÚDE COLETIVA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER 97/2007

PROCESSO: 43/2007

Projeto de Pesquisa: **ATIVIDADE ANTICARIOGÊNICA DE EXTRATOS E COMPOSTOS QUÍMICOS DO CACAU E DO CAFÉ**

Pesquisador: Luciane Cople Maia de Faria

O Comitê de Ética em Pesquisa, tendo em vista o que dispõe a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, resolveu APROVAR o presente projeto.

Informamos que o CEP está à disposição do pesquisador para quaisquer esclarecimento ou orientação que se façam necessários no decorrer da pesquisa.

Lembramos que o pesquisador deverá apresentar relatório da pesquisa no prazo de um ano a partir desta data.

Cidade Universitária, 22 de novembro de 2007.

Marisa Pafácios
Coordenadora CEP/NESC

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Faculdade de Odontologia
Departamento de Odontopediatria e Ortodontia
Disciplina de Odontopediatria

Prezado Sr (a):

A Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro estará realizando uma pesquisa que visa avaliar o efeito anti-cárie do café, bem como dos seus componentes químicos.

Para realização destes testes, cada voluntário deverá cuspir em um tubo estéril apropriado, com o objetivo de coletar a sua saliva. Além de estar em jejum de uma hora antes dessa coleta.

Com a participação nesta pesquisa você poderá ser beneficiado (a) com uma avaliação da sua saúde bucal, com instruções de higiene bucal e com avaliações das propriedades da sua saliva (testes salivares).

Caso você desista de participar da pesquisa ou retire seu consentimento por qualquer motivo, isto não implicará em qualquer penalização.

Todos os dados que envolvam a privacidade dos voluntários serão codificados e só serão conhecidos pelos pesquisadores.

Para qualquer esclarecimento não hesite em procurar a pesquisadora e/ou orientadora deste estudo (contatos descritos abaixo). Assim como o Instituto de Estudos de Saúde Coletiva, Comitê de Ética em pesquisa – tel: (021) 2598-9328.

Assinatura: _____

Andréa Gonçalves Antonio

Cirurgiã-dentista, Mestre em Odontopediatria e aluna do Programa de Doutorado em Odontologia da UFRJ – pesquisadora. Telefones: (021) 2491-2980.

Assinatura: _____

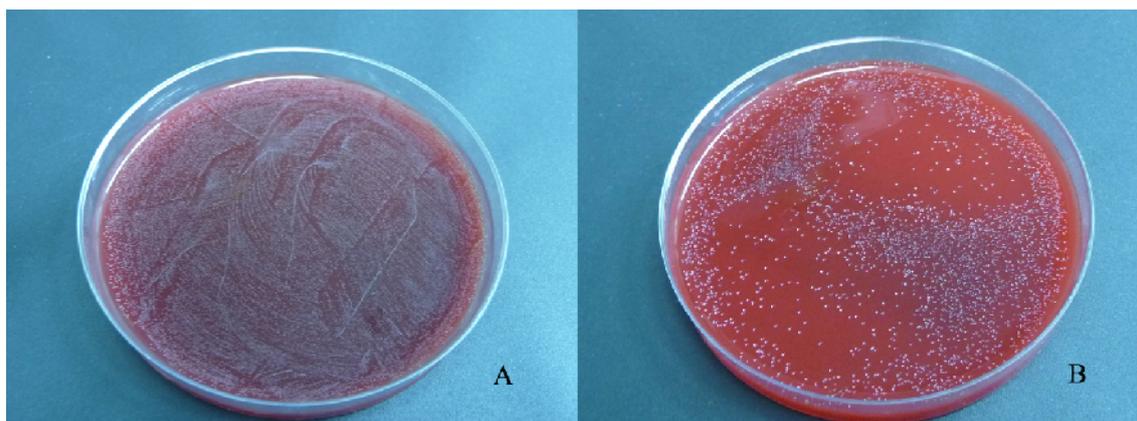
Lucianne Cople Maia de Faria

Cirurgiã-dentista, Mestre em Odontopediatria, Doutora em Odontologia Social e professora do Programa de Doutorado em Odontologia da UFRJ – orientadora e responsável pela pesquisa. Telefones: (021) 2629-3738.

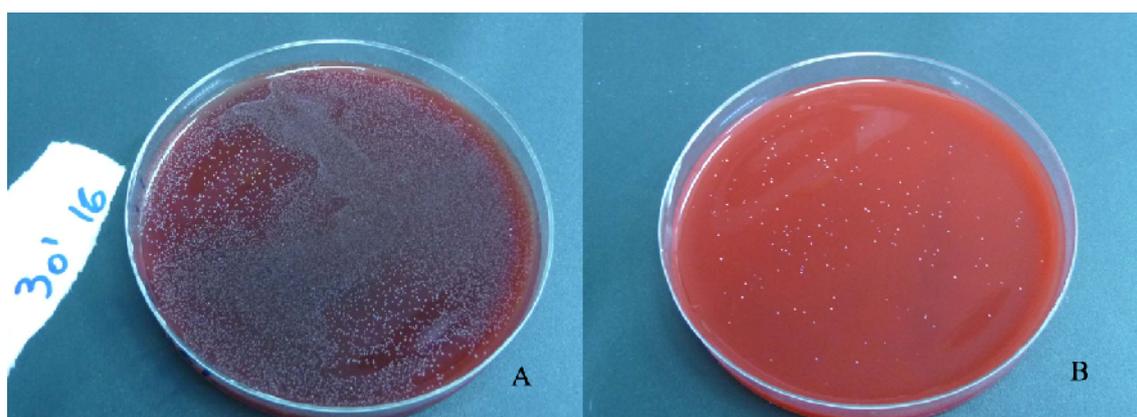
Tendo sido informado (a) dos procedimentos a serem realizados, concordo com a participação na pesquisa descrita acima.

Assinatura: _____

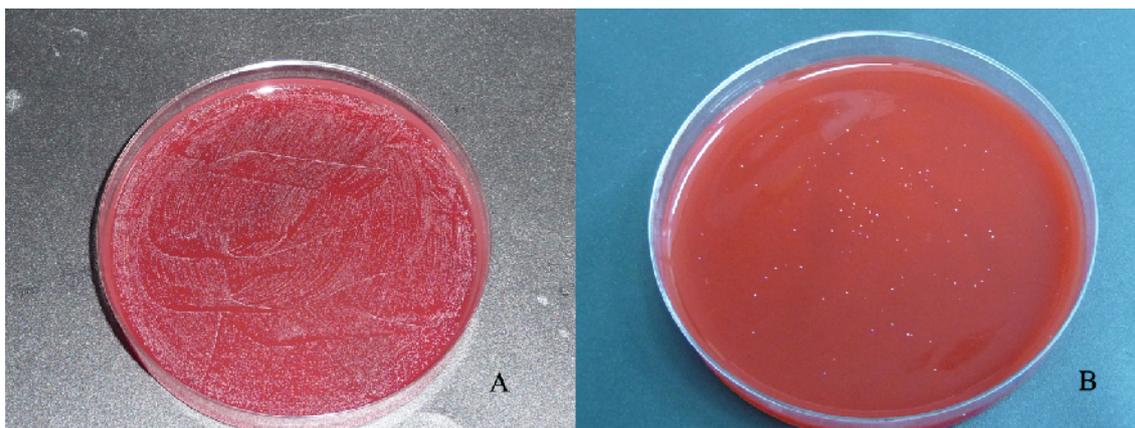
Anexo 3 – Fotografias demonstrando o número de colônias de *Streptococcus mutans* em dois momentos do ensaio da curva de morte, quando expostos às diferentes concentrações do extrato de *Coffea canephora* (1%, 16% e 20%)



Colônias de *Streptococcus mutans* após 30 minutos (A) e 180 minutos (B) de exposição ao extrato de café a 1%



Colônias de *Streptococcus mutans* após 30 minutos (A) e 180 minutos (B) de exposição ao extrato de café a 16%



Colônias de *Streptococcus mutans* após 30 minutos (A) e 180 minutos (B) de exposição ao extrato de café a 20%

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)