



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA – NÍVEL:
MESTRADO**

THÁISE PEREIRA DANTAS SAMPAIO

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS VEGETAIS E
FRAÇÕES QUÍMICAS DE *Sideroxylon obtusifolium* T.D. PENN
SOBRE MICRORGANISMOS BUCAIS**

CAMPINA GRANDE – PB

2014

THAÍSE PEREIRA DANTAS SAMPAIO

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS VEGETAIS E FRAÇÕES
QUÍMICAS DE *Sideroxylon obtusifolium* T.D. PENN SOBRE MICRORGANISMOS
BUCAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Jozinete Vieira Pereira.

Coorientador: Prof. Dr. Harley da Silva Alves

CAMPINA GRANDE - PB

2014

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

S192p Sampaio, Thaíse Pereira Dantas.
Potencial antimicrobiano de extratos vegetais e frações químicas de *Sideroxylon Obtusifolium* T.D. Penn sobre microrganismos bucais [manuscrito] / Thaíse Pereira Dantas Sampaio. – 2014.
56 f. : il. color.

Digitado
Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2014.

“Orientação: Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira, Departamento de Odontologia”.
“Co-Orientação: Prof. Dr. Harley da Silva Alves, Departamento de Farmácia”.

1. Fitoterapia. 2. Placa dentária. 3. Atividade antimicrobiana.
4. *Candida albicans*. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

THAISE PEREIRA DANTAS SAMPAIO

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS VEGETAIS E FRAÇÕES
QUÍMICAS DE *Sideroxylon obtusifolium* T.D. PENN SOBRE MICRORGANISMOS
BUCAIS

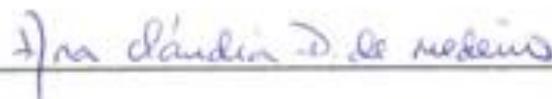
DATA DA DEFESA: 28 / 05 / 2014

BANCA EXAMINADORA



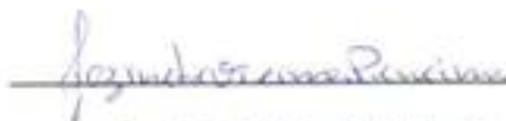
Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro /UFPB

Membro Titular (Examinador externo)



Profª. Drª. Ana Cláudia Dantas de Medeiros/UEPB

Membro Titular (Examinador interno)



Profª. Drª. Jozinete Vieira Pereira / UEPB

Membro Titular (Orientadora)

Dedico este trabalho

A Deus,

Por me conduzir em todos os momentos... “quando eu pensei que estava sozinha, as pegadas na areia eram as Dele”.

A minha mãe,

Tão presente em minha vida quanto minha própria alma. Todos os caminhos que escolho seguir, ela me acompanha com amor e não se cansa!

Ao meu esposo,

Esta vitória é da nossa família ... e você sempre acreditou que eu seria capaz. Todos os dias.

A minha filha,

Por existir, por ser minha melhor conquista, por deixar meus dias mais lindos!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, Senhor de todas as coisas e de tudo que existe. Tudo foi possível pela Tua infinita bondade e misericórdia.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia** - Mestrado em Clínica Odontológica da Universidade Estadual da Paraíba pela oportunidade de realizar esta pós-graduação.

Ao Programa **CASADINHO/PROCAD**, parceria com a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pelo apoio técnico e financeiro.

À **Prof^a. Dr^a. Jozinete Vieira Pereira**, minha orientadora, pela confiança, tranquilidade na condução deste trabalho e pela humanidade e delicadeza com que sempre me tratou.

Ao **Prof. Dr. Harley S. Alves**, pela gentileza e disponibilidade em auxiliar-me nos experimentos finais e decisivos à conclusão deste estudo.

À **Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Dantas de Medeiros** e sua equipe de alunos pesquisadores, por inúmeros questionamentos respondidos, por tantas dúvidas compartilhadas e pelo aprendizado que tive com cada um.

À **Banca examinadora** pela disponibilidade em analisar este trabalho.

Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia** - Mestrado em Clínica Odontológica, por todos os ensinamentos compartilhados.

À minha mãe **Maria das Dores**, por nunca medir esforços para auxiliar-me em minhas conquistas; sinto seu amor por mim em tudo o que faz.

Ao meu pai, **José Dantas** (*in memoriam*), porque esteve comigo da maneira que lhe foi possível e construiu bases para este momento poder acontecer.

Ao meu esposo **Reudisman**, por ser o amor que a vida me presenteou, pela nobreza das renúncias diárias e pelas palavras entusiastas que sempre me reerguiam.

À minha filha **Ana Luísa**, por quem eu quero sempre viver e lutar. Você me faz ir além do que imagino, é o amor mais lindo que eu tenho.

Aos meus queridos irmãos **Higo** e **Fernanda**, porque se alegram com minhas conquistas e torcem por mim; aos meus sobrinhos e cunhados por tantos momentos felizes.

À minha colega-amiga de pesquisa **Nathália Alexandre**, pela humildade, determinação e ética ao longo de todo este trabalho.

À **Mylena Alves** e **Demóstenes**, pelo auxílio, quando possível, durante os testes laboratoriais.

Aos **colegas de turma**, Patrícia Ravena, Janaína, Kevan, Eveline, Ivison, Thiara, Andréia, Rafaella, Julyanna, Ianny, Emmanuel, Marayza e Monalisa pela disponibilidade em ajudar-me, pelo carinho e tantos momentos agradáveis que compartilhamos. Vocês foram a melhor turma de mestrado que eu poderia participar.

À **Airlla Laana**, técnica do Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM), pela organização do seu trabalho ter contribuído para a realização dos experimentos e pela gentileza e disponibilidade com que sempre me tratou.

Aos mesmos de sempre, que guardo em meu coração, que sempre estão intercedendo por mim e pelos desafios de cada dia. Nunca os esquecerei!

Muito Obrigada!

“Tudo é possível ao que crê”.

Marcos 9 : 23.

Sampaio, T. P. D.

Potencial antimicrobiano de extratos vegetais e frações químicas de *Sideroxylon obtusifolium* T.D. Penn sobre microrganismos bucais

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais e frações químicas de *Sideroxylon obtusifolium* T.D. Penn sobre *Streptococcus mutans* (ATCC 27175), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073), *Streptococcus parasanguinis* (ATCC 903) e *Candida albicans* (ATCC 10231), bem como, identificar as classes de substâncias químicas bioativas presentes nos extratos de melhor atividade. Extratos liofilizados da folha e casca (LF e LC) e extratos etanólicos da folha e casca (EF e EC) de *S. obtusifolium* T. D. Penn foram submetidos à avaliação do potencial antimicrobiano através da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Os ensaios foram realizados pelo método da microdiluição em triplicata, em três experimentos independentes. A caracterização fitoquímica foi realizada através da quantificação do teor de polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados. O extrato EC de *S. obtusifolium* T. D. Penn apresentou atividade bacteriostática e bactericida sobre *Streptococcus mutans* (CIM= 1000 µg/mL; CBM= 1000 µg/mL); as demais cepas de estreptococos mostraram-se resistentes às concentrações dos extratos testados; todos os extratos, etanólicos e liofilizados, da folha e casca apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento de *Candida albicans* (CIM= 500 µg/mL); as frações diclorometano e n-butanol do extrato LF apresentaram potencial antifúngico maior que o extrato bruto LF (CIM= 250 µg/mL; CFM= 500 µg/mL). A caracterização fitoquímica revelou predomínio dos compostos polifenóis totais (EC= 29,23%; LC= 25,98%), seguidos por taninos condensados (LC= 38,84%; LF= 17,78%). De acordo com os resultados sugere-se que *Sideroxylon obtusifolium* TD Penn apresenta potencial antifúngico sobre *C. albicans* e potencial antibacteriano sobre *S. mutans*, podendo sua ação estar relacionada com a presença de compostos fitoquímicos da classe dos polifenóis totais e taninos condensados.

Palavras-chave: fitoterapia; placa dentária; *Candida albicans*; Sapotaceae; polifenóis; flavonoides; taninos.

Sampaio, T. P. D.

Antimicrobial potential of plant extracts and chemical fractions from *Sideroxylon obtusifolium* T. D. Penn on oral microorganisms

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of plant extracts and chemical fractions from *Sideroxylon obtusifolium* T.D. Penn on *Streptococcus mutans* (ATCC 27175), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073), *Streptococcus parasanguinis* (ATCC 903) and *Candida albicans* (ATCC 10231), as well as to identify the bioactive chemical substances contained in the extracts with the best antimicrobial activity. Lyophilized extracts of leaf and bark (LL and LB) and ethanol extracts of leaf and bark (EL and EB) of *S. obtusifolium* T. D. Penn were tested for their antimicrobial potential by determining their Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC). Tests were performed in triplicate by the microdilution method in three independent experiments. Phytochemical characterization was performed by measuring the content of total polyphenols, total flavonoids and condensed tannins. The EB extract of *S. obtusifolium* T. D. Penn showed bacteriostatic and bactericidal activity against *Streptococcus mutans* (MIC = 1000 µg/ml, MBC = 1000 µg/ml); the other streptococci strains were found to be resistant to the extract concentrations tested; all extracts (ethanol and lyophilized, from leaf and bark) showed inhibitory activity on *Candida albicans* (MIC = 500 µg/ml); the dichloromethane and n-butanol fractions of LL extract showed higher antifungal potential than the crude LL extract (MIC = 250 µg/ml; CFM = 500 µg/ml). Phytochemical characterization revealed predominance of polyphenol compounds (EB = 29.23%, LB = 25.98%), followed by condensed tannins (LB = 38.84%, LB = 17.78%). According to the results, it is suggested that *Sideroxylon obtusifolium* T. D. Penn has antifungal activity on *C. albicans* and antibacterial activity on *S. mutans*, possibly due to the presence of total polyphenols and condensed tannins.

Key-words: phytotherapy; dental plaque; *Candida albicans*; Sapotaceae; polyphenols; flavonoids; tannins.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
CBiotec	Centro de Biotecnologia
EC	Extrato etanólico da casca
EF	Extrato etanólico da folha
LC	Extrato liofilizado da casca
LF	Extrato liofilizado da folha
G	Gramma
H	Hora
LABDEM	Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
Nm	Nanômetro
Rpm	Rotações por minuto
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UI	Unidade Internacional de Medida

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Foto 1-	<i>Sideroxylon obtusifolium</i> T. D. Penn.....	20
Foto 2-	Folhas de <i>Sideroxylon obtusifolium</i> T. D. Penn.....	20
Foto 3-	Caule de <i>Sideroxylon obtusifolium</i> T. D. Penn.....	20

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1-	Potencial antimicrobiano dos extratos liofilizados e etanólicos da folha e casca de <i>S. obtusifolium</i> T. D. Penn.....	37
Tabela 2-	Quantificação do teor de polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados dos extratos liofilizados e etanólicos da folha e casca de <i>S. obtusifolium</i> T.D. Penn.....	40
Tabela 3-	Potencial antimicrobiano das frações químicas dos extratos liofilizados da casca e folha de <i>S. obtusifolium</i> sobre <i>C. albicans</i>	42

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	13
2	OBJETIVOS	18
2.1	GERAL	18
2.2	ESPECÍFICOS	18
3	METODOLOGIA	19
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	19
3.2	LOCALIZAÇÃO DO ESTUDO	19
3.3	MATERIAL VEGETAL	19
3.4	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	21
3.5	CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO.....	22
3.5.1	Linhagens ensaiadas.....	22
3.5.2	Meios de cultura	22
3.5.3	Preparo do inóculo	22
3.5.4	Concentração dos extratos para os teste de atividade antimicrobiana.....	23
3.5.5	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	23
3.5.6	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) ou Concentração Fungicida Mínima (CFM)	24
3.5.7	Classificação do potencial antimicrobiano	25
3.6	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	25
3.6.1	Quantificação de compostos	25
3.6.2	Fracionamento líquido-líquido	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	ARTIGO – Potencial antimicrobiano de extratos vegetais e frações químicas de <i>Sideroxylon obtusifolium</i> T. D. Penn	28
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXO - Normas para Submissão de Artigos: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine	53

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O biofilme dental é amplamente estudado como um sistema complexo de adesão bacteriana, propiciando o desenvolvimento de doenças infecciosas, dentre elas a cárie dentária e a periodontite (ZIJNGE et al., 2010). É composto por um derivado de matriz extracelular, sendo este os polissacarídeos extracelulares que formam uma película na superfície dos dentes, a qual fornece um sítio de ligação para os microrganismos e acumula as células microbianas (XIAO et al., 2012).

Os estreptococos da cavidade bucal associadas à cárie dentária se subdividem em três grupos: Grupo *mutans* (*Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*); Grupo *salivarius* (*Streptococcus salivarius*) e Grupo *mitis* (*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis*) (JORGE, 2007).

A identificação dos microrganismos que compõem o biofilme dental, a partir de suas características genéticas, evidencia o predomínio de microrganismos do tipo bactérias em 82%. Destas, 66% correspondem a estreptococos. Considerando a presença de estreptococos na placa dental de indivíduos cárie-ativos, as espécies *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus parasanguinis* e *Streptococcus oralis* foram muito bem representadas. Contudo *S. mutans* exibe a maior abundância diferencial em relação a qualquer outra espécie (PETERSON, 2013).

Os *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *Streptococcus sp.*, *S. gordonii* e *S. intermedius* são as espécies deste gênero que primeiro colonizam a superfície dentária, antecedendo a multiplicação do complexo de bactérias Gram-negativas. Esta colonização primária, favorecida pelo biofilme, encontra proteção contra o ataque de microrganismos competidores, sistema imune do hospedeiro e a ação dos antibióticos (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002).

A composição bacteriana no biofilme ou na forma planctônica está diretamente relacionada com a capacidade de adesão que estes microrganismos possuem a superfícies duras, selecionando aqueles que irão tornar-se membros da microbiota aderente. Estudo avaliando a composição microbiana de bactérias

organizadas em biofilmes ou na forma planctônica evidenciou que *S. mutans*, *S. sanguinis* e lactobacilos foram predominantes no biofilme dental. *S. sobrinus* e *S. salivarius* mais predominante em saliva, e *S. mitis* e *S. oralis* foram encontrados de forma semelhante tanto aderidos a biofilmes, quanto na forma planctônica. (WESSEL et al., 2014).

O sucesso da terapia antimicrobiana está em satisfazer os requisitos aparentemente contraditórios de manter o biofilme em níveis compatíveis com a saúde bucal, mas sem interromper as propriedades benéficas da microbiota residente. Um grande desafio para o futuro será o desenvolvimento de produtos com eficácia clínica satisfatória, preservando os benefícios da microbiota bucal (MARSH, 2010).

Candida albicans é caracterizada como um fungo dimórfico Gram-positivo. Habita comensalmente a microbiota bucal de indivíduos saudáveis, sendo a levedura mais frequente nos isolados da cavidade bucal, especialmente na saliva, epitélio de revestimento das mucosas e biofilmes dentais. Fatores locais (placa bacteriana, xerostomia) e sistêmicos (diabetes, doença renal, deficiência de fatores nutricionais) podem favorecer sua virulência e desencadear a candidose bucal (SALERNO et al., 2011; REIS et al., 2011; HÖFLING et al., 2004).

A candidose é a infecção fúngica bucal mais frequente em humanos, causada por *Candida albicans*. Resulta da transição do microrganismo de seu estado comensal a patogênico e pode estar associado à capacidade de formar biofilme e associar-se com outros microrganismos residentes (REIS et al., 2011; HÖFLING et al., 2004). *Candida albicans* frequentemente são encontradas em biofilmes dentais, aumentando a produção de exopolissarídeos e conseqüente acúmulo de massa microbiana (FALSETA et al., 2014).

O aumento dos casos de infecções fúngicas nas últimas décadas é notório, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (FARAH et al., 2010; HÖFLING et al., 2004). O aumento da incidência de diabetes, expectativa prolongada de vida e a utilização de antibioticoterapia de largo espectro contribuem para modificações no sistema imunológico dos indivíduos favorecendo o desenvolvimento de infecções oportunistas variadas (FARAH et al., 2010).

Os antifúngicos mais utilizados para o tratamento da candidose incluem suspensões a base de nistatina, anfotericina-B, miconazol e fluconazol. Geralmente estes medicamentos favorecem a remissão satisfatória dos sinais no período de 12 a 14 dias (SALERNO et al., 2011). Contudo, relata-se resistência às terapias antifúngicas tradicionalmente utilizadas, particularmente em pacientes imunocomprometidos (JUNQUEIRA et al., 2012).

Estudos que avaliem a eficácia de novas alternativas, como o uso de extratos vegetais na prevenção e tratamento da candidose são cada vez mais frequentes e relevantes (REIS et al., 2011). Estudos acerca do potencial antimicrobiano de extratos e frações de plantas medicinais são recorrentes, especialmente em busca de novos compostos com potencial antifúngico sobre o gênero *Candida* (ANIBAL et al., 2011).

Os produtos naturais são uma fonte rica de substâncias estruturalmente diferentes com ampla atividade biológica. No entanto, devido à complexidade de procedimentos químicos é um desafio o isolamento para derivar os compostos ativos. Assim, o verdadeiro valor da ação desses produtos naturais permanece largamente desconhecido (JEON et al., 2011).

Considerando a riqueza e diversidade da vegetação do semiárido, a caracterização de plantas medicinais desta região que possam auxiliar no controle do biofilme dental constitui importante fator de impacto sobre o aproveitamento dos recursos locais (CARTAXO et al., 2010).

Há números expressivos de espécies de plantas medicinais conhecidas da região de caatinga do nordeste do Brasil com necessidade de mais estudos fitoquímicos e farmacológicos, bem como uma análise pormenorizada da sua disponibilidade e efeitos potenciais sobre o uso intensivo na população (ALBUQUERQUE et al., 2007).

A planta *Sideroxylon obtusifolium* T.D. Penn, pertence à família Sapotacea, conhecida como quixaba, quixabeira ou rompe-gibão. A casca do vegetal tem sido largamente utilizada pela população para as seguintes afecções: traumas, dores em geral, úlcera duodenal, gastrite, azia, inflamação crônica, lesão genital, inflamação nos ovários, anexites, cólicas, problemas renais, problemas cardíacos, diabetes

(ALBUQUERQUE et al., 2007), gripe, contusões, inflamações em geral e ação anticancerígena (PAULINO et al., 2012).

Sideroxylon obtusifolium T. D. Penn é uma das espécies vegetais mais populares do Cariri paraibano devido as suas propriedades medicinais. Muitas plantas frequentemente utilizadas por populações locais ainda não foram estudadas ou seus princípios ativos ainda não foram identificados para validá-las como medicamento ou para aproveitá-las economicamente (ALVES; NASCIMENTO, 2010).

Pesquisa realizada com moradores de uma comunidade do Nordeste do Brasil para seleção e posterior investigação de plantas com atividade antifúngica revelou que joazeiro, catingueira, quixabeira e jatobá foram as espécies vegetais mais citadas. Verificou-se que a casca da quixabeira, extraído seus compostos por decocção, foi indicada para tratamento de micoses superficiais (CRUZ et al., 2007).

O extrato da casca, pelo método da microdiluição em caldo, apresentou atividade bactericida e bacteriostática sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, enquanto que o extrato da folha apresentou as mesmas atividades para *S. aureus* (ROCHA et al., 2013). Costa et al. (2012) observaram que o extrato hidroalcoólico a 70% da casca de *S. obtusifolium* apresentou atividade sobre *Enterococcus faecalis* pelo método de difusão em ágar.

No extrato etanólico da entrecasca de *S. obtusifolium* registrou-se presença de flavonoides, fenóis, saponinas, esteroides e taninos. Observou-se uma associação de compostos como flavonoides à propriedade antinociceptiva e anti-inflamatória em testes *in vivo* com ratos e camundongos (ARAÚJO-NETO et al., 2010). Infusões das folhas também são usadas como anti-inflamatório, no entanto, as informações sobre os constituintes de *S. obtusifolium* T. D. Penn permanecem escassas (OLIVEIRA et al., 2012).

Palombo (2011) afirma que a busca por compostos fitoquímicos com atividade biológica é de grande relevância para ser incorporado a uma formulação farmacêutica, mostrando-se como um método de tratamento promissor.

Tendo em vista que estreptococos do biofilme dental estão relacionados com a etiologia da cárie dentária, importante e prevalente doença dos tecidos dentários em humanos, assim como, a *Candida albicans* está fortemente associada ao

surgimento da candidose bucal, é propício o estudo de substâncias terapêuticas alternativas àquelas utilizadas com frequência contra estes microorganismos. Muitos agentes terapêuticos não alcançam mais a eficácia esperada devido à resistência microbiana ou proporcionam efeitos tóxicos aos tecidos humanos.

Considerando a complexidade do biofilme dental, a resistência aos antifúngicos para candidose bucal, bem como, as indicações terapêuticas e os estudos ainda escassos sobre o potencial antimicrobiano de *S. obtusifolium* T. D. Penn torna-se viável maiores investigações acerca desta planta medicinal do semiárido brasileiro, muito utilizada pela população local.

Com isso, a investigação de novas alternativas de tratamento a partir de princípios ativos de plantas medicinais possibilita a elaboração de formulações farmacêuticas de acesso mais fácil à população e com perspectiva de menores contraindicações de uso.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais e frações químicas de *Sideroxylon obtusifolium* T.D. Penn sobre microrganismos da cavidade bucal, bem como, identificar as classes de substâncias químicas bioativas presentes nos extratos de melhor atividade.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais liofilizados e etanólicos da folha e casca de *S. obtusifolium* visando à seleção dos extratos de melhor atividade;
- Identificar a(s) classe(s) de substância(s) química(s) bioativa(s) presente(s) no(s) extrato(s) de melhor atividade;
- Executar partição com solventes orgânicos de polaridade crescente dos extratos liofilizados de melhor atividade;
- Avaliar a atividade antimicrobiana das frações dos extratos liofilizados (folha e casca) objetivando a seleção da(s) fração(ões) de melhor atividade.

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Ensaio laboratorial experimental *in vitro*.

3.2 LOCALIZAÇÃO DO ESTUDO

A elaboração dos extratos e os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

O processo de liofilização dos extratos foi realizado no Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

A triagem fitoquímica foi realizada no Laboratório de Fitoquímica da UEPB.

3.3 MATERIAL VEGETAL

As folhas e cascas de *Sideroxylon obtusifolium* T.D. Penn foram coletadas no período matutino, no Sítio Capim Grande, pertencente ao município de Campina Grande/PB, no mês de Fevereiro de 2013. As exsiccatas da planta em estudo, após a identificação da espécie, foram catalogadas no Herbário Arruda Câmara da UEPB (ACAM 583). (Fotos 1, 2 e 3).



Foto 1- *Sideroxylon obtusifolium* T. D.

Fonte: arquivo pessoal.



Foto 2- Folhas de *S. obtusifolium* T. D. Penn

Fonte: arquivo pessoal.



Foto 3- Caule de *S. obtusifolium* T. D. Penn.

Fonte: http://w3.ufsm.br/erbarioflorestal/especie_det_alhes.php?nome_filtrado=espinheiro

O material vegetal foi acondicionado em sacolas de papel e em seguida realizou-se limpeza deste material, eliminando os espinhos e demais partes aéreas presentes nas folhas, bem como, a eliminação de parte das cascas impregnadas por líquens ou matéria contaminante que venha interferir na qualidade da planta estudada.

As folhas e cascas foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante (FANEM – Modelo 330/5) a 40°C, por um período de 14 dias alcançando a estabilização final do peso. Posteriormente foram moídas em moinho de facas (SOLAB – Modelo SL 30), com diâmetro da partícula de 10 mesh, cuja finalidade foi aumentar a superfície de contato e facilitar a extração dos fitoconstituintes das partes da planta, quando submetidas à solução extratora.

O rendimento das cascas correspondeu a 48,76% do seu peso inicial e o rendimento das folhas, 41,56%.

3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Foram preparados extratos hidroalcoólicos das folhas e cascas de *S. Obtusifolium* T. D. Penn na proporção 200g planta seca e moída para 1 litro de solvente utilizando o álcool etílico a 70%, bem como, extratos etanólicos utilizando como solvente o álcool etílico a 96%. O método de extração utilizado foi maceração, com agitação ocasional.

Os extratos hidroalcoólicos e etanólicos foram evaporados sob pressão reduzida em rotaevaporador a 40° e 70 rpm para eliminação do solvente. Posteriormente, os extratos hidroalcoólicos foram liofilizados (Liofilizador LS 3000 Terroni®) com temperatura entre -20°C a -40°C.

Os extratos foram acondicionados em recipientes de vidro, protegidos da luz e conservados sob refrigeração.

Obtiveram-se então os seguintes extratos submetidos aos testes antimicrobianos: extrato liofilizado da folha (LF), extrato liofilizado da casca (LC), extrato etanólico da folha (EF) e extrato etanólico da casca (EC).

3.5 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO

3.5.1 Linhagens ensaiadas

Foram utilizadas cepas American Type Culture Collection (ATCC) provenientes da Fundação Oswaldo Cruz, sendo estas: *Streptococcus mutans* (27175), *Streptococcus parasanguinis* (903), *Streptococcus salivarius* (7073), *Streptococcus oralis* (10557) e *Candida albicans* (10231).

3.5.2 Meios de cultura

Para a reativação das bactérias, preparo do inóculo e para os testes de atividade antibacteriana foram utilizados os meios de cultura Brain Heart Infusion (BHI) caldo - HIMEDIA[®] e o meio BHI Ágar - HIMEDIA[®], acrescido de 5% de sangue lisado de carneiro.

Para reativação da levedura, preparo do inóculo e para os testes de atividade antifúngica foram utilizados os meios de cultura Saboraud Dextrose Caldo - HIMEDIA[®] e Saboraud Dextrose Ágar - HIMEDIA[®].

3.5.3 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo para os testes de suscetibilidade foi realizado seguindo as recomendações do protocolo M7-A6 para bactérias (CLSI, 2005) e protocolo M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008).

O inóculo bacteriano foi padronizado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 625nm e absorvância entre 0,08 – 0,1, correspondendo à concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Após diluições sucessivas, obteve-se inóculo com

concentração de 1×10^6 UFC/mL. Nos poços da microplaca, durante os testes de atividade antimicrobiana, esta concentração caiu pela metade, resultando em 5×10^5 UFC/mL.

O inóculo fúngico foi padronizado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 530nm e absorbância entre 0,08 – 0,1, correspondendo à concentração de 5×10^6 UFC/mL. Após diluições sucessivas, obteve-se inóculo com concentração de 5×10^3 UFC/mL. Nos poços da microplaca, durante os testes de atividade antimicrobiana, esta concentração caiu pela metade, resultando em $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

3.5.4 Concentração dos extratos para os testes de atividade antimicrobiana

Os extratos liofilizados e etanólicos foram solubilizados em álcool a 40%, resultando em extratos-teste na concentração de 4000µg/mL.

3.5.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios foram realizados seguindo o método da microdiluição em caldo, em microplacas de 96 poços, conforme protocolo (CLSI, 2005) e (CLSI, 2008), respectivamente para bactérias e leveduras, sendo o último protocolo com modificação quanto ao meio de cultura.

Realizou-se controle do meio de cultura (coluna 1), controle de crescimento do microorganismo (coluna 2), controle positivo (coluna 3) com uso da clorexidina 0,12% para bactérias e nistatina 100.000UI/mL para levedura, e controle do solvente (coluna 4).

Em uma microplaca esterilizada de 96 poços (8 linhas A-H/1-12 colunas) foram depositados 100 µL do meio de cultura em todos os poços a partir da linha A. Em seguida, foram acrescentados 100 µL do extrato a ser testado no poço da linha

B, o conteúdo dos poços homogeneizados com o meio e transferidos para o poço da linha seguinte (C), repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente das amostras. Os 100 µL finais foram desprezados. Em seguida, foram adicionados 100µL do inóculo do microrganismo a ser avaliado. As placas foram incubadas por 24 h a 37° C em ambiente de microaerofilia para as bactérias e por 48 h a 37° C, para levedura. Para cada concentração do extrato testado foi realizado procedimento em triplicata e em três experimentos independentes.

As concentrações dos extratos nos poços variaram de 1000 µg/mL a 15,625 µg/mL.

Após o período de incubação foram adicionados 20 µL da solução aquosa de resazurina (Sigma-Aldrich®) a 0,01% para leitura visual da atividade antimicrobiana (VASCONCELOS, 2013; SILVA et al, 2012; LIU et al., 2007; SARKER et al., 2007).

Poço com coloração rosa indica atividade bacteriana ou fúngica com reação química de óxido-redução da resazurina em resofurina. Poço com coloração azul indica ausência de células viáveis por inibição do crescimento celular (VASCONCELOS, 2013; LIU et al., 2007).

A CIM foi definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade (CLSI, 2005), verificada através da mudança de coloração do meio.

3.5.6 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Uma alíquota do poço correspondente à CIM e poços anteriores foram plaqueados em meio ágar específico, sendo ágar BHI acrescido de sangue de carneiro (5%) para bactérias e ágar Sabouraud Dextrose para levedura.

A CBM/CFM correspondeu a menor concentração do extrato que impediu o crescimento microbiano visível em meio de cultura sólido (ROCHA et al., 2013).

Os testes foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes.

3.5.7 Classificação do potencial antimicrobiano

A atividade antimicrobiana dos extratos será classificada de acordo com Aligiannis et al (2001), que propuseram a classificação da atividade antimicrobiana das plantas de acordo com os resultados da CIM, de modo que: forte inibição – CIM até 500 $\mu\text{g/mL}$; moderada inibição – CIM entre 600 $\mu\text{g/mL}$ e 1500 $\mu\text{g/mL}$; e fraca inibição – CIM acima de 1600 $\mu\text{g/mL}$.

3.6 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

3.6.1 Quantificação de compostos

Os extratos de melhor atividade antimicrobiana foram quantificados quanto ao teor de polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados.

Para a determinação do teor de polifenóis totais, utilizou-se o método descrito por Chandra e Mejía (2004). Adicionou-se 1 mL da solução aquosa do extrato a 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N, e esta mistura permaneceu em repouso por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 2 mL de uma solução aquosa de Na_2CO_3 a 20% (p/v), e a mistura permaneceu em repouso por mais 10 minutos. Em seguida, foi feita a leitura da absorbância a 757 nm em espectrofotômetro (Shimadzu® UV mini-1240), contra um branco composto por água destilada, reagente de Folin-Ciocalteu e solução a 20% de Na_2CO_3 .

Para a obtenção da curva analítica, uma solução padrão de 100 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico foi preparada pela dissolução de 10 mg do padrão em 100 mL de água destilada. A partir dessa solução foram feitas diluições em triplicata, de forma a obter soluções de 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35, e 40 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico. As análises foram realizadas em triplicata.

A determinação do conteúdo de flavonóides totais seguiu o método de Meda et al. (2005). A 5 mL de cada solução (em metanol) do extrato foi adicionado o mesmo volume de uma solução (em metanol) de $AlCl_3$ a 2% (p/v). A mistura permaneceu em repouso por 10 minutos antes da leitura da absorbância a 415 nm, contra um branco composto pela solução de $AlCl_3$.

A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão a 100 $\mu g/mL$, preparada pela dissolução de 10 mg de quercetina em 100 mL de metanol. A partir dessa solução, foram feitas diluições em triplicata, obtendo-se soluções de quercetina nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 26, 28 e 30 $\mu g/mL$. A concentração de flavonoides foi expressa em miligramas equivalentes de quercetina. As análises foram realizadas em triplicata.

O teor de taninos condensados foi quantificado utilizando-se o método de Makkar e Becker (1993), no qual 0,5 mL da amostra do extrato vegetal foi adicionado a 3 mL de uma solução de vanilina (4% p/v em metanol); em seguida, adicionou-se 1,5 mL de HCl concentrado (37%). A reação ocorreu em tubos de ensaio, mergulhados em água a cerca de 22°C. A leitura foi feita a 500 nm, contra um branco composto pela solução de vanilina, HCl e uma solução de etanol 50% (v/v) em água.

A curva de calibração para este ensaio foi obtida a partir de uma solução padrão de catequina obtida pela dissolução de 10 mg do padrão em 100 mL de metanol. A partir dessa solução, foram realizadas diluições em triplicata, de forma a obter soluções de catequina nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 $\mu g/mL$. A concentração de taninos condensados foi expressa em miligramas equivalentes de catequina. As análises foram realizadas em triplicata.

3.6.2 Fracionamento líquido-líquido

Os extratos liofilizados de melhor atividade foram fracionados em funil de separação, utilizando-se solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol. A porção final correspondeu à fase aquosa.

Solubilizou-se 5g do extrato liofilizado de melhor atividade em 50 mL de uma solução metanol:água (70:30), obtendo-se a solução-mãe para o fracionamento. Levou-se ao funil de separação. Adicionou-se 50 mL do solvente mais apolar, inicialmente, agitou-se e observou-se a separação das fases. Cada solvente foi utilizado até o esgotamento total dos compostos da solução-mãe. Cada passagem do solvente pela solução-mãe foi coletada, em seguida evaporado sob pressão reduzida em rotaevaporador a 40°C, com rotação de 70 rpm e armazenado sob refrigeração para posterior submissão aos testes de atividade antimicrobiana.

Repetiu-se o mesmo procedimento para cada solvente utilizado no fracionamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ARTIGO: Potencial antimicrobiano de extratos vegetais e frações químicas de *Sideroxylon obtusifolium* T.D. PENN

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (Qualis: A1. Fator de Impacto: 1.72).

Título

Potencial antimicrobiano de extratos vegetais e frações químicas de *Sideroxylon obtusifolium* T.D. Penn.

Autores

Thaíse Pereira Dantas Sampaio¹, Nathália Alexandre de Oliveira Cartaxo², Myllena Alves¹, Cleildo Pereira de Santana², Harley da Silva Alves², Ana Cláudia Dantas de Medeiros^{1,2}, Edja Maria Melo de Brito Costa^{1,2}, Gustavo Pina Godoy¹, Pedro Luiz Rosalen³, Jozinete Vieira Pereira¹

Afiliação

¹ Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brasil

³ Departamento de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas (UNICAMP), Piracicaba, SP, Brasil

Autor para Correspondência

Prof^a. Dr^a. Jozinete Vieira Pereira.

Rua Baraúnas, 351- Bairro Universitário, Campina Grande – PB, CEP 58429-500. Fone/Fax: (83) 3315-3300.

jozinetevieira@hotmail.com

Email dos autores

Thaíse Pereira Dantas Sampaio: thaiseuepb@gmail.com

Nathália Alexandre de Oliveira Cartaxo: nathalia_cartaxo@hotmail.com

Myllena Alves: myllenalves@hotmail.com

Cleildo Pereira de Santana: cleildosantana@hotmail.com

Harley da Silva Alves: harley.alves@hotmail.com

Ana Cláudia Dantas de Medeiros: anacdmedeiros@yahoo.com.br

Edja Maria Melo de Brito Costa: edjacosta@gmail.com

Gustavo Pina Godoy: gruiga@hotmail.com

Pedro Luiz Rosalen: rosalen@fop.unicamp.br

Jozinete Vieira Pereira: jozinetevieira@hotmail.com

Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais e frações químicas de *Sideroxylon obtusifolium* T.D. Penn sobre *Streptococcus* sp e *Candida albicans*, e identificar classes de substâncias químicas bioativas nos extratos de melhor atividade. Extratos liofilizados da folha e casca (LF e LC) e etanólicos da folha e casca (EF e EC) foram avaliados pela Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Utilizou-se o método da microdiluição, em triplicata e três experimentos independentes. A caracterização fitoquímica realizada pela quantificação de polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados. O extrato EC apresentou atividade bacteriostática e bactericida sobre *Streptococcus mutans* (CIM= 1000 µg/mL; CBM= 1000 µg/mL); todos os extratos apresentaram atividade inibitória sobre crescimento de *C. albicans* (CIM= 500 µg/mL). As frações diclorometano e n-butanol do extrato LF apresentaram potencial antifúngico maior que o extrato bruto (CIM= 250 µg/mL; CBM= 500 µg/mL). Predominou compostos polifenóis totais, seguidos por taninos condensados. Observou-se que *Sideroxylon obtusifolium* TD Penn apresenta forte potencial antifúngico sobre *C. albicans* e moderada atividade antibacteriana sobre *S. mutans*. Este potencial sugere possibilidade de produção de um fitoterápico adjuvante ao tratamento de candidoses e adjuvante às substâncias no controle do biofilme dental.

Palavras-chave: fitoterapia; placa dentária; *Candida albicans*; Sapotacea; polifenóis; flavonoides; taninos.

1 Introdução

Os biofilmes são compostos por pequenas colônias de origem bacteriana, organizados de forma não aleatória numa matriz composta por água, polissacarídeos extracelulares, proteínas, sais e células. Sabe-se que existem associações específicas entre bactérias do biofilme dental, as quais representam o principal agente etiológico de diversas doenças bucais [1,2,3], sendo os *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* as principais espécies associadas à cárie dentária [3]. Os *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *Streptococcus sp.*, *S. gordonii* e *S. intermedius* são as espécies que primeiro colonizam a superfície dentária, antecedendo a multiplicação do complexo de bactérias Gram-negativas [4].

Considerando a presença de estreptococos no biofilme dental de indivíduos cárie-ativos, as espécies *S. sanguinis*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. intermedius*, *S. gordonii*, *S. parasanguinis* e *S. oralis* foram observados no biofilme dental de crianças com atividade de cárie. Contudo *S. mutans* exibe a maior quantidade diferencial em relação a qualquer outra espécie [5].

Candida albicans são leveduras frequentemente encontradas em biofilmes dentais, aumentando a produção de exopolissarídeos e consequente acúmulo de massa microbiana [6], além de serem responsáveis pela candidose, a infecção fúngica bucal mais comum em seres humanos [7].

O sucesso da terapia antimicrobiana está em satisfazer os requisitos aparentemente contraditórios de manter o biofilme em níveis compatíveis com a saúde bucal, mas sem interromper as propriedades benéficas da microbiota residente. Um grande desafio para o futuro será o desenvolvimento de produtos com eficácia clínica satisfatória, preservando os benefícios da microbiota bucal [8].

Os produtos naturais são uma fonte rica de substâncias estruturalmente diferentes com ampla atividade biológica. No entanto, devido à complexidade de procedimentos químicos é um desafio o isolamento para derivar os compostos ativos. Assim, o verdadeiro valor da ação desses produtos naturais permanece largamente desconhecido [9].

Os experimentos com plantas medicinais em busca de novos compostos bioativos apresentam-se como uma alternativa promissora, tendo em vista a resistência de microrganismos importantes às substâncias antimicrobianas conhecidas [10, 11].

A planta *Sideroxylon obtusifolium* TD Penn é conhecida como quixaba, quixabeira ou rompe-gibão, pertence à família Sapotaceae. Estende-se do semi-árido nordestino até a região sudeste do Brasil [12,13,14]. A casca do vegetal tem sido largamente utilizada pela população para as seguintes afecções: traumas, dores em geral, úlcera duodenal, gastrite, azia, inflamação crônica, lesão genital, inflamação nos ovários, anexites, cólicas, problemas renais, problemas cardíacos e diabetes [15]. Infusões das folhas também são usadas como anti-inflamatório, no entanto, as informações sobre os constituintes de *S. obtusifolium* permanecem escassas [16].

Sideroxylon obtusifolium é uma espécie vegetal popular do nordeste do Brasil devido suas propriedades medicinais. Muitas plantas frequentemente utilizadas por populações locais ainda não foram estudadas ou seus princípios ativos não foram identificados para validá-las como medicamento ou para aproveitá-las economicamente [17].

Tendo em vista que estreptococos do biofilme dental estão relacionados com a etiologia da cárie dentária, importante e prevalente doença dos tecidos dentários em humanos, assim como, *Candida albicans* está fortemente associada ao surgimento da candidose bucal, é relevante a busca por substâncias terapêuticas alternativas àquelas utilizadas com frequência contra estes microrganismos. Muitos agentes terapêuticos não alcançam mais a eficácia esperada devido à resistência microbiana ou proporcionam efeitos adversos aos tecidos humanos. A investigação de novas alternativas a partir de princípios ativos de plantas medicinais pode favorecer a elaboração de formulações farmacêuticas com menos contraindicações de uso e de fácil acesso à população.

Nesta perspectiva o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais e frações químicas de *Sideroxylon obtusifolium* T.D. Penn sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguinis* e *Candida albicans*, bem como, identificar as classes de substâncias químicas bioativas presentes nos extratos de melhor atividade.

2 Material e método

2.1 Preparação do extrato de *Sideroxylon obtusifolium* T. D. Penn

As folhas e cascas de *Sideroxylon obtusifolium* T.D. Penn foram coletadas no município de Campina Grande/PB. As exsiccatas da planta em estudo, após a identificação da espécie, foram catalogadas no Herbário Arruda Câmara da UEPB (ACAM 583). O material foi limpo, seco em estufa de ar circulante a 40°C e moído em moinho de facas. O rendimento das cascas correspondeu a 48,76% do seu peso inicial e o rendimento das folhas, 41,56%.

Foram preparados extratos hidroalcoólicos a 70% e etanólicos a 96% das folhas e cascas de *S. obtusifolium*, na proporção 200g planta seca e moída para 1 litro de solvente, pelo método da maceração. Os extratos foram submetidos à evaporação sob pressão reduzida em rotaevaporador a 40°C e 70 rpm para eliminação do solvente. Os extratos hidroalcoólicos após esta etapa foram liofilizados à temperatura entre -20°C a -40°C. Obtiveram-se então os seguintes extratos submetidos aos testes antimicrobianos: extratos liofilizados da folha e casca (LF e LC) e extratos etanólicos da folha e casca (EF e EC). Os extratos foram acondicionados em recipientes de vidro, protegidos da luz e conservados sob refrigeração.

2.2 Caracterização do potencial antimicrobiano

2.2.1 Linhagens ensaiadas e preparo do inóculo

Foram utilizadas cepas American Type Culture Collection (ATCC) provenientes da Fundação Oswaldo Cruz, sendo estas: *Streptococcus mutans* (27175), *Streptococcus parasanguinis* (903), *Streptococcus salivarius* (7073), *Streptococcus oralis* (10557) e *Candida albicans* (10231)

O preparo do inóculo para os testes de suscetibilidade foi realizado seguindo as recomendações do protocolo M7-A6 para bactérias [18] e protocolo M27-A3 para leveduras [19].

O inóculo bacteriano foi padronizado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 625nm e absorvância entre 0,08 - 0,1. Após diluições sucessivas, obteve-se inóculo para teste com concentração de 1×10^6 UFC/mL.

O inóculo fúngico foi padronizado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 530nm e absorvância entre 0,08 - 0,1. Após diluições sucessivas, obteve-se inóculo para teste com concentração de 5×10^3 UFC/mL.

2.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios foram realizados seguindo o método da microdiluição em caldo, em microplacas de 96 poços, conforme protocolo CLSI [18] e CLSI [19], respectivamente para bactérias e leveduras, sendo o último protocolo com modificação quanto ao meio de cultura.

Os extratos liofilizados e etanólicos foram solubilizados em álcool a 40% resultando extratos-teste na concentração de 4000µg/mL. As placas foram incubadas por 24 h a 37° C em ambiente de microaerofilia para as bactérias, e por 48 h a 37° C para levedura. Para cada concentração de extrato testado foi realizado procedimento em triplicata e em três experimentos independentes. As concentrações dos extratos nos poços variaram de 1000 µg/mL a 15,625 µg/mL. Realizou-se controle do meio de cultura, controle de crescimento do microorganismo, controle positivo com uso da clorexidina 0,12% para bactérias e nistatina 100.000UI/mL para levedura, e controle do solvente.

Após o período de incubação foram adicionados 20 µL da solução aquosa de resazurina (Sigma-Aldrich®) a 0,01% para leitura visual da atividade antimicrobiana [20,21,22,23].

A CIM foi definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade [18], verificada através da mudança de coloração do meio. A atividade antimicrobiana dos extratos foi classificada de acordo com Aligiannis [24].

2.2.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima e Concentração Fungicida Mínima (CBM e CFM)

Uma alíquota do poço correspondente à CIM e poços anteriores foi semeada em meio ágar específico, sendo ágar BHI acrescido de sangue de carneiro (5%) para bactérias e ágar Sabouraud Dextrose para levedura.

A CBM/CFM correspondeu a menor concentração do extrato que impediu o crescimento microbiano visível em meio de cultura sólido [10].

Os experimentos foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes.

2.3 Caracterização química

2.3.1 Quantificação de compostos

Os extratos de melhor atividade antimicrobiana foram quantificados quanto ao teor de polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados.

Para a determinação do teor de polifenóis totais, utilizou-se o método descrito por Chandra e Mejía [25], com leitura da absorbância a 757 nm em espectrofotômetro. A concentração de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico.

A determinação do conteúdo de flavonóides totais seguiu o método de Meda et al. [26] com leitura da absorbância a 415 nm. A concentração de flavonóides foi expressa em miligramas equivalentes de quercetina.

O teor de taninos condensados foi quantificado utilizando-se o método de Makkar e Becker [27]. A leitura da absorbância foi feita a 500 nm. A concentração de taninos condensados foi expressa em miligramas equivalentes de catequina.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.3.2 Fracionamento líquido-líquido

Os extratos liofilizados de melhor atividade foram fracionados utilizando-se solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol. A porção final correspondeu à fase aquosa.

Solubilizou-se 5g do extrato liofilizado de melhor atividade em 50 mL de uma solução metanol : água (70:30), obtendo-se a solução-mãe para o fracionamento. Levou-se ao funil de separação. Adicionou-se 50 mL do solvente mais apolar, inicialmente, agitou-se e observou-se a separação das fases. Cada solvente foi utilizado até o esgotamento total dos compostos da solução-mãe. Cada passagem do solvente pela solução-mãe foi coletada, em seguida evaporado sob pressão reduzida em rotaevaporador a 40°C, com rotação de 70 rpm e armazenado sob refrigeração para posterior submissão aos testes de atividade antimicrobiana.

Repetiu-se o mesmo procedimento para cada solvente utilizado no fracionamento.

Todas as frações foram submetidas aos ensaios de caracterização do potencial antimicrobiano, utilizando-se como solvente o álcool a 40%.

3 Resultados e Discussão

3.1 Atividade antimicrobiana dos extratos vegetais

A tabela 1 apresenta os resultados dos testes antimicrobianos (CIM, CBM e CFM) dos extratos liofilizados e etanólicos de *Sideroxylon obtusifolium* T. D. Penn.

Tabela 1. Potencial antimicrobiano dos extratos liofilizados e etanólicos da folha e casca de *S. obtusifolium* T. D. Penn.

Extratos	Potencial antimicrobiano µg/mL									
	<i>S. mutans</i>		<i>S. oralis</i>		<i>S. parasanguinis</i>		<i>S. salivarius</i>		<i>C. albicans</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CFM
LF	>1000	*	>1000	*	>1000	*	>1000	*	500	>1000
LC	>1000	*	>1000	*	>1000	*	>1000	*	500	>1000
EF	>1000	*	>1000	*	>1000	*	>1000	*	500	>1000
EC	1000	1000	>1000	*	>1000	*	>1000	*	500	>1000

*Teste não realizado por ausência de atividade no teste antimicrobiano da CIM.

Conforme a Tabela 1, o extrato etanólico da casca de *S. obtusifolium* T. D. Penn foi o único que apresentou atividade bacteriostática e bactericida frente à cepa de *S. mutans*. As demais cepas de estreptococos mostraram-se resistentes à concentração testada de 1000 µg/mL para todos os extratos, entretanto, todos os extratos liofilizados e etanólicos da casca e folha de *Sideroxylon obtusifolium* T. D. Penn apresentaram atividade inibitória de crescimento (CIM) frente *Candida albicans* em concentrações semelhantes. Diferenças entre a parte da planta utilizada (folha ou casca), bem como, o tipo de extrato (liofilizado ou etanólico) não influenciaram em sua atividade antimicrobiana frente à levedura testada.

Quando submetida ao teste da CFM, *C. albicans* mostrou-se resistente neste estudo às concentrações dos extratos testadas de 500 µg/mL e 1000 µg/mL. Verificou-se que os extratos liofilizados da casca e folha de *Sideroxylon obtusifolium* apresentaram potencial inibitório

sobre o crescimento de *Candida albicans*, não apresentando potencial fungicida sobre esta levedura nas concentrações testadas.

As bactérias mostraram-se sensíveis à substância controle, clorexidina 0,12%, bem como *C. albicans* mostrou-se sensível à nistatina 100.000 UI/mL em todas as concentrações testadas. O álcool a 40% não apresentou atividade antimicrobiana em nenhuma concentração.

Considerando o potencial antimicrobiano dos extratos neste estudo, conforme a classificação proposta por Aligianis et al. [24], todos os extratos avaliados apresentaram forte atividade inibitória para o crescimento de *Candida albicans* (CIM=500 µg/mL) e o extrato etanólico da casca, moderada atividade inibitória para o crescimento de *Streptococcus mutans* (CIM=1000 µg/mL).

Cruz et al. [28] avaliaram a ação antifúngica, pelo método de difusão em ágar, do extrato liofilizado da casca da quixabeira sobre *Trichophyton rubrum*, *Candida guilliermondii*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Fonsecaea pedrosoi*. Os autores observaram que o extrato liofilizado da quixabeira não apresentou atividade antifúngica frente às espécies analisadas, discordando com achados encontrados no presente estudo, onde foi observada forte atividade inibitória para o crescimento de *C. albicans*.

Diferenças metodológicas entre os estudos podem ter influenciado nos diferentes resultados quanto à ação antifúngica do extrato liofilizado da casca. Segundo Rocha et al. [10] o método de difusão em ágar, que apresenta limitação quanto à capacidade de difusibilidade da substância testada pode ter influenciado na ação antifúngica no estudo de Cruz et al. [28], considerando que neste estudo a ação do extrato liofilizado da casca da quixabeira foi satisfatória.

Outros fatores como a diferença regional quanto ao local de coleta da planta e diferentes concentrações do extrato testado entre os experimentos podem interferir no potencial da atividade antimicrobiana da espécie vegetal em estudo [29]. A sazonalidade, o tipo de solo, a temperatura e o clima também interferem neste processo [30,31]. O método de preparo do extrato e a parte da planta utilizada também são determinantes para revelar o potencial dos constituintes bioativos da espécie vegetal estudada [32,28].

Diferenças quanto ao método de obtenção dos extratos também foram evidenciadas entre os estudos. A maceração foi o método de elaboração dos extratos neste estudo, enquanto que no estudo de Cruz et al. [28] foi utilizado o método de decocção.

O potencial antibacteriano de extratos hidroalcoólicos a 70% da casca e folha de *S. obtusifolium* foi avaliado sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* pelos métodos de difusão em ágar e microdiluição em caldo. Pelo método de difusão em ágar nenhum dos extratos apresentou atividade, contudo pelo método da microdiluição em caldo, o extrato da casca apresentou atividade bactericida e bacteriostática sobre *S. aureus* e *E. coli*, enquanto que o extrato da folha apresentou as mesmas atividades para *S. aureus*. [10]. Estes resultados não corroboram aos achados de Costa et al. [33], em que o extrato hidroalcoólico a 70% da casca de *S. obtusifolium* apresentou atividade sobre *E. faecalis* pelo método de difusão em ágar.

A variabilidade de resultados entre os experimentos que utilizaram extrato, microrganismo e técnica semelhantes pode sugerir que a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de *S. obtusifolium* pode sofrer influência pelo método de difusão em ágar.

O potencial antimicrobiano do extrato etanólico da casca de *S. obtusifolium* foi avaliado sobre cepas de *E. faecalis*, através do método de difusão em ágar. As concentrações de 100% e 50% foram as que apresentaram melhor atividade, apesar de inferiores aos extratos de aroeira-da-praia e aroeira-do-sertão, que apresentaram os maiores halos de inibição até a concentração de 6,25% [34]. Considerando os microrganismos testados em cada experimento, o estudo de Costa et al. [34] confirmou a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da casca sobre *E. faecalis* e neste estudo foi confirmada a ação do mesmo extrato sobre *S. mutans*.

Extrato etanólico da casca de *Ennglerophytum magalismontanum* (Sond.) T.D. Penn, espécie vegetal da família Sapotacea, apresentou atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar sobre bactérias do gênero *Actinomyces*, *Prevotella* e a espécie *Streptococcus mutans*. Contudo mostrou-se resistente à ação sobre *Candida albicans*, nas concentrações de 2 e 3mg/mL [35]. O potencial antimicrobiano desta espécie assemelha-se ao de *S. obtusifolium* quanto à ação sobre *S. mutans*. Compostos fitoquímicos em comum entre várias espécies da mesma família vegetal podem ser responsáveis por esta ação.

3.2 Caracterização fitoquímica

A tabela 2 apresenta a quantificação fitoquímica dos extratos liofilizados e etanólicos de *S. obtusifolium* T.D. Penn quanto ao teor de polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados.

Tabela 2. Quantificação do teor de polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados dos extratos liofilizados e etanólicos da folha e casca de *S. obtusifolium* T.D. Penn.

Extratos	Polifenóis totais		Flavonóides totais		Taninos condensados	
	mg/g	%	mg/g	%	mg/g	%
LF	223,77 (±37,52)	22,37 (±3,75)	17,03 (±1,09)	1,70 (±0,10)	177,88 (±32,16)	17,78 (±3,21)
LC	259,83 (±24,76)	25,98 (±2,47)	2,00 (±0,10)	0,20 (±0,01)	388,44 (±28,21)	38,84 (±2,82)
EF	131,38 (±2,48)	13,13 (±0,24)	14,39 (±0,49)	1,43 (±0,04)	137,87 (±4,89)	13,78 (±0,48)
EC	292,35 (±6,03)	29,23 (±0,60)	2,25 (±0,02)	0,22 (±0,002)	157,05 (±21,23)	15,70 (±2,12)

Cada valor de concentração de polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados correspondem à média de três repetições ± desvio-padrão.

Compostos fenólicos inclui uma diversidade de estruturas simples e complexas, dentre estas estão os fenóis simples, ácidos fenólicos, xantonas, lignanas, flavonoides, taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Atividade antitumoral, antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória são propriedades dos flavonoides. Os taninos caracterizam-se por ação bactericida, fungicida, antitumoral e inibição de enzimas glicosiltransferases de *S. mutans* [36].

Conforme a Tabela 2 os compostos químicos mais prevalentes nos extratos da casca e folha de *S. obtusifolium* são polifenóis totais e taninos condensados. Quanto ao teor de polifenóis totais, destacam-se o extrato etanólico da casca (EC) seguido do extrato liofilizado da casca (LC). Para a quantificação de taninos condensados, destaca-se o extrato liofilizado da casca (LC) seguido do extrato liofilizado da folha (LF). A presença destes compostos pode estar relacionada com a ação antibacteriana do extrato EC sobre *S. mutans* e com a ação dos extratos LC e LF sobre *C. albicans*, conforme Tabela 1.

O uso popular da casca da quixabeira para tratamento anti-inflamatório combinado com sua atividade antioxidante pode estar associado à presença de polifenóis e taninos, consideradas as moléculas responsáveis por parte de suas ações farmacológicas [37]. A presença abundante de compostos polifenólicos também foi relatada na fração acetato de etila da casca de *S. obtusifolium* e pode estar associado ao seu potencial antioxidante e atividade antibacteriana apresentada sobre *S. aureus* [38]. Essa afirmação corrobora com os resultados da atividade antimicrobiana neste estudo relacionada ao extrato da casca, de modo que o extrato EC apresentou a maior quantificação de polifenóis totais e foi o único responsável pela atividade bactericida e bacteriostática sobre *S. mutans*. Taninos condensados foram quantificados em todos os extratos liofilizados e etanólicos, os quais exerceram forte atividade inibitória sobre o crescimento de *C. albicans*.

A presença de taninos e flavonoides no extrato etanólico da casca de *S. obtusifolium* também foi verificado em estudo de Araújo-Neto et al. [39], associado à presença de fenóis, saponinas, esteróides, triterpenos e xantonas. Neste estudo, taninos condensados e flavonoides totais também foram quantificados no extrato EC. Considerando o teor destes compostos, flavonoides provavelmente podem ter influenciado na atividade bacteriostática e bactericida do extrato EC sobre *S. mutans*.

A capacidade de se complexar com proteínas confere aos taninos a característica de precipitar estes compostos auxiliando, por exemplo, na inibição de enzimas glicosiltransferases de *S. mutans*, bem como, efeito inibitório sobre fungos [37]. Neste estudo pode-se sugerir que, os teores de taninos verificados na Tabela 2 influenciaram a ação antibacteriana apresentada neste estudo pelo extrato EC sobre *S. mutans* e a ação antifúngica que todos os extratos testados apresentaram sobre *C. Albicans*, conforme Tabela 1.

A presença de flavonóides e terpenos, dentre outros componentes em extratos vegetais, tem sido apontados como possíveis responsáveis pela ação inibitória da síntese de polissacarídeos insolúveis da matriz intermicrobiana do biofilme dental [40]. A apigenina, importante flavonóide presente na propólis apresentou-se como potente inibidor da atividade de glucosiltransferase, enzima produzida por *S. mutans* relacionada com fatores de virulência para a cárie dentária [41]. Neste estudo a presença de flavonoides foi verificada em todos os extratos analisados.

Quanto ao teor de compostos das folhas, Oliveira et al. [16] relatam o predomínio de saponinas e flavonoides obtidos da fração butanólica. Neste estudo com o extrato bruto, os

flavonoides totais foram os compostos em menor quantidade (LF= 1,70%; LC= 0,20%; EF= 1,43%; EC= 0,22%), comparado aos polifenóis totais e taninos condensados. Dentre os extratos analisados, LF apresentou o maior teor de flavonoides totais.

Silva [42] relatou não haver diferença entre a quantidade de flavonoides nos extratos metanólicos da casca e folha de *S. obtusifolium* através de cromatografia em camada delgada. Contudo, a quantificação destes compostos a partir de extratos com álcool etílico, como ocorreu neste estudo, evidenciou predomínio deste composto no extrato LF (1,70%) e EF (1,43%).

3.3 Atividade antimicrobiana das frações químicas

Considerando que ambos os extratos LF e LC apresentaram forte potencial antimicrobiano sobre *C. albicans*, os mesmos foram fracionados, conforme metodologia previamente descrita, a fim de verificar a atividade antimicrobiana em suas respectivas frações, com possibilidades de futuros estudos para isolamento dos compostos responsáveis por esta ação.

A tabela 3 apresenta o potencial antimicrobiano das frações químicas dos extratos liofilizados da casca e folha de *S. obtusifolium* T. D. Penn sobre *C. albicans*.

Tabela 3: Potencial antimicrobiano das frações químicas dos extratos liofilizados da folha e casca de *S. obtusifolium* sobre *C. albicans*.

Extratos	Potencial antimicrobiano µg/mL									
	Fração hexânica		Fração diclorometano		Fração acetato de etila		Fração n-butanol		Fração aquosa	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CFM
LF	500	1000	250	500	500	>1000	250	500	>1000	*
LC	500	>1000	500	>1000	500	>1000	500	>1000	500	>1000

*Não realizado devido ausência de resultado no teste da CIM.

Conforme a Tabela 3, as frações diclorometano e n-butanol do extrato LF apresentaram maior atividade antifúngica, mostrando ser mais potente comparada à atividade verificada no extrato LF bruto (Tabela 1). A fração hexânica apresentou semelhante atividade

fungistática àquela apresentada pelo extrato LF bruto, contudo apresentou atividade fungicida, anteriormente não evidenciada.

Estudos sobre a atividade moduladora de frações de extratos mostraram-se como perspectiva de avaliação do potencial antimicrobiano de frações de extratos vegetais. De acordo com Moraes-Braga et al [11], um extrato pode não apresentar atividade diretamente sobre o microorganismo, mas pode potencializar a ação de um antimicrobiano de uso tradicional. Considerando a atividade moduladora do estudo de Moraes-Braga et al [11], a potencialização da ação antifúngica das frações diclorometano e n-butanol de LF evidenciadas neste estudo podem estimular futuras pesquisas sobre a ação moduladora das referidas frações de *S. obtusifolium* sobre terapias antifúngicas que apresentam resistência ao microorganismo *C. albicans*.

O fracionamento de extratos vegetais tem por finalidade o isolamento de substâncias ativas para avaliação da atividade biológica [36]. Conforme a Tabela 3, o aumento do potencial antimicrobiano do extrato LF, quanto às frações diclorometano e n-butanol, pode ter sido influenciado pela presença de compostos bioativos, extraídos pelas diferentes polaridades dos solventes e com melhor atividade inibitória sobre crescimento e morte de *C. albicans* quando separados do extrato bruto.

Höfling et al [43] confirmou importante atividade de extratos vegetais fracionados sobre isolados clínicos de *C. albicans* e inibição da atividade proteolítica da membrana fúngica, demonstrando importante alternativa para controlar e prevenir a candidose. Esta afirmativa evidencia a importância da atividade antimicrobiana de extratos fracionados. Neste estudo as frações diclorometano e n-butanol do extrato LF de *S. obtusifolium* mostraram importante atividade fungistática e fungicida sobre *C. albicans*.

Quanto aos extratos fracionados da casca de *S. obtusifolium* (LC), neste estudo o fracionamento do extrato LC não potencializou sua ação sobre *C. albicans*. Em outro estudo [38] a atividade antibacteriana das frações do extrato etanólico da casca de *S. obtusifolium* foi testada sobre isolados clínicos de *S. aureus* resistentes à metilina, demonstrando que a fração acetato de etila apresentou melhor atividade, comparado à ação das frações hexano, diclorometano, n-butanol e aquosa.

Os estudos avaliando a ação antimicrobiana de frações de *S. obtusifolium* ainda são incipientes, mas mostram resultados satisfatórios, tendo em vista a necessidade de se

investigar alternativas à resistência de microrganismos importantes à terapêutica convencional.

Estudos sobre o potencial antimicrobiano de *S. obtusifolium* T. D. Penn ainda são escassos e os resultados na literatura indicam a necessidade de mais investigações. Neste estudo abre-se precedente a mais uma linha de pesquisa para explorar sua potencialidade antimicrobiana, especialmente antifúngica, visando o isolamento de compostos responsáveis por esta ação específica.

4 Conclusões

De acordo com os resultados deste estudo pode-se concluir que:

O potencial antimicrobiano dos extratos de *S. obtusifolium* T. D. Penn sobre as linhagens bacterianas testadas foi considerado moderado, com atividade bacteriostática e bactericida sobre *Streptococcus mutans*. As demais cepas bacterianas foram resistentes à concentração testada.

S. obtusifolium T. D. Penn apresenta potencialidade sobre a inibição de crescimento para *C. albicans*, não havendo diferença deste potencial inibitório entre os extratos analisados.

O potencial antimicrobiano das frações químicas de *S. obtusifolium* T. D. Penn sobre *C. albicans* foi considerado forte para todos os extratos, exceto para a fração aquosa de LF.

As frações diclorometano e n-butanol do extrato LF apresentaram maior ação antimicrobiana sobre essa levedura.

Polifenóis totais e taninos condensados foram as classes de compostos bioativos com maior teor em todos os extratos brutos analisados, podendo estar relacionados com as propriedades antimicrobianas evidenciadas neste estudo.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesse neste estudo.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Universidade Estadual de Campinas/ UNICAMP pelo fomento e parceria técnica através do Programa Casadinho /PROCAD, ação transversal 06/2011.

Referências

- [1] J. Xiao, M. I. Klein, M. L. Falsetta, B. Lu, C. M. Delahunty, J. R. Yates III, A. Heydorn, and H. Koo. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *Plos One Pathogens*, vol. 8, no. 4, doi:10.1371/journal.ppat.1002623, 2012.
- [2] V. Zijngé, M. B. M. van Leeuwen, J. E. Degener, F. Abbas, T. Thurnheer, R. Gmür, and H. J. M. Harmsen. Oral biofilm architecture on natural teeth. *Plos One*, vol. 5, no. 2, doi:10.1371/journal.pone.0009321, 2010.
- [3] J. R. Cortelli, and R. E. L. S. Thénoux. The effect of mouthrinses against oral microorganisms. *Brazilian Oral Research*, vol. 21, (Spec Iss 1), pp. 23-28, 2007.
- [4] S. S. Socransky, and A. D. Haffajee. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*, vol. 28, pp. 12-55, 2002.
- [5] S. N. Peterson, E. Snesrud, J. Liu, A. C. Ong, M. Kilian, N. J. Schork, and W. Bretz. The dental plaque microbiome in health and disease. *PLoSOne*, vol. 8, no. 3, March, 2013.
- [6] M. L. Falsetta, M. I. Klein, P. M. Colonne, K. Scott-Anne, S. Gregoire, C. H. Pai, M. Gonzalez-Begne, G. Watson, D. J. Krysan, W. H. Bowen, and H. Koo. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes the virulence of plaque-biofilms in vivo. *Infect. Immun.*, vol. 82, no. 5, pp. 1968-81, May, 2014.
- [7] B. W. Neville, D. D. Dam, C. M. Allen, and J. E. Bouquot. *Patologia oral e maxilofacial*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- [8] P. D. Marsh. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *Journal of Dentistry*, vol. 38 (Suppl. 1), pp. 11-15, 2010.
- [9] J.G Jeon, P. L. Rosalen, M. L. Falsetta, and H. Koo. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Research*, vol. 45, no. 3, pp. 243-263, 2011.
- [10] E. A. L. de S. S. Rocha, A. V. O. R. de Carvalho, S. R. A. de Andrade, A. C. D. de Medeiros, D. M. de B. M. Trovão, and E. M. M. de B. Costa. Potencial antimicrobiano de seis

plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. *Rev. Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, vol. 34, no. 3, pp. 351-355, 2013.

[11] M. F. B. Morais- Braga, T. M. Souza, K. K. A. Santos, G. M. M. Guedes, J. C. Andrade, S. R. Tintino, J. G. M. Costa, I. R. A. Menezes, A. A. F. Saraiva, and H. D. M. Coutinho. Atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da atividade antimicrobiana de frações obtidas de *Lygodium venustum* SW. *Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol. 12, no. 1, pp. 38-43, 2013.

[12] A. E. S. Beltrão, A. C. de A. Tomaz, F. A. S. Beltrão, and P. Marinho. In vitro biomass production of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem & Shult). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 18 (Supl.), pp. 696-698, 2008.

[13] G. M. da C. Silva, P. de L. Martins, H. Silva, and K. K. C. de Freitas. Estudo autoecológico de *Bumélia sertorium* (Quixabeira) – Espécie ameaçada de extinção no ecossistema Caatinga. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, vol. 4, no. 1, 2004.

[14] R. N. Almeida, J. M. Barbosa Filho and S. R. Naik. Chemistry and pharmacology of an ethanol extract of *Bumelia sartorum*. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 14, pp. 173-185, 1985.

[15] U. P. Albuquerque, P. M. de Medeiros, A. L. S. de Almeida, J. M. Monteiro, E. M. de F. Lins Neto, J. G. de Melo, and J. P. dos Santos. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 114, pp. 325-354, 2007.

[16] A. P. Oliveira, M. Raith, R. M. Custer, L. M. Rocha, M. Hamburger, and O. Potterat. Metabolite profiling of the leaves of the brazilian folk medicine *Sideroxylon obtusifolium*. *Planta Medica*, vol. 78, no. 7, pp. 703-710, 2012.

[17] J. J. A. Alves, and S. S. Nascimento. Levantamento fitogeográfico das plantas medicinais nativas do cariri paraibano. *Revista Geográfica Acadêmica*, vol. 4, no. 2, pp. 73-85, 2010.

[18] CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Norma M7-A6. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. Pennsylvania, 6ª edição, 2005.

[19] CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard, vol. 28, no. 14, CLSI document M27-A3, Wayne, PA, USA, 3ª edição, 2008.

[20] L. C. Vasconcelos. Avaliação da viabilidade celular de *Candida albicans* frente à ação antifúngica do timol. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Federal da Paraíba, 2013.

[21] M.S.P. Silva, D. O. Brandão, T. P. Chaves, A. L. N. Formiga Filho, E. M. M. de B. Costa, V. L. Santos, and A. C. D. Medeiros. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the control of oral microorganisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 681207, 6 páginas, 2012.

[22] S. D. Sarker, L. Nahar, and Y. Kumarasamy. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro*

antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, vol. 42, pp. 321-324, 2007.

[23] M. Liu, V. Seidel, D. R. Katerere, and A. I. Gray. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods*, vol. 42, pp. 325-329, 2007.

[24] N. Aligiannis, E. Kalpoutzakis, S. Mitaku and I. B. Chinou. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.*, 49, pp. 4168-4170, 2001.

[25] S. Chandra, and E. G. Mejía. Polyphenolic compounds, antioxidant Capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, pp. 3583-3589, 2004.

[26] A. Meda, C. E. Lamien, M. Romito, J. Millogo, and O. G. Nacoulma. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, vol. 91, pp. 571-577, 2005.

[27] H. P. S. Makkar, and K. Becker. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 19, no. 4, 1993.

[28] M. C. S. Cruz, P. O. Santos, A. M. Barbosa Jr., D. L. F. M. de Melo, C. S. Alviano, A. R. Antonioli, D. S. Alviano, and R. C. Trindade. Antifungal activity of brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 111, pp. 409-412, 2007.

[29] N. T. P. Reis, T. C. Lelis, A. T. Mendonça, and J. K. Chavasco. Avaliação da ação de extratos vegetais sobre a formação de biofilmes por *Candida albicans*. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, vol. 9, no. 2, pp. 337-343, ago/dez, 2011.

[30] C. T. Lubian, J. M. Teixeira, R.G. Lund, P. S. Nascente, and F. A. B. Del Pino. Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) sobre espécies orais de *Candida*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, vol. 12, no. 2, pp. 157-162, 2010.

[31] L. Gobbo-neto, and N. P. Lopes. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*, vol. 30, no. 2, pp. 374-381, 2007.

[32] W. S. Alviano, D. S. Alviano, C. G. Diniz, A. R. Antonioli, C. S. Alviano, L. M. Farias, M. A. R. Carvalho, M. M. G. Souza, and A. M. Bolognese. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on brazilian folk medicine. *Archives of oral biology*, vol. 53, pp. 545- 552, 2008.

[33] E. M. M. de B. Costa, A. P. A. Evangelista, A. C. D. de Medeiros, F. R. Dametto, and R. A. de Carvalho. In vitro evaluation of the root canal cleaning ability of extracts and their antimicrobial action. *Brazilian Oral Research*, vol. 26, no. 3, pp. 215-221, 2012.

[34] E. M. M. de B. Costa, A. S. Barbosa, T. A. de Arruda, P. T. de Oliveira, F. R. Dametto, R. A. de Carvalho, and M. das D. Melo. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de extratos de

plantas contra *Enterococcus faecalis*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, vol. 46, no. 3, pp. 175-180, 2010.

[35] G. More, T. E. Tshikalange, N. Lall, F. Botha, and J. J. M. Meyer. Antimicrobial activity of medicinal plants against oral. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 119, pp. 473–477, 2008.

[36] C. M. O. Simões, E. P. Sckenkel, G. Gosmamm, J. C. P. de Melo, L. A. Mentz, and P. R. Petrovick. *Farmacognósia – da planta ao medicamento*. 5ª ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.

[37] D. L. V. Cabral, T. J. da S. Peixoto Sobrinho, E. L. C. de Amorim, and U. P. de Albuquerque. Relationship of biometric parameters on the concentration of tannins in two medicinal plants – a case study. *Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol. 9, no. 5, pp. 368-376, 2010.

[38] H. S. Ruela, I. C. R. Leal, M. R. A. de Almeida, K. R. N. dos Santos, L. A. Wessjohann, and R. M. Kuster. Antibacterial and antioxidante activities and acute toxicity of *Bumelia sartorum*, a brazilian medicinal plant. *Revista Brasileira de Farmacognósia*, vol. 21, no. 1, pp. 86-91, 2011.

[39] V. Araújo-Neto, R. R. Bonfim, V. O. B. Oliveira, A. M. P. R. Passos, J. P. R. Oliveira, C. A. Lima, S. S. Mendes, C. S. Estevam, and S. M. Thomazzi. Therapeutic benefits of *Sideroxylon obtusifolium* (Humb. Ex Roem. & Shult) T.D.Penn., Sapotaceae, in experimental models of pain and inflammation. *Revista Brasileira de Farmacognósia*, v. 20, n. 6, pp. 933-938, 2010.

[40] M. de S. A. Silva, M. A. R. Silva, J. S. Higino, M. S. V. Pereira, and A. de A. T. Carvalho. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. *Revista Brasileira de Farmacognósia*, vol. 18, no. 2, pp. 236-240, 2008.

[41] H. Koo, P. L. Rosalen, J. A. Cury, Y. K. Park, and W. H. Bowen. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 46, no. 5, pp. 1302-1309, May, 2002.

[42] M. D.Silva. Estudo farmacobotânico de três espécies medicinais da caatinga. Dissertação (Mestrado em Botânica). Departamento de Biologia. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2008. 68.: il.

[43] J. F. Höfling, R. C. Mardegan, P. C. Anibal, V. F. Furletti, and M. A. Foglio. Evaluation of antifungal activity of medicinal plant extracts against oral *Candida albicans* and proteinases. *Mycopathologia*, vol. 172, n. 2, pp. 117–124, 2011.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os experimentos que avaliaram o potencial antimicrobiano de *Sideroxylon obtusifolium* T. D. Penn demonstraram forte poder inibitório de crescimento dos extratos, tanto etanólicos quanto liofilizados da folha e casca, sobre *Candida albicans*. O extrato etanólico da casca proporcionou moderada atividade inibitória de crescimento sobre *Streptococcus mutans*.

A literatura relata com frequência do uso popular da casca de *S. obtusifolium* T. D. Penn como anti-inflamatório. Contudo, o potencial antibacteriano do extrato etanólico da casca, evidenciado neste estudo, sugere mais investigações sobre sua atividade em microrganismos associados ao biofilme dental.

A investigação da atividade antifúngica indica forte potencial do extrato da folha, propondo estudos subseqüentes em modelos de biofilmes dentais. A potencialização da atividade antifúngica do extrato liofilizado da folha, a partir das frações de diclorometano e n-butanol sugere a presença de compostos bioativos distintos e com ação sobre *C. albicans*.

Neste estudo o maior teor de compostos pertenceu à classe de polifenóis totais e taninos condensados. A quantificação fitoquímica direciona para o isolamento dos possíveis compostos responsáveis pelo potencial antimicrobiano do extrato.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE U.P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.
- ALIGIANNIS N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **J. Agric. Food Chem.**, 49, pp. 4168-4170, 2001.
- ALVES, J.J.A.; NASCIMENTO, S.S. Levantamento fitogeográfico das plantas medicinais nativas do cariri paraibano. **Revista Geográfica Acadêmica**, v. 4, n. 2, p. 73-85, 2010.
- ANIBAL, P.C. et al. Conventional and alternative antifungal therapies to oral candidiasis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 824-831, 2010.
- ARAÚJO-NETO, V. et al. Therapeutic benefits of *Sideroxylon obtusifolium* (Humb. Ex Roem. & Shult) T.D.Penn., Sapotaceae, in experimental models of pain and inflammation. **Revista Brasileira de Farmacognósia**, v. 20, n. 6, p. 933-938, 2010.
- CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326-342, 2010.
- CHANDRA, S.; MEJÍA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard, v. 28, n. 14, CLSI document M27-A3, Wayne, PA, USA, 3ª edição, 2008.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. Norma M7-A6. Pennsylvania, 6ª edição, 2005.
- COSTA, E.M.M.B. et al. In vitro evaluation of the root canal cleaning ability of extracts and their antimicrobial action. **Brazilian Oral Research**, v. 26, n. 3, p. 215-221, 2012.
- CRUZ, M.C.S. et al. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 409-412, 2007.
- FALSETTA, M.L. et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes the virulence of plaque-biofilms in vivo. **Infect Immun.** 2014 May;82(5):1968-81.
- FARAH, C.S.; LYNCH, N.; MCCULLOUGH, MJ. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. **Australian Dental Journal**, v. 5 (Suppl 1), p. 48-54, 2010.

HÖFLING, J.F. et al. Colonização bucal por espécies de *Candida* – Parte II. **Revista da Faculdade de Odontologia de Passo Fundo**, v. 9, n. 1, p. 22-26, jan./jun, 2004.

JEON, J.G. et al., Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. **Caries Research**, v. 45, p. 243-263, 2011.

JORGE, A.O.C. **Microbiologia bucal**. Editora Santos, 2007. 198p.

JUNQUEIRA, J.C. et al. Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 54, n. 1, p. 17-24, jan./fev, 2012.

LIU, M. et al. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. **Methods**, v. 42, p. 325-329, 2007.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 4, 1993.

MARSH, P.D. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. **Journal of Dentistry**, v. 38 (Suppl. 1), p.11-15, 2010.

MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.

OLIVEIRA, A.P. et al. Metabolite profiling of the leaves of the brazilian folk medicine *Sideroxylon obtusifolium*. **Planta Medica**, v. 78, n. 7, p. 703-710, 2012.

PALOMBO, E. A. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2011, doi:10.1093/ecam/nep067.

PAULINO R.C. et al. Medicinal plants at the Sitio do Gois, Apodi, Rio Grande do Norte State, Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognósia**, v. 22, n. 1, p. 29-39, 2012.

PETERSON, S.N. et al. The dental plaque microbiome in health and disease. **PLoSOne**, v. 8, n. 3, Março, 2013.

REIS, N.T.P. et al. Avaliação da ação de extratos vegetais sobre a formação de biofilmes por *Candida albicans*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 2, p. 337-343, ago/dez., 2011.

ROCHA, E.A.L.S.S. et al. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 351-355, 2013.

SALERNO, C. et al. *Candida*-associated denture stomatitis. **Medicina Oral Patologia Oral y Cir. Bucal**, v. 16, n. 2, p. 39-43, 2011.

SARKER, D.S. et al. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening

of phytochemicals. **Methods**, v. 42, p. 321-324, 2007.

SILVA, M.S.P. et al. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the control of oral microorganisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Article ID 681207, 6 páginas, 2012.

SOCRANSKY S. S.; HAFFAJEE. A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontology 2000**, v. 28, p. 12-55, 2002.

VASCONCELOS, LC. Avaliação da viabilidade celular de *Candida albicans* frente à ação antifúngica do timol. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Federal da Paraíba, 2013.

WESSEL, S.W. et al. Adhesion forces and composition of planktonic and adhering oral microbiomes. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 1, p. 84-88, 2014.

XIAO, J. et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed- species oral biofilm. **Plos One Pathogens**, vol. 8, no. 4, doi:10.1371/journal.ppat.1002623, 2012.

ZIJNGE, V. et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. **Plos One**, vol. 5, no. 2, doi:10.1371/journal.pone.0009321, 2010.

ANEXO – Normas para Submissão de Artigos: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.



Author Guidelines

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online Manuscript Tracking System. Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact ecam@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All enquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to ecam@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. Submissions will be considered by an editor and “if not rejected right away” by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

Article Processing Charges

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, please visit the Article Processing Charges information page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included

- Paper title
- Full author names
- Full institutional mailing addresses
- Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Disclosure Policy

A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal any possible conflict of interests in their submitted manuscripts.

If there is no conflict of interests, authors should state that “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.”