

Atividade Inibitória de Extratos do Cerrado Brasileiro sobre Microrganismos Anaeróbios e Associados a Infecções Nosocomiais

Inhibitory activity of extracts of the Brazilian Cerrado on anaerobic microorganisms and associated with nosocomial infections

ELERSON GAETTI-JARDIM JÚNIOR¹
LUIS FERNANDO LANDUCCI²
ELLEN CRISTINA GAETTI-JARDIM³
JORGIANA SANGALLI⁴
FÁTIMA REGINA NUNES DE SOUSA⁵

RESUMO

Objetivo: O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais do cerrado brasileiro sobre microrganismos bucais e patógenos oportunistas. **Materiais e Métodos:** Nos testes foram preparados extratos hidroalcoólicos e aquosos de 22 espécies de plantas utilizadas nas regiões norte, nordeste e Centro-Oeste como parte de medicina popular. Esses extratos foram testados sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 3384, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 e ATCC 25586, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 2564, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Inicialmente foi realizada uma triagem para se determinar a atividade antimicrobiana dos extratos. Em seguida, foram realizados testes para avaliar a maior diluição inibitória dos extratos por meio do método de diluição em caldo. **Resultados:** Os resultados demonstraram que aproximadamente 20% de todos os extratos mostraram atividade inibitória sobre algum dos microrganismos alvo, os extratos de mais amplo espectro foram os extratos aquosos e hidroalcoólicos de araçá e aroeira, não apresentando diferença significativa entre aquoso ou hidroalcoólico. **Conclusão:** Os extratos aquosos e hidroalcoólicos de araçá e aroeira foram efetivos frente a maioria das cepas teste. Novos estudos devem ser realizados para avaliar seus efeitos em baixas concentrações, bem como o mecanismo capaz de inibir microrganismos tão fisiologicamente diferentes quanto os empregados no presente estudo.

DESCRITORES

Plantas medicinais. Produtos com ação antimicrobiana. Cárie dentária. Periodontite.

SUMMARY

Objective: The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of extracts of plants from Brazilian savanna on oral microorganisms and opportunistic pathogens. **Material and Methods:** For the test, hydroalcoholic and aqueous extracts were prepared from 22 plant species used in the Northern, Northeastern and Midwestern Brazilian's regions as part of folk medicine. These extracts were tested against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 3384, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 e ATCC 25586, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 2564, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Initially it was performed a screening in order to determine the antimicrobial activities of the extracts. In addition, there were conducted tests to evaluate the highest inhibitory dilution by mean of dilution broth method. **Results:** The results evidenced that 20% of all tested extract presented antimicrobial activity on at least some targeted microorganisms, and the most active were the hydroalcoholic and aqueous extracts obtained from araçá and aroeira, no significant difference between aqueous and hydroalcoholic. **Conclusion:** The aqueous and hydroalcoholic extracts obtained from araçá e and aroeira were effective against most strains testing. Further studies should be performed to evaluate its effects at low concentrations, as well as the mechanism capable of inhibiting physiologically different microorganisms such as those employed in this study.

DESCRIPTORS

Plants medicinal. Products with antimicrobial action. Dental caries. Periodontitis.

1 Professor Livre Docente Doutor do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da FOA-UNESP

2 Doutor em Odontologia Biopatologia Bucal São José dos Campos pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Brasil.

3 Mestre em Estomatologia, pós-graduanda em Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP

4 Mestre em Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP

5 Aluna de pós-graduação de Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP

Os microrganismos anaeróbios bucais são causa freqüente de infecções de cabeça e pescoço e oportunistas e por vezes se disseminam (ISHIHARA *et al.*, 2004), embora não tenham grande relevância nas infecções hospitalares, onde outros patógenos anaeróbios facultativos e aeróbios são mais relevantes, como *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* (DONLAN, 2008). Esses microrganismos freqüentemente albergam genes de resistência a antimicrobianos e podem converter a cavidade bucal em seus reservatórios (GONÇALVES *et al.*, 2007, GAETTI-JARDIM JR. *et al.*, 2008).

Sabe-se que a maioria das doenças que atinge a boca é de natureza infecciosa, destacando-se as periodontopatias, as mucosites e a cárie dental em função de suas prevalências e danos que causam ao aparelho estomatognático (DAROUT *et al.*, 2002). Nessas doenças, tem-se a participação de diferentes grupos microbianos, que desempenham papéis específicos na patogênese das mesmas. Esses microrganismos fazem parte de estruturas complexas denominadas “biofilmes”, os quais são pouco sensíveis à maioria dos compostos químicos (BERCY, LESSERRE, 2007).

Esse fenômeno de formação de biofilme também é bastante relevante nas infecções associadas aos gêneros *Enterococcus* e *Pseudomonas* em ambiente hospitalar, o que corrobora para que esses microrganismos se convertam em dois dos mais perigosos agentes de infecções super-resistentes a antimicrobianos (DONLAN, 2008).

Além desse aspecto, os agentes químicos tradicionais para controle do biofilme bucal, muito utilizados em pacientes com paralisia cerebral, politraumatizados ou irradiados, como bisguanidinas, compostos fenólicos, oxidantes, antibióticos e outros, possuem efeitos colaterais que vão desde pigmentação dental, perda de paladar até possível carcinogenicidade (WEST, MORAN, 2008), sendo que ainda não existem protocolos confiáveis de controle e tratamento de doenças associadas ao biofilme dental para populações carentes que vivem em áreas distantes dos centros urbanos (IWAKI *et al.*, 2006). Em muitas regiões do Brasil, essas populações ainda mantêm um grande conhecimento da medicina natural de seus ancestrais indígenas e, por vezes, africanos, costumam utilizá-la no tratamento e prevenção de doenças infecciosas.

A despeito da redução no número de dentes perdidos, cariados e restaurados (índice CPOD) observado em nosso país, existe o fenômeno de polarização da cárie dental, onde uma parcela muito pequena da população concentra grande parte das novas

lesões cáries (NARVAI *et al.*, 2006). Além da cárie, as doenças periodontais também representam patologias de natureza infecciosa e de caráter endógeno, associada ao desenvolvimento do biofilme subgingival (FENG, WEINBERG, 2006; HERRERA *et al.*, 2008). Dentre os periodontopatógenos, destacam-se os anaeróbios Gram-negativos, como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*, bem como o microaerófilo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, particularmente nos quadros mais precoces e agressivos (FENG, WEINBERG, 2006; HERRERA *et al.*, 2008).

Na população em geral, existe um costume de considerar a utilização de ervas medicinais e outros produtos naturais como recursos eficientes no tratamento de doenças infecciosas, existindo também a falsa idéia que estes compostos não causam efeitos colaterais. Em países como o Brasil, que concentra uma parcela significativa da biodiversidade vegetal do planeta, esses aspectos apresentam grande importância (VIEIRA, MARTINS, 2000), existindo, inclusive, programas governamentais de estímulo ao uso desses fármacos naturais.

Merece destaque o fato de que apenas mínima parcela das denominadas “plantas medicinais” tenha sido avaliada em experimentos *in vitro* ou *in vivo*, sendo que o ritmo de ocupação antrópica dos biomas vegetais é infinitamente maior do que a capacidade de avaliação das propriedades biológicas das plantas que se extinguem, particularmente quando falamos de ecossistemas complexos e ricos como o cerrado brasileiro (BATALHA *et al.*, 2001). Entretanto, o crescimento populacional e a demanda por alimentos, associados às condições edafo-climáticas favoráveis do cerrado, transformaram essa região na mais importante área para atividades agropecuárias no Brasil, implicando em um ritmo acelerado de ocupação nas últimas décadas, levando a irreparável perda do patrimônio genético vegetal (VIEIRA, MARTINS, 2000).

Assim, esse estudo teve como objetivos avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais de plantas medicinais do cerrado brasileiro sobre microrganismos anaeróbios estritos e facultativos bucais, bem como sobre *E. faecalis* e *P. aeruginosa*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismos testados

Foram utilizadas as cepas de referência *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 3384, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Fusobacterium*

nucleatum ATCC 10953 e ATCC 25586, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 2564, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

Preparo dos extratos vegetais

Foram preparados extratos vegetais das espécies listadas no Quadro 1, divididas por família, espécie, parte utilizada na medicina popular e nome popular. A escolha das espécies de plantas utilizadas seguiu as informações etnofarmacológicas obtidas durante dois anos de visitas prévias às famílias de sertanejos que viviam nas áreas geográficas de coleta dos espécimes vegetais.

As plantas foram coletadas em áreas mantidas como reserva permanente em propriedades rurais dos municípios de Carolina, Estado do Maranhão e Camapuã, Estado do Mato Grosso do Sul, onde estão algumas das mais preservadas e amplas áreas de cerrado do país. O período da coleta correspondeu ao período chuvoso (novembro a fevereiro) dos anos de 2003 a 2008, por facilidade de acesso. As coordenadas geográficas dos locais de coleta de cada espécime vegetal, bem como imagens e informações fornecidas pelos sertanejos que auxiliaram na coleta foram anexadas às *exicatas* e enviadas ao laboratório de Farmacognosia para identificação dos espécimes e preparo dos extratos.

Os extratos hidroalcoólicos foram obtidos de acordo com metodologia empregada por NAVARRO *et al.*, (1998). Após secagem inicial em locais ventilados em temperatura ambiente (média 27°C), as folhas e cascas dos caules foram submetidas à secagem em estufa, até o ponto em que as folhas e cascas dos caules apresentavam-se secos e quebradiços. A seguir, realizou-se a etapa de fragmentação até que as plantas fossem convertidas em pó fino e homogêneo. Adicionou-se então, 25g de pó da planta testada em 125mL de etanol 80%. Os frascos foram agitados vigorosa e manualmente por três minutos. Esta operação foi realizada cinco vezes ao dia durante 12 dias. Finalmente, procedia-se a filtração fracionada e o produto também era esterilizado por filtração (membrana Millipore 0,22µm) e imediatamente utilizado.

Os extratos aquosos dos vegetais foram preparados de acordo com metodologia descrita por TSUCHIYA *et al.*, (1994). Para tanto, 25 gramas de folhas ou cascas e caules, de cada planta foram adicionadas a 100mL de água destilada e mantidas por 5 minutos a 100°C, por 1 hora a 55°C e por 72 horas em temperatura ambiente. Cada mistura era agitada a cada 24 horas. Os extratos aquosos foram submetidos a filtração fracionada e esterilizados como descrito acima.

Quadro 1 – Relação de espécies do cerrado de uso na medicina popular, empregadas no presente estudo, de acordo com família, espécie, parte da planta utilizada e nome popular.

Família	Espécie	Parte utilizada	Nome popular
Anacardiaceae	<i>Anacardium giganteum</i>	Folha	Cajuaçu
Anacardiaceae	<i>Anacardium occidentale</i>	Folha	Caju
Anacardiaceae	<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Casca e folhas	Aroeira
Astearaceae	<i>Solidago chilensis</i>	Caule	Arnica
Bignoniaceae	<i>Jacaranda cuspidifolia</i>	Folha	Caroba
Bignoniaceae	<i>Tabebuia impetiginosa</i>	Casca e folhas	Ipê-roxo
Bignoniaceae	<i>Tabebuia ochracea</i>	Casca e folha	Ipê-amarelo
Bignoniaceae	<i>Tabebuia róseo-alba</i>	Casca e folha	Ipê-branco
Boraginaceae	<i>Cordia glabrata</i>	Casca e folhas	Louro-de-mato-grosso
Boraginaceae	<i>Patagonula americana</i>	Folhas	Guajuvira
Caryocaraceae	<i>Caryocar brasiliense</i>	Casca e folhas	Pequi
Celastraceae	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Caule	Cancerosa
Combretaceae	<i>Terminalia argentea</i>	Casca	Capitão-do-campo
Compositae	<i>Piptocarpha rotundifolia</i>	Casca e folhas	Candeia
Leguminosae	<i>Diptychandra aurantiaca</i>	Casca e folhas	Balsaminho
Leguminosae	<i>Platypodium elegans</i>	Casca	Jacarandá
Meliaceae	<i>Cedrela fissilis</i>	Casca	Cedro
Mimosaceae	<i>Anadenanthera falcata</i>	Casca e folhas	Angico
Moraceae	<i>Ficus enormis</i>	Casca e folhas	Figueira
Myrtaceae	<i>Psidium cattleianum</i>	Casca e folhas	Araçá
Phytolaccaceae	<i>Gallesia integrifolia</i>	Folhas	Pau d'alho
Proteaceae	<i>Roupala brasiliensis</i>	Folhas	Carne-de-vaca

Triagem inicial da atividade antimicrobiana dos extratos

Inicialmente, foram executados testes para verificar a eficácia da atividade antimicrobiana dos variados extratos frente aos microrganismos alvo, para otimizar os testes subsequentes. Para tanto, a turbidez de culturas microbianas desenvolvidas em caldo infuso de cérebro e coração (BHI) acrescido de 0,5% de extrato de levedura, hemina e menadiona, incubadas a 37°C, por 24- 48 horas, foi comparada com o tubo cinco da escala de McFarland, sendo 0,1 mL transferido para as placas contendo ágar Wilkins-Chalgren acrescido de 0,5% de extrato de levedura, hemina (5µg/ml) e menadiona (1µg/ml), bem como sangue desfibrinado de cavalo.

Subseqüentemente, discos de papel de filtro, com seis milímetros de diâmetro, saturados com cada extrato a ser testado (20mL) foram colocados na superfície de cada placa, sendo posicionados quatro por placa. Para *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, o mesmo procedimento era realizado em ágar Mueller-Hinton.

Os discos de papel impregnados com os extratos foram mantidos por 60 minutos em estufa (37°C) antes da realização dos testes, para evaporação do álcool presente. Todos os testes foram realizados em dez repetições. As placas foram incubadas a 37°C, em condições de oxido-redução ideais para cada microrganismo (aerobiose para *E. faecalis* e *P. aeruginosa*; anaerobiose para os demais microrganismos testados), por 48 horas, verificando-se a presença ou não de halos de inibição do crescimento microbiano. Como controle positivo empregou-se digluconato de clorexidina (solução aquosa, 0,12%), enquanto o controle negativo foi constituído de papel de filtro embebido em caldo BHI.

Todos os extratos que produziram halos de inibição, independente do diâmetro, foram selecionados e submetidos a testes para avaliar a máxima diluição inibitória frente aos microrganismos testados.

Determinação da máxima diluição inibitória (MDI) dos extratos

Para a determinação da MDI de cada extrato utilizou-se o método de diluição em caldo. Os extratos vegetais foram adicionados a tubos contendo caldo BHI acrescido com 0,5% de extrato de levedura, hemina (5µg/mL) e menadiona (1µg/mL), previamente inoculados com 10⁵ UFC da cepa bacteriana. As concentrações do extrato representavam de metade a 1/128 da concentração do extrato inicialmente obtido. A seguir os tubos eram incubados nas condições de oxido-redução adequadas para cada microrganismo, como

descrito acima, a 37°C, por 24- 48 horas. Como controle negativo foi utilizado caldo BHI inoculado com as cepas teste, enquanto o controle positivo foi constituído de clorexidina (0,12%).

RESULTADOS

Para a maioria dos extratos vegetais testados, observou-se correlação entre a atividade antimicrobiana da preparação hidroalcoólica (Tabela 1) e da preparação aquosa (Tabela 2). A Tabela 1 evidencia o resultado da triagem envolvendo os extratos hidroalcoólicos, sendo que os extratos da folha e casca de araçá, bem como folha de aroeira, foram ativos frente à maioria dos microrganismos testados, enquanto os demais extratos apresentados na Tabela 1 apresentaram atividade inibitória sobre alguns microrganismos e não sobre outros. Apenas os extratos hidroalcoólicos obtidos da casca e folha da araçá e da folha de aroeira foram ativos sobre *E. faecalis* ATCC 19433 e *P. aeruginosa* ATCC 10145.

Os extratos hidroalcoólicos da casca e folha de angico, caule de arnica, casca do caju, folha do cajuaçu, folha da candeia, casca do capitão-do-campo, casca e folha de cedro, casca da figueira, folha da carne-de-vaca, casca e folha das diferentes espécies de ipê, folha de pau d'alho, casca e folha de pequi, folha de louro-de-mato-grosso, bem como a casca e folha de balsaminho não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos alvo.

A Tabela 2 apresenta os resultados da triagem envolvendo os extratos aquosos, sendo que os resultados mostraram-se semelhantes aos apresentados na Tabela 1. Como observado para os extratos hidroalcoólicos, os extratos de casca e folha de araçá e de aroeira foram os que apresentaram o maior espectro de inibição, enquanto os demais extratos listados na Tabela 2 inibiram apenas parte das cepas de referência testadas. Os extratos aquosos de casca e folha de angico, caule de arnica, casca do caju, folha do cajuaçu, casca do capitão-do-campo, casca e folha de cedro, casca da figueira, folha da candeia, folha da carne-de-vaca, casca e folha de todos os tipos de ipê testados, folha de pau d'alho, folha e casca de pequi, folha de louro-de-mato-grosso, bem como casca e folha de balsaminho não apresentaram atividade inibitória.

Com relação às máximas diluições inibitórias (MDI), apresentadas nas Tabelas 3 e 4, as mesmas variaram de "sem diluição" (1/1) a 1/128 do extrato inicial (correspondente a 0,78% da concentração original),

Tabela 1 - Triagem inicial da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais hidroalcoólicos. Extratos que apresentaram atividade inibitória frente, a pelo menos, uma cepa de referência testada.

Extrato	Microorganismos testados							
	¹ Aa	Ef	Fn1	Fn2	Pg	Pi	Pa	Sm
Casca de araçá	+ ^a	+	+	+	+	+	+	+
Folha de araçá	+	+	+	+	+	+	+	+
Casca de aroeira	- ^b	-	+	+	+	+	-	+
Folha de aroeira	+	+	+	+	+	+	+	+
Caule de cancerosa	+	-	+	-	-	+	-	+
Casca da candeia	-	-	-	-	+	+	-	+
Folha da figueira	+	-	+	-	-	+	-	+
Folha de guajuvira	-	-	-	+	-	+	-	+
Casca de jacarandá	+	-	-	-	+	+	-	+
Folha de caroba	+	-	+	-	-	+	-	+
Casca de louro-de-mato-grosso	-	-	-	-	+	+	-	+

¹Microorganismos testados: Aa, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384; Ef, *E. faecalis* ATCC 19433; Fn1, *F. nucleatum* ATCC 10953; Fn2, *F. nucleatum* ATCC 25586; Pg, *P. gingivalis* ATCC 33277; Pi, *P. intermedia* ATCC 2564; Pa, *P. aeruginosa* ATCC 10145; Sm, *S. mutans* ATCC 35668.

+^a Presença de halo de inibição do crescimento do microrganismo.

-^b Ausência de halo de inibição do crescimento do microrganismo.

Tabela 2 - Triagem inicial da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais aquosos. Extratos que apresentaram atividade inibitória frente a, pelo menos, uma cepa de referência testada.

Extrato	Microorganismos testados							
	¹ Aa	Ef	Fn1	Fn2	Pg	Pi	Pa	Sm
Casca de araçá	+ ^a	+	+	+	+	+	+	+
Folha de araçá	+	+	+	+	+	+	+	+
Casca de aroeira	- ^b	-	+	+	+	+	-	+
Folha de aroeira	+	+	+	+	+	+	+	+
Caule de cancerosa	+	-	+	-	-	+	-	+
Casca da candeia	-	-	-	-	+	+	-	+
Folha da figueira	-	-	+	-	-	+	-	+
Folha de guajuvira	-	-	-	+	-	+	-	+
Casca de jacarandá	-	-	-	-	+	+	-	+
Folha de caroba	+	-	+	-	-	+	-	+
Casca de louro-de-mato-grosso	-	-	-	-	-	+	-	+

¹Microorganismos testados: Aa, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384; Ef, *E. faecalis* ATCC 19433; Fn1, *F. nucleatum* ATCC 10953; Fn2, *F. nucleatum* ATCC 25586; Pg, *P. gingivalis* ATCC 33277; Pi, *P. intermedia* ATCC 2564; Pa, *P. aeruginosa* ATCC 10145; Sm, *S. mutans* ATCC 35668.

+^a Presença de halo de inibição do crescimento do microrganismo.

-^b Ausência de halo de inibição do crescimento do microrganismo.

Tabela 3 – Máxima diluição inibitória (MDI) dos extratos vegetais hidroalcoólicos frente às cepas de referência teste.

Extrato	Microorganismos testados							
	¹ Aa	Ef	Fn1	Fn2	Pg	Pi	Pa	Sm
Casca de araçá	1/16 ^a	1/4	1/16	1/32	1/16	1/32	1/8	1/64
Folha de araçá	1/32	1/8	1/64	1/128	1/32	1/64	1/8	1/64
Casca de aroeira	— ^b	—	1/16	1/8	1/32	1/16	—	1/32
Folha de aroeira	1/16	1/4	1/32	1/32	1/32	1/64	1/2	1/64
Caule de cancerosa	1/8	—	1/8	—	—	1/4	—	1/4
Casca da candeia	—	—	—	—	1/4	1/4	—	1/4
Folha da figueira	1/2	—	1/8	—	—	1/4	—	1/4
Folha de guajuvira	—	—	—	1/32	—	1/32	—	1/32
Casca de jacarandá	1/16	—	—	—	1/2	1/32	—	1/32
Folha de caroba	1/2	—	1/4	—	—	1/4	—	1/4
Casca de louro-de-mato-grosso	—	—	—	—	1/1	1/2	—	1/2

¹Microorganismos testados: Aa, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384; Ef, *E. faecalis* ATCC 19433; Fn1, *F. nucleatum* ATCC 10953; Fn2, *F. nucleatum* ATCC 25586; Pg, *P. gingivalis* ATCC 33277; Pi, *P. intermedia* ATCC 2564; Pa, *P. aeruginosa* ATCC 10145; Sm, *S. mutans* ATCC 35668.

1/16^a Significa que o extrato ainda inibiu a cepa alvo quando diluído 16 vezes.

—^b Extrato que não apresentou atividade inibitória sobre esse microorganismo nos ensaios iniciais de triagem.

Tabela 4 – Máxima diluição inibitória (MDI) dos extratos vegetais aquosos frente às cepas de referência teste.

Extrato	Microorganismos testados							
	¹ Aa	Ef	Fn1	Fn2	Pg	Pi	Pa	Sm
Casca de araçá	1/16 ^a	1/2	1/8	1/8	1/8	1/16	1/2	1/16
Folha de araçá	1/16	1/2	1/16	1/32	1/32	1/32	1/4	1/16
Casca de aroeira	— ^b	—	1/16	1/8	1/32	1/16	—	1/32
Folha de aroeira	1/16	1/4	1/32	1/32	1/32	1/64	1/2	1/64
Caule de cancerosa	1/8	—	1/8	—	—	1/4	—	1/4
Casca da candeia	—	—	—	—	1/4	1/4	—	1/4
Folha da figueira	—	—	1/8	—	—	1/4	—	1/4
Folha de guajuvira	—	—	—	1/32	—	1/32	—	1/32
Casca de jacarandá	1/16	—	—	—	1/2	1/32	—	1/32
Folha de caroba	1/2	—	1/4	—	—	1/4	—	1/4
Casca de louro-de-mato-grosso	—	—	—	—	—	1/2	—	1/2

¹Microorganismos testados: Aa, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384; Ef, *E. faecalis* ATCC 19433; Fn1, *F. nucleatum* ATCC 10953; Fn2, *F. nucleatum* ATCC 25586; Pg, *P. gingivalis* ATCC 33277; Pi, *P. intermedia* ATCC 2564; Pa, *P. aeruginosa* ATCC 10145; Sm, *S. mutans* ATCC 35668.

1/16^a Significa que o extrato ainda inibiu a cepa alvo quando diluído 16 vezes.

—^b Extrato que não apresentou atividade inibitória sobre esse microorganismo nos ensaios iniciais de triagem.

sendo que as maiores diluições foram observadas para o extrato da folha de araquá, tanto na forma hidroalcoólica quanto aquosa. Para alguns microrganismos, notadamente os anaeróbios obrigatórios e *A. actinomycetemcomitans*, a máxima diluição inibitória dos extratos hidroalcoólicos foi ligeiramente superior aos valores obtidos para os extratos aquosos.

DISCUSSÃO

A utilização de produtos químicos no controle de populações microbianas em sistemas complexos, como a microbiota bucal, reflete o conhecimento adquirido sobre a especificidade de diferentes microrganismos na etiologia das enfermidades bucais. A redução de microrganismos cariogênicos no biofilme, como *S. mutans*, bem como o controle da expressão dos fatores de virulência desses microrganismos, como a acidogenicidade, aciduridade e capacidade de adesão às estruturas mineralizadas, pode levar ao controle da doença cárie (CIARDI *et al.*, 1981). O mesmo pode ser aplicado aos diferentes microrganismos do biofilme subgingival e as periodontites (LEDDER *et al.*, 2009).

Dentre os microrganismos associados a doenças periodontais, tem-se um grupo de microrganismos capazes de expressar uma extensa gama de fatores de virulência, como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia*, enquanto outros, como *F. nucleatum*, atuam criando condições para a implantação dos microrganismos mais virulentos, como os acima mencionados (KOLENBRANDER, LONDON, 1993). Por outro lado, outros patógenos, como *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, dependem mais da inter-relação com o hospedeiro do que com os demais membros da microbiota bucal, sendo oportunistas e frequentemente se disseminam em ambiente hospitalar (MARKOGIANNAKIS *et al.*, 2009).

Como o efetivo controle do biofilme por métodos mecânicos por vezes se mostra temporariamente insuficiente no controle do biofilme dental, agentes químicos podem ser utilizados para controlar os parâmetros microbiológicos (QUIRYNEN *et al.*, 2006), embora os efeitos colaterais do uso crônico desses compostos por vezes igualam seus benefícios (WEST, MORAN 2008). Desta forma, a avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais merece ser estudada, uma vez que muitos desses compostos são largamente utilizados na medicina popular, devendo-se considerar também o menor custo destas formas terapêuticas em relação a medicamentos industrializados (REHDER *et al.*, 2004).

Contudo, para a obtenção das amostras de plantas, a participação dos moradores de cada região é fundamental, visto que os mesmos apresentam habilidade em localizar, identificar, extrair e manipular os recursos locais utilizados na elaboração de remédios caseiros há gerações (RODRIGUES, 1998). Dos 33 extratos hidroalcoólicos testados, oriundos de vinte e duas espécies de plantas típicas do cerrado, nove evidenciaram atividade inibitória sobre pelos menos parte das cepas bacterianas testadas, representando um percentual elevado em comparação com trabalhos realizados com plantas medicinais na América Latina (ANESINI, PERES, 1993; LOPEZ *et al.*, 2001).

Como os espécimes de plantas foram obtidos em um período de rápido crescimento vegetal, é possível que parte da atividade antimicrobiana dos extratos não tenha sido detectada em função de uma redução dos princípios ativos, que são mais abundantes durante o período de estresse hídrico no cerrado, mas que inviabilizava o acesso às arenosas áreas preservadas. As preparações hidroalcoólicas e aquosas mostraram atividade antimicrobiana semelhante, o que indica que o(s) princípio(s) ativo(s) pode(m) ser extraído(s) por métodos simples, empregando-se água como líquido extrator sem muito prejuízo para a atividade antimicrobiana (ALONSO PAZ *et al.*, 1995).

Até onde se pôde verificar, as plantas que apresentaram atividade antimicrobiana não são utilizadas para controle do biofilme microbiano bucal e mesmo para tratamento das infecções superficiais, embora possam ser encontradas referências ao seu uso como parte da medicina popular em outras áreas, como anti-inflamatórios, anti-reumáticos, antidiarréicos e outros usos populares (ALVES *et al.*, 2000, OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Dois espécies de plantas mostraram resultados bastante promissores quanto a obtenção de fármacos bioativos: a aroeira e a araquá. A aroeira (*M. urundeuva*) é uma planta comumente usada como parte da medicina natural para as populações rurais do cerrado brasileiro, devido ao seu potencial anti-ulcerogênico, analgésico e anti-inflamatório (RAO *et al.*, 1987, ALBUQUERQUE *et al.*, 2007), mas nada sugeria uma atividade antimicrobiana significativa. Por outro lado, as espécies do gênero *Psidium* são nativas da América tropical e têm sido usadas para tratar escorbuto na Ásia e na África, diarreia, no México, tosse e doenças pulmonares na Bolívia e no Egito, e como um anti-inflamatório e hemostático agente na China devido a sua composição de fenóis, triterpenos e óleos essenciais, tais como eugenol (LOZOYA *et al.*, 1994, JAIARJ *et al.*, 1999).

Contudo, praticamente nada é conhecido sobre *P. cattleianum*, a araçá, a espécie mais freqüente no cerrado.

A literatura relata efeito inibitório de extratos aquosos frente a *S. mutans* ou o efeito sobre a experiência de cárie da população (PAOLINO *et al.*, 1980; KASHKET *et al.*, 1985), sendo que o ácido tânico presente em plantas inibe enzimas bacterianas como a aminocidase, b-galactosidase, glicose isomerase e dextrano-sucrase em *S. mutans* (PAOLINO *et al.* 1980). De acordo com WU-YUAN *et al.*, (1988), compostos fenólicos poderiam levar à precipitação de proteínas e inibir o crescimento bacteriano em concentrações similares àquelas encontradas em bebidas.

Estudos do presente grupo evidenciaram que a exposição de bactérias cariogênicas a concentrações sub-letais de araçá produziu uma significativa redução na abundância de proteínas essenciais para a síntese de RNA, síntese protéica e metabolismo energético, com

redução acentuada na expressão gênica das enzimas necessárias para a glicólise e produção de ácido láctico (BRIGHENTI *et al.*, 2008).

COMENTÁRIOS

Os extratos da folha e casca de araçá, bem como folha de aroeira, foram ativos frente à maioria dos microrganismos testados, e não houve diferença significativa entre os extratos aquosos e hidroalcoólicos. No entanto, os efeitos dos extratos sobre a fisiologia de anaeróbios e outros microrganismos ainda permanecem obscuros. Os estudos devem ser realizados para avaliar seus efeitos em baixas concentrações, bem como o mecanismo capaz de inibir microrganismos tão fisiologicamente diferentes quanto os empregados no presente estudo.

REFERÊNCIAS

1. ALBUQUERQUE UP, MONTEIRO JM, RAMOS MA, DE AMORIM ELC. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern. *J Ethnopharmacol*, 110 (1): 76-91, 2007.
2. ALONSO PAZ E, CERDEIRAS MP, FERNANDEZ J, FERREIRA F, MOYNA P, SOUBES M *et al.*. Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*, 45 (1): 67-70, 1995.
3. ALVES TM DE A, SILVA AF, BRANDÃO M, GRANDI TSM; SMÂNIA E DE FA, SMÂNIA JÚNIOR A. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95 (3): 367-373, 2000.
4. ANESINI C, PERES C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*, 39 (2): 119-128, 1993.
5. BATALHA MA, MANTOVANI W, DE MESQUITA JUNIOR HN. Vegetation structure in cerrado physiognomies in south-eastern Brazil. *Braz J Biol*, 61 (3): 475-483, 2001.
6. BERCY P, LESSERRE J. Susceptibility to various oral antiseptics of *Porphyromonas gingivalis* W83 within a biofilm. *Adv Ther.*, 24 (6): 1181-1191, 2007.
7. BRIGHENTI FL, LUPPENS SBI, DELBEMACB, DENG DM, HOOGENKAMP MA, GAETTI-JARDIM JR E, *et al.* Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on *Streptococcus mutans* viability, protein expression and acid production. *Caries Res.*, 42 (2):148-154.
8. CIARDI JE, ROSENTHAL AB, BOWEN WH. Rapid quantitative determination of the effect of antiplaque agents and antisera on the growth, acid production, and adherence of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res*, 60 (3): 756-762, 1981.
9. DAROUT IA, ALBANDAR JM, SKAUG N, ALI RW. Salivary microbiota levels in relation to periodontal status, experience of caries and miswak use in Sudanese adults. *J Clin Periodontol*, 29 (5): 411-420, 2002.

10. DONLAN RM. Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? *Curr Top Microbiol Immunol*, 322: 133-161, 2008.
11. FENG Z, WEINBERG A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol* 2000, 40: 50-76, 2006.
12. GAETTI-JARDIM JÚNIOR E, NAKANO V, WAHASUGUI TC, CABRAL FC; GAMBA R; AVILA-CAMPOS MJ. Occurrence of yeasts, enterococci and other enteric bacteria in subgingival biofilm of HIV-positive patients with chronic gingivitis and necrotizing periodontitis. *Braz. j. microbiol*; 39 (2): 257-261, 2008.
13. GONÇALVES MO, COUTINHO-FILHO WP, PIMENTA FP, PEREIRA GA, PEREIRA JA, MATTOS-GUARALDIAL et al.. Periodontal disease as reservoir for multi-resistant and hydrolytic enterobacterial species. *Lett Appl Microbiol.*, 44 (5): 488-494, 2007.
14. HERRERA D, CONTRERAS A, GAMONAL J, OTEO A, JARAMILLO A, SILVA N et al.. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol.*, 35 (2): 106-113, 2008.
15. ISHIHARAK, NABUCHIA, ITO R, MIYACHI K, KURAMITSU HK, OKUDA K. Correlation between detection rates of periodontopathic bacterial DNA in coronary stenotic artery plaque and in dental plaque samples. *J Clin Microbiol.*, 42 (3):1313-1315, 2004.
16. IWAKI K, KOYA-MIYATA S, KOHNO K, USHIO S, FUKUD S. Antimicrobial activity of *Polygonum tinctorium* Lour: extract against oral pathogenic bacteria. *J Nat Med.*, 60 (2): 121-125, 2006.
17. JAIARJ P, KHOOHASWAN P, WONGKRAJANG Y, PEUNGVICHA P, SURIYAWONG P, SARAYA ML, RUANGSOMBOON O. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn leaf extract. *J Ethnopharmacol.*, 67 (2): 203-212, 1999.
18. KASHKET S, PAOLINO VJ, LEWIS D, VANHOUTE J. Glucosyltransferase inhibition by tannin-like constituents of beverages. *J Dent Res*, 64: 212, 1985.
19. KOLENBRANDER PE, LONDON J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol*, 175 (11): 3247-3252, 1993.
20. LEDDER RG, MADHWANI T, SREENIVASAN PK, DE VIZIO W, MCBAIN AJ. An in vitro evaluation of hydrolytic enzymes as dental plaque control agents. *J. Med. Microbiol.*, 58 (Pt 4): 482-491, 2009.
21. LOPEZ A; HUDSON JB; TOWERS GH. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.*, 77 (2-3): 189-196, 2001.
22. LOZOYA X, MECKES M, ABOU-ZAID M, TORTORIELLO J, NOZZOLILLO C, AMASON JT. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* Linn. leaves and determination of spasmolytic principle. *Arch Med Res.*, 25: 11-15, 1994.
23. MARKOGIANNAKIS H, PACHYLAKI N, SAMARA E, KALDERIM, MINETTOU M, TOUTOUZA M et al.. Infections in a surgical intensive care unit of a university hospital in Greece. *Int. J. Infect. Dis.*, 13 (2): 145-153, 2009.
24. NARVAI PC, FRAZAO P; RONCALLI AG, ANTUNES JLF. Cárie dentária no Brasil: declínio, polarização, iniquidade e exclusão social. *Rev Panam Salud Publica* 19 (6): 385-393, 2006.
25. NAVARRO DE FÁTIMA, DOS SANTOS EAT, DAROCHA JCF, BREMM LL, JUKOSKI M, RIBEIRO PG et al.. Efeitos do digluconato de clorexidina, *Plantago major* e placebo sobre placa dental e gengivite: uma comparação clínica da eficácia de colutórios. *Rev Bras PI Med*, 1 (1): 28-38, 1998.
26. OLIVEIRA FQ, JUNQUEIRA RG, STEHMANN JR, BRANDAO MGL. Potencial das plantas medicinais como fonte de novos antimaláricos: espécies indicadas na bibliografia etnomédica brasileira. *Rev Bras PI Med*, 5 (2): 23-31, 2003.
27. PAOLINO VJ, KASHKET S, SPARAGNACA. Inhibition of dextran synthesis by tannic acid. *J Dent Res*, 59 (1): 389, 1980.
28. QUIRYNEN M, DE SOETE M, BOSCHMANS G, PAUWELS M, COUCKE W, TEUGHELIS W, et al. Benefit of "on-stage full-mouth disinfection" is explained by disinfection and root planning within 24 hours: a randomized controlled trial. *J Clin Periodontol*, 33 (9): 639-647, 2006.
29. RAO VS, VIANA GSB, MENEZES AMS, GADELHANGT. Studies on the antiulcerogenic activity of *Astronium urundeuva* Engl. II. Aqueous extract. *Braz J Med Biol Res.*, 20 (6): 803-805, 1987.
30. REHDER VLG, MACHADO ALM, DELARMELINA C, SARTORATTO A, FIGUEIRA GM, DUARTE MCT. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. *Rev Bras PI Med*, 6 (2): 67-71, 2004.
31. RODRIGUES E. Etnofarmacologia no parque nacional do Jaú, AM. *Rev Bras PI Med*, 1(1): 01-14, 1998.
32. TSUCHIYA H, SATO M, IINUMA M, YOKOYAMA J, OHYAMA M, TANAKA T et al.. Inhibition of growth of cariogenic bacteria in vitro by plant flavanones. *Experientia.*, 50 (9): 846-849, 1994.

33. VIEIRA RF, MARTINS MVM. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. *Rev Bras Pl Med*, 3 (1): 13-36, 2000.
34. WEST NX, MORAN JM. Home-use preventive and therapeutic oral products. *Periodontol 2000*, 48: 7-9, 2008.
35. WU-YUAN CD, CHEN CY, WU RT. Gallotannins inhibit growth, water-insoluble glucan synthesis, and aggregation of *mutans* streptococci. *J Dent Res*, 67 (1): 51-55, 1988.

CORRESPONDÊNCIA

Elerson Gaetti-Jardim Júnior
R. José Bonifácio 1193,
16015-050 Araçatuba – São Paulo – Brazil

E-mail

egaettij@foa.unesp.br ou gaettijardim@gmail.com