

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

PAULA CRISTINA ANIBAL

Biomédica

Potencial de ação antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas na inibição de *Candida* spp, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção de grau de Mestre em Biologia Buco-Dental, área de Concentração em Microbiologia e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Höfling

Co-orientador (a): Profa. Dra. Mary Ann Foglio

Piracicaba
2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

An52p Anibal, Paula Cristina.
Potencial de ação antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas na inibição de *Candida* spp, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. / Paula Cristina Anibal. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.

Orientadores: José Francisco Höfling, Mary Ann Foglio.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Leveduras. 2. Antifúngicos. 3. Plantas medicinais. I. Höfling, José Francisco. II. Foglio, Mary Ann. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: *In vitro* antimicrobial activity of plants extracts against *Candida* spp, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Yeasts. 2. Antifungal agents. 3. Plants, medicinal

Área de Concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Mestre em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: José Francisco Höfling, Mário Hiroyuki Hirata, Pedro Luiz Rosalen

Data da Defesa: 23-02-2007

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 23 de Fevereiro de 2007, considerou a candidata PAULA CRISTINA ANIBAL aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "J. Hofling".

PROF. DR. JOSE FRANCISCO HOFLING

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Mario Hirata".

PROF. DR. MÁRIO HIROYUKI HIRATA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Pedro Rosalen".

PROF. DR. PEDRO LUIZ ROSALEN

*Dedico este trabalho à minha mãe Creusa,
pelo seu incentivo, amor e apoio
prestados a todo momento.
E a meu orientador Prof. Dr. Höfling,
pela oportunidade concedida.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS e ao Grande Mestre Jesus, por tudo o que me é concedido neste mundo, pela oportunidade do aprendizado e trabalho, maiores privilégios que podemos ter e desenvolver.

À minha querida e amada mãe Creusa, pelo seu amor, sua dedicação e apoio em todos os momentos desta minha trajetória terrena, sejam eles de alegria ou de dificuldade, sempre me incentivando a não desistir de minhas conquistas.

Às minhas irmãs, Lilian e Raquel, e cunhados, Alexandre e Fábio, por todos os incentivos dispensados e compreensão da minha ausência.

A meu pai Armando (*in memoriam*), apesar de nossas desavenças, hoje entendendo seus conselhos. Sei que está feliz por mim, onde quer que esteja.

Ao Prof. Dr. José Francisco Höfling, pela grande oportunidade concedida, sendo mais que um orientador, um Amigo e Mestre, me dando apoio e orientação todo tempo, os quais foram imprescindíveis para a realização deste trabalho e minha formação.

À Profa. Dra. Mary Ann Foglio, pela co-orientação, pelo tempo dispensado para meu aprendizado nesta área que me é nova, a acolhida, a amizade e o carinho.

Aos Profs. Drs. Reginaldo Bruno Gonçalves e Renata de Oliveira Mattos-Graner, pelos ensinamentos e esclarecimentos prestados durante esta importante fase.

Aos Profs. Drs. Marta Cristina Teixeira Duarte e Rodney Alexandre Rodrigues, pelo auxílio dispensados e orientação.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Prof. Dr. Francisco Haiter Neto (Diretor), pela oportunidade concedida de aprimoramento profissional e desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fausto Bérzin, coordenador do curso de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP/UNICAMP.

Aos membros da banca examinadora, Profs. Drs. Maria da Graça Stupiello Andrietta e Mário Hiroyuki Hirata por aceitarem avaliar este trabalho, enriquecendo-o com conhecimento e experiência, e aos suplentes Profs. Drs. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa e Pedro Luiz Rosalen, por aceitarem este convite.

Aos amigos da Pós-Graduação Alessandra Castro Alves, Bruna de Araújo Lima, Cristiane Duque, Daniel Saito, Gustavo Alberto Pereda Obando, Iriana Carla Junqueira Zanin, Janaína de Cássia Orlandi Sardi, Marlise Inêz Klein, Priscila de Laet Sant'Ana Mariano, Rafael Nóbrega Stipp, Regianne Umeko Kamiya, Rita de Cássia Mardegan, Ruchele Dias Nogueira, Sérgio Eduardo Braga da Cruz, Thaís de Cássia Negrini e Vivian Fernandes Furletti, com quem convivi durante este tempo de aprendizado e trabalho, pelos momentos inesquecíveis, a amizade e a cooperação.

Aos funcionários do laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOP, Anderson, Wilma e Flávia, e do laboratório do Departamento de Fitoquímica do CPQBA, Ilza, pelos

esclarecimentos, auxílio e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho, e pela amizade.

A todos os amigos do CPQBA/UNICAMP, pela acolhida, carinho, tempos dispensados para o desenvolvimento do meu trabalho e pelos momentos sempre agradáveis de convivência.

E a todos meus amigos e aqueles a quem tenho imenso carinho, por muitas vezes ter que me ausentar e ainda assim ser compreendida, por se alegrarem comigo, me incentivarem nesta caminhada e serem partes da minha razão de viver.

À CAPES, pelo apoio financeiro instituído pela concessão de bolsa de mestrado, e à FAPESP e FAEPEX, pelo financiamento do projeto de pesquisa, processos nº 06/51022-0 e 28/2006, respectivamente.

A vaidade enlouquece.
A revolta dificulta.
A dor regenera.
A facilidade perturba.
O trabalho educa.
A humildade eleva sempre.

(EMMANUEL)

RESUMO

A cavidade oral abriga uma complexa comunidade de microrganismos que podem estar aderidos aos dentes, à mucosa epitelial ou formando biofilme. A maioria desses microrganismos são comensais, com uma minoria causando infecções oportunistas. Dentre esses microrganismos, encontramos as leveduras do gênero *Candida*, principalmente em indivíduos imunocomprometidos; o principal agente etiológico da cárie dental *Streptococcus mutans* e, apesar da presença controversa, o patógeno oportunista *Staphylococcus aureus*. Diante do desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, há uma grande preocupação relacionada a qual tipo de tratamento utilizar no combate às infecções provocadas por esses microrganismos. O emprego de extratos brutos de plantas tem merecido a atenção de pesquisadores de vários países, já que podem inibir o crescimento bacteriano e fúngico por diferentes mecanismos quando comparados aos antimicrobianos, justificando a pesquisa em questão. As plantas utilizadas nesta pesquisa foram a *Mentha piperita*, *Rosmarinus officinalis*, *Tabebuia avellanedae*, *Arrabidaea chica*, *Syzygium cumini* e *Punica granatum*, extraídas com os solventes diclorometano e metanol, os quais foram eliminados em rotaevaporador, para a obtenção dos extratos brutos, a fim de se avaliar sua concentração inibitória mínima (CIM) frente a essas cepas de microrganismos. Os resultados obtidos revelaram-se promissores com as espécies de *Candida* testadas, principalmente com o extrato metanólico, cuja inibição apresentou atividade com alta sensibilidade das leveduras, porém essa mesma atividade não ocorreu entre as bactérias. Esses dados indicam a necessidade da ampliação do conhecimento sobre as espécies de plantas com potencial antimicrobiano, além de se testar extratos mais purificados e com propriedades farmacológicas ativas contra organismos microbianos. De qualquer forma, estes resultados nos levam a considerar esses extratos vegetais como fontes valiosas para a descoberta de novas moléculas bioativas empregadas para o tratamento alternativo no combate aos agentes microbianos, principalmente àqueles resistentes às drogas antifúngicas e antibacterianas convencionais.

ABSTRACT

The oral cavity is a source of a complex microorganisms community that may adhere to teeth, epithelial mucosa or form biofilms. Most of these strains are thought to be commensal, and a small number cause opportunistic infections. Among these microorganisms *Candida* yeast is the most common in immunocompromised patients; *Streptococcus mutans* is regarded as the primary etiologic agent of dental caries and, although considered controversial the presence, *Staphylococcus aureus* is also mentioned as an opportunistic pathogen in the oral cavity. Considering the frequent use of antifungal and antibiotics as antimicrobial agents, the development of resistance to these drugs has become an important and worrying factor for the treatment of the infections caused by these microorganisms. The use of crude plants extracts has been a researcher's concern from all over the world, since they may inhibit the bacteria and fungi growing by different mechanisms present in the conventional antimicrobials, becoming an important source of investigation. The plants used in this research were *Mentha piperita*, *Rosmarinus officinalis*, *Tabebuia avellanedae*, *Arrabidaea chica*, *Syzygium cumini* and *Punica granatum*, extracted with dichloromethane and methanol solvents, followed by a minimal inhibitory concentration (MIC) evaluation. The data obtained with *Candida* strains were promising, specially with the methanolic extract that showed activity in a higher sensibility, but the same activity did not occur among the bacterias. This information increases our knowledge of the crude plants extracts effect against microbial organisms. Nevertheless, the results of this study indicated that these extracts are a promising source for the alternative treatment against the microbial agents, specially for those resistant to the conventional antimicrobial agents.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Microbiota Oral	4
2.2 Gênero <i>Candida</i>	5
2.3 <i>Streptococcus</i> grupo <i>mutans</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.4 Antifúngicos	9
2.5 Antimicrobianos	11
2.6 Plantas Medicinais	13
3 PROPOSIÇÃO	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Material	19
4.1.1 Plantas	19
4.2 Métodos	20
4.2.1 Preparação dos extratos	20
4.2.2 Monitoramento dos extratos	21
4.2.3 Limpeza do extrato metanólico	22
4.2.4 Diluição dos extratos	22
4.2.5 Esterilização dos extratos	22
4.3 Cepas de Microrganismos	22
4.3.1: Preparo dos inóculos	23
4.3.2 Diluição dos extratos	24
4.3.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Método da Microdiluição	24
4.3.4 Preparo dos antimicrobianos	26
4.3.5 Leitura dos resultados	27
5 RESULTADOS	28
5.1 Massa dos extratos obtidos	28
5.2 Cromatografia	29
5.3 Diluição final dos extratos e antimicrobianos aplicados nas microplacas	29

5.4 Leitura da atividade antimicrobiana dos extratos	30
5.5 Atividade antimicrobiana dos extratos diclorometânicos	33
5.6 Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos	34
5.7 Atividade antimicrobiana do fluconazol e do cloranfenicol.	36
5.8 Atividade dos extratos diclorometânicos e metanólicos	37
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXO 1	65
ANEXO 2	67
ANEXO 3	68
ANEXO 4	69

1. INTRODUÇÃO

A cavidade oral abriga centenas de microrganismos que formam uma complexa comunidade estrutural, e podem estar aderidos à superfície dos dentes, da mucosa epitelial ou formando biofilmes (Whittaker *et al.*, 1996; Kolenbrander, 2000). Muitos desses microrganismos são comensais, e um pequeno número é considerado patógenos oportunistas potenciais. A habilidade que um germe possui para desencadear doenças é devido à composição do sítio em que ele habita (Chen *et al.*, 2000).

A levedura *Candida albicans* constitui parte da microflora normal humana, incluindo a cavidade oral, e pode ser isolada da boca de 20-40% dos indivíduos saudáveis. Entretanto, alterações locais ou sistêmicas, como sistema imune deprimido, desordens endócrinas, nutrição deficiente, favorecem o desenvolvimento de sua ação patogênica, causando candidíase oral (Odds, 1988; Ellepola & Samaranayake, 2001; Aly *et al.*, 1975). Outras espécies, além de *C. albicans*, tem sido isoladas como: *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* e *C. dubliniensis*, principalmente de indivíduos infectados pelo HIV (Cartledge *et al.*, 1999; Kantarcioglu & Yücel, 2002).

Um microrganismo considerado como principal agente etiológico da cárie dental é o *Streptococcus mutans*, residente no biofilme aderido à superfície dos dentes (Navarre & Schneewind, 1999; Loesche, 1986). Uma importante característica desses organismos em promover o desenvolvimento da cárie é sua habilidade em aderir firmemente à superfície dos dentes (Napimoga *et al.*, 2004).

Por ser encontrado em abundância na pele ou em membranas mucosas (Kloss, 1997), a presença do *Staphylococcus aureus* como componentes da flora oral é controversa, mas estudos demonstraram que algumas infecções na cavidade oral são causadas, em parte, por esse microrganismo (Smith *et al.*, 2001), sendo isolados de sítios subgengivais de pacientes com periodontite (Murdoch *et al.*, 2004). Estudos de Miyake *et al.* (1991), realizados com 307 crianças entre 1-5 anos, demonstrou que 84% carregam Estafilococos

na cavidade oral, sendo que 33% eram *Staphylococcus aureus* (5% desses isolados eram resistentes a metacilina).

A infecção oral causada por *Candida* é comumente tratada com agentes polienos (nistatina e anfotericina B) e com triazóis, como o fluconazol (Powderly *et al.*, 1999). Estudos demonstraram que o desenvolvimento de resistência ao fluconazol em cepas de *Candida* isoladas de pacientes aidéticos (Ruhnke *et al.*, 1994), ocorre durante o tratamento (Johnson *et al.*, 1995; Redding *et al.*, 1994), onde são administradas altas doses, com o uso prolongado desse antifúngico (Sullivan *et al.*, 1995; Pfaller *et al.*, 1999; Ruhnke *et al.*, 2000). Provavelmente, a redução da sensibilidade da *C. albicans* e outras espécies aos antifúngicos azóis é porque todos eles tem o mesmo mecanismo de ação (Vanden-Bosche *et al.*, 1994; Dronda *et al.*, 1994).

Emergentes cepas com resistência intermediária ou alta à penicilina estão crescendo e sendo reconhecidas mundialmente (Teng *et al.*, 1998). Porém essa resistência não é somente aos β -lactâmicos, mas também a muitos outros agentes antimicrobianos, como a vancomicina (Fridkin *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004; Tsuda *et al.*, 2002).

O emprego de plantas medicinais para recuperação e tratamento da saúde vem evoluindo ao longo dos tempos. As plantas também produzem moléculas orgânicas que estão envolvidas na proteção contra bactérias, vírus, fungos, insetos e animais. Muitos desses compostos químicos são biologicamente ativos quando isolados. Portanto, as plantas são fontes muito ricas de agentes químicos com atividades farmacológicas e podem ser considerados medicamentos em potencial (Page *et al.*, 2004). O uso da planta medicinal, quando bem escolhida e usada corretamente, só difere do medicamento industrial feito com a substância isolada, pela embalagem e as substâncias corantes, aromatizantes, flavorizantes, encorpantes e conservantes que acompanham o princípio ativo, nesse tipo de medicamento (Lorenzi & Matos, 2002).

Diversos autores demonstraram atividades antimicrobianas encontradas nas folhas de hortelã de *Mentha piperita*, família *Lamiaceae*, (Janssen *et al.*, 1987; Hammer *et al.*, 1999; Dorman *et al.*, 2000; Vaughn *et al.*, 1994; Baruah *et al.*, 1996; Haas, 1995; Cowan, 1999); na carajuru, *Arrabidaea chica*, da família *Bignoniaceae*, uma planta típica

na região Amazônica (Zorn *et al.*, 2001; Taylor, 1998; Mors *et al.*, 2000); no alecrim, *Rosmarinus officinalis*, família *Lamiaceae* (Guenther, 1974; Mangena & Muyima, 1999); na casca do ipê-roxo, *Tabebuia avellanedae*, família *Bignoniaceae* (Lorenzi, 1992; Sousa *et al.*, 1991); nas frutas da romã, *Punica granatum*, família das *Punicaceae* (Gracious Ross *et al.*, 2001; Prashanth *et al.*, 2001; Schubert *et al.*, 2002; Longtin, 2003; Braga *et al.* 2005); e nas sementes de jabolão, *Syzygium cumini*, da família das *Myrtaceae* (Kirtikar & Basu, 1991; Shafi *et al.* 2002; Chandrasekaran & Venkatesalu 2004).

Assim, o emprego das plantas pela medicina tem chamado a atenção de pesquisadores, no sentido de ser um campo promissor para o tratamento alternativo de doenças (sejam elas provocadas por bactérias ou fungos), considerando que encontramos na literatura diversos estudos demonstrando seus efeitos, em particular, antimicrobianos e antifúngicos sobre microrganismos de interesse médico, além de apresentarem um tratamento significativo em cepas resistentes, terem um menor custo que os medicamentos alopáticos e não provocarem efeitos colaterais tão perigosos para a saúde, justificando os nossos propósitos de avaliar o potencial de ação antimicrobiana dessas plantas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microbiota Oral

A flora endógena no ser humano tem importante função na nutrição, carcinogênese e resistência à colonização por patógenos, e por abrigar microrganismos potencialmente patogênicos (Kroes *et al.*, 1999). A microbiota oral é um ecossistema complexo que contém uma ampla variedade de espécies microbianas (Hamada & Slade, 1980). Esta microflora apresenta, entre bactérias e fungos, mais de 500 espécies microbianas conhecidas e espécies de organismos não-cultiváveis, que estão sendo identificados por técnicas de biologia molecular, sendo que as espécies cultiváveis representam <1% do total da população existente. Muitas dessas espécies são consideradas comensais e um pequeno número patógenos oportunistas. Doenças locais como cárie dental, gengivite e periodontite, têm servido de fonte para muitas investigações da microbiota oral. Estas doenças estão associadas com mudanças da densidade bacteriana local e sua composição (Kroes *et al.*, 1999). A periodontite está associada com uma diversa e complexa microbiota subgengival composta por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, organismos aeróbios facultativos e anaeróbios, e, possivelmente, fungos (Järvensivu *et al.*, 2004). Como na cavidade oral há vários sítios com diferentes condições ambientais, isso proporciona o desenvolvimento dos diferentes microrganismos (Wilson *et al.*, 1997). A capacidade que um microrganismo tem em causar doença é afetada pela composição microbiana do local onde ele está, sendo que sua aderência provoca a liberação de vários mediadores inflamatórios nos tecidos moles resultando na destruição do tecido hospedeiro (Chen *et al.*, 2000).

A despeito desta microbiota oral indígena e de suas características, que envolve os vários sítios presentes na microbiota bucal, muitas dessas espécies são microrganismos oportunistas com potencial patogênico e, além disso, inúmeros outros microrganismos adentram na cavidade oral como patógenos estranhos, quer aí permanecendo ou se dirigindo a outras regiões do nosso organismo, dando origem à várias doenças.

2.2 Gênero *Candida*

A levedura do gênero *Cândida* é um microrganismo aeróbio comensal e oportunista que pode ser isolado da cavidade oral (Arendorf & Walker, 1979; Odds, 1988), colonizando a língua, o palato e as mucosas (Arendorf & Walker, 1980), podendo ocorrer, também, na placa subgengival de adultos com periodontites (Slots *et al.*, 1988). Esta levedura pode tornar-se um patógeno oportunista causando doenças em hospedeiros que estão com seu sistema imune deprimido (Richardson, 1992; Odds, 1988; Scully *et al.*, 1994), principalmente em indivíduos infectados pelo vírus HIV – Human Immunodeficiency Virus (Barchiesi *et al.*, 1994(a); Ruhnke *et al.*, 1994; O' Sullivan *et al.*, 1997; Cartledge *et al.*, 1999; Anil & Samaranayake, 2002), onde a *Candida albicans* contribui para o desenvolvimento de necrose em doenças periodontais desses pacientes (Odden *et al.*, 1994). Candidíase oral é um termo coletivo usado para várias patologias da cavidade bucal que incluem candidíase pseudomembranosa aguda, candidíase eritematosa, candidíase hiperplásica crônica e candidíase atrófica crônica (O'Sullivan *et al.*, 2000). Uma característica particular da *Candida*, que parece ser essencial para o desenvolvimento da candidíase hiperplásica crônica, é a sua habilidade para invadir os tecidos da mucosa oral (Bartie *et al.*, 2004).

A *C. albicans* é considerada como um dos fungos patogênicos mais potenciais, normalmente encontrado na cavidade oral, que, quando coloniza esta cavidade, promove um passo importante para uma sequência de eventos que levam à infecção desta cavidade (O'Sullivan *et al.*, 2000). Quando coloniza superfícies epiteliais, a *C. albicans* encontra-se na forma leveduriforme. Ambientes favoráveis como bolsa gengival e fluido crevicular gengival promovem o desenvolvimento de seu tubo germinativo e de hifas, as quais tem habilidade de penetrar no tecido hospedeiro e aderir a superfícies provocando inflamações destrutivas desse tecido (Järvensivu *et al.*, 2004). O tubo germinativo da *Candida*, o qual marca o começo do crescimento das suas hifas, é responsável pela sua patogenicidade, facilitando sua aderência a células epiteliais, e é uma forma de resistência à fagocitose, além de promover a agregação das células leveduriformes e permitir o contato de outros

microrganismos com esse epitélio colonizado, quando comparado com sua forma de blastoporo (Ellepola & Saramanayake, 2001). A *C. albicans* secreta proteinases capazes de degradar a principal matriz extracelular e os componentes basais da membrana, como colágeno e fibronectina. Essas proteinases podem induzir a destruição do tecido da célula hospedeira, similarmente às proteinases liberadas pela bactéria *Porphyromonas gingivalis* (Järvensivu *et al.*, 2004).

Embora a colonização por *C. albicans* seja comum e cause lesões severas em pacientes imunocomprometidos ou gravemente doentes, outras espécies de *Candida* vêm sendo isoladas desses pacientes, como: *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondi* (Belazi *et al.*, 2004; Cartledge *et al.*, 1999; Anil & Samaranayake, 2002) e *C. dubliniensis*, que é o mais novo fungo reconhecido como principal causa de doenças de mucosas em pacientes com AIDS (Acquire Immune Deficiency Syndrome), tornando-se uma causa significativa de infecções humanas, que incluem infecções abdominais e fungemias (Kantarcioglu & Yucel, 2002; Coleman *et al.*, 1997).

Infecções fúngicas oportunistas estão crescendo como uma consequência do aumento no número de pacientes imunocomprometidos em várias áreas do sistema da saúde. A situação tem se tornado mais alarmante com a pandemia da AIDS (Phongpaichit *et al.*, 2005). O aumento em doenças invasivas causadas por espécies de *Candida* não-*albicans*, como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* vem acompanhada de detecção *in vitro* da resistência a agentes azólicos. A escolha de antifúngicos apropriados para o tratamento é importante, porém limitado a poucos agentes permitidos (Provine & Hadley, 2000). Espécies de *C. albicans* resistentes ao cetoconazol e fluconazol tem sido isoladas da cavidade oral de pacientes com AIDS, tornando-se difícil estabelecer se o fracasso da terapia antifúngica se deve aos fatores do hospedeiro associado com seu estado imunocomprometido, ou a apenas a resistência a essa droga (Barchiesi *et al.*, 1994(a)). Trabalhos de Cartledge *et al.* (1999), avaliaram pacientes HIV-positivos com infecção por *Candida* não-*albicans* submetidos a tratamento prolongado com agentes azólicos apresentando candidíase recorrente. Inicialmente, a candidíase oral em pacientes com HIV

é facilmente tratada com agentes azólicos, porém a maioria das *Candida não-albicans* isoladas desses pacientes demonstraram resistência clínica aos agentes azólicos em menos de três meses após o primeiro fracasso do tratamento com o fluconazol. Todos os 57 isolados de *C. glabrata* eram resistentes ao fluconazol e cetoconazol *in vitro* e 12 (22%) apresentavam resistência cruzada ao itraconazol. Os isolados de *C. krusei* eram resistentes ao fluconazol e cetoconazol, e *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* foram resistentes ao fluconazol e cetoconazol *in vitro*.

2.3 *Streptococcus grupo mutans* e *Staphylococcus aureus*

Muitas espécies de *Streptococcus* grupo *mutans* já foram isoladas da cavidade oral, sendo que o *Streptococcus mutans* é considerado o principal agente etiológico do desenvolvimento da cárie, tanto em humanos como em animais, isolado pela primeira vez em 1924 (Hamada & Slade, 1980; Loesche, 1986; Shen *et al.*, 2004). Para aderir à superfície dos dentes na placa dental, *S. mutans* produz várias proteínas extracelulares ou enzimas, como as proteínas de ancoramento (Sato *et al.*, 2004), além da síntese de glucanos extracelulares da sacarose através da enzima glicosiltransferase (GTF). Os glucanos promovem o acúmulo dos estreptococos cariogênicos (e outros microrganismos orais) na superfície do dente, sendo um fator crítico para a formação e estrutura integral do biofilme, com o acúmulo de ácidos que levam à desmineralização do esmalte dos dentes (Ooshima *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2006). Sendo assim, a GTF é essencial para a expressão da virulência desse microrganismo, apresentando três tipos de GTFs: GTFB, síntese de glucanos insolúveis; GTFC, que sintetiza uma mistura de glucanos solúveis e insolúveis; e GTFD, que sintetiza glucanos solúveis (Duarte *et al.*, 2003; Hayacibara *et al.*, 2005).

A prevalência dos *S. mutans* não se encontra apenas em pessoas com moderada ou alta taxa de cárie, mas também nas populações com ausência ou baixa incidência da mesma (Napimoga *et al.*, 2004). Outro sítio de onde o *S. mutans* é constantemente isolado é de pacientes com endocardite infecciosa e com sérias infecções piogênicas (Nomura *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 1998). Outras espécies de *Streptococcus* do grupo *mutans* identificadas

são: *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. salivarius*, *S. miller*, entre outros. O habitat preferido do *S. mutans* parece ser a superfície dos dentes, podendo ser frequentemente isolado das fezes humanas. Observações clínicas em humanos e animais indicam que a formação da placa é essencial para o desenvolvimento da cárie dental e periodontite (Hamada & Slade, 1980).

O gênero *Staphylococcus*, particularmente a espécie *aureus*, é reconhecido como um dos maiores patógenos responsáveis por uma ampla incidência de infecções, desde moderadas infecções de pele até as mais agressivas, bacteremias (associada com 80% do índice de mortalidade antes do uso dos antibióticos) e septicemias (Hardy *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004), assim como podem estar presentes em endocardites de prótese de válvula (Murdoch *et al.*, 2004). A presença deste microrganismo como residente da flora oral ainda é controversa, mas diversos estudos apresentaram sua distribuição nesta cavidade, assim como infecções causadas por *S. aureus*, que incluem: infecções endodônticas, osteomielites da mandíbula, infecção da glândula parótida e, mais recentemente, uma forma de mucosite oral em idosos, principalmente em pacientes recebendo nutrição parenteral (Smith *et al.*, 2001).

Da mesma forma que o *Staphylococcus* pode ser considerado um organismo transiente da cavidade oral, sua freqüente presença neste local pode ser considerada uma potencial fonte de infecção (Smith & MacFarlane, 1999). Doenças sistêmicas muitas vezes são causadas por bactérias transientes, que podem ocorrer através da mastigação, da escovação dos dentes, fio dental ou de procedimentos cirúrgicos. Este risco de infecção é maior em pacientes com doença periodontal por causa do aumento do risco de bacteremia devido à proximidade destes organismos com a corrente sangüínea (Slots, 2003).

Estudos realizados por Murdoch *et al.* (2004), isolando *Staphylococcus* de locais saudáveis e de sítios subgengivais doentes, do palato e do assoalho da boca de pacientes com periodontite e de indivíduos controle saudáveis, demonstraram que a maior prevalência foi de *Staphylococcus* coagulase-negativa (*S. epidermidis*), seguida do *S. aureus*. Trabalhos de Percival *et al.* (1991), Jackson *et al.* (1999) e Kim *et al.* (1995), revelaram que 94 a 100% de adultos saudáveis são colonizados por *Staphylococcus* spp e que o predomínio de *S. aureus* é de 24 a 36%.

O *S. aureus* é um dos mais significantes agentes etiológicos de processos infecciosos adquiridos, tanto em pacientes ambulatoriais como em pacientes hospitalizados, apresentando vários fatores como toxinas e enzimas que contribuem para sua virulência (Catão *et al.*, 2006). O aumento crescente da frequência de *S. aureus* resistentes à oxacilina e da possibilidade do aparecimento de linhagens resistentes também a vancomicina, tornam relevantes o desenvolvimento de novas drogas com atividade antiestafilocócicas (Sader *et al.*, 1993).

A terapia antimicrobiana altera a microflora diretamente via erradicação ou super-colonização, ou indiretamente, selecionando cepas resistentes. O aumento da incidência de infecções provocadas por bactérias Gram-positivas deve-se, geralmente, ao uso indiscriminado de agentes antimicrobianos (Kerawala *et al.*, 2001; Larson *et al.*, 1986).

2.4 Antifúngicos

A maioria dos fungos não é afetada pelos agentes antibacterianos. Existem poucos agentes antifúngicos específicos e o emprego de muitos deles ainda é restrito pela relativa toxicidade. Paralelamente ao aumento de infecções fúngicas, tem ocorrido a introdução de novos agentes antifúngicos e o isolamento de cepas resistentes a essas drogas. O uso prolongado de agentes azólicos para o tratamento de pacientes com AIDS é um fator que seleciona microrganismos mais resistentes à terapia com esses agentes (Colombo *et al.*, 1995).

Este fenômeno se deve ao fato de que todos os agentes azólicos possuem o mesmo mecanismo de ação, como mudanças na composição do esterol da membrana que causa uma redução dos níveis de permeabilidade às drogas; outro mecanismo seria uma mutação do esterol 14 α -demetilase, a enzima do citocromo P-450, que resulta na diminuição da afinidade destas drogas azólicas (Barchiesi *et al.*, 1994b).

A anfotericina B e a nistatina apresentam uma ação análoga sobre as membranas celulares dos fungos. Estes dois fármacos antifúngicos permitem duplas ligações múltiplas

e conjugadas, que as fazem interagirem preferencialmente com o ergosterol, o principal esterol de certas membranas celulares fúngicas, em vez de reagirem com o colesterol das membranas celulares dos mamíferos. Estes agentes produzem canais hidrofílicos através da membrana fúngica, permitindo o extravasamento do conteúdo celular essencial. Os imidazóis interferem também no fornecimento do ergosterol da membrana celular dos fungos. Estas drogas inibem o citocromo P-450 específico que desmetila o lanosterol precursor do ergosterol (Kalant & Roschlau, 1991).

A anfotericina B é produzida por bactérias que vivem no solo, sendo isoladas dos *Streptomyces nodosus*, mas a anfotericina B é menos tóxica e mais ativa que a anfotericina A (Silva, 2002). A anfotericina B é nefrotóxica e neurotóxica. Além disso, dor e flebite podem ocorrer no local da injeção. Os fungos podem desenvolver resistência à anfotericina na presença de uma alteração do ergosterol na membrana fúngica ou de modificações na membrana produzindo uma ligação de menor avidéz da droga (Page *et al.*, 2004).

A nistatina é produzida pelo *Streptomyces noursei*. Possui o mesmo mecanismo de ação da anfotericina B. Seu uso é limitado à infecções da pele e mucosa oral, esofágica e vaginal por todas as espécies de *Candida* (Silva, 2002). A nistatina é extremamente tóxica para administração parenteral (Page *et al.*, 2004).

O cetoconazol, um antifúngico imidazólico, inibe o sistema enzimático do citocromo P-450, e a permeabilidade da membrana fúngica é alterada (Silva, 2002). Pode provocar náuseas, vômitos, fotofobias, erupções cutâneas, hepatotoxicidade, ligeira elevação de enzimas hepáticas (5-10%), ginecomastia, redução da libido e irregularidades menstruais (Page *et al.*, 2004).

Desde 1989, o fluconazol tem sido usado no tratamento de pacientes infectados com o HIV para a prevenção e terapia de candidíase orofaríngea. Porém alguns anos depois, estudos já descreviam desenvolvimento de resistência a essa droga por cepas de *C. albicans* (Ruhnke *et al.*, 1994). Barchiesi *et al.* (1994a), observaram que isolados de *Candida* que apresentaram um valor de MIC elevado, também tiveram um índice proporcionalmente alto do itraconazol, demonstrando que pode estar havendo o fenômeno

da resistência cruzada. O fluconazol, um derivado imidazólico, é fungistático e atua inibindo a síntese do ergosterol porque se liga ao citocromo P-450 (Silva, 2002). Os efeitos adversos do fluconazol incluem vômito, diarreia e erupções cutâneas (Page *et al.*, 2004).

Num estudo de Ellepola & Samaranayake (2000), foi demonstrado que houve uma supressão da formação do tubo germinativo da levedura *C. albicans* através do uso da clorexidina. Porém, Vaahtoniemi (1997), revela que a exposição da mucosa oral à clorexidina devastou a estrutura normal das células epiteliais e seus receptores microbianos. Trabalhos de Gjermo (1989), demonstraram que a clorexidina pode interferir com a sensação do paladar, provocar feridas na mucosa oral e descoloração dos dentes, associada com a desnaturação e precipitação das proteínas da saliva.

2.5 Antimicrobianos

O descobrimento dos componentes antibacterianos do *Penicillium notatum* por Alexander Fleming permitiu o desenvolvimento dos antibióticos que são as principais armas no combate às infecções bacterianas (Chen *et al.*, 2005). No entanto, desde muito cedo, o aparecimento de patógenos resistentes aos antibióticos, vêm sendo reconhecido como um significativo problema clínico, e intensas pesquisas estão voltadas para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos alternativos (Ryan *et al.*, 1996). Emergentes cepas com resistência intermediária ou alta à penicilina estão crescendo e sendo reconhecidas mundialmente, além de complicar a terapia antimicrobiana em endocardites (Teng *et al.*, 1998). No passado, eritromicina e clindamicina apresentavam boa atividade no combate a microrganismos, mas recentes estudos mostraram que a resistência aos macrolídeos pode ser um problema em várias áreas (Johnson *et al.*, 1999). Como exemplo de microrganismos resistentes aos antimicrobianos temos: *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* e *Candida albicans* (Barbour *et al.*, 2004).

Estudos realizados por Teng *et al.* (1998), demonstraram resistência em *Streptococcus* grupo *mutans* à penicilina e macrolídeos maior que em outros casos já relatados, resultado da alteração da proteína ligadora de penicilina e genes de resistência que podem ser transferidos entre esses estreptococos e *S. pneumoniae*, assim como Tsuda *et al.* (2002), relataram resistência à bacitracina, um antibiótico tópico da família das penicilinas, que inibe a síntese da parede celular bacteriana (Page *et al.*, 2004).

A resistência dos *Streptococcus mutans* cariogênicos à bacitracina é bem conhecida. A bacitracina é um antibiótico polipeptídico cíclico, produzido por uma certa espécie de *Bacillus*, e sua ação é inibir a síntese de peptidoglicana da parede celular bacteriana. Seu uso oral vem adquirindo importância pela sua capacidade de erradicar enterococos resistentes à vancomicina do trato gastrointestinal. Desde que o *S. mutans* foi encontrado em fezes humanas, fenótipos do *S. mutans* bacitracina-resistentes possivelmente podem ser transferidos para esses enterococos que adquirem tolerância à bacitracina (Tsuda *et al.*, 2002).

Apesar da introdução dos antibióticos ter diminuído a mortalidade causada por *S. aureus*, este microrganismo desenvolveu um mecanismo de resistência a todos os agentes antimicrobianos já produzidos (Hardy *et al.*, 2004). A introdução da penicilina ofereceu uma oportunidade para que o tratamento de infecções estafilocócicas obtivessem sucesso. Mas pouco tempo depois, *S. aureus* começou a produzir a enzima penicilinase, conhecida como β -lactamase, capaz de inibir a atividade do antimicrobiano. A partir disso, uma série de penicilinas semi-sintéticas foram desenvolvidas para tentar destruir a enzima β -lactamase. A meticilina foi um desses antibióticos e foi introduzida na prática clínica em 1959. Mas um ano depois, o primeiro *S. aureus* resistente à meticilina foi detectado (Hardy *et al.*, 2004), e essa resistência não é somente à meticilina e outros β -lactâmicos, mas também a muitos outros agentes antimicrobianos, como a vancomicina (Fridkin *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004; Tsuda *et al.*, 2002).

Pesquisas de Murdoch *et al.* (2004), com isolados de *Staphylococcus* spp da cavidade oral de pacientes saudáveis e com periodontite, demonstraram que 70% eram resistentes a penicilina, 3% a meticilina e 2,5% com resistência a tetraciclina, amoxicilina e

teicoplanina. Assim como a penicilina, a amoxicilina é susceptível à ação das β -lactamases, produzidas por muitas espécies de *Staphylococcus*, que são freqüentemente encontrados em bolsa periodontal (Walker *et al.*, 1987), e estas enzimas também são produzidas por periodonto patógenos, como espécies de *Bacteroides* (Legg & Wilson, 1990).

Infecções por estafilococos meticilina-resistentes causadas por isolados de *S. aureus* cresceram nas últimas duas décadas sendo o patógeno mais freqüentemente isolado de bacteremias nosocomias com uma mortalidade estimada em 42%. Nestes casos, a terapia limita-se ao uso de vancomicina e teicoplanina. Porém, algumas cepas de *S. aureus* resistentes a estes glicopeptídeos tem sido reportados no Brasil e em outros países. Então, a pesquisa por novos agentes antimicrobinos é uma área de grande importância (Pereira *et al.*, 2006).

2.6 Plantas Medicinais

Apesar da produção de novos antibióticos ter aumentado nas últimas três décadas, a resistência microbiana a essas drogas também aumentou. Em geral, as bactérias têm a habilidade genética de adquirir e transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos. O problema da resistência bacteriana é crescente e a perspectiva futura da produção e do uso das drogas antimicrobianas continua incerta. Assim, o uso de extratos vegetais e fitoquímicos de conhecida atividade antimicrobiana podem adquirir significado nos tratamentos terapêuticos (Loguercio *et al.*, 2005). Testes antimicrobianos *in vitro* permitem a seleção de extratos brutos de plantas com propriedades potenciais de uso em estudos químicos e farmacológicos (Pinto *et al.*, 2000).

As plantas medicinais são meios naturais, resultando em valiosos produtos herbais, freqüentemente usados no tratamento de várias doenças (Chandrasekaran & Venkatesala, 2004) e constituem uma importante fonte de novos componentes biologicamente ativos (Portillo *et al.*, 2001). O uso das plantas e preparações feitas a partir

delas para tratar infecções é uma prática antiga, utilizada por uma boa parte da população mundial, principalmente em países em desenvolvimento, onde há uma dependência da medicina tradicional para uma variedade de doenças (Ahmad *et al.*, 1998). Os componentes antimicrobianos das plantas podem inibir o crescimento bacteriano e fúngico por diferentes mecanismos do que aqueles presentes nos antimicrobianos em uso e tem um significativo valor clínico (Eloff, 1988).

Originária da Europa, a hortelã (*Mentha piperita* Linnaeus, família *Lamiaceae*) é muito cultivada como planta medicinal em canteiros de jardins e quintais de todo o Brasil (Lorenzi & Matos, 2002) e, em todo o mundo, pelo seu sabor, fragrância e aplicações medicinais e farmacológicas. Seu uso medicinal inclui atividades antiinflamatória, antiespasmódica, analgésica, estimulante, entre outros. É também muito usada nos casos de náusea, bronquite, anorexia e úlceras. O óleo essencial é geralmente utilizado externamente como antiprurido, adstringente, antiséptico, para tratar neuralgia, mialgia e dores de cabeça, antibacteriano, antifúngica e anti-helmíntica (Iskan *et al.*, 2002; Lorenzi & Matos, 2002; Akdogan *et al.*, 2001). Recentemente, tem sido reportado que o óleo da hortelã é efetivo contra reações alérgicas tipo I (Inoue *et al.*, 2001). Esta substância contém entre 0,32 a 4% de óleo essencial volátil, 25 a 62% de mentol, 13 a 40% de mentona, 1 a 4% de mentofurano e 0 a 25% de limoneno (Baser, 1993). Estudos realizados por Iskan *et al.* (2002), observaram que o mentol parece ser o principal constituinte responsável pela sua bioatividade.

As espécies do gênero *Arrabidaea*, família *Bignoniaceae*, têm sido usadas na medicina tradicional para a limpeza de feridas e tratamento de desordens intestinais. No nordeste brasileiro, a *A. chica* (Verlot), conhecida popularmente como Carajuru, Puca Panga, Chica ou Pariri, é usada pelos índios para tatuagens, e com o extrato de suas folhas obtêm-se um pigmento vermelho de onde se extrai a carajurina e a carajurona. O extrato etanólico de seu caule demonstrou ter atividade antioxidante. Suas folhas são usadas como agentes antiinflamatórios e adstringente, e também para cólica intestinal, diarréia sanguinolenta, anemias e leucemias (Pauletti *et al.*, 2003; Zorn *et al.*, 2001). Este gênero é uma fonte de antocianinas, flavonóides e taninos. Seu extrato etanólico demonstrou atividade antioxidante (Pauletti *et al.*, 2003). Também são encontrados na composição dessa planta

os compostos ativos ácido anísico, taninos, ferro assimiláveis e cianocobalamina (Vieira e Albuquerque, 1998).

Nativa da região do Mediterrâneo, o uso medicinal do alecrim (*Rosmarinus officinalis*, Linnaeus) da família *Lamiaceae*, emprega suas folhas na forma de chá abafado (infusão) para os casos de má digestão, dor de cabeça, hipertensão, perda de apetite e nos sintomas de reumatismo (externamente), além de ser antimicrobiano contra *Staphylococcus* spp e *Candida* spp (Gruenwald *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 1991; Boorhem, 1999), e antiinflamatória (Aruoma *et al.*, 1996). Um grande número de componentes polifenólicos com atividade antioxidante vêm sendo identificadas no alecrim, como a presença do diterpeno fenólico, ácido cafêico (Aeschbach *et al.*, 1990; Frankel *et al.*, 1996; Lamaison *et al.*, 1991; Cuvelier *et al.*, 2000), taninos, flavonóides e alguns ácidos fenólicos (Matos, 2000; Lorenzi & Matos, 2002). Estudos de Dulger & Gonuz (2004), demonstraram que o alecrim inibiu o crescimento de cepas de *S. aureus*.

Uma outra planta com propriedades medicinais é a *Tabebuia avellanedae* (Lorentz & Grisebach, família *Bignoniaceae*), popularmente conhecida como ipê-roxo, pau d'arco, lapacho entre outros. Na literatura etnobotânica o uso da casca, sob a forma de chá, é indicado como antiinfecioso, antifúngico, diurético, adstringente, no tratamento caseiro do impetigo e contra alguns tipos de câncer, de lupus, doença de Parkinson, psoríase e alergias (Sousa *et al.*, 1991; Taylor, 1998). Essa planta é rica em saponinas, flavonóides, cumarinas e naftoquinona (Wagner *et al.*, 1989), que possui atividade antibacteriana (D'Albuquerque, 1968), antifúngica (Gershon, 1975), antiviral (Lagrotta *et al.*, 1986) e antineoplásica (Schuerch, 1978). Muitas naftoquinonas são encontradas na natureza demonstrando atividade contra bactérias aeróbias e anaeróbias. Em geral, são ativas contra *S. aureus*, *Enterococcus faecium* e *Bacillus subtilis*, mas inativas contra bactérias Gram-negativas (Rifell *et al.*, 2002).

Estudos de Portillo *et al.* (2001), demonstraram que o extrato da *T. avellanedae*, feito a partir do diclorometano, produziu efeito antifúngico contra *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus fumigatus*. Machado *et al.* (2003), utilizando extratos etanólicos totais e frações da madeira, detectaram a presença

de atividade antibacteriana contra todas as cepas de *S. aureus* meticilina resistentes testadas.

Nas últimas décadas a romã (*Punica granatum* Linnaeus, família *Punicaceaea*) tem sido associada à muitas desordens, incluindo aterosclerose/arteriosclerose, infecção bacteriana, fúngica e parasitária, doença periodontal e intoxicação alimentar (Gracious Ross *et al.*, 2001; Schubert *et al.*, 2002; Longtin, 2003). A análise fitoquímica da romã registra, além dos alcalóides, a presença de até 28% de taninos gálicos nas cascas do caule e dos frutos e, em menor quantidade, nas folhas; nas sementes foi registrada 7% de um óleo fixo, que entre seus ácidos graxos está principalmente o ácido punícico (Robineau, 1995; Sousa *et al.*, 1991). Machado *et al.* (2003), detectaram que os extratos etanólicos totais e frações do pericarpo da romã apresentaram atividade contra todas as colônias de *S. aureus* testadas; e que seu principal constituinte químico com atividade antibacteriana está concentrada em sua fração polar, que é rica em taninos hidrolizáveis. Prashanth *et al.* (2001), detectaram atividade do extrato metanólico da romã contra cepas de *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* e *Salmonella typhi*. Resultados obtidos por Braga *et al.* (2005), demonstraram que o extrato metanólico da *P. granatum* é efetivo para reduzir ou inibir a produção de enterotoxina tipo A estafilocócica.

Utilizando a casca do *Syzygium cumini* Linnaeus (jambolão), família *Myrtaceae*, encontramos atividade contra disenteria, no tratamento de inflamações e de diabetes mellitus (Shafi *et al.*, 2002; Lorenzi e Matos, 2002). No extrato das folhas podemos encontrar muitos agentes flavonóides (Slowing *et al.*, 1994), e trabalhos de Abad *et al.* (1997), demonstraram atividade antiviral contra o herpes simples tipo I. Djipa *et al.* (2000), observaram nas cascas do jambolão a presença de saponinas e taninos, este último demonstrando propriedades antimicrobianas. O extrato da semente do jambolão é usado para tratar gripe, febre e problemas tanto de pele quanto de erupções cutâneas da boca, da garganta, do intestino e do trato genitourinário (Kirtikar & Basu, 1991). Trabalhos realizados por Shafi *et al.* (2000), avaliaram que o óleo essencial das folhas contem considerável atividade antibacteriana, principalmente contra *Salmonella typhimurium*. Estudos de Djipa *et al.* (2000), demonstraram que o jambolão foi efetivo contra cepas de

Enterococcus fecalis, *S. aureus*, *Enterobacter aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganela morganii*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei* e *Yersinia enterocolitica*. Chandrasekaran & Venkatesalu (2004), observaram que o extrato metanólico e aquoso das sementes de jambolão possuem atividade contra cepas bacterianas e fúngicas.

Através da literatura citada, pudemos observar, ao lado da grande variedade da microflora oral, emergentes e preocupantes espécies resistentes aos antimicrobianos, reconhecidamente um significativo problema clínico. Por outro lado as plantas têm demonstrado possuir um efeito antimicrobiano potencial contra esses microrganismos, justificando o aparecimento de inúmeras pesquisas, voltadas para o desenvolvimento de agentes microbianos alternativos. Assim, a ampliação do conhecimento desse efeito antimicrobiano como tratamento alternativo sobre esses organismos, poderá demonstrar ou ter, num curto espaço de tempo, um importante significado clínico, justificando as pesquisas nessa área.

3. PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Determinar se os extratos brutos das plantas relacionadas possuem efeito antimicrobiano *in vitro* contra cepas padrão de *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. utilis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata* e *C. rugosa*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*.
2. Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de plantas medicinais em relação às cepas de microrganismos.
3. Determinar qual extrato da planta (composto polar/apolar) apresenta melhor CIM contra as cepas de microrganismos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Plantas

As plantas selecionadas (Figura 1 A/C/D/E) foram coletadas no campo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP) – Figura 1 F – e no bairro Vila Rezende, Piracicaba/SP (Figura 1 B). O material botânico foi identificado pelo Prof. Dr. Jorge Yoshio Tamashiro com depósito de exsicata no herbário UEC do IB-Unicamp (Quadro 1).

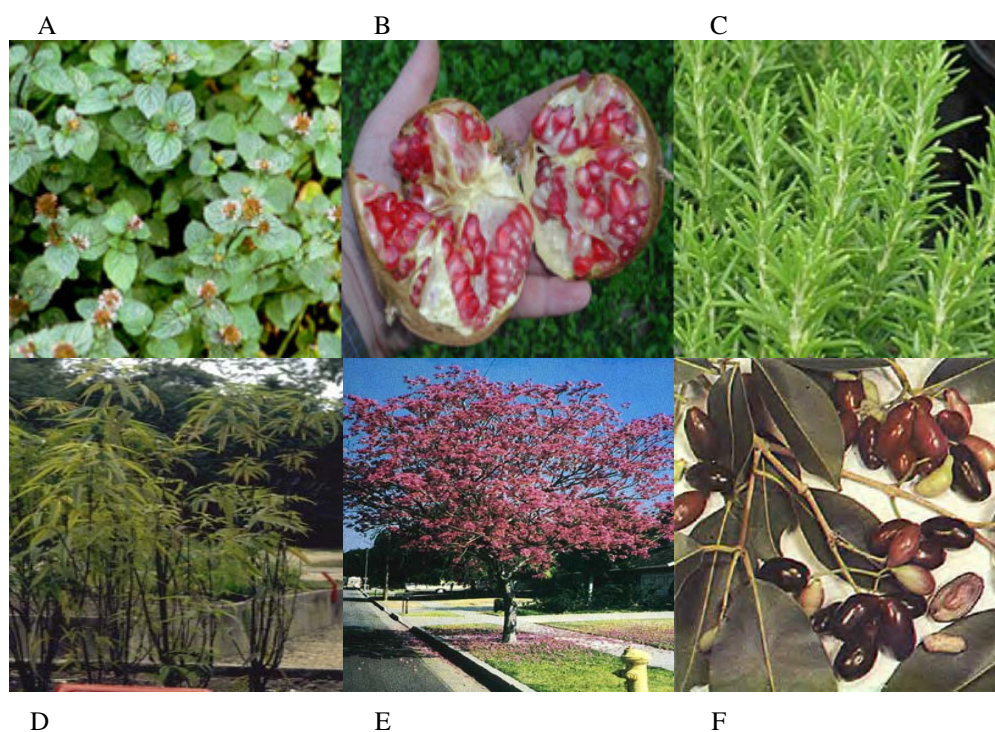


Figura 1: Ilustração das plantas selecionadas para estudo: A) *Mentha piperita* (Linnaeus); B) *Punica granatum* (Linnaeus); C) *Rosmarinus officinalis* (Linnaeus); D) *Arrabidaea chica* (Verlot); E) *Tabebuia avellanedae* (Lorentz & Grisebach); F) *Syzygium cumini* (Linnaeus).

Nome científico	Nome popular	Família	Parte utilizada	Nº exsicata UEC
<i>Mentha piperita</i> (Linnaeus)	Hortelã	<i>Lamiaceae</i>	Folha	1253
<i>Arrabidaea chica</i> (Verlot)	Carajuru	<i>Bignoniaceae</i>	Folha	1254
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Linnaeus)	Alecrim	<i>Lamiaceae</i>	Folha	1264
<i>Tabebuia avellanedae</i> (Lorentz & Grisebach)	Ipê-roxo	<i>Bignoniaceae</i>	Casca	1256
<i>Punica granatum</i> (Linnaeus)	Romã	<i>Punicaceaea</i>	Frutas	143723
<i>Syzygium cumini</i> (Linnaeus)	Jambolão	<i>Myrtaceae</i>	Sementes	143724

Quadro 1: Plantas selecionadas

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação dos extratos

Os extratos das plantas selecionadas (Quadro 1) foram extraídos a partir de 5g da planta fresca, por turbolização através do aparelho extrator Dispensor Extratur (Quimis® modelo Q-252-28), com diclorometano - CH_2Cl_2 (Labsynth PA) - (3 x 200 mL), e, em seguida, filtrado. O resíduo vegetal foi re-extraído com metanol - CH_3OH (Labsynth PA) - (3 x 200 mL) e filtrado. Os solventes foram eliminados sob vácuo em rotaevaporador (Buchi® modelo R-200) fornecendo os extratos brutos (Härmäla *et al.*, 1992) (Figura 2).

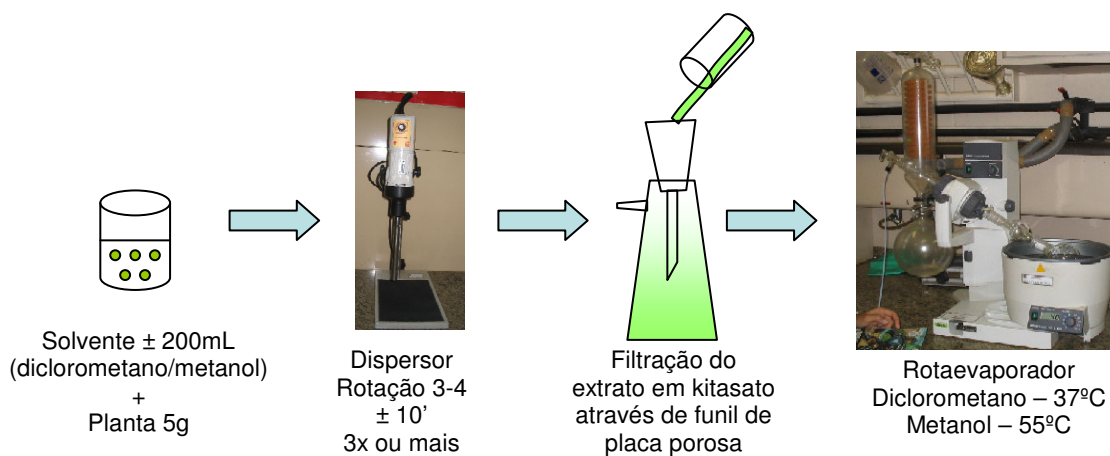


Figura 2: Esquema das etapas para obtenção dos extratos brutos

4.2.2 Monitoramento dos extratos

Os extratos brutos foram monitorados por cromatografia em Camada Delgada (CCD) em cromatoplasas de sílicagel (60 F254 Merck 1.05554), uma técnica simples e muito importante para análises qualitativas rápidas, extremamente efetiva e conveniente para o isolamento de pequenas quantidades de frações de misturas complexas ou na purificação de substâncias. Ela é utilizada para identificar componentes de uma mistura comparando-os com padrões, acompanhar o processo de uma reação pelo aparecimento dos produtos e para um simples monitoramento das condições de extração.

Elui-se as cromatoplasas em sistemas de solventes utilizando gradientes de diclorometano e metanol conforme a polaridade do extrato bruto. Para extratos altamente polares ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$) utilizou-se o eluente: butanol/ ácido acético glacial/ água (40/10/50). A detecção dos compostos foi feita por pulverização com revelador de anisaldeído, seguido de aquecimento em estufa Corporation-Precision (110°C , 10 minutos). As placas foram digitalizadas (Erdelmeier & Köning, 1991; Nyiredy, 1990).

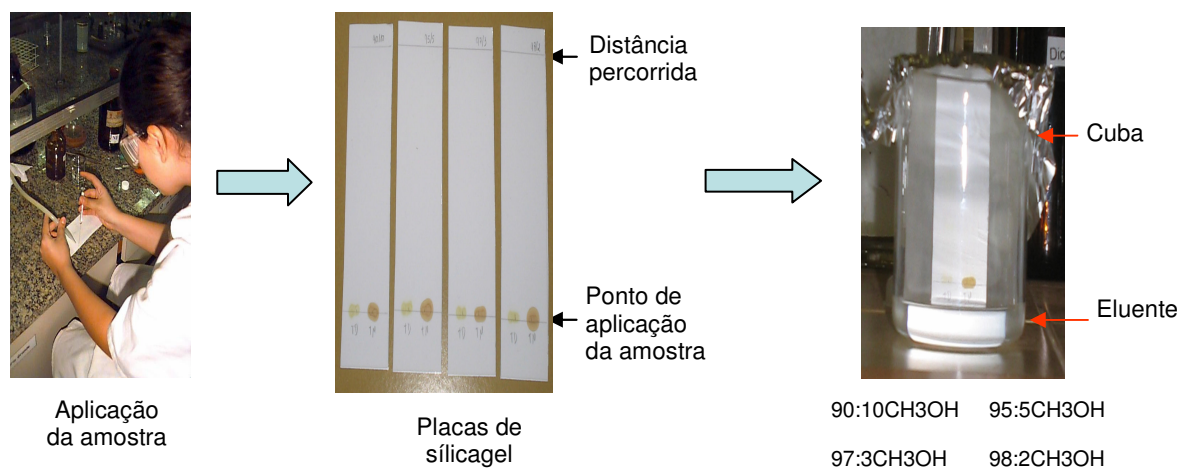


Figura 3: Ilustração dos materiais e etapas envolvidas em cromatografia de camada delgada (CCD): aplicação, placas de sílicagel e corrida cromatográfica.

4.2.3 Eliminação da clorofila do extrato metanólico

Aos extratos metanólicos secos foram adicionados 30% de carvão ativo no extrato bruto, num *erlenmeyer*, e deixado sob agitação por duas horas. Estes foram filtrados em funil de placa porosa contendo terra diatomácea (Celite®) e lavados com metanol (100mL). O solvente foi eliminado sob vácuo fornecendo o extrato bruto sem clorofilas (De Bernardi *et al.*, 1984; Redl *et al.*, 1994).

4.2.4 Diluição dos extratos

Partindo do peso seco do extrato, preparou-se as soluções estoque de modo que a concentração obtida fosse de 5mg/mL, adicionando Tween 20 Tween 20 (Labsynth) para dissolver o extrato e água destilada estéril até atingir a concentração desejada (Anexo 2 Tabela 8).

4.2.5 Esterilização dos extratos

Concomitante com a esterilização dos extratos, foi eliminada a clorofila do extrato diclorometânico. Os extratos foram esterilizados por filtração em membrana de acetato de celulose de 0,45µm (Milipore). Extratos mais grossos foram filtrados primeiramente em membrana de 0,8µm (Milipore), e, posteriormente, refiltrados em membrana de 0,22µm (TPP) com o auxílio de uma seringa em frascos de penicilina e, em seguida, mantidos no congelador, considerados como solução estoque.

4.3 Cepas de Microrganismos

Foram utilizadas cepas padrão de *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e de diversas espécies de *Candida* spp provenientes da Bacterioteca e Micoteca do laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOP/UNICAMP.

CBS-562	<i>C. albicans</i>	CBS-573	<i>C. krusei</i>
CBS-7987	<i>C. dubliniensis</i>	B-06	<i>C. lusitaniae</i>
CBS-604	<i>C. parapsilosis</i>	B-07	<i>C. glabrata</i>
CBS-94	<i>C. tropicalis</i>	B-12	<i>C. rugosa</i>
CBS-566	<i>C. guilliermondii</i>	UA-159	<i>Streptococcus mutans</i>
CBS-5609	<i>C. utilis</i>	ATCC-25923	<i>Staphylococcus aureus</i>

Quadro 2: Cepas padrão de microrganismos

4.3.1 Preparo dos inóculos

O preparo dos inóculos para os testes de suscetibilidade foram feitos através do método de microdiluição seguindo as recomendações do protocolo M27-A2 e M7-A6 para as leveduras e bactérias, respectivamente (NCCLS 2002 e NCCLS 2003 – atual CLSI).

Para as **leveduras**, o preparo foi feito como segue:

Culturas de 24 horas em ágar Sabouraud Dextrose (Merck, Alemanha) foram preparadas em água destilada estéril (5mL), comparando-se a turbidez com a escala de Mc Farland (0,5) e ajustando sua absorbância entre 0,08 a 0,10 a 625nm, com uma concentração equivalente a $5,0 \times 10^6$ céls/mL. Em seguida, foi feita diluição seriada, chegando a uma concentração de $5,0 \times 10^3$ céls/mL em meio de cultura RPMI-1640 (com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, GIBCO – Invitrogen Co.). Nos poços inoculados, resultou a diluição de 1:1 ($2,5 \times 10^3$ céls/mL).

Para as **bactérias**, o procedimento foi o seguinte:

Culturas de 24 horas foram preparadas em solução salina (0,85%) esterilizada (5mL), comparando-se a turbidez com a escala de Mc Farland (0,5) e ajustando sua absorbância entre 0,08 a 0,10 a 625nm, originando uma concentração equivalente a $1,5 \times 10^8$ céls/mL. A partir disso, foi feita a diluição seriada a uma concentração de $1,5 \times 10^6$

céls/mL e, desta última solução, 1mL foi adicionado em 500µL de meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI – Merck, Alemanha), estabelecendo-se uma concentração de 10^6 céls/mL. Os poços inoculados resultaram em uma concentração de 5×10^5 céls/mL.

4.3.2 Diluição dos extratos

A diluição dos extratos se deu a partir da solução estoque (SE) de 5mg/mL, adicionando-se água destilada estéril para uma concentração final de 4mg/mL, considerada como *Diluição 1(D1)*, e a partir dessa solução obteve-se uma diluição seqüencial até a décima diluição, onde a concentração do extrato era de 0,0078mg/mL (*D10*) (Anexo 3 Tabela 9).

4.3.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Método da Microdiluição

Teste de suscetibilidade para levedura

A 50µL do extrato diluído adicionou-se 50µL de meio RPMI-1640 concentrado (2x) + 100µL do microrganismo (placa de 96 poços), do poço da coluna 1 a 10, com o extrato diluído em seu respectivo poço. Os poços 11 e 12 foram, respectivamente, poço controle positivo com 100µL do inóculo + 100µL de RPMI-1640 e poço controle negativo com 50µL do extrato bruto + 150µL de meio RPMI-1640 concentrado 2x. A seguir foram incubados em estufa de aerobiose a 37°C por 24-48h, em duplicata (Figura 4).

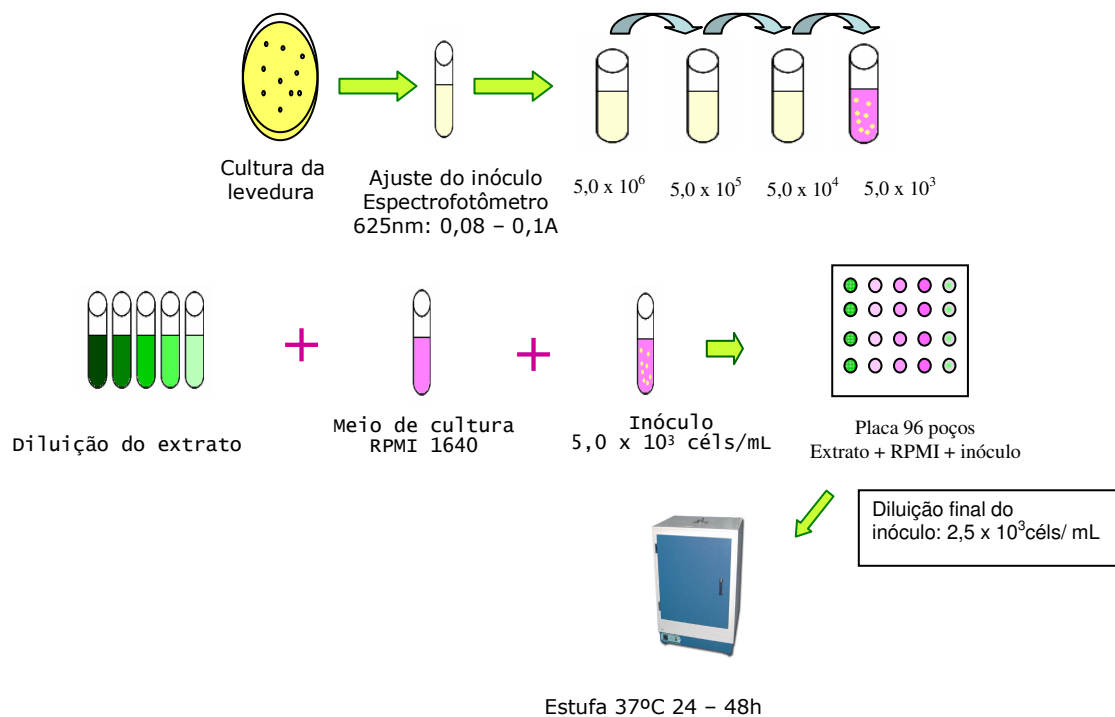


Figura 4: Esquema do teste de suscetibilidade para levedura: ajuste e diluição do inóculo, diluição do extrato, inoculação em placa de 96 poços e incubação em estufa.

Teste de suscetibilidade para bactérias

A 50µL do extrato diluído adicionou-se 50µL de meio BHI concentrado (2x) + 100µL do microrganismo (placa de 96 poços), do poço da coluna 1 a 10, com o extrato diluído em seu respectivo poço. Os poços 11 e 12 foram, respectivamente, poço controle positivo com 100µL do inóculo + 100µL de BHI e poço controle negativo com 50µL do extrato bruto + 150µL de meio BHI concentrado 2x. A seguir foram incubados em estufa de aerobiose para a espécie *S. aureus* e de CO₂ para o *S. mutans* a 37°C por 24h, em duplicata (Figura 5).

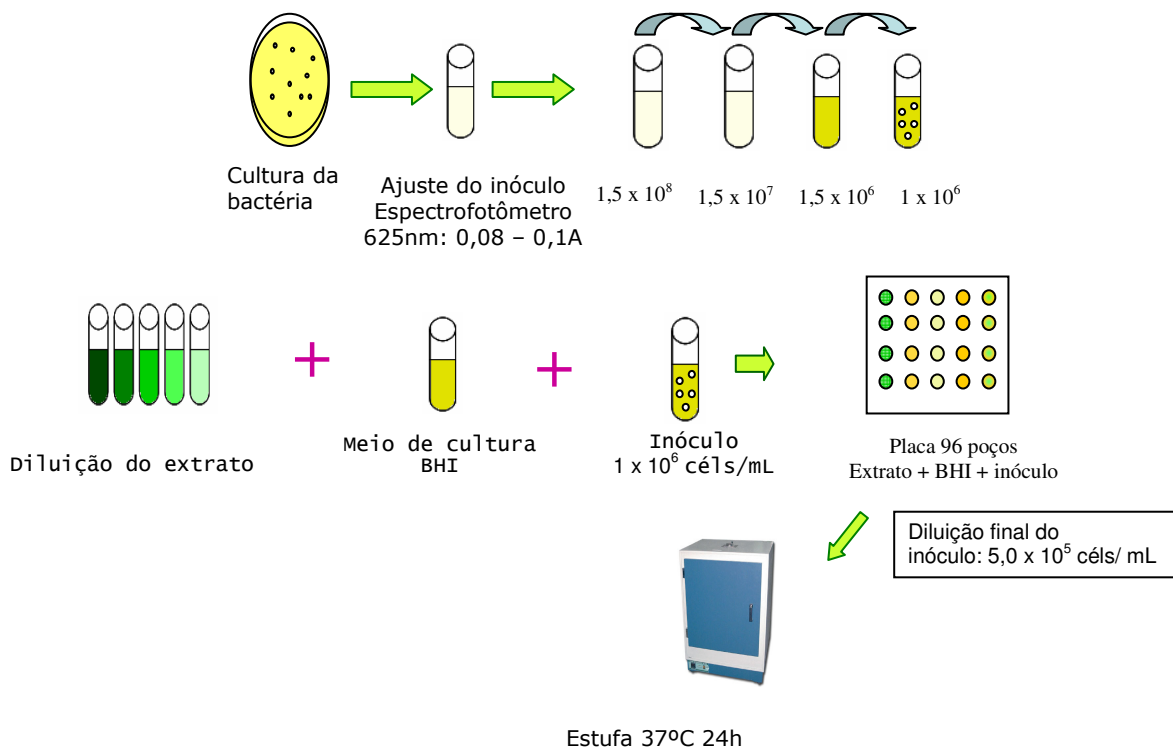


Figura 5: Esquema do teste de suscetibilidade para bactérias. Ajuste e diluição do inóculo, diluição do extrato, inoculação em placa de 96 poços e incubação em estufa.

4.3.4 Preparo dos antimicrobianos

Fluconazol

A partir de 50mg do antifúngico fluconazol (Neon Co. Ltda), dilui-se em 10mL de água destilada estéril, obtendo-se uma solução estoque de 5mg/mL (5000µg/mL). Desta solução-mãe, uma *solução trabalho* foi feita, com concentração de 0,64mg/mL (640µg/mL), 10x mais concentrada que a diluição da droga final do experimento. A partir desta solução trabalho, foram feitas 10 diluições sequenciais e, posteriormente, diluídas em 1:5 em meio RPMI-1640 e mantidas estocadas para uso. No momento do teste, foi adicionado nas placas 100µl do antifúngico + 100µL do inóculo, mantendo-se na estufa a 37°C por 24-48h.

Cloranfenicol

Partindo-se de uma concentração inicial de 1mg/mL do antibiótico cloranfenicol (Sigma, Alemanha) foi diluído em água destilada estéril a uma concentração de 0,25mg/mL (250µg/mL). Foram feitas 10 diluições sequenciais, adicionando-se 100µl do antibiótico + 100µl do inóculo em cada poço, no momento do teste, mantendo-se na estufa a 37°C por 24h.

4.3.5 Leitura dos resultados

A leitura das placas, aplicadas com os extratos brutos ou com os antimicrobianos controles positivos (cloranfenicol / bactérias e fluconazol / leveduras), foram feitas após o tempo de incubação, 24-48h, onde obteve-se dados referentes a CIM pela leitura das placas através da alteração da cor e depósito do microrganismo, comparando-se com o observado no controle positivo.

Nos testes com as leveduras avaliou-se a viragem do meio de cultura (cor-de-rosa → amarelo), mais a detecção de depósito microbiano, tanto para o teste com os extratos quanto para o fluconazol. Com relação ao crescimento das bactérias, era observada apenas o depósito microbiano tanto para o extrato quanto para o cloranfenicol.

5. RESULTADOS

5.1 Massa dos extratos obtidos

As massas dos extratos obtidos e seus rendimentos podem ser observados na Tabela 1. Dos extratos metanólicos da *M. piperita*, *P. granatum*, *S. cumini* e *T. avellaneda* obteve-se um maior rendimento; e dos extratos diclorometânicos a maior quantidade de massa obtida foi do *R. officinalis* e da *A. chica*.

Tabela 1
Rendimento dos extratos brutos das espécies avaliadas

Planta Medicinal	Extrato	Massa da planta (g)	Massa do extrato obtido (g)	Rendimento do extrato (%)
<i>Mentha piperita</i>	Diclorometano	5,0	0,24	4,8
<i>Mentha piperita</i>	Metanol	5,0	1,12	22,4
<i>Punica granatum</i>	Diclorometano	5,0	0,33	6,6
<i>Punica granatum</i>	Metanol	5,0	0,48	9,6
<i>Syzygium cumini</i>	Diclorometano	5,0	0,03	0,6
<i>Syzygium cumini</i>	Metanol	5,0	0,43	8,6
<i>Syzygium cumini</i>	Diclorometano	5,0	0,02	0,4
<i>Tabebuia avellaneda</i>	Diclorometano	5,0	0,17	3,4
<i>Tabebuia avellaneda</i>	Metanol	5,0	1,0	20
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Diclorometano	5,0	0,72	14,4
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Metanol	5,0	0,60	12
<i>Arrabidaea chica</i>	Diclorometano	5,0	0,264	5,28
<i>Arrabidaea chica</i>	Metanol	5,0	0,219	4,39

5.2 Cromatografia

Por cromatografia de camada delgada observou-se a reprodutibilidade dos compostos da extração com o diclorometano e metanol, constatando-se a separação dos constituintes majoritários extraídos (Figura 6 e Anexo 4, Figuras de 11 a 15).

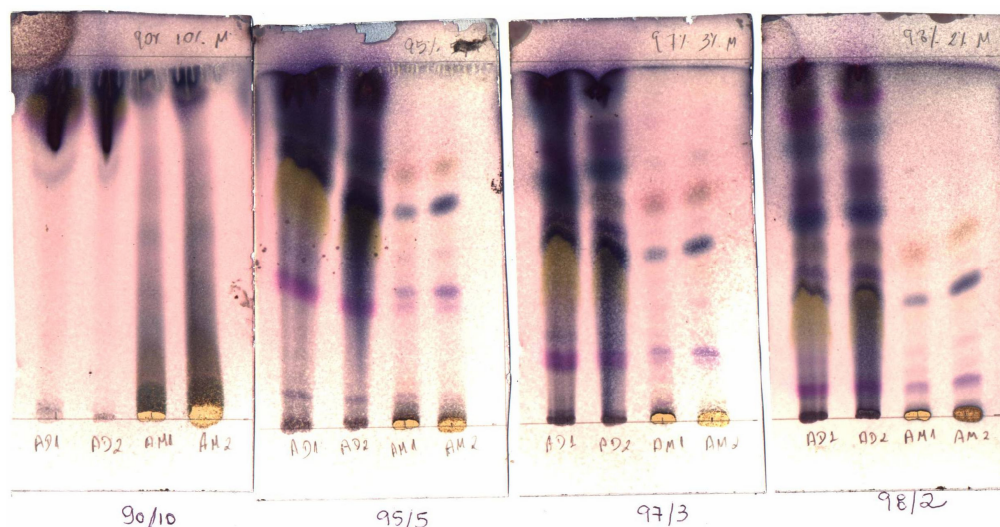


Figura 6: Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos extratos de *Rosmarinus officinalis*, nas quatro diferentes concentrações do eluente (A; alecrim; D: diclorometano; M: metanol).

5.3 Diluição final dos extratos e antimicrobianos aplicados nas microplacas

As diluições finais dos extratos, do antifúngico fluconazol (já estava diluído e estocado) e do antibiótico cloranfenicol (diluído no momento do teste), adicionados nas colunas numeradas de 1 a 10 das placas de 96 poços, adquiriram nova concentração final, apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2

Concentração final dos extratos e antimicrobianos utilizados em cada poço (CIM - mg/mL)

Poço	Extrato diluído	Fluconazol	Cloranfenicol
1	1	0,064	0,125
2	0,5	0,032	0,0625
3	0,250	0,016	0,0312
4	0,125	0,008	0,0156
5	0,0625	0,004	0,0078
6	0,0312	0,002	0,0039
7	0,0156	0,001	0,0019
8	0,0078	0,0005	0,00099
9	0,0039	0,00025	0,00049
10	0,0019	0,000125	0,00024

5.4 Leitura da atividade antimicrobiana (CIM – mg/mL) de extratos

A leitura do crescimento das leveduras foi observada pela viragem do meio de cultura (coloração), que era cor-de-rosa e tornava-se amarelo, além do depósito microbiano observado. Quando ocorria inibição pelo extrato e antifúngico, a coloração do pocinho se apresentava cor-de-rosa (Figura 7 e 8). Com relação ao crescimento das bactérias, era observado apenas o depósito microbiano tanto para o extrato quanto para o cloranfenicol (Figura 9 e 10).

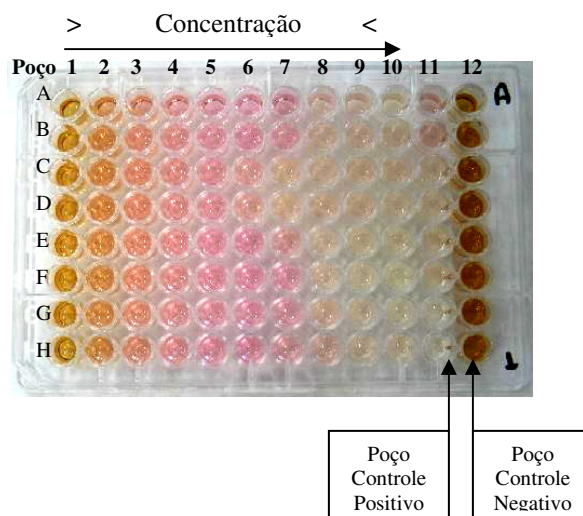


Figura 7: Placa para teste de susceptibilidade a extratos de plantas. Extrato da *A. chica* (diclorometano) x amostras de levedura. A/B: 562, inibição poço 7; C/D: 7987, inibição poço 6; E/F: 604, inibição poço 7; G/H: 94, inibição poço 7. Leitura realizada com 48h.

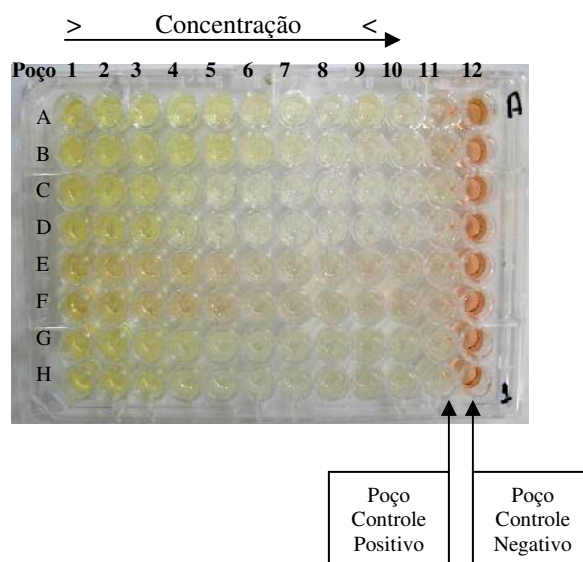


Figura 8: Placa para teste de susceptibilidade a extratos de plantas. Extrato da *A. chica* (metanol) x amostras de levedura. A/B: 562, sem inibição; C/D: 7987, sem inibição; E/F: 604, sem inibição; G/H: 94, sem inibição. Leitura realizada com 48h.

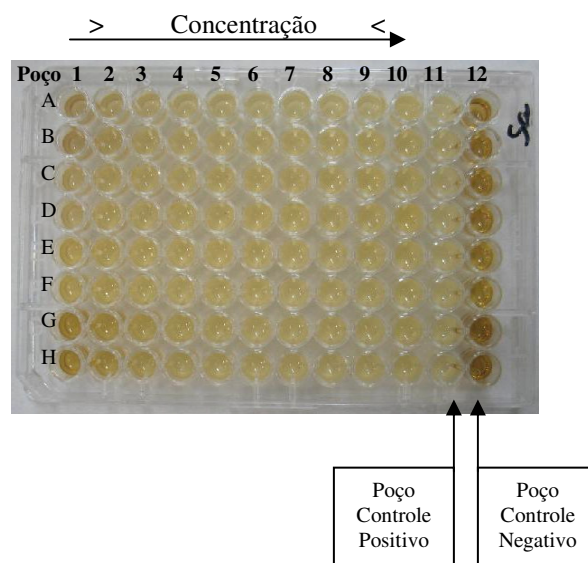


Figura 9: Placa para teste de susceptibilidade a extratos de plantas x amostras de *S. aureus*. A/B: *T. avellanedae* (diclorometano), sem inibição; C/D: *T. avellanedae* (metanol), sem inibição; E/F: *A. chica* (metanol), sem inibição; G/H: *R. officinalis* (metanol), sem inibição. Leitura realizada com 24h.

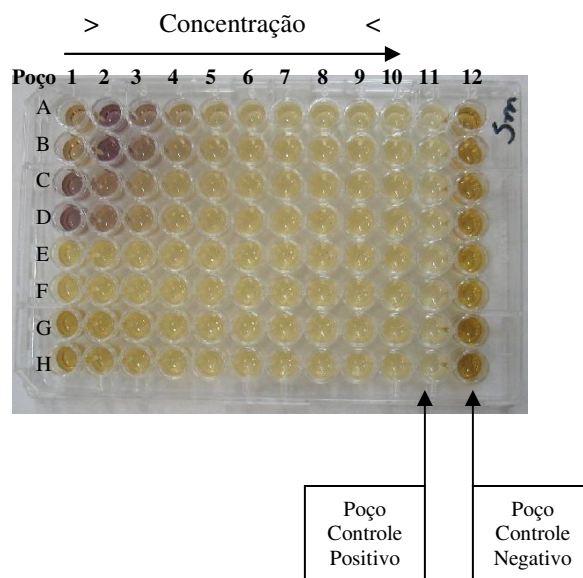


Figura 10: Placa para teste de susceptibilidade a extratos de plantas x amostras de *S. mutans*. A/B: *T. avellanedae* (diclorometano), sem inibição; C/D: *T. avellanedae* (metanol), sem inibição; E/F: *A. chica* (metanol), sem inibição; G/H: *R. officinalis* (metanol), sem inibição. Leitura realizada com 24h.

5.5 Atividade antimicrobiana dos extratos diclorometânicos

A atividade antimicrobiana dos extratos brutos diclorometânicos pode ser observada na Tabela 3, apresentando os resultados da CIM sobre as cepas de leveduras e bactérias, com 24 horas de leitura. Enquanto algumas cepas de leveduras ainda apresentavam crescimento, não havendo resultado da CIM sobre elas, outras já demonstravam resistência, e a maioria exibiu atividade do extrato diclorometânico. Contudo as bactérias foram resistentes a todos os extratos brutos já com 24 horas.

Tabela 3

Atividade antimicrobiana (CIM – mg/mL) dos extratos diclorometânicos (24 horas)

Microrganismos	<i>A. chica</i>	<i>M. piperita</i>	<i>S. cumini</i>	<i>T. avellanadae</i>	<i>R. officinalis</i>	<i>P. granatum</i>
562	C	0,0625	0,0019	0,125	C	0,0019
7987	0,0078	0,0625	0,0019	0,125	0,0019	C
604	0,0078	0,0019	C	0,0625	0,0078	C
94	0,0078	R	0,0019	R	0,0039	0,0019
566	C	0,0156	C	C	0,0039	C
5609	C	0,0312	C	C	C	C
573	C	0,125	0,0019	C	0,0019	C
06	C	0,125	0,0019	R	0,0019	0,0019
07	C	C	C	C	C	C
12	0,0019	0,0625	0,0019	0,0156	0,0019	0,0019
25923	R	R	R	R	R	R
UA159	R	R	R	R	R	R

C: crescimento; R: resistência

Os resultados finais da atividade antimicrobiana dos extratos brutos diclorometânicos sobre as cepas de leveduras podem ser observados na Tabela 4, após 48 horas de leitura da CIM. Alguns extratos apresentaram atividade nas mínimas

concentrações, como *P. granatum* a 0,0019mg/mL, enquanto outros extratos agiram em concentrações mais elevadas e/ou não tiveram atividade, como a *M. piperita*.

Tabela 4

Atividade antimicrobiana (CIM – mg/mL) dos extratos diclorometânicos (48horas)

Microorganismos	<i>A. chica</i>	<i>M. piperita</i>	<i>S. cumini</i>	<i>T. avellanadae</i>	<i>R. officinalis</i>	<i>P. granatum</i>
562	0,0156	R	0,0312	R	0,0078	0,0019
7987	0,0312	R	0,0625	R	0,0156	0,0019
604	0,0156	R	0,0078	R	0,0312	0,0019
94	0,0156	R	0,0312	R	0,0156	0,0019
566	0,0156	R	0,0078	R	0,0078	0,0019
5609	R	R	0,0019	R	R	0,0019
573	0,0078	R	0,0312	0,0625	0,0039	0,0019
06	0,0078	R	0,0312	R	0,0078	0,0019
07	R	0,0019	0,0019	R	R	0,0019
12	0,0078	0,0019	0,0312	R	0,0019	0,0019

R: resistência

5.6 Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos

A atividade antimicrobiana dos extratos brutos metanólicos pode ser observada na Tabela 5, apresentando os resultados da CIM sobre as cepas de leveduras e bactérias, com 24 horas de leitura. Assim como ocorreu com o extrato diclorometânico, enquanto algumas cepas de leveduras ainda apresentavam crescimento, sem resultado da CIM sobre elas, outras demonstravam resistência, e a maioria exibia atividade do extrato metanólico a baixas concentrações. Com relação às bactérias, a cepa 25923 foi resistente a todos os extratos, e a outra cepa, UA159, demonstrou sensibilidade ao extrato da planta *S. cumini*, sendo resistente aos demais.

Tabela 5

Atividade antimicrobiana (CIM – mg/mL) dos extratos metanólicos (24horas)

Microrganismos	<i>A. chica</i>	<i>M. piperita</i>	<i>S. cumini</i>	<i>T. avellaneda</i>	<i>R. officinalis</i>	<i>P. granatum</i>
562	R	C	0,0019	C	C	0,0019
7987	R	0,0019	0,0019	0,0019	0,0019	0,0019
604	0,0019	0,0019	0,0019	0,0039	0,0039	C
94	R	0,0039	0,0019	0,0078	0,0019	0,0019
566	C	0,0019	0,0019	C	0,0019	C
5609	C	C	0,0019	C	C	C
573	R	0,0019	0,0019	C	0,0019	0,0019
06	R	0,0039	0,0019	0,0019	0,0019	0,0019
07	R	C	0,0019	C	C	C
12	R	0,0019	0,0019	0,0039	0,0019	0,0019
25923	R	R	R	R	R	R
UA159	R	R	1	R	R	R

C: crescimento; R: resistência

Os resultados finais da atividade antimicrobiana dos extratos brutos metanólicos, após 48horas, sobre as cepas de leveduras podem ser observados na Tabela 6, a qual revela que a melhor CIM foi do extrato da planta *S. cumini* a 0,0019mg/mL. Os outros extratos, com exceção da *A. chica* que não demonstrou atividade sobre nenhuma cepa, apresentaram atividade nas mínimas concentrações.

Tabela 6

Atividade antimicrobiana (CIM – mg/mL) dos extratos metanólicos (48horas)

Microrganismos	<i>A. chica</i>	<i>M. piperita</i>	<i>S. cumini</i>	<i>T. avellaneda</i>	<i>R. officinalis</i>	<i>P. granatum</i>
562	R	0,0078	0,0019	0,0039	0,0019	0,0039
7987	R	0,0078	0,0019	0,0078	0,0078	0,0039
604	R	0,0039	0,0019	0,0039	0,0039	0,0039
94	R	0,0039	0,0019	0,0156	0,0039	0,0019
566	R	0,0019	0,0019	0,0019	0,0039	0,0019
5609	R	0,0078	0,0019	0,0039	R	0,0039
573	R	0,0078	0,0019	0,0078	0,0019	0,0019
06	R	0,0078	0,0019	0,0039	0,0019	0,0019
07	R	0,0039	0,0019	0,0019	R	0,0039
12	R	0,0039	0,0019	0,0039	0,0019	0,0039

R: resistência

5.7 Atividade antimicrobiana do fluconazol e do cloranfenicol.

Os resultados obtidos sobre a atividade antifúngica do fluconazol para as leveduras e cloranfenicol para as bactérias (ambos usados como controle positivo) se acham expressos na Tabela 7. Testes mantidos por 48H, demonstraram valores positivos de inibição para todas as amostras testadas. Na atividade antimicrobiana do cloranfenicol, detectou-se valores positivos para ambos os microrganismos testados.

Tabela 7

Atividade dos antimicrobianos testados (CIM – mg/mL)

Leveduras	Fluconazol (48h)
562	0,032
7987	0,032
604	0,032
94	0,064
566	0,032
5609	0,032
573	0,064
06	0,032
07	0,032
12	0,064
Bactéria	Cloranfenicol (24h)
UA 159	0,0625
25923	0,0625

4

5.8 Atividade dos extratos diclorometânicos e metanólicos

Os dados obtidos da CIM dos extratos diclorometânicos e metanólicos comparativos entre as amostras de leveduras x plantas testadas se acham expressos nos Gráficos 1 e 2, respectivamente. Maiores valores do extrato diclorometânicos podem ser observados para os extratos do jambolão, enquanto que a menor CIM foi apresentada pelo extrato da romã. As amostras de *C. utilis* e a *C. glabrata* foram as mais resistentes (Gráfico 1). Em relação aos resultados da CIM obtidos dos extratos metanólicos, pode-se observar valores de sensibilidade para as espécies de *C. guilliermondii*, *C. rugosa*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (Gráfico 2). Os resultados obtidos com as amostras bacterianas não revelaram valores positivos para os extratos testados, com exceção da espécie *S. mutans*, demonstrando sensibilidade apenas ao extrato metanólico do jambolão.

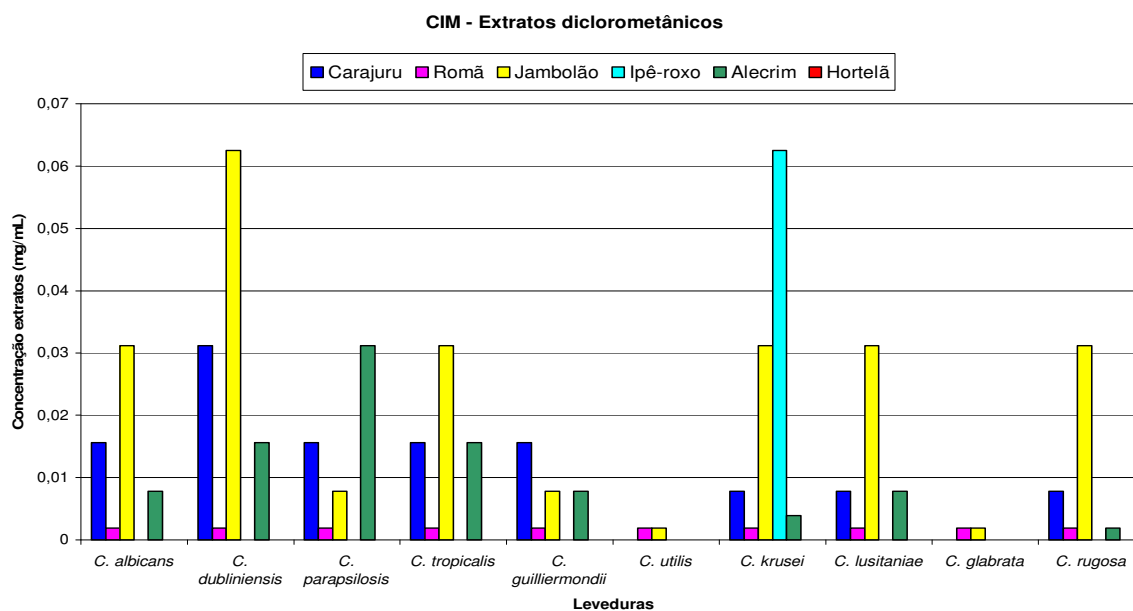


Gráfico 1: Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos diclorometânicos em relação às amostras de *Candida* testadas.

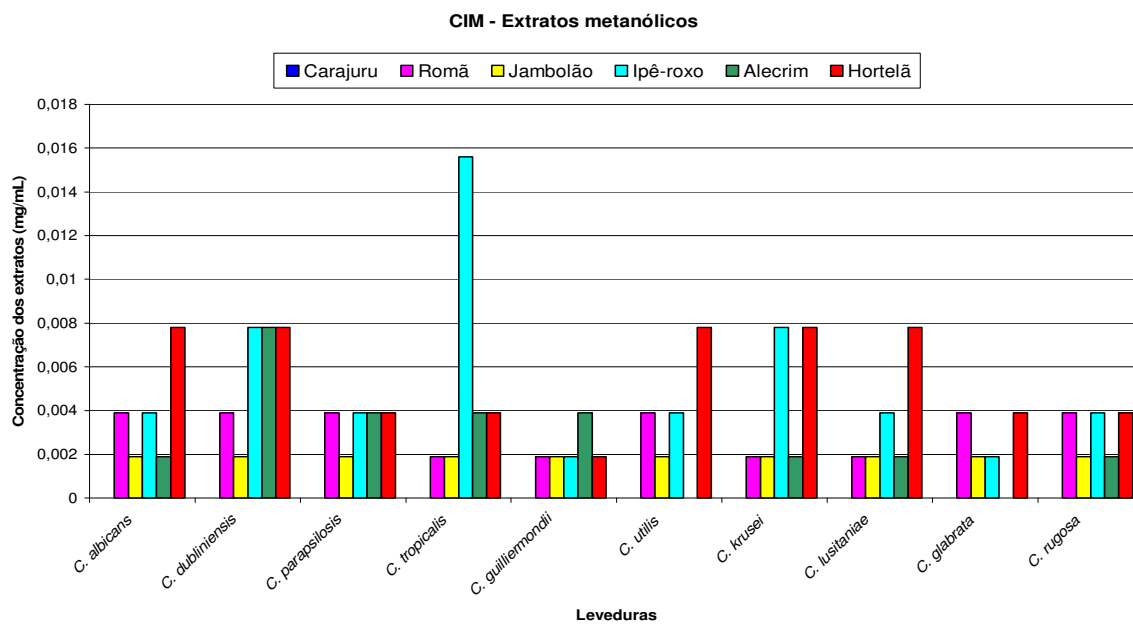


Gráfico 2: Concentração mínima inibitória (CIM) dos extratos metanólicos em relação às cepas de *Candida* spp.

6. DISCUSSÃO

Embora a indústria farmacêutica tenha desenvolvido um grande número de novos antibióticos nas três últimas décadas, a resistência a essas drogas pelos microrganismos aumentou. Em geral, as bactérias têm habilidade genética para transmitir e adquirir resistência às drogas, as quais são utilizadas como agentes terapêuticos. Devido ao número de pacientes hospitalizados, que estão com seu sistema imunológico suprimido, e às novas espécies bacterianas multi-resistentes, novas infecções podem ocorrer nos hospitais, resultando num alto índice de mortalidade (Cohen, 1992). O aumento prevalente de microrganismos multi-resistentes, assim como o aparecimento de efeitos indesejáveis de algumas drogas, faz com que a busca por novos agentes antimicrobianos seja uma importante estratégia para o estabelecimento de terapias alternativas para infecções de difícil tratamento (Pereira *et al.*, 2006; Phongpaichit *et al.*, 2005).

Por muito tempo, as plantas tem sido uma valiosa fonte de produtos naturais para preservar a saúde humana, principalmente nos últimos anos em que as terapias naturais vem sendo intensivamente estudadas. O uso de compostos vegetais com finalidade farmacêutica está crescendo gradualmente no Brasil (Santos *et al.*, 1995). Assim, o uso dos extratos de plantas e produtos fitoquímicos, ambos com propriedades antimicrobianas conhecidas, podem ter grande significado no tratamento terapêutico. Muitas plantas têm sido usadas devido às suas características antimicrobianas, que fazem parte da síntese de seus metabólitos como um composto secundário. Esses compostos são conhecidos pelas suas substâncias ativas, como compostos fenólicos, que fazem parte dos óleos essenciais, assim como os taninos (Nascimento *et al.*, 2000).

Com relação aos resultados obtidos com a planta medicinal *A. chica* o extrato diclorometânico demonstrou melhor atividade farmacológica contra as leveduras. Com 24 horas, algumas cepas ainda estavam crescendo (562, 566, 5609, 573, 06 e 07), enquanto outras apresentavam sensibilidade (7987, 604, 94 e 12); e com 48 horas, com exceção das cepas 5609 e 07 que foram resistentes, as leveduras foram inibidas por esse extrato, com as concentrações variando entre 0,0078 a 0,0312mg/mL. O extrato metanólico apresentou

atividade sobre as leveduras com 24 horas, porém esse resultado tornou-se negativo com 48 horas, isto é, todas as leveduras foram resistentes. As amostras bacterianas mostraram-se resistentes a ambos os extratos testados. Estes resultados sugerem a necessidade de mais estudos para se investigar melhor esses compostos que se mostraram ativos, ou suas substâncias purificadas, que demonstrem atividade antibacteriana, já que, de acordo com a literatura, a *A. chica* é utilizada para a limpeza de feridas (Pauletti *et al.*, 2003; Zorn *et al.*, 2001), e algum efeito sobre esses microrganismos ela deve apresentar.

De acordo com Iscan *et al.* (2002), o óleo essencial da *M. piperita* inibiu, entre microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, *S. aureus* e *C. albicans*, à uma concentração de 2,5 – 0,625mg/mL e 0,625 – 0,312mg/mL, respectivamente, contudo, esses resultados elevados inviabilizam esses testes, já que concentrações mais baixas são desejáveis. Em nossos estudos, porém, os extratos metanólicos e diclorometânicos não tiveram ação sobre as amostras bacterianas testadas. O extrato diclorometano apresentou atividade sobre as amostras de leveduras com 24 horas (em concentração de 0,0019 a 0,125mg/mL); porém, com 48 horas todas se mostraram resistentes, o que demonstra uma pequena capacidade de ação contra as amostras testadas. Por outro lado, o extrato metanólico demonstrou atividade contra as amostras de leveduras a uma baixa concentração (0,0019mg/mL) com 24 horas, sendo que com 48 horas houve mudança da CIM (0,0019 a 0,0078mg/mL). Não houve alteração da CIM para as amostras 94, 566 e 06, sugerindo um efeito fungicida, enquanto que para as outras amostras se observou aumento da CIM (ação fungistática).

A atividade antimicrobiana dos extratos da *S. cumini* revelou resultados promissores para a terapia alternativa no combate a esses microrganismos, uma vez que as leveduras foram sensíveis a ambos os extratos. O extrato diclorometânico demonstrou atividade em algumas cepas (562, 7987, 94, 573, 06 e 12) com 24 horas de leitura a baixas concentrações (0,0019mg/mL), sendo que com 48 horas, todas as cepas foram inibidas porém houve mudança dos valores da CIM (0,0019 – 0,0625mg/mL), sugerindo efeito fungistático. O extrato metanólico demonstrou melhor resultado, não ocorrendo mudança do valor da CIM de 24 para 48 horas, podendo ser considerado um extrato fungicida.

Enquanto as amostras de *Candida* spp. mostraram sensibilidade, *S. aureus* foi resistente a ambos os extratos e *S. mutans* sensível ao extrato metanólico, a uma alta concentração (1mg/mL). Estudos, no entanto, que revelem os compostos ativos desse extrato contra esses microrganismos, se fazem necessários. Dados da literatura tem demonstrado resultados positivos em relação a *C. albicans*, mas contrários em relação ao *S. aureus*. Duraipandiyan *et al.* (2006), obtiveram bons resultados com o extrato metanólico (folhas) sobre *C. albicans* e *S. aureus*, enquanto Nascimento *et al.* (2000), demonstrou atividade com o extrato etanólico (folhas) e Chandrasekaram & Venkateslu (2004) tiveram melhores resultados ainda com o extrato metanólico de sementes com valores da CIM de 125µg/mL e 31,25µg/mL, respectivamente, onde as leveduras se mostraram mais sensíveis.

Com relação aos resultados obtidos da casca da *T. avellanadae*, o extrato diclorometânico, com 24 horas, demonstrou atividade sobre algumas cepas de leveduras (562, 7987, 604, 12), com concentração de 0,00156 a 0,125mg/mL, mas após 48 horas, as leveduras se mostraram resistentes a esse extrato com exceção da cepa 573, que foi sensível a uma concentração de 0,0625mg/mL. Em compensação, com 24 horas algumas leveduras (7987, 604, 94, 06 e 12) demonstraram alta sensibilidade aos extratos metanólicos (0,0019 a 0,0078mg/mL) e com 48 horas esse extrato apresentou atividade contra todas as leveduras com CIM de 0,0019 a 0,0156mg/mL, sendo que as cepas 604 e 12 não apresentaram mudança da CIM. As cepas bacterianas, mais uma vez, foram resistentes a ambos os extratos. Esses dados, em princípio, diferem da literatura, onde Portillo *et al.* (2001), demonstraram melhores resultados com o extrato diclorometânico. As amostras bacterianas se mostraram resistentes, contrastando com a literatura, já que Rifell *et al.* (2002) e Machado *et al.* (2003), detectaram atividade antibacteriana contra amostras de *S. aureus*.

Pereira *et al.* (2006), trabalharam com um componente do ipê-roxo, o lapachol e sintetizaram outros três componentes, a α -lapachona, a β -lapachona e a 3-hidroxi- β -N-lapachona, denominadas de naftoquinonas. Estes compostos inibiram todas as cepas de *S. aureus* testadas. Estudaram a possibilidade dessas naftoquinonas agirem na síntese de proteínas das bactérias. Os resultados demonstraram que a naftoquinona causa uma reação de estresse na célula bacteriana, sugerindo uma relação de estresse oxidativo. A atividade

da naftoquinona foi observada até mesmo contra isolados de *S. aureus* vancomicina hetero-resistentes, sugerindo que ela pode ser um agente antimicrobiano alternativo na terapia de infecções por *Staphylococcus* multi-resistentes. Por outro lado, as proteínas de síntese bacteriana não foram inibidas por essas naftoquinonas, mas houve uma indução de estresse oxidativo em todos os microrganismos testados. É suposto que esta substância (naftoquinona) promove um estresse oxidativo na membrana da célula bacteriana quando a síntese de ATP ocorre na cadeia respiratória. Quando os compostos da naftoquinona foram testados em células eucarióticas (BSC-40), um efeito citotóxico foi observado. Os resultados mostraram que estas substâncias (lapachol, α -lapachona, β -lapachona e 3-hidroxi- β -N-lapachona) não são ideais para serem usadas por administração endógena por poderem causar dano às células humanas já que um quarto do valor da CIM (256, 64, 8 e 8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) demonstrou toxicidade às células eucarióticas. Porém, quando essas substâncias foram aplicadas topicamente em coelhos, nenhum dano foi observado, a não ser quando usadas em alta concentração (800 $\mu\text{g/mL}$). Esses resultados mostram que é possível um uso tópico desse componente, mas não em procedimentos profiláticos ou em tratamentos de feridas infeccionadas, a não ser após maiores investigações em relação à aplicação por longos períodos na derme. É possível que possa ser usada como aplicação tópica contra infecções por estafilococos após melhores investigações de suas propriedades farmacológicas.

Resultados da atividade da *R. officinalis* demonstraram que as leveduras foram sensíveis a ambos os extratos, com exceção das amostras 5609 e 07, que foram resistentes. O extrato diclorometânico demonstrou atividade sobre algumas cepas (7987, 604, 94, 566, 573, 06 e 12) com 24 horas, em concentrações de 0,0019 a 0,0078mg/mL, e com 48 horas apresentou ação sobre essas leveduras, sendo estável para as amostras 573 e 12, podendo ser considerado, em uma primeira análise, fungicida. O resultado da CIM do extrato metanólico sobre as amostras 604, 573, 06 e 12 não demonstrou alteração da leitura de 24 para 48 horas, inibindo também as demais cepas de leveduras. Contudo, não houve inibição das amostras bacterianas, discordando dos resultados de Dulger e Gonuz (2004), os quais encontraram atividade contra *S. aureus*, mesmo em altas concentrações (200mg/mL), e resistência da *C. albicans*. Nascimento *et al.* (2000), trabalhando com a *R. officinalis*,

encontrou atividade desta planta para *C. albicans* mas não contra *S. aureus*, corroborando com os nossos resultados.

A atividade antimicrobiana da *P. granatum* foi a que demonstrou os melhores resultados entre os extratos de todas as plantas avaliadas, revelando alta sensibilidade das leveduras a ambos os extratos, não ocorrendo mudança da CIM após 48 horas do extrato diclorometânico sobre as cepas 562, 94, 06 e 12, sugerindo efeito fungicida, e inibindo também as demais nas mínimas concentrações (0,0019mg/mL); mas houve, no entanto, alteração da CIM do extrato metanólico entre as amostras 562, 7987, 5609, 07 e 12, demonstrando uma ação fungistática, com a CIM variando entre 0,0019 a 0,0039mg/mL. Embora os resultados com as amostras de leveduras tenham sido satisfatórias, o mesmo não ocorreu com relação às bactérias, que demonstraram resistência aos extratos dessa planta. Alguns desses dados estão de acordo com a literatura, enquanto outros não. Machado *et al.* (2003), Prashanth *et al.* (2001), Braga *et al.* (2005) e Duraipandiyan *et al.* (2006), demonstraram sensibilidade do *S. aureus* a *P. granatum*, enquanto que Nascimento *et al.* (2000), obtiveram resultados negativos, semelhantes aos resultados obtidos aqui, enquanto Voravuthkunchai *et al.* (2004), encontraram atividade até mesmo contra a cepa de *E. coli* 0157:H7, com CIM de 0,19mg/mL. Porém, Nascimento *et al.* (2000), não observou sensibilidade da *C. albicans* a este extrato, enquanto que Duraipandiyan *et al.* (2006), encontrou bons resultados. Estudos fitoquímicos são requeridos mais uma vez, para se determinar as prováveis substâncias bioativas contra agentes microbianos.

Navarro *et al.* (1996), realizaram um trabalho de atividade antimicrobiana *in vitro* com diversas plantas potencialmente ativas contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, encontrando efeito antimicrobiano da *P. granatum* contra essas linhagens microbianas testadas, em concentrações iguais ou inferiores a 10mg/mL. Tais concentrações, no entanto, poderiam apresentar algum efeito citotóxico em células eucarióticas, devido à alta concentração utilizada.

O patógeno oportunista *C. albicans* é uma importante causa de infecção superficial da mucosa e doenças sistêmicas em humanos (Bartie *et al.*, 2004). Para o combate desses patógenos, a eficácia dos antifúngicos depende de muitos fatores. Na boca,

a levedura do gênero *Candida* está constantemente exposta a um meio ambiente repleto de saliva e seus constituintes antimicrobianos. O constante fluxo salivar também age a favor do microrganismo quando os agentes antifúngicos são aplicados topicamente, diminuindo a concentração da droga abaixo dos níveis terapêuticos. Assim, o microrganismo suporta apenas uma exposição limitada do antifúngico durante o tratamento, e a concentração da droga tende a variar nos diferentes nichos da cavidade oral (Anyl & Samaranayake, 2002). Estudos de Nishiyama *et al.* (2001) demonstraram que a combinação de uma droga azólica e a lisozima afeta a formação da parede celular da *Candida* spp, interrompendo a construção e integração dos componentes da parede celular. Esse dado permite considerar que o fluxo salivar também pode influenciar a concentração do extrato vegetal utilizado, devendo-se levar em conta estas condições para sua aplicação tópica.

Ruhnke *et al.* (1997), trabalhando com cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes HIV-positivos, observou redução da sensibilidade aos antifúngicos usados, desenvolvida durante o tratamento prolongado desses pacientes, tanto para o fluconazol como para o voriconazol. Essa redução de sensibilidade da *C. albicans* e provável resistência cruzada entre os agentes azólicos parecem ser comuns, devido ao mecanismo de ação destes agentes, que são os mesmos. De acordo com Larsen (1990), a imunossupressão dos pacientes facilita a recorrência das infecções por *Candida*. Devido ao uso prolongado dos antifúngicos, o tratamento alternativo com plantas medicinais pode ser considerado relevante devido aos resultados encontrados, os quais demonstraram, no caso da *S. cumini* (metanol), inibição do crescimento com 24h, ou mesmo ser realizado um rodízio de tratamento, o que poderia reduzir a seleção de cepas resistentes aos antifúngicos e compostos ativos das plantas (que podem ser isolados e identificados).

Cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina vem crescendo nas últimas duas décadas, sendo o patógeno mais frequentemente isolado de bacteremias nosocomiais, atribuindo-se uma alta mortalidade de, aproximadamente, 42%. Nestes casos, a terapia limita-se a vancomicina e teicoplanina. Porém, algumas cepas resistentes a esses glicopeptídeos já são reportados no Brasil e outros países (Pereira *et al.*, 2006). Por isso, a

busca por novos agentes antimicrobianos que tenham compostos naturais e bioativos se faz necessário, como é o caso dos extratos vegetais que possuem essas características.

No ambiente oral, os antimicrobianos têm sua eficácia substancialmente reduzida *in vivo* por causa das diferentes espécies de microrganismos encontradas neste local, e também devido à coagregação entre as espécies bacterianas e à complexa estrutura da placa dental. Quando ocorre a formação de biofilme, a penetração do antibiótico *in vivo* se faz lenta ou parcialmente, gerando acúmulo dos nutrientes e seus metabolitos que alteram o ambiente local, ocorrendo uma redução do crescimento do biofilme, que leva a um decréscimo da sensibilidade aos antibióticos e algumas bactérias adquirem resistência (Eick *et al.*, 2004). Este mesmo processo de redução da sensibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos, devido ao ambiente em que estão presentes, pode ser desencadeado com os extratos vegetais. Esta observação é importante, pois as cepas laboratoriais podem não expressar a mesma virulência ou resistência quando comparadas com as cepas isoladas da cavidade oral ou de outros locais (Duarte *et al.*, 2003). Por isso, estudos farmacológicos também devem ser feitos para se determinar a melhor concentração em que o extrato vegetal possa ser utilizado, após o isolamento do composto ativo.

Os resultados obtidos demonstraram que ambos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana, porém o extrato metanólico demonstrou um melhor potencial de ação do que o extrato diclorometânico, ou seja, as cepas de leveduras foram mais sensíveis aos extratos metanólicos da *M. piperita*, *S. cumini*, *T. avellanadae*, *R. officinalis* e *P. granatum*, observando-se atividade em baixas concentrações (Tabela 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente), variando a CIM entre 0,0019mg/mL a 0,0078mg/mL. Os extratos diclorometânicos, apesar da maior resistência, também apresentaram boa atividade, com os extratos da *A. chica* e da *P. granatum*, revelando melhores valores de atividade (Tabela 3 e 8, respectivamente), e sua CIM variando entre 0,0019mg/mL a 0,0625mg/mL, confirmando dados da literatura.

As cepas bacterianas demonstraram resistência a esses extratos brutos, o que nos leva a considerar que os compostos contidos nesses extratos possuem diferenças de ação quanto às suas atividades antibacteriana e antifúngicas, atribuindo-se essa disparidade,

provavelmente, à natureza e quantidade dos agentes antimicrobianos presentes nos extratos e modo de ação sobre os diferentes microrganismos testados (Barbour *et al.*, 2004). Pode-se considerar também, que a metodologia utilizada no preparo dos extratos para os testes com essas cepas bacterianas diverja da literatura, ainda assim, ela nos revela que esses extratos possuem atividade antibacteriana, até mesmo contra espécies Gram-negativas, as quais apresentam maior resistência contra os antibióticos devido à sua membrana externa, que apresenta barreiras à penetração desses agentes, e ao espaço periplasmático que contém enzimas capazes de quebrar moléculas estranhas (Duffy & Power, 2001).

Dos extratos metanólicos, os que demonstraram um melhor potencial de ação, em relação a todas as leveduras, foram a *P. granatum* ($\leq 0,0039\text{mg/mL}$) e *S. cumini* ($0,0019\text{mg/mL}$). Dos extratos diclorometânicos, a *P. granatum* ($0,0019\text{mg/mL}$), *S. cumini* e o *R. officinalis* tiveram melhor desempenho. De todas as leveduras, a *Candida utilis* e a *Candida glabrata*, foram as mais resistentes aos extratos, principalmente aos extraídos com diclorometano.

Durante a leitura dos resultados, que foi feito com 24 e 48h para as leveduras, algumas cepas cresciam com 24 horas e outras com somente 48 horas, sendo a leitura final considerada somente após as 48 horas. Foi observado que ocorria uma diferença na CIM entre esses dois períodos, mas não entre todas as leveduras. Os extratos diclorometânicos que apresentaram essa diferença foram a *A. chica*, *S. cumini*, *T. avellanadae*, *R. officinalis* e *M. piperita*, com apenas a *P. granatum* não apresentando mudança da CIM. Dos extratos metanólicos, apenas o *S. cumini* não apresentou diferença em todas as cepas, enquanto que a *P. granatum*, *R. officinalis*, *M. piperita* e *T. avellanadae*, demonstraram acréscimo dos valores da CIM de uma diluição para outra.

Apesar dos extratos terem demonstrado bons resultados com as cepas de leveduras, deve-se considerar que o mesmo não ocorreu com as cepas de bactérias, isto é, somente o extrato metanólico da *S. cumini* apresentou atividade contra a cepa de *S. mutans* (UA159) e, em concentração elevada (1mg/mL). Os outros extratos não apresentaram atividade, cujos dados concordam com a literatura vigente.

Os testes efetuados com a espécie *S. mutans* com o extrato da *T. avellanae*, onde nas maiores concentrações deste extrato, houve um escurecimento nos pocinhos (Figura 10), a solução apresentou uma coloração amarronzada e não inibiu seu crescimento. De acordo com Pereira *et al.* (2006), uma das substâncias bioativas da *T. avellanae* é a quinona (naftoquinona), e segundo Cowan (1999), este composto é responsável pela reação de escurecimento das frutas e legumes quando sofrem algum tipo de lesão, o que deve explicar, em parte, esse escurecimento durante o teste do *S. mutans* com o extrato da *T. avellanae*.

Embora os resultados encontrados neste estudo tenham demonstrado uma melhor atividade dos extratos metanólicos (agente polar), Phongpaichit *et al.* (2005), trabalhando com extratos de plantas da Tailândia (*Alpinia galanga*, *Boesenbergia pandurata*, *Piper betle* e *Zingiber zerumbet*), observaram que a maioria dos extratos teve melhor atividade antifúngica através da extração com o solvente clorofórmio (mais apolar), do que com o metanol, sendo que essas plantas testadas apresentaram atividade contra *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Microsporum gypseum*.

Trabalhos de Barbour *et al.* (2004), feitos com plantas do Líbano (*Achillea damascena*, *Anthemis scariosa*, *Cirsium* sp., *Centaurea ainetensis*, *Hieracium* sp., *Origanum libanoticum*, *Ranunculus myosuroudes*, *Nepeta curviflora* e *Verbascum leptostychnum*) em cepas de fungos e bactérias, entre elas, *C. albicans* e *S. aureus*, com extrato aquoso e metanólico, demonstraram uma inibição mais eficiente com extrato metanólico, onde houve inibição de $\geq 88,8\%$ dos microrganismos testados, inclusive *C. albicans* e *S. aureus*. Boer *et al.* (2005), obtiveram, através dos extratos metanólicos de plantas da Tanzânia (*Cinerária grandiflora*, *Clutia abyssinica*, *Coccinia adoensis*, *Marattia fraxinea*, *Pavonia urens* e *Vangueria infausta*), atividade também contra *S. aureus* e *Aspergillus fumigatus*, mas não contra *C. albicans*, o qual foi o único organismo praticamente insensível a estes extratos avaliados.

Ooshima *et al.* (2000), trabalhando com isolados de compostos polifenólicos obtidos da casca das sementes do cacau, demonstraram atividade anticárie junto com a inibição do crescimento de *S. mutans* ou a inibição de GTFs. Esses autores observaram que

a casca das sementes de cacau apresentou atividade contra *S. mutans* e *S. sobrinus* (reduziu a produção de ácido). Se observou também, um efeito cariostático em ratos, com a inibição da síntese de glucanos pelas GTFs e inibição do crescimento dessas cepas, com concentrações de 1mg/mL, 2mg/mL e maior inibição a 5mg/mL. Entre os compostos polifenólicos, estão presentes flavonóides, quinonas, taninos, cumarinas (Cowan, 1999). Na presente pesquisa, houve inibição da cepa de *S. mutans* pelo extrato metanólico da *Syzygium cumini*, o qual, de acordo com Slowing *et al.* (1994) e Djipa *et al.* (2000), apresenta compostos polifenólicos (taninos e flavonóides), esses dados sugerem trabalhar com este extrato *in vivo* para testar seu potencial de inibição da síntese dos glucanos produzidos pelas enzimas GTFs.

Trabalhos de Matsumoto *et al.* (2004), com a casca das sementes do cacau (usado como enxaguatório bucal), através da extração com etanol a uma concentração de 1mg/mL *in vitro* e *in vivo*, permitiram a extração de 12,6% de compostos polifenólicos, os quais observaram a inibição do depósito da placa e redução do número de *S. mutans* presentes na saliva. Estes resultados tornam-se importantes por causa da atividade anti-GTF dos compostos encontrados na casca das sementes de cacau. Concluem, estes autores, que os constituintes biologicamente ativos desses extratos são capazes de reduzir o acúmulo da placa em humanos quando usados como enxaguatório bucal. Hayacibara *et al.* (2005), observaram que a inibição das GTF B e C têm muitas implicações, pois são importantes para a aderência bacteriana e seu acúmulo na superfície do dente, já que os glucanos insolúveis sintetizados por essas enzimas ficam retidos como uma película e promove o ligamento do *S. mutans* e outras bactérias cariogênicas, contribuindo para a formação do biofilme. Além disso, as GTF B e C constituem fatores de virulência associados com a patogenicidade da cárie dental.

Num estudo de Nascimento *et al.* (2000), com diversas plantas, entre elas *R. officinalis*, *S. cumini* e *P. granatum*, onde testou seus extratos etanólicos através do método da difusão em disco em amostras de *E. coli* e *P. aeruginosa* – que são microrganismos multi-resistentes a drogas –, a espécie *E. coli* demonstrou resistência a esses extratos testados, e a segunda espécie teve seu crescimento inibido pelos extratos de *S. cumini* e *P.*

granatum, entre outros. Estes resultados são importantes, já que a *P. aeruginosa* foi isolada de um ambiente hospitalar e seu controle tem sido difícil pelas principais terapias usualmente utilizadas. Tais dados justificam mais estudos sobre o modo de ação destes compostos nessas células bacterianas, para se determinar o modo de ação e isolamento dos compostos ativos dessas plantas.

De acordo com Ellepola & Samaranayake, (2001), a clorexidina vem sendo usada como suprimento do tratamento terapêutico devido à sua ação antimicrobiana contra um largo espectro de organismos, incluindo a levedura *Candida*, pois sua característica estrutural lhe confere uma efetiva atividade antimicrobiana em baixas concentrações, condição esta que prolonga seu efeito terapêutico no ambiente oral; competência para reduzir a formação da placa e desfazer a placa pré-formada. Em estudos com plantas da Nova Zelândia (*Leptospermum morrisonii*, *L. scoparium*, arnica, eucalipto e outras) em combinação com clorexidina, Filoche *et al.* (2005), também demonstraram a inibição do crescimento de duas importantes bactérias cariogênicas, *S. mutans* e *Lactobacillus plantarum*, inibindo a formação do biofilme durante o crescimento planctônico. A combinação da clorexidina com óleos essenciais dessas plantas avaliadas, resultou na mesma inibição do crescimento dessas bactérias comparado quando a clorexidina é utilizada sem nenhum outro agente, tendo sua concentração reduzida.

Essas diferenças de resultados apresentadas no estudo em questão e os dados da literatura, podem decorrer em função do método utilizado para a obtenção dos extratos ou da aplicação dos mesmos nas amostras, já que parte dos resultados obtidos nessa linha de investigação se dá através do método da difusão em discos. Fatores como período sazonal e o local da coleta das amostras vegetais podem também influenciar.

A despeito do potencial antimicrobiano de plantas através do uso de seus extratos brutos, essas pesquisas – por apresentarem um caráter multidisciplinar – necessitam, para serem assumidas com segurança, da conjunção de dados provenientes de outras áreas, como: químicas, botânicas, farmacológicas, etc. Somente com a soma desses conhecimentos será possível considerar o real potencial de extratos vegetais como agentes antimicrobianos.

Os dados obtidos nesta pesquisa demonstraram um efetivo potencial antimicrobiano dos extratos vegetais. O isolamento dos compostos bioativos, sua ação antimicrobiana, o conhecimento de seu mecanismo de ação e dados futuros sobre a regulação dos genes de resistência desses microrganismos com relação a esses extratos, poderão ampliar consideravelmente as informações sobre o real potencial microbicida dos extratos vegetais.

7. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

1. Os extratos metanólicos tem melhor potencial de ação antimicrobiana em relação aos extratos diclorometânicos sobre as amostras de leveduras testadas.
2. Os extratos brutos das plantas testadas contra os microrganismos possuem ação fungicida e fungistática.
3. As amostras bacterianas são resistentes aos efeitos da ação de componentes obtidos de extratos brutos de plantas.
4. Os compostos ativos dos extratos que apresentaram atividade sobre as cepas de *Candida* spp. tem características polar.

REFERÊNCIAS*

- Abad MJ, Bermejo P, Villar A. Antiviral activity of medicinal plant extracts. *Phytotherapy Research*. 1997; 11: 198-202.
- Aeschbach R, Aeschbacher HV, Phillipossian G. Process for obtaining carnosic acid and its utilization for its anticarcinogenic and antiviral property. Eur Patent 1990; 90119218.7
- Ahmad I, Mehmood Z, Mohammad F. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobials properties. *J Ethnopharmacol*. 1998; 62: 183-193
- Akdogan M, Ozguner M, Kocak A, Meral O, Cicek E. Effects of peppermint teas on plasma testosterone, follicle-stimulating hormone, and luteinizing hormone levels and testicular tissue in rats. *J Urology* 2004; 64 (2): 394-398.
- Aly R, Maibach HI, Rahman R, Shinefield HR, Mandel AD. Correlation of human *in vivo* and *in vitro* cutaneous antimicrobial factors. *J Infect Dis*. 1975; 131 (5): 579-583.
- Anyl S, Samaranayake LP. Impact of lysozyme and lactoferrin on oral *Candida* isolates exposed to polyene antimycotics and fluconazole. *Oral Dis*. 2002; 8: 199-206.
- Arendorf TM, Walker DM. Oral candidosis populations in health and disease. *Br Dent J*. 1979; 47: 267-272
- Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch Oral Biol*. 1980; 25: 1-10.
- Aruoma OI, Spencer JP, Rossi R, Aeschbach R, Khan A, Mahmood N *et al*. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and Provencial herbs. *Food Chem Toxicol*. 1996; 34: 449-456.
- Barbour CK, Sharif M, Sagherian VK, Habre AN, Talhouk RS, Talhouk SN. Sreening of selected indigenous of Lebanon for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 93: 1-7.
- Barchiesi F, Colombo AL, McGough DA, Fothergill AW, Rinaldi MG. *In vitro* activity of itraconazole against fluconazole-susceptible and –resistant *Candida albicans* isolates from oral

* De acordo com as Normas da UNICAMP/FOP, baseadas no referencial do *International Committe of Medical Journal Editors* – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o *Medline*.

cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994 (a); 38(7): 1530-1533.

Barchiesi F, Colombo AL, McGough DA, Fothergill AW, Rinaldi MG. *In vitro* activity of a new antifungal triazole, D0870, against *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994 (b); 38(11): 2553-2556.

Bartie KL, Williams DW, Wilson MJ, Potts AJC, Lewis MAO. Differential invasion of *Candida albicans* isolates in an *in vitro* model of oral candidosis. *Oral Microbiol Immun*. 2004; 19: 293-296

Baruah P, Sharma RK, Singh RS, Ghosh AC. Fungicidal activity of some naturally occurring essential oils against *Fusarium moniliforme*. *J Essent Oil Rev*. 1996; 8: 411-413.

Baser KHC. Essential oils of *Anatolian labiatae*: a profile. *Acta Horticult*. 1993; 333: 217-238.

Belazi M, Velegraki A, Koussidou-Eremondi T, Andreadis D, Hini S, Arsenis G, *et al*. Oral *Candida* isolates in patients undergoing radiotherapy for head and neck cancer: prevalence, azole susceptibility profiles and response to antifungal treatment. *Oral Microbiol Immun*. 2004; 19: 347-351.

Boer HJ, Kool A, Broberg A, Mziray WR, Hedberg I, Levemfors JJ. Anti-fungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. *J Eth Pharm*. 2005; 96: 461-469.

Boorhem R L. Reader's Digest – Segredos e virtudes das plantas medicinais. Reader's Digest Brasil Ltda, Rio de Janeiro, 416p. 1999.

Braga LC, Shupp JW, Cummings C, Jett M, Takahashi JA, Carmo LS *et al*. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *J Ethnopharmacol*. 2005; 96: 335-339.

Cartledge JD, Midgley J, Gazzard BG. Non-*albicans* oral candidosis in HIV-positive patients. *J Antimicrobiol Chemotherapy*. 1999; 43: 419-422.

Catão, RMR, Antunes RMP, Arruda TA, Pereira MS, Higino JS, Alves JA *et al*. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico de *Punica granatum linn* (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. *RBAC*. 2006; 38(2): 111-114.

Chandrasekaran M, Venkatesalu V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolonum* seeds. *J Ethopharmacol* 2004; 91: 105-108.

- Chen HY, Cox SW, Eley BM *et al.* Matrix metallo-proteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adults periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 366-369.
- Chen L, Cheng X, Shi W, Lu Q, Go VL, Heber D *et al.* Inhibition of growth of *Streptococcus mutans*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, and vancomycin-resistant Enterococci by kurarinone, a bioactive flavonoid isolated from *Sophora flavescens*. *J Clin Microbiol.* 2005; 7: 3574-3575.
- Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science.* 1992; 257: 1050-1055.
- Colombo AL, Barchiesi F, McGough DA, Rinaldi MG. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 535-540.
- Coleman DC. *et al.* Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *AIDS.* 1997;11: 557-567.
- Cowan M M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12: 564-582.
- Cuvelier ME, Bondety V, Berset C. Behavior Of Phenolic Antioxidants In A Partioned Medium: Structure – activity relationship. *J Am Oil Chem Soc.* 2000; 7: 819-823.
- D’Albuquerque IL. Termorreação da 2-hidroxi 3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona. *Rev Inst Antibiot.* 1968; .8: 73-88.
- De Benardi M, Uberti E, Vidari G. High-performance liquid-chromatography of flavonoid glycosides from *Dryas octopetala*. *J Chromatogr.* 1984; 284: 269.
- Djipa CD, Delmée M, Quetin-Leclercq J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *J Eth Pharmacol.* 2000; 71: 307-313.
- Dorman H JD, Deans SG. Antimicrobial agents from Plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 2000; 88:.308-316.
- Dronda F, Chaves F, Alonso-Sanz M, Laguna F, Martinez-Suarez JV, Rodrigues-Tudela JL, *et al.* Clinical significance of mixed oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans* and non-*albicans* strains in HIV-infected patients. In *Program and Abstracts of the Thirty-Fourth Interscience*

Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Orlando, FL. Abstract 1215, p. 212. American Society for Microbiology, Washinton, DC, 1994.

Duarte S, Koo H, Bowen WH, Hayacibara MF, Cury JA, Ikegaki M *et al.* Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biol Pharm Bull.* 2003; 26: 527-531.

Duarte S, Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Schaich K, Bowen WH *et al.* Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. *FEMS Microbiol.* 2006; 257: 50-56.

Duffy CF, Power RF. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plants extracts. *Int J of Antimicrob.* 2001; 17: 527-529.

Dulger B, Gonuz A. Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional Medicine. *Asian J Plant Sci.* 2004; 3(1): 104-107.

Duraipandiyar V, Ayyanar M, Ignacimuthu. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC Complement Alternat Med.* 2006; 6(35): 1-7

Eick S, Seltsmann T, Pfister W. Efficacy of antibiotics to strains of periodontopathogenic bacteria within a single species biofilms – an *in vitro* study. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 376-383.

Ellepolu ANB, Samarayake LP. Oral candidal infections and antimycotics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11(2): 172-198.

Ellepolu ANB, Samaranayake, LP. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Diseases.* 2001; 7: 11-17.

Eloff JN. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *J Ethnopharmacol.* 1988; 60: 1-8.

Erdelmeier CAJ, Köning GM. New planar techniques in natural product analysis. *Phytochemical Analysis.* 1991; 2,3.

Filho SK, Soma K, Sissons CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. 2005; 20: 221-225.

Frankel EN, Huang, S, Aeschbach R, Prior, E. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *J Agric Food Chem.* 1996; 44: 131-135.

- Fridkin, S.K. *et al.* Determinants of vancomycin use in adult intensive care units in 41 United States hospitals. *Clin. Infect. Dis.* 1999; 28: 1119-25.
- Gershon H. Fungitoxity of 1,4-naphthoquinones to *Candida albicans*. *Can J Microbiol.* 1975; 21: 1317-1321.
- Gjermo P. Chlorhexidine and related compounds. *J Dent Res.* 1989; 68: 1602-1608.
- Gracious Ross R, Selvasubramanian S, Jayasunder S. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits - a preliminary study. *J Ethnopharmacol.* 2001; 78: 85-87.
- Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C. Physicians Desk References (PDR) for herbal medicines. Med Econ. Co, New Jersey, 2000; 858 pp.
- Guenther E. essential oils of the plant family Labiatae: oil of rosemary. In: The essential Oils ed. 695-709. Florida: Kreiger Publishing Company, 1974.
- Haas LF. *Mentha piperita* (peppermint). *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1995; 59(6): 607.
- Hamada S, Slade HD. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* 1980; 44: 331-384.
- Hämälä P, Vuorela H, Hiltunen R, Nyiredy Sz, Sticher O, Törnquist K *et al.* Strategy for the isolation and identification of coumarins with calcium antagonistic properties from the roots of *Angelica archangelica*. *Phytochemicals Analysis.* 1992; 3, 42.
- Hammer KA, Carson JF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts *J Appl Microbiol.* 1999; 86: 985-990.
- Hardy KJ, Hawkey PM, Gao F, Oppenheim BA. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. *British Journal of Anaesthesia.* 2004; 92 (1): 121-130.
- Hayacibara MF, Koo H, Rosalen PL, Duarte S, Franco EM, Bowen WH *et al.* *In vitro* and *in vivo* effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *J Eth Pharm.* 2005; 101: 110-115.
- Inoue T, Sugimoto Y, Masuda H, Kamei C. Effect of peppermint (*Menthapiperita* L.) extracts on experimental allergic rhinitis in rats. *Biol Pharm Bull.* 2001; 24: 92-95.
- Iscan G, Kirimer N, Kürkcüoğlu M, Baser KHC, Demirci F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 3943-3946.

- Jackson MS, Bagg J, Gupta MN, Sturrock RD. Oral carriage of staphylococci in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 1999; 38: 572-575.
- Janssen AM, Scheffer JJ, Baerheim SA. Antimicrobial activity of essential oils – a literature review (1976-1986) aspects of the Test Methods. *Planta Med*. 1987; 53, p.395-398.
- Järvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms *in vivo*. *Oral Dis*. 2004; 10: 106-112.
- Johnson EM, Warnock DW, Luker J, Porter SR, Scully C. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J Antimicrobiol Chemother*. 1995; 35: 103-114.
- Johnson DM, Jones RN, Erwin ME. Quality control study group: anti-streptococcal activity of SB-265805 (LB20304), a novel fluoronaphthyridone, compared with five other compounds, including quality control guidelines. *Diagnostic Microbiology & Infections Diseases*. 1999; 33, 87-91.
- Kalant H, Roschlau WH. E. *Princípios de farmacologia médica*. 5ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
- Kantarciolu AS, Yücel A. The presence of fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strains among *Candida albicans* isolates from immunocompromised or otherwise debilitated HIV-negative Turkish patients. *Rev Iberoam Micol*. 2002; 19: 44-48.
- Kerawala M, Ambler JE, Lee PYC, Drabu YJ. In vitro activity of gemifloxacin (SB- 265805) compared to eleven other antimicrobial agents against streptococcal isolates, excluding *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Microbiol Infect Dis*. 2001; 20: 271-275.
- Kim KJ, You YO, Kim ES. δ -Hemolysin like gene of *Staphylococcus lugdenensis* in acute oral infection have partial homology with δ -hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*. *J Oral Biol*. 1995; 19: 61-65.
- Kim KJ, Yun HH, Jeong SI, Cha JD, Kim SM, You YO. Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol*. 2004; 91: 81-87.
- Kirtikar KR, Basu BD. In: Singh, M. P. (Eds), *Indian medicinal plants*, vol II, 2nd ed. Dehra Dun, p 1053, 1991.

- Kloss W. Taxonomy and sistematics of staphylococci indigennous to human. In: Crossley KB, Archer GL, eds. *Teh staphylococci in human disease*. Churchill Livingston: New York, p 113-137, 1997.
- Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol*. 2000; 54, 413-437.
- Kroes I, Lepp PW, Relman DA. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *PNAS*. 1999; 25: 14547-14552.
- Lagrota MH, Wigg MD, Aguiar AN. Antiviral activity of naphthoquinones. I Lapachol derivatives against enteroviruses. *Rev Latinoam Microbiol*. 1986; 28:221-226.
- Lamaison JL, Petitjean-Freytet C, Carnat A. Medicinal Lamiaceae with antioxidant properties, a potential source of rosmarinic acid. *Pharm Acta Helv*. 1991; 66: 185-188.
- Larsen RA. AIDS commentary: azoles and AIDS. *J Infect. Dis*. 1990; 162: 727-730.
- Larson EL, McGinley KJ, Foglia AR, Talbot GH, Leyden JJ. Composition and antimicrobial resistance of skin flora in hospitalized and healthy adults. *J Clin Microbiol*. 1986; 23: 604-608.
- Legg JA, Wilson M. The prevalence of beta-lactamase producing bacteria in subgingival plaque and their sensitivity to Augmentin. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1990; 28: 180-184.
- Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986; 50: 353-380.
- Loguercio AP, Battistin A, Vargas AC, Henzel A, Witt NM. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* L. Skells). *Ciência Rural*. 2005; 35(2): 371-376
- Longtin R. The promegante: nature's power fruit? *J Nation Cancer Institute* 2003; 95: 346-348.
- Lorenzi H. Árvores brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Ed. Plantarum, Nova Odessa, 360 pp, 1992.
- Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002. 512p
- Machado TB, Pinto AV, Pinto MCFR, Leal ICR, Silva MG, Amaral ACF, *et al*. In vitro activity of brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, agaist methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Inter J of Antimicrobial Agents*. 2003; 21: 279-284.

- Mangena T, Muyima NY. O. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Letters in Applied Microbiology* 1999; 22: 291-296.
- Matos FJ de. Plantas Medicinais – Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 2ed. Fortaleza: Imprensa Universitária UFC, 2000, 344p.
- Matsumoto M, Tsuji M, Okuda J, Sasak H, Nakano K, Osawa K *et al.* Inhibitory effects of cação bean husk extract on plaque formation *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112: 249-252.
- Miyake Y, Iwai M, Sugai M, Miura K, Suginaka H, Nagasaka N. Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* from teeth and tongues of children. *J. Dent. Res.* 1991; 70: 1045-1047.
- Mors WB. *et al.* Medicinal Plants of Brazil. Reference Publications, Inc. Algonac, Michigan 2000.
- Murdoch FE, Sammons RL, Chaplle ILC. Isolation and characterization of subgingival staphylococci from periodontitis patients and controls. *Oral Dis.* 2004; 10: 155-162.
- Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bactéria. *Braz J Microbiol.* 2000; 31: 247-256.
- Napimoga, MH, Kamiya RU, Rosa RT, Rosa EAR, Höfling JF, Mattos-Graner RO, Gonçalves RB. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. *J Med Microbiol.* 2004; 53, 697-703.
- Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell envelope. *Microbiol Mol Rev.* 1999; 63: 174-229.
- Navarro V, Villarreal M, Rojas G, Lozoya X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *J Ethnopharmacol.* 1996; 53 (3): 143-147.
- NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada – Segunda Edição. Norma M27-A2. 2002. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. (Atual CLSI).
- NCCLS. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbio; Norma Aprovada – Sexta Edição. Norma M7-A6. 2003. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. (Atual CLSI).

- Nishiyama Y, Nakaoka C, Hiratani T, Abe S, Uchida K, Yamaguchi H. Synergy of lysozyme and lanconazole on the morphology of *Candida albicans*. J Electron Microsc. 201; 50: 41-49.
- Nomura R, Nakano T, Ooshima T. Contribution of glucan-binding protein C of *Streptococcus mutans* to bacteremia occurrence. Arc. of Oral Biol. 2004; 49: 783-788.
- Nyiredy Sz. Sample preparation and isolation using planar chromatography methods. Analytical Chemistry Acta. 1990; 236, 83.
- O' Sullivan JM, Cannon RD, Sullivan PA, Jenkinson HF. Identification of salivary basic proline-rich proteins as receptors for *Candida albicans* adhesion. Microbiology. 1997; 143: 341-348.
- O' Sullivan JM, Jenkinson HF, Cannon RD. Adhesion of *Candida albicans* to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal cell surface. Microbiology. 2000; 146: 41-48.
- Odden K, Schenick K, Koppang HS, Hurlen B. Candidal infection of the gingiva in HIV-infected persons. J Oral Pathol. 1994; 23: 178-183.
- Odds FC. Candida and candidoses: a review and bibliography. 2nd edn. London: Basilière Tindall, 1988.
- Ooshima T, Osaka Y, Sasaki H, Osawa K, Yasuda H, Matsumura W. *et al.* Caries anhibitory activity of cacao bean husk extract in *in-vitro* and animals experiments. Arch Oral Biol. 2000; 45: 639-645.
- Page C, Curtis M, Sutter M, Walker M, Hoffman B. Farmacologia integrada. 2^a ed. Barueri: Manole, 2004.
- Pauletti PM, Castro-Gamboa I, Silva DHS, Young MCM, Tomazela DM, Eberlin MN *et al.* New antioxidant C-glucosylxanthenes from the stems of *Arrabidaea samydoides*. J Nat Prod. 2003; 66: 1384-1387.
- Percival RS, Challacombe SJ, Marsh PD. Age-related microbiological changes in the salivary and plaque microlora of healthy adults. J Med Microbiol. 1991; 35: 5-11.
- Pereira EM, Machado TB, Leal ICR, Jesus DM, Damaso CRA, Pinto AV *et al.* *Tabebuia avellaneda* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. Annals Clin Microbiol Antimicrobial. 2006; 5(5): 1-7.

- Pfaller MA, Messer AS, Gee S. *et al.* *In vitro* susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 840-872.
- Phongpaichit S, Subhadhirasakul S, Wattanapiromsakul C. Antifungal activities of extracts from Thai medicinal plants against opportunistic fungal pathogens associated with AIDS patients. *Mycoses.* 2005; 48: 333-338.
- Pinto CN, Dantas AP, De Moura KC, Emery FS, Polequevitch PF, Pinto MC, *et al.* Chemical reactivity studies with naphthoquinones from *Tabebuia* with anti-trypanosomal efficacy. *Arzneim-Forsch/ Drug Res.* 2000; 50:1120-1128.
- Portillo A, Vila R, Freixa B, Adzet T, Cañigüeral S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 2001; 76: 93-98.
- Powderly WG, Gallant JE, Ghannoum MA. *et al.* Oropharyngeal candidiasis in patients with HIV: suggested guidelines for therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1999; 15: 1619-1623.
- Prashanth D, Asha MK, Amit A. Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia.* 2001; 72: 171-173.
- Provine H, Hadley S. Preliminary evaluation of a semisolid agar antifungal susceptibility test for yeasts and molds. *J Clin Microbiol.* 2000; 2: 537-541
- Redding S, Smith G, Farinacci M, Rinaldi A, Fothergill J, Rhine C *et al.* Resistance of *Candida albicans* to fluconazole during treatment of oropharyngeal candidiasis in a patient with AIDS: documentation by *in vitro* susceptibility testing and DNA subtype analysis. *Clin infect Dis.* 1994; 18: 240-242.
- Richardson MD. Fungal infections. In: McGee JOD, Isaacson PG, Wright NA, eds. *Oxford textbook of pathology*, Vol. 1. Oxford University Press: Oxford, pp. 487-491, 1992.
- Riffel A, Medina LF, Stefani V, Santos RC, Bizani D, Brandelli A. *In vitro* antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones. *Br J Med Biol Res.* 2002; 35(7): 811-818.
- Robineau LG. Hacia una farmacopea caribeña / TRAMIL7, Enda-caribe UAG & Universidad de Antioquia, Santo Domingo, 1995.
- Ruhnke M, Eigler A, Tennagen I, Geiseler B, Engelmann E, Trautmann M. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal

candidosis and human immunodeficiency virus infection. J of Clin Microbiol. 1994; 32(9): 2092-2098.

Ruhnke M, Schmidt-Westhausen A, Trautmann M. *In vitro* activities of voriconazole (UK-109,496) against fluconazole- susceptible and resistant *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients with human immunodeficiency virus infection. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1997; 3: 575-577.

Ruhnke M, Schmidt-Westhausen A, Morschhauser J. Development of resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. J. Antimicrobiol Chemother. 2000; 46: 291-295.

Ryan MP, Rea MC, Hill C, Ross RP. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. Applied and Environmental Microbiology. 1996; 62: 612-619.

Sader HS, Pignatari AC, Hollons RJ, Leme I, Jones RN. Oxacillin and quinolone resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil: a multicenter molecular and epidemiology study. Infect Control Hosp Epidemiol. 1993; 14: 260-234.

Santos PRV, Oliveira ACX, Tomassini TCB. Controle microbiológico de produtos fitoterapêuticos. Rev Farm Bioquim. 1995; 31: 35-38.

Sato Y, Okamoto K, Kagami A, Yamamoto Y, Ohta K, Igarashi T *et al.* Application of *in Vitro* mutagenesis to identify the gene responsible for cold agglutination phenotype of *Streptococcus mutans*. Microbiol Immunol. 2004; 48: 449-456

Scully C, El-Kabir M, Samaranyake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. Crit Rev Oral Biol Med. 1994; 5: 125-157.

Schubert SY, Neeman N. A novel mechanism for the inhibition of NF-kappaB activation in vascular endothelial cells by natural antioxidants. FASEB Journal 2002; 16: 1931-1933.

Schuerch AR. β -lapachone, an inhibitor of oncornavirus reverse transcriptase and eukaryotic DNA polymerase- α . Inhibitory effect thiol dependency and specificity. Eur J Biochem 1978; 84: 197-205.

Shafi PM, Rosamma MK, Jamil K, Reddy PS. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oils. Fitoterapia. 2002; 73: 414-416.

- Shen S. *et al.* In vitro growth, acidogenicity and cariogenicity of predominant human root caries flora. J of Dental. 2004; 32: 662-673.
- Silva P. Farmacologia. 6ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeast, enteric rods and pseudomonads in the subgingivalis flora of severe adult periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 1988; 3: 47-52.
- Slots J. Update of general health risk of periodontal disease. Int Dent J. 2003; 53 (Suppl. 3): 200-207.
- Slowing K, Sollhuber M, Carretero E, Villar A. Flavonoid glycosides from *Eugenia jambos*. Phytochemistry. 1994; 37(1): 255-258.
- Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of *Staphylococcus* species in oral cavity. J Med Microbiol. 2001; 50: 940-946.
- Smith A, Macfarlane WT. Fungi and other opportunistic pathogens in plaque. In: Newman H. N.; Wilson, M. eds Dental plaque revisited bioline. 1999; Cardiff: UK, pp. 387-417.
- Sousa MP. *et al.* Constituintes químicos de plantas medicinais brasileiras. Impr. Universitária/UFC, Fortaleza, 416 pp, 1991.
- Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology. 1995; 141: 1507-1521.
- Taylor L. Herbal secrets of the Rainforest, Prima Health Inc Roaklin, 313pp, 1998.
- Teng LJ, Hsueh PR, Chen YC, Ho SW, Luh KT. Antimicrobial susceptibility of viridans group streptococci in Taiwan with an emphasis on the high rates of resistance to penicillin and macrolides in *Streptococcus oralis*. J Antimicrobial Chemoth. 1998; 41: 621-627.
- Tsuda H, Yamashita Y, Shibata Y, Nakano Y, Koga T. Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002; Dec. 3756-3764.
- Vaahtoniemi LH. Surface ultrastructure of intact and *in situ* chlorhexidine-treated human buccal cells. A method for scanning electron microscopy. Acta Odontol Scand. 1997; 55: 277-281.
- Vanden-Bossche H, Marichal P, Odds FC. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. Trends Microbiol. 1994; 2: 393-400.

- Vaughn SF, Spencer GF. Antifungal activity of natural compounds against thiabendazole-resistant *Fusarium sambucinum* strains. J Agric Food Chem. 1994; 42: 200-203.
- Vieira LS, Albuquerque JM. Fitoterapia Tropical – Manual de Plantas Medicinais. FCAP Serviço e Documentação e Informação. Belém, 1998.
- Voravuthikunchai S, Lortheeranuwat A, Jeeju W, Sririrak T, Phongpaichit S, Supawita T. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J Eth Pharm. 2004; 94: 49-54.
- Wagner H, Kreher B, Lotter H, Hambuerger MO, Cordell GA. Structure determination of new isomeric naphtha [2,3-b] furan-4,9-diones from *Tabebuia avellanedae* by the selective-INEPT technique. Helv Chim Acta. 1989; 72: 659-67.
- Walker CB, Tyler KT, Low SB. Penicillin-degrading enzymes in sites associated with periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 1987; 2: 129-131.
- Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. Annu Rev Microbiol. 1996; 50: 513-552.
- Wilson MJ, Weightman AJ, Wade WG. Applications of molecular ecology in the characterization of uncultured microorganisms associated with human disease. Rev Med Microbiol. 1997; 8: 91-101.
- Zorn B, Garcia-Piñeres AJ, Castro V, Murillo R, Mora G, Merfort I. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. Phytochemistry. 2001; 56: 831-835.

ANEXO 1

Meios de cultura

1. SDA - Sabouraud Dextrose Agar

Diferido enzimático de caseína	10g
Dextrose	40g
Ágar	15g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Dissolver as substâncias na água destilada. Aquecer em microondas para homogeneizar, sem deixar ferver. Autoclavar por 15 minutos a 121°C.

2. BHI - Brain Heart Infusion

Substrato nutricional (extrato de cérebro, coração e peptona)	27,5g
D(+)-glucose	2,0g
Cloreto de Sódio	5,0g
Hidrogênio fosfato di-sódico	2,5g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Dissolver as substâncias na água destilada. Aquecer em microondas para homogeneizar, sem deixar ferver. Autoclavar por 15 minutos a 121°C.

3. RPMI-1640, com L-Glutamina, sem Bicarbonato de Cálcio

NaCl	6,0g
D-Glucose	2,0g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	1,5g
KCl	0,4g
L-Glutamina	0,3g
L-Arginina	0,2g
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0,1g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1g
L-Asparagina	0,05g
L-Cisteína	0,05g
L-Isoleucina	0,05g
L-Leucina	0,05g
L-Lisina·HCl	0,04g
i-inositol	0,035g
L-Serina	0,03g
L-Ácido aspartico	0,02g
L-Ácido glutâmico	0,02g
L-Hidroxiprolina	0,02g
L-Prolina	0,02g
L-Teorina	0,02g

L-Tyrosina	0,02g
L-Valina	0,02g
L-Histidina	0,015g
L-Metionina	0,015g
L-Fenilalanina	0,015g
Glicina	0,01g
L-Triptofan	5,0mg
Phenol Red	5,0mg
Glutathione	1,0mg
Ácido p-Aminobenzóico	1,0mg
Ácido Fólico	1,0mg
Nicotinamida	1,0mg
Piridoxina	1,0mg
Tiamina HCl ₂	1,0mg
Pantotenato D-Cálcio	0,25mg
Biotina	0,20mg
Riboflavina	0,20mg
Vitamina B ₁₂	5,0µg
Glicose anidra	20g
Água destilada estéril	q.s.p. 1000mL

Dissolver a glicose anidra com a água, em seguida, misturar o meio RPMI-1640. Esterilizar por filtração a vácuo.

ANEXO 2

Preparo das soluções estoque para análise da CIM – diluição dos extratos.

Tabela 8

Preparação de soluções estoques para análises da CIM

Planta Medicinal	Extrato	Massa do extrato obtido (mg)	Razão Tween 20 ^o / H ₂ O (mL)	Concentração Solução estoque (mg/mL)
<i>M. piperira</i>	Diclorometano	240	48 (3 / 45)	5
<i>M. piperira</i>	Metanol	1120	224 (2 / 222)	5
<i>P. granatum</i>	Diclorometano	330	66 (2 / 63)	5
<i>P. granatum</i>	Metanol	480	96 (2 / 94)	5
<i>S. cumini</i>	Diclorometano	30	6 (1 / 5)	5
<i>S. cumini</i>	Metanol	430	86 (2 / 84)	5
<i>S. cumini</i>	Diclorometano	20	4 (1* / 3)	5
<i>R. officinalis</i>	Diclorometano	720	144 (3* / 2** / 139)	5
<i>R. officinalis</i>	Metanol	600	120 (2 / 118)	5
<i>A. chica</i>	Diclorometano	264	52,8 (3 / 50)	5
<i>A. chica</i>	Metanol	219	43,8 (3 / 40,8)	5
<i>T. avellanedae</i>	Diclorometano	170	34 (2 / 32)	5
<i>T. avellanedae</i>	Metanol	1000	200 (2 / 198)	5

* adicionado DMSO no lugar de Tween 20^o

** adicionado Tween 80^o

ANEXO 3

Diluição seqüencial dos extratos para testes da CIM – diluição 1 a 10.

Tabela 9

Diluição dos extratos para teste da CIM.

Concentração inicial (mg/mL)	Diluição (extrato mL + H ₂ O mL)	Concentração final (mg/mL)
5,000	3 + 0,750	4,000 (D1)
4,000	1,5 + 1,5	2,000 (D2)
2,000	1,5 + 1,5	1,000 (D3)
1,000	1,5 + 1,5	0,500 (D4)
0,500	1,5 + 1,5	0,250 (D5)
0,250	1,5 + 1,5	0,125 (D6)
0,125	1,5 + 1,5	0,0625 (D7)
0,0625	1,5 + 1,5	0,0312 (D8)
0,0312	1,5 + 1,5	0,0156 (D9)
0,0156	1,5 + 1,5	0,0078 (D10)

ANEXO 4

Resultados das corridas cromatográficas em camada delgada

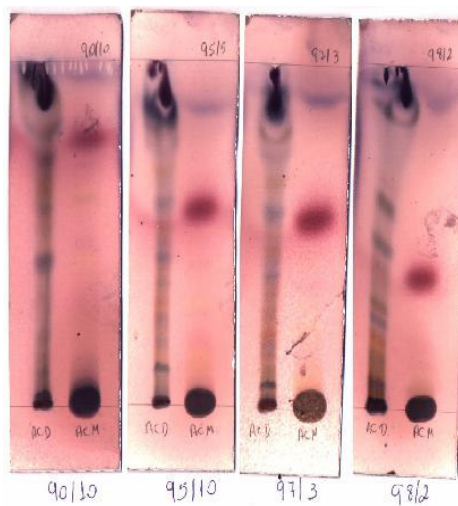


Figura 11: Perfil observado por cromatografia de camada delgada de amostra de *A. chica* extraída com diclorometano e metanol, com eluente butanol/ácido acético/água e revelado com reagente de anisaldeído.

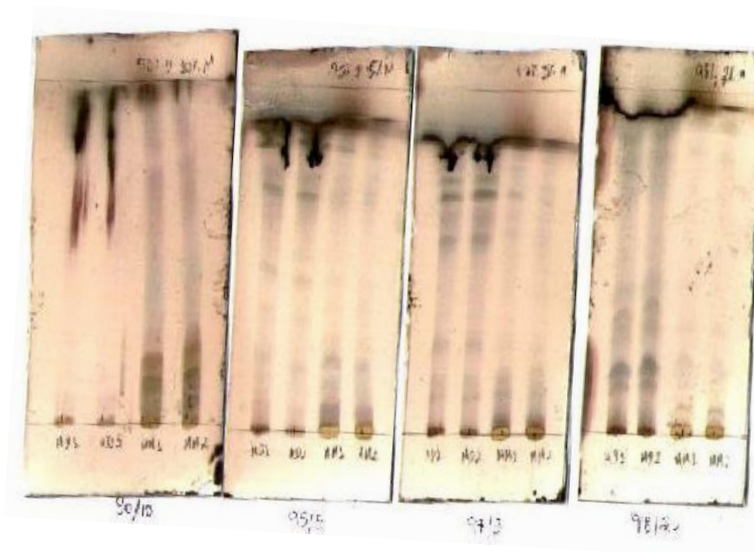


Figura 12: Perfil observado por cromatografia de camada delgada de amostra de *M. piperita* extraída com diclorometano e metanol, com eluente diclorometano e metanol e revelado com reagente de anisaldeído.

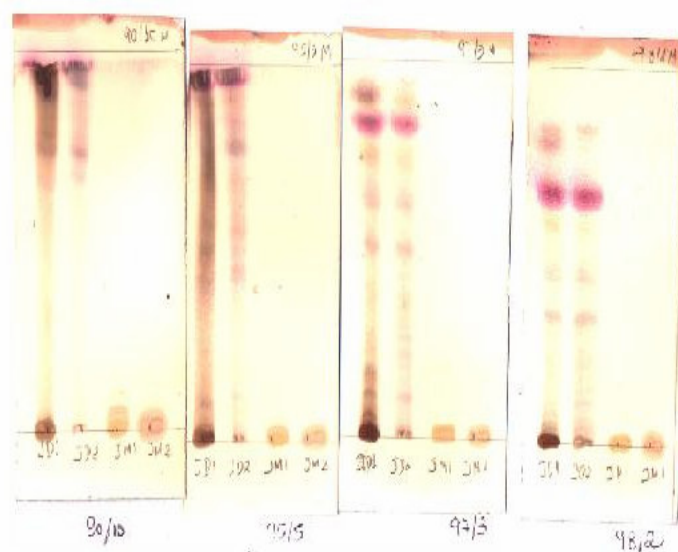


Figura 13: Perfil observado por cromatografia de camada delgada de amostra de *S. cumini* extraída com diclorometano e metanol, com eluente diclorometano e metanol e revelado com reagente de anisaldeído.

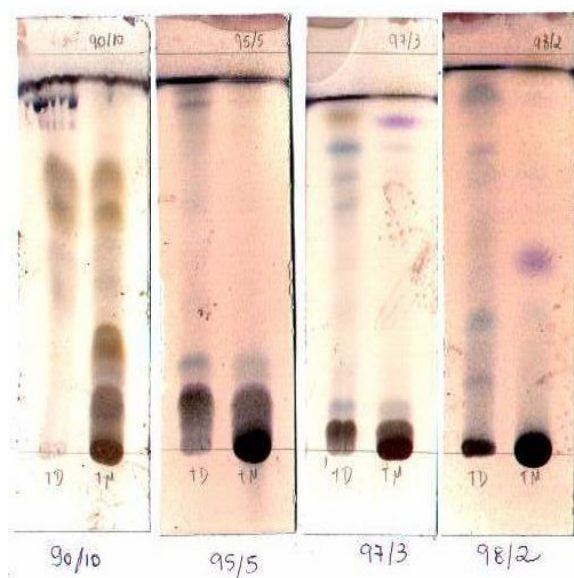


Figura 14: Perfil observado por cromatografia de camada delgada de amostra de *T. avellanadae* extraída com diclorometano e metanol, com eluente diclorometano e metanol e revelado com reagente de anisaldeído.

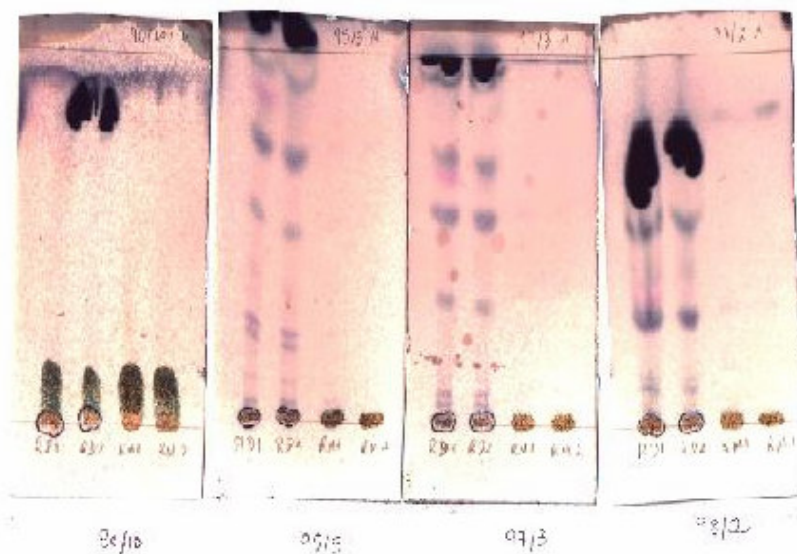


Figura 15: Perfil observado por cromatografia de camada delgada de amostra de *P. granatum* extraída com diclorometano e metanol, com eluente diclorometano e metanol e revelado com reagente de anisaldeído.